

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA

CARACTERIZACIÓN DEL MODO DE HERENCIA Y LIGAMIENTO EN
UN JUEGO DE MARCADORES MICROSATÉLITES EN *Paspalum dilatatum*

por

Gina DOGLIOTTI PERRONE

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

MONTEVIDEO

URUGUAY

2021

Tesis aprobada por:

Director: -----

Ing. Agr. PhD. Pablo Speranza

Lic. PhD. Paola Gaiero

Ing. Agr. PhD. Clara Pritsch

Fecha: 26 de marzo de 2021

Autora: -----

Gina Dogliotti Perrone

AGRADECIMIENTOS

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

A Pablo y a Paola por ser la guía de este trabajo, teniendo confianza y paciencia en todo el proceso.

A Inés, German, Pablo y Venancio por su apoyo constante y a todos los que forman parte del LEDP, por compartir estos años generando un ambiente más que próspero para mi desarrollo personal y profesional, especialmente a Paola y Magdalena por estar siempre dispuestas a despejar mis dudas.

A la UdelaR por darnos a mí y a tantos otros compañeros la oportunidad de formarnos como profesionales.

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

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES.....	VI
I. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
II. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u>	2
A. <i>Paspalum dilatatum</i>	2
1. <u>Solución agroecológica: Incorporación de especies C4</u>	2
2. <u>Estado actual del uso y venta semillas</u>	4
3. <u>Origen y reproducción</u>	5
4. <u>Perspectivas del mejoramiento genético</u>	5
5. <u>Germoplasma sexual del grupo Dilatata</u>	6
6. <i>Paspalum dilatatum subsp. flavescens</i>	6
7. <i>Paspalum dilatatum</i> biotipo <i>Virasoro</i>	7
B. MARCADORES MOLECULARES.....	7
1. <u>Definiciones</u>	7
2. <u>Usos</u>	8
a. Mejoramiento asistido.....	8
b. Estudios de diversidad.....	8
c. Estudios de reproducción.....	8
d. Mapas genéticos.....	9
3. <u>Microsatélites</u>	10
a. Definición descripción de microsatélites.....	10
b. Ventajas de los microsatélites sobre otros marcadores.....	11
c. Evolución de los diferentes usos de los microsatélites.....	12
d. Desarrollo de microsatélites.....	13
e. Microsatélites utilizados en este trabajo.....	14
C. PUESTA A PUNTO Y CARACTERIZACIÓN.....	15
	16
III. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	
A. MATERIAL VEGETAL.....	16
B. EXTRACCIÓN DE ADN.....	16
C. AMPLIFICACIÓN POR PCR.....	16
D. MARCADORES MOLECULARES.....	17
E. AJUSTE A HERENCIA MENDELIANA.....	17
F. ANÁLISIS DE LIGAMIENTO.....	18

IV. <u>RESULTADOS</u>	19
V. <u>DISCUSIÓN</u>	24
VI. <u>CONCLUSIONES</u>	27
VII. <u>RESUMEN</u>	28
VIII. <u>SUMMARY</u>	29
IX. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	30
X. <u>ANEXOS</u>	48

LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Cuadro No.	Página
1. Marcadores moleculares utilizados en este trabajo.....	16
2. Frecuencias genotípicas y alélicas observadas para 15 marcadores SSR en la población de líneas F ₆ derivadas de un cruzamiento en <i>Paspalum dilatatum</i>	21
3. Resultados del cálculo de frecuencias de recombinación y puntuación LOD representados en una matriz.....	22
Figura No.	
1. Estimación de uso de semilla nacional de <i>Paspalum dilatatum</i> . Período 2009-2019.....	19
2. Mapa de éxito de amplificación de los marcadores moleculares en una población de <i>Paspalum dilatatum</i>	21

I. INTRODUCCIÓN

La incorporación de especies estivales nativas de metabolismo C4 a las pasturas sembradas en Uruguay podría contribuir a la estabilidad ecológica del sistema debido a la complementariedad de los ciclos de crecimiento entre las gramíneas invernales y estivales. Además de su contribución estival de forraje, las especies perennes nativas C4 se caracterizan por usar con mayor eficiencia el nitrógeno y el agua y por tanto se adaptarían de mejor forma a los suelos de baja fertilidad y susceptibles a la sequía. Una de las especies nativas con mayor potencial para cumplir ese rol es *Paspalum dilatatum* Poir. La inclusión de *Paspalum* en mezclas forrajeras convencionales aumenta la cobertura y biomasa en momentos del año donde la producción de materia seca es mínima. Sin embargo esta especie, tiene algunas limitantes para su adopción, siendo las principales la baja producción de semillas asociada a su susceptibilidad a *Claviceps paspali* y su lenta instalación, en parte debido a la dormición de las semillas (Schrauf et al., 1995). El grupo Dilatata, que incluye a *P. dilatatum*, se compone de cinco tetraploides sexuales con fórmulas genómicas equivalentes IIJJ: *Paspalum dasypleurum* Kunze ex Desv. *P. urvilleii* Steud. y *P. dilatatum* subsp. *flavescens* Roseng. Arr. et Izag. y *P. dilatatum* biotipos Vacaría y Virasoro. Estos alotetraploides son altamente autógamos y no presentan como limitantes la baja producción de semilla ni la alta infección por *Claviceps* como el biotipo común de *P. dilatatum*. Los tetraploides sexuales del grupo Dilatata de *Paspalum* representan una gran reserva genética para el desarrollo de forrajeras estivales. Para avanzar en el mejoramiento del grupo, existe una necesidad de contar con herramientas genéticas que aporten a la utilización más eficiente de sus recursos, como son los marcadores moleculares. Trabajos previos como el de Speranza y Malosetti (2007), Rebollo (2017) desarrollaron marcadores microsatélites dentro del grupo Dilatata de *Paspalum*. Con el objetivo de continuar el proceso de la domesticación de *Paspalum dilatatum*, es necesario valorizar estas herramientas previamente desarrolladas.

El presente trabajo se enmarca en un proyecto que tiene como objetivo general el crear herramientas para asistir el mejoramiento y domesticación de *Paspalum dilatatum*. Los objetivos específicos de este trabajo fueron: i) Confirmar el modo de herencia disómica de 15 marcadores SSR desarrollados en el grupo Dilatata ii) Detectar segregación independiente o ligamiento entre ellos, en una población F₆ derivada de un cruzamiento interespecífico entre *P. dilatatum* subsp. *flavescens* y *P. dilatatum* biotipo Virasoro.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

A. *Paspalum dilatatum*

Paspalum es uno de los géneros que incluye mayor cantidad de especies dentro de las Poaceas, con 330 especies que se distribuyen en América (Denham 2005, Zuloaga y Morrone 2005). Este género explica una gran parte de la biodiversidad en los ecosistemas de praderas en Sudamérica. Sus centros de mayor diversidad comprenden la ecorregión del Cerrado en Brasil y praderas de Argentina, Uruguay y Sur de Brasil (Rua et al., 2010).

La mayoría de las especies de *Paspalum* son de hábito de crecimiento perenne estival y constituyen el género más representativo del ecosistema campo en Uruguay (Milot et al., 1987). *Paspalum dilatatum* se refiere a un complejo de entidades híbridas compuesto de distintos biotipos. Desde el punto de vista productivo cada biotipo posee características agronómicas diferentes, por lo que en general son evaluados independientemente (Venuto et al., 2003).

Paspalum dilatatum es una gramínea perenne estival de tipo C4 y hábito cespitoso, conocida por sus altos rendimientos y buena adaptación al pastoreo (Pizarro, 2000). También se adapta a distintas condiciones edáficas, humedad excesiva y sequías moderadas (Carámbula, 1977). Esta especie demostró una muy buena tolerancia al frío y a la sequía en comparación con otras especies estivales disponibles en los mercados internacionales, tales como *Paspalum distichum*, *Setaria geniculata*, *Pennisetum clandestinum*, *Eleusine indica*, *Digitaria sanguinalis*, *Cynodon dactylon* y *Axonopus affinis* (Campbell et al., 1999). *P. dilatatum* ha demostrado en varios estudios ser una especie muy adecuada para el uso pastoril en Uruguay. Además de ser ventajoso por su gran adaptabilidad a distintos ambientes de la región, se considera que su inclusión en las pasturas sembradas puede contribuir en gran medida a lograr una producción de pasto más sustentable y estable en el tiempo.

1. Solución agroecológica: Incorporación de especies estivales C4

La producción ganadera en Uruguay tiene como una de sus mayores problemáticas la disponibilidad de forraje en cantidades suficientes durante las cuatro estaciones del año (Carámbula, 1991). Las gramíneas perennes disponibles comercialmente son en su gran mayoría de ciclo invernal (Carámbula, 2003). La presencia de especies estivales de metabolismo C4 juega un rol fundamental en la estabilidad ecológica del sistema debido a la complementariedad de los ciclos de crecimiento entre las gramíneas invernales y estivales (Campbell et al. 1999, Silveira et al. 2016, Tejera et al. 2016). Las

principales limitantes dentro de las mezclas forrajeras en Uruguay son los problemas de implantación, la falta de equilibrio entre gramíneas y leguminosas, la marcada estacionalidad y el enmalezamiento prematuro entre otras (Carámbula, 2003). Las causas del enmalezamiento prematuro de las pasturas mixtas radican en el incremento de la población de especies invasoras por el banco de semillas y/u órganos perennes en los suelos (Carámbula, 2003).

Trabajos como el de Costa (2015) comprueban que existe una correlación negativa entre la biomasa de especies invasoras y la presencia de especies nativas de metabolismo C4 en las pasturas. Las especies C4 nativas o introducidas invaden la pastura, ocupando el nicho ecológico vacante. *Cynodon dactylon* es una gramínea C4 exótica, frecuentemente citada como la principal maleza en el Uruguay (Ríos et al., 1990), su invasión es uno de los principales motivos de la corta duración de la fase de pastura en las rotaciones agroganaderas en Uruguay (García, 1995). Se prevé además que este problema tienda a agravarse en un escenario de cambio climático.

La baja oferta de forraje en la época estival en la cuenca del Plata puede ser compensada en parte mediante la utilización de especies nativas C4 de ciclo estival como *P. dilatatum* (Millot 1969, García 1995). La incorporación de *P. dilatatum* en mezclas convencionales ha demostrado mayor cobertura en otoño y menor competitividad y efectos negativos sobre el crecimiento de la gramínea invernal *Festuca* en el invierno que *P. notatum*. Además, *P. dilatatum* tiene una buena combinación de productividad estival y tolerancia a heladas (Tejera et al., 2016).

2. Estado actual del uso y venta semillas de *Paspalum dilatatum*

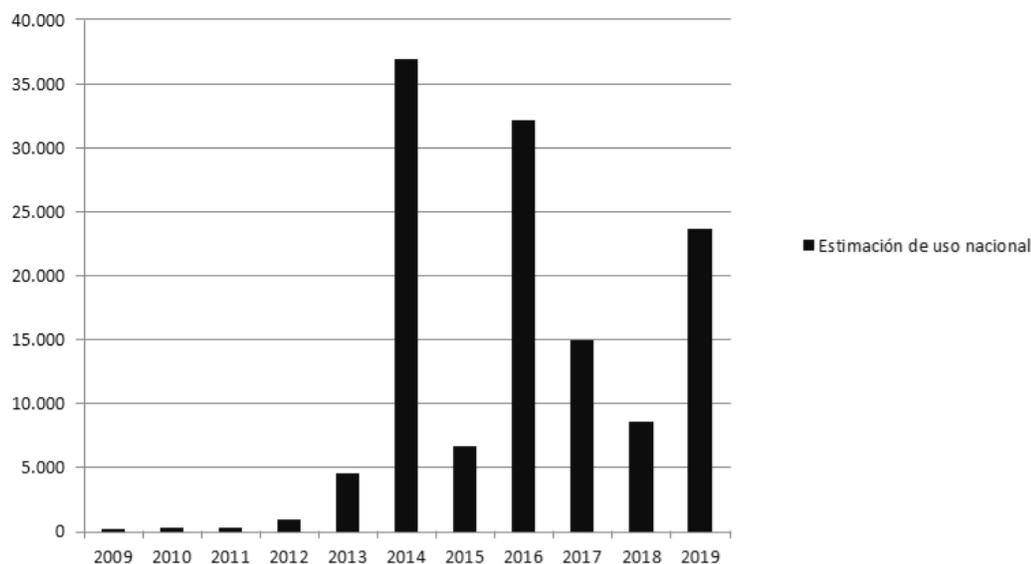


Figura 1. Estimación del uso de semilla nacional de *Paspalum dilatatum*. Período 2009-2019

Fuente: INASE (2019).

La comercialización de semilla de *Paspalum dilatatum* común como especie forrajera ha aumentado considerablemente en la última década. En el Uruguay se comenzó a comercializar semilla de *P. dilatatum* a partir de 2012. Entre este año y el 2014, la comercialización aumentó de 1 a un máximo de 37 toneladas. En los años siguientes se puede observar una gran fluctuación del uso de semilla con una tendencia a la disminución, luego del pico en 2014. La información no cuenta con datos de reserva de semilla por parte de productores, por lo que el uso nacional de semilla es equivalente al comercio local de semilla de *Paspalum dilatatum*. La especie ya tiene cierto grado de adopción en Uruguay, lo que hace de un buen contexto para continuar su domesticación y mejoramiento. Sin embargo, existen dos grandes limitantes, la baja producción de semillas debido a su susceptibilidad a *Claviceps paspali* y la dormición de las mismas (Schrauf et al., 1995). Por este motivo, continúan los esfuerzos de buscar nuevas vías de mejoramiento.

3. Origen y reproducción

Paspalum pertenece a un clado en el que sus miembros comparten un número cromosómico básico de $x = 10$, según demuestran análisis moleculares de la tribu Paniceae y de la subfamilia Panicoideae (Gómez-Martínez y Culhman 2000, Duvall et al. 2001). Muchos de los citotipos de *Paspalum* son diploides sexuales y poliploides apomícticos. Esta forma de reproducción presenta varias dificultades para los métodos de mejoramiento convencional (Burson, 1983). Se han realizado en el género, hibridaciones interespecíficas a partir de citotipos diploides (Quarin y Norrmann 1990, Speranza y Malosetti 2007). El biotipo común de *P. dilatatum* tiene IIJJX como fórmula genómica (Burson, 1983). El grupo Dilatata de *Paspalum* incluye cinco alotetraploides sexuales que comparten la misma fórmula genómica IIJJ: *P. urvillei* Steud, *P. dasyleurum* Kunze ex Desv., *P. dilatatum* subsp. *flavescens* Roseng., B. R. Arrill. y Izag., y dos biotipos *P. dilatatum* Vacaria y *P. dilatatum* Virasoro. Estos taxones están actualmente nombrados como especies, subespecies o biotipos (Speranza, 2009).

4. Perspectivas del mejoramiento genético

Durante décadas y utilizando diferentes estrategias, se insistió en el mejoramiento del biotipo común de *P. dilatatum* (pentaploide y apomíctico). Burson (1983) propone como estrategia el sintetizar *Paspalum dilatatum* común a través de la hibridación de un hexaploide (IIJJXX) x un tetraploide (IIJJ). Este pentaploide fue sintetizado con éxito por Burson (1991).

Speranza (2009) propone que es más probable que los dos biotipos hexaploides identificados sean derivados de los pentaploides, estos son capaces de transmitir gametos euploides IJX y producir nuevos pentaploides IIJJX cuando se cruzan con un tetraploide IIJJ (Mazzella y Speranza, 1997). Este es el mecanismo por el cual se propone que se ha originado la variabilidad natural en *P. dilatatum*. El biotipo común está constituido por un único clon dominante y varios clones de distribución muy restringida derivados en su mayoría de la hibridación de este clon con los biotipos tetraploides locales (Speranza et al., 2017).

Sin embargo, la obtención de plantas fértiles a partir de cruzamientos entre plantas sexuales, o entre sexuales y apomícticas en el género *Paspalum* ha sido poco frecuente y la cruzabilidad ha sido muy baja (Burson, 1991). La cruzabilidad entre formas sexuales del grupo Dilatata es variable pero mucho mayor (Speranza, 2009).

En base a estas experiencias previas, actualmente se estudia la posibilidad de recurrir a otras especies estrechamente emparentadas con menor incidencia de las limitantes descritas previamente, o en las que sus características reproductivas permitan levantar las limitantes de forma más sencilla. Como los biotipos altamente valorados de *P. dilatatum* tienen reproducción por apomixis, los componentes sexuales del grupo Dilatata podrían ser una alternativa de germoplasma para la domesticación.

Recientemente ha crecido el interés por estudiar el potencial agronómico de los biotipos tetraploides sexuales de *Paspalum* en distintas instituciones de la región como la Universidad de la República, Universidad de Buenos Aires y Universidad Federal de Rio Grande do Sul (Schrauf et al. 2003, Scheffer-Basso et al. 2007). Además de su mayor producción de semilla y baja infección por *Claviceps*, los diferentes biotipos sexuales del grupo Dilatata muestran diferentes requerimientos de germinación que pueden modificarse mediante el mejoramiento convencional (Glison et al., 2015).

5. Germoplasma sexual del grupo Dilatata

El germoplasma sexual del grupo Dilatata se compone de cinco tetraploides sexuales con fórmulas genómicas equivalentes IIJJ, *Paspalum dasypleurum* Kunze ex Desv. *P. urvillei* Steud., *P. dilatatum* subsp. *flavescens* Roseng. Arr. et Izag. y dos biotipos de *P. dilatatum*: Vacaria y Virasoro. Estos biotipos son altamente autógamos (Speranza, 2009) y no presentan las limitantes del biotipo común de *P. dilatatum* (Schrauf et al., 2003). Además de una alta frecuencia de bivalentes entre los cromosomas de los distintos biotipos sexuales, el análisis de la segregación de marcadores moleculares en cruzamientos entre estos biotipos, particularmente *P. dilatatum* subsp. *flavescens* y *P. dilatatum* biotipo Virasoro, muestra un patrón de herencia disómica regular (Speranza y Malosetti, 2007). Se propone que estos biotipos pueden ser hibridados artificialmente con el objetivo de generar cultígenos adaptados a diversas situaciones productivas (Speranza, 2009). Para ello se pueden generar poblaciones segregantes mediante líneas endocriadas (RIL) o poblaciones de retrocruzas (Speranza, 2009).

6. *P. dilatatum* subsp. *flavescens*

P. dilatatum subsp. *flavescens* Roseng., Arrill. et Izag. es perenne y altamente autógamo (Speranza, 2009). Se encuentra en los ecosistemas de campo en el sur de Uruguay y al este de la provincia de Buenos Aires, Argentina (Speranza, 2009). En Uruguay se encuentra específicamente en el sur, entre el Río de la Plata y el Río Negro, donde es frecuente encontrarlo en

parches densos en los bordes de carreteras, particularmente en áreas de serranías y a lo largo de pequeños arroyos. Se diferencia del resto de los biotipos principalmente por la forma de la panoja y el tamaño de la espiguilla (Sandro, 2014). Este biotipo ha sido utilizado extensamente para estudios citogenéticos (Burson et al. 1973, Burson 1991, Quarín y Caponio 1995). La caracterización primaria de una amplia colección de la especie mostró grandes niveles de variabilidad para caracteres morfológicos de interés agronómico (Sandro, 2014). Este biotipo contiene un alto nivel de variabilidad genética y morfológica que puede utilizarse en programas de mejoramiento convencional (Sandro et al., 2019).

7. *Paspalum dilatatum* biotipo Virasoro

Otro biotipo de interés dentro del grupo Dilatata es *Paspalum dilatatum* biotipo Virasoro. Se distribuye en Argentina, en el área de Gobernador Virasoro y en la región de las Misiones. Se extiende por el río Uruguay hasta la región de “Planalto medio” de Rio Grande del Sur en Brasil (Hickenbick et al., 1992). Se puede diferenciar del *P. dilatatum* subsp. *flavescens* por presentar espiguillas de mayor tamaño y mayor número de nervaduras en lema y pálea (Caponio y Quarín, 1987). Este biotipo mostró menores niveles de dormición de semilla en comparación a otros biotipos de *P. dilatatum* (Glison et al., 2015). En otros trabajos (Da Costa y Scheffer-Basso 2003, Scheffer-Basso et al. 2007) mostró gran variabilidad y potencial para la producción de forraje. Tanto la autofecundación como la polinización cruzada ocurren en este biotipo, en base a análisis con isozimas (Hickenbick et al., 1992). Sin embargo Speranza (2009) analiza dos individuos que resultaron homocigotos para 13 *loci* microsatélites, indicando un alto nivel de autogamia.

B. MARCADORES MOLECULARES

1. Definiciones

Un marcador molecular puede definirse como un segmento específico de ADN que es representativo de las diferencias a nivel del genoma entre distintos individuos (Agarwal et al., 2008). Los marcadores moleculares pueden o no correlacionarse con la expresión fenotípica de una característica (Agarwal et al., 2008). Los diferentes tipos de marcadores se distinguen por su capacidad de detectar polimorfismos en *loci* únicos o múltiples y son de tipo dominante o codominante (Simpson, 1997). Los marcadores moleculares ofrecen numerosas ventajas sobre los métodos basados en los fenotipos. Son estables y detectables en todos los tejidos, independientemente del crecimiento, la

diferenciación, el desarrollo o el estado de defensa de la célula, no varían con el medio ambiente, ni por efectos pleiotrópicos o efectos epistáticos (Agarwal et al., 2008). Hoy en día son un método confiable para la determinación de polimorfismos en varios *loci*.

2. Usos

a. Mejoramiento asistido

Los mejoradores pueden utilizar marcadores moleculares o genéticos como herramientas de selección (Darvasi y Soler, 1994). La selección asistida por marcadores (MAS) puede potencialmente aumentar la eficiencia de la selección a través de caracteres fenotípicos de interés asociados al marcador molecular, ya que permite una selección más temprana y así también una reducción del tamaño de la población (Staub et al. 1996, Bonnacerrere et al. 2015).

En etapas previas a los cruzamientos y el desarrollo de líneas, existen varias aplicaciones en las que los datos de marcadores moleculares pueden ser útiles para el mejoramiento, como la determinación de la identidad del cultivar, la evaluación de la diversidad genética, la selección parental y la confirmación de los híbridos (Collard y Mackill, 2008). Además, los marcadores pueden utilizarse para confirmar la verdadera identidad de individuos dentro de un programa. En híbridos de arroz, se utilizaron marcadores SSR y STS para confirmar la pureza, método que era considerablemente más simple que las pruebas de crecimiento estándar (Yashitola et al., 2002).

b. Estudios de diversidad

Los estudios de diversidad genética y relaciones genéticas realizados con marcadores moleculares pueden mejorar el uso de los diferentes genotipos en programas de mejoramiento y el diseño de nuevos cruzamientos para estos programas. Existen estudios de diversidad con diferentes marcadores moleculares: utilizando RFLP y AFLP (Russell et al. 1997, Lübberstedt et al. 2000, García et al. 2004), con RAPDS e ISSR (El Rabey et al., 2015), también marcadores basados en retrotransposones LTR (Pearce et al. 2000, Bretó et al. 2001, Solouki et al. 2008) y microsatélites o SSR (Chakravarthi y Naravaneni 2006, Kuleung et al. 2006, Sun et al. 2008), AFLP y SSR (Marulanda et al., 2007). Partir de poblaciones diversas genéticamente es un paso clave en el mejoramiento genético. Los microsatélites son muy buenos marcadores genéticos para estudios de diversidad genética en una amplia gama de plantas. Debido a su alto polimorfismo, abundancia y herencia co-dominante, son muy

adecuados para la evaluación de la diversidad genética de una especie y entre especies (Gupta et al. 1996, Wünsch y Hormaza 2002).

c. Estudios de reproducción

En estudios relacionados a la reproducción en plantas se han utilizado distintos marcadores moleculares. Para el estudio de apomixis en *Poa pratensis* L. se utilizaron isoenzimas y marcadores RAPD (Mazzucato et al., 1995). Con el objetivo de investigar la herencia del modo de reproducción en *Rubus* (Antonius y Nybom, 1995) se evaluaron cruzamientos interespecíficos entre moras apomícticas facultativas utilizando patrones M13-RFLP. Se utilizaron ISSR para estudiar relaciones genéticas entre los genotipos estudiados en *Rubus* (Rosaceae) (Sedighi y Rahimmalek, 2015). Para determinar autoincompatibilidad e inter-compatibilidad en diferentes cultivares de olivo (*Olea europaea* L.), se realizaron determinaciones de cuajado confirmadas por análisis de paternidad con SSRs.¹

d. Mapas genéticos

Los mapas de ligamiento determinan la posición lineal de genes o marcadores en un cromosoma. Proporcionan información sobre las tasas de recombinación del genoma, así como también información sobre los reordenamientos genómicos intra e interespecies dentro y entre cromosomas. Estos mapas son muy útiles en estudios de genómica evolutiva y comparativa, como se ha mostrado en trabajos con *Festuca pratensis* Huds. y también entre especies frutales de la familia Rosaceae (Alm et al. 2003, Cosson et al. 2004).

En un principio, los estudios de ligamiento producían sólo mapas genéticos de baja densidad. Con el desarrollo de marcadores moleculares directamente basados en secuencias de ADN, como los RFLP, aumentó el número de *loci* dando posibilidad a mapas de ligamiento de mayor densidad (Bradshaw et al. 1994, Devey et al. 1996). La llegada de la técnica AFLP (polimorfismo de longitud de fragmento amplificado) proporcionó una nueva clase de marcadores altamente polimórficos y reproducibles que combinan estrategias RFLP y PCR (Becker et al. 1995, Jones et al. 1998).

¹ Riella, V.; Speranza, P; Speroni, G. 2020. The effect of the effective pollination period (EPP) on the self incompatible 'Arbequina' olive cultivar (*Olea europaea* L.) For a non-traditional area. (sin publicar).

La gran cantidad de marcadores generados puede contribuir a la saturación de los mapas existentes. Una gran cantidad de microsatélites se han colocado en los mapas genéticos del trigo (Gao et al. 2004, Nicot et al. 2004, Yu et al. 2004) y la cebada (Thiel et al., 2003). Los microsatélites se convirtieron en un tiempo en los marcadores de elección en mapeo en especies de plantas (Weber y May, 1989). Los SSR proporcionaron un método más confiable para construir mapas genéticos debido a su herencia codominante y gran número de alelos por locus (Hodel et al., 2016). Estos marcadores fueron usados como ancla para la construcción de mapas genéticos de distintas especies frutales por ejemplo (Yamamoto et al. 2005, Deleu et al. 2009). Se integraron 14 STSs, 34 AFLPs, 24 RAPDs, 3 ISSRs y 9 características fenotípicas para la construcción de un mapa genético en durazno (Yamamoto et al., 2005), incluyendo además 94 SSRs. En la actualidad existe una creciente posibilidad de saturar el mapa genético con polimorfismos nucleótido único (SNP), los cuales son más adecuados para el análisis de alto rendimiento, especialmente si estos marcadores se encuentran en regiones codificantes del genoma, para proporcionar marcadores funcionales como se propone para el caso del melón (Deleu et al., 2009).

3. Microsatélites

a. Definición y descripción de microsatélites

Los marcadores microsatélites o secuencias simples repetidas (SSR por su sigla en inglés) son secuencias de ADN formadas por repeticiones en tándem de unidades de 1 a 6 nucleótidos. Son codominantes, altamente polimórficos y densamente distribuidos en el genoma de los organismos eucariotas (Kashi y Soller, 1998). Muestran polimorfismo tanto inter como intra específico (Gao et al., 2013). Tienen una tasa de mutación que va de 10^{-2} a 10^{-6} eventos de mutación por *locus* por generación (Hanslik et al. 2000, Li et al. 2002). Se espera que los alelos más cortos exhiban tasas de mutación más bajas y, por lo tanto, una menor heterocigosis observada (Symonds y Lloyd 2003, Paun y Hörandl 2006). La alta variación de los microsatélites está en los cambios en el número de unidades de repetición (Li et al. 2002, Gao et al. 2013) lo que los convierte en marcadores alterando su largo en pares de bases.

Los microsatélites son considerados una herramienta poderosa para un muy amplio rango de usos (Putman y Carbone 2014, Hodel et al. 2016). Entre los usos revisados en estos trabajos (Putman y Carbone 2014, Hodel et al. 2016) pueden destacarse: construcción de mapas genéticos de alta densidad, identificación de individuos, clones o cultivares (Hoshino et al., 2012), determinaciones del sistema reproductivo de una especie (Merritt et al., 2015),

identificación de parentales (Selkoe y Toonen 2006, Merritt et al. 2015) y evaluación de características comunes o distancias genéticas entre individuos o taxones relacionados (Kalia et al. 2011, Hodel et al. 2016). En el mejoramiento genético se utilizan asociándolos a genes de interés (Gao et al., 2013). Dentro de la genética de poblaciones tienen también usos diversos (Putman y Carbone 2014, Merritt et al. 2015, Hodel et al. 2016), tales como: determinación de la diversidad y estructura genética, niveles de endocría, dirección del flujo génico entre poblaciones y análisis de estructura clonal. Son utilizados en genética de la conservación, estudios sobre evolución y filogeografía. Los microsatélites pueden implementarse para el desarrollo de marcadores específicos de alelos, dentro de los genes que controlan caracteres de interés. Junto con los SNP y otros tipos de marcadores serán de importancia para aplicaciones en el fitomejoramiento (Varshney et al., 2005). En el desarrollo de los microsatélites es importante determinar que los fragmentos amplificadas se localizan en un locus único (Slavov et al., 2004). Sin embargo, en el caso de los alopoliploides ocurre en ciertas ocasiones que un par de cebadores amplifica dos *loci* homeólogos. Si los alelos de cada *locus* presentan diferencias en el tamaño que permiten asignar los fragmentos a los diferentes *loci* sin ambigüedad, podrían usarse cebadores que amplifiquen más de un *locus*. Es de esperar que no haya ligamiento entre dichos *loci* ya que están en cromosomas homeólogos, y de constatarse la ausencia de ligamiento podrían ser usados para genotipar (Speranza y Malosetti, 2007).

b. Ventajas de los microsatélites sobre otros marcadores

Se pueden usar distintas técnicas basadas en PCR para detectar polimorfismos en plantas, una de las principales ventajas de los microsatélites sobre otros marcadores moleculares es su alta variación alélica. Esta característica también hace que estos marcadores sean herramientas poderosas para evaluar la similitud genética entre individuos o taxones estrechamente relacionados (Guichoux et al., 2011). Los microsatélites son una buena herramienta para revelar variabilidad genética. Tomando el ejemplo del trigo, 13 marcadores isoenzimas, RFLP y AFLP muestran un alto grado de conservación de marcadores (Hazen et al., 2002). Por otro lado, se determinó que los microsatélites son capaces de revelar una gran variabilidad genética (Röder et al., 1995), superando ampliamente a otros como RFLP, AFLP e isoenzimas.

Los microsatélites han sido el marcador de elección para la mayoría de los estudios de parentesco debido a su alta variabilidad y amplia disponibilidad (Hauser et al., 2011) Recientemente hay un mayor interés por el uso de marcadores SNP para estudios de parentesco a gran escala (Anderson y Garza, 2006). Los SNPs han mostrado en algunos ejemplos tener menor poder

de resolución de paternidad (Jones y Wang 2010, Hauser et al. 2011), lo que puede solucionarse aumentando la cantidad de *loci* (Putman y Carbone, 2014).

Otra clara ventaja de estos marcadores radica en su fácil genotipado, el cual puede realizarse manualmente reduciendo errores (Hodel et al., 2016). La validación manual de conjuntos de marcadores SNPs tan grandes generados por técnicas como GBS o RAD-Seq no es práctica y la precisión de las herramientas de análisis automático aún no está clara, por lo que algunos errores pueden pasar inadvertidos (Davey et al., 2013). Sin embargo, el bajo número de *loci* utilizados en un estudio con marcadores microsatélites permite un análisis manual y reduce las posibilidades de error considerablemente. Por otra parte, el trabajo con microsatélites no requiere de habilidades en bioinformática, como sí se necesitan a la hora de trabajar con datos de secuencia en análisis de SNPs. Su alta reproducibilidad representa otra gran ventaja, en Jones (1998) proponen que a diferencia de otros marcadores como AFLPs y RAPDs, todos los laboratorios pudieron amplificar los alelos SSR, obteniéndose pequeñas diferencias en su tamaño. Es importante que estas tecnologías de marcadores puedan estandarizarse y así obtener resultados reproducibles e intercambiables entre laboratorios.

A pesar de muchas ventajas, los marcadores microsatélites también tienen varios desafíos y dificultades. El principal inconveniente de los marcadores microsatélites es que, para la mayoría de las especies, los microsatélites deben desarrollarse *de novo* (Abdelkrim et al., 2009). Sin embargo, todos los tipos de marcadores tienen algunas desventajas y la versatilidad de los microsatélites para abordar muchos tipos de preguntas ecológicas supera sus inconvenientes para muchas aplicaciones (Selkoe y Toonen, 2006).

c. Evolución de los diferentes usos de los microsatélites

En los años 1990s para la mayoría de los estudios con marcadores moleculares se empleaban RAPDs (ADNs polimórficos amplificados al azar) o RFLPs (polimorfismos en el largo de los fragmentos de restricción). Desde que el desarrollo de microsatélites se volvió rentable a fines de la década del 1990, los investigadores los han usado con frecuencia en estudios que requieren altos niveles de polimorfismo. Se han generado aproximadamente 225.000 artículos publicados (Hodel et al., 2016). Esta evidencia muestra que los SSR hoy en día son una alternativa viable para una amplia gama de estudios.

El uso de microsatélites indudablemente está dando paso a nuevas tecnologías que involucran secuenciación masiva como RAD-Seq y GBS (Hodel et al., 2016). De todas maneras hay varias razones por las cuales los SSR son

y seguirán siendo valiosos. Estos marcadores moleculares aún tienen una gran aplicabilidad debido a su alto polimorfismo, análisis relativamente fácil, neutralidad comprobable y herencia mendeliana (Hodel et al., 2016). El uso de microsatélites hoy en día puede llevarse a cabo con bajo presupuesto y habilidades computacionales limitadas (Varshney et al. 2005, Hodel et al. 2016). Además, para estudios relacionados con la genética de la conservación, los microsatélites probablemente continuarán siendo la opción más económica por un tiempo (Jennings et al., 2011). Existen muchos estudios que no requieren la alta densidad de marcadores proporcionada por RAD-Seq y GBS, siendo más beneficiados con la inclusión de grandes cantidades de muestras (Hodel et al., 2016). La alta variación alélica de los microsatélites, comparada a la de marcadores basados en secuencias, es óptima para la identificación de marcadores presentes en subpoblaciones de interés, como individuos resistentes a enfermedades (Miah et al., 2013). Por todas estas razones, los microsatélites siguen siendo una buena opción para dar respuesta a variadas preguntas.

d. Desarrollo de microsatélites

Para la identificación de microsatélites en una especie, el enfoque tradicional consistía en el tamizado de bibliotecas genómicas desarrolladas por digestión con una o más enzimas de restricción (Ritschel et al., 2004). El ADN digerido de cada reacción se usa luego para construir una biblioteca genómica. La biblioteca es enriquecida en secuencias que contienen repeticiones en tándem. Ésta se forma a partir de la unión de segmentos de ADN, digeridos con enzimas de restricción, a sondas conteniendo secuencias repetidas, las cuales sólo se hibridan con los fragmentos de secuencias complementarias a la de la sonda (Hodel et al., 2016). En una etapa posterior, los fragmentos son aislados e hibridados a la sonda, estos se amplifican por PCR en base a una secuencia conocida que se ligó con la digestión y se secuencian para el posterior diseño de los cebadores. La esencia de los microsatélites obtenidos por este medio está limitada por el paso del enriquecimiento (Hodel et al., 2016). Además, varias secuencias se pierden en la etapa de clonación (Kalia et al., 2011). Esta metodología consume mucho tiempo, es costosa y su rendimiento es bajo, de entre 8 y 20 *loci* polimórficos por cada 30 a 60 pares de microsatélites testeados (Zalapa et al., 2012).

En épocas más recientes los métodos de secuenciación de próxima generación (NGS, Next Generation Sequencing) tienen mayores rendimientos y menores costos (Hoshino et al. 2012, Hodel et al. 2016). Las tecnologías de NGS pueden usarse para secuenciar genomas completos o restringirse a áreas específicas de interés, incluidos los genes codificantes o un pequeño número de genes individuales (Benhjati y Tarpey, 2013). Con este método no se

requiere ninguna elección de una repetición específica (Castoe et al., 2012), igualmente deben tomarse otras decisiones como la preparación de la biblioteca, la plataforma de secuenciación (largo de la lectura y la cobertura) y también la elección de él o los programas utilizados para la detección de los marcadores (Hodel et al., 2016).

Una vez que los investigadores generan u obtienen datos de NGS, el siguiente paso es usar un programa de software para identificar posibles *loci* (Hodel et al., 2016). Estos pueden variar en: largo de lectura, número de lecturas obtenidas y calidad de las mismas. Estas características van a afectar la capacidad de descubrir marcadores microsatélites así como su éxito. De todas las plataformas, actualmente Illumina es considerada la ideal para este fin por su relación eficiencia-costo (Hodel et al., 2016).

e. Microsatélites utilizados en este trabajo

El grupo de trabajo del Laboratorio de Evolución y Domesticación de Plantas (LEDP) de la Facultad de Agronomía (UdelaR), acompañando el interés por estudiar el potencial agronómico de los tetraploides sexuales del grupo han desarrollado marcadores moleculares para este grupo, siendo el principal insumo para el presente trabajo. A partir de una biblioteca genómica enriquecida en fragmentos con la repetición CA, en Speranza y Malosetti (2007) se desarrollaron 15 marcadores microsatélites sobre *P. dilatatum* ssp. *favescens* con el nombre de "Pdf'l's". En Rebollo (2017) se desarrollaron 82 marcadores microsatélites sobre *Paspalum urvillei* (serie "PUR" 1-23), *P. dilatatum* ssp. *favescens* (serie "Pdf'l" 30-50) y los biotipos Vacaría (serie "Pdva" 1-19) y Virasoro (serie "Pdvi" 1-20) de *P. dilatatum* denominados de acuerdo a la especie focal. Estos SSR se desarrollaron a partir de datos de secuenciación de baja cobertura de NGS de cada especie. Speranza y Malosetti (2007), Rebollo (2017) analizaron la segregación de 20 y 15 marcadores microsatélites de los desarrollados en sus trabajos, en 32 y 43 individuos respectivamente. Estos individuos corresponden a la F₂ del cruzamiento entre *P. dilatatum* biotipo Virasoro y *P. dilatatum* subsp. *flavescens* descrito en (Speranza y Malosetti, 2007). En el presente trabajo se realizó el estudio sobre la población proveniente del mismo cruzamiento pero en F₆. En ambos trabajos (Speranza y Malosetti 2007, Rebollo 2017) se menciona que la gran mayoría de los marcadores microsatélites mostraron proporciones de segregación de acuerdo con las expectativas de herencia disómica normal en F₂. Con la excepción de los marcadores Pdva6 y Pdva16 en Rebollo (2017) y Pdf'l15a en Speranza y Malosetti (2007).

C. PUESTA A PUNTO Y CARACTERIZACIÓN

El conocimiento sobre la diversidad de germoplasma y las relaciones genéticas entre los materiales de mejoramiento podría ser una ayuda invaluable en las estrategias de mejoramiento de cultivos (Mohammadi y Prasanna, 2003). Para aplicar de forma exitosa y eficiente el mejoramiento genético de *P. dilatatum* a través de los tetraploides sexuales del grupo Dilatata, se requiere del mayor grado de información posible. Para *P. dilatatum* en particular se cuenta con dos conjuntos de microsatélites que podrían aportar información de mucha utilidad. Para poder aplicarlos, es fundamental confirmar que cada uno de ellos presente herencia mendeliana y conocer si existe ligamiento entre todas las posibles parejas de marcadores microsatélites. Tanto la forma en que segregan como la ubicación en el mapa genético son muy importantes para que se pueda explorar totalmente el potencial de un marcador molecular.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

A. MATERIAL VEGETAL

La población de plantas que se utilizaron en este estudio son el resultado de un cruzamiento realizado en 1999 de *P. dilatatum* subsp. *flavescens* x *P. dilatatum* biotipo Virasoro (Pf1s*V). La obtención de los híbridos se describe en Speranza y Malosetti (2007). La población de este trabajo se obtuvo de semillas F₂ conservadas en el Banco de Germoplasma de la Facultad de Agronomía, Montevideo, Uruguay por el método de descendencia de una sola semilla. Para el año 2019 se obtuvieron 235 líneas endocriadas F₆ recombinantes.² Para este trabajo se seleccionaron al azar en la población 198 de estas líneas en F₆.

B. EXTRACCIÓN DE ADN

Las extracciones de ADN de los individuos se llevaron a cabo a partir de material foliar fresco o secado con gel de sílice siguiendo el protocolo propuesto por Doyle (1987), Collins y Symons (1992). Para moler el material vegetal se utilizó un homogeneizador con munición de zirconio a una velocidad de 6,5 m/s (45 segundos/10 ciclos).

C. AMPLIFICACIÓN POR PCR

La mezcla de reacción consistió en tampón 1x, MgCl₂ 1,5mM, dNTPs 0,15mM, M13 0,40μM, cebador iniciador 0,30μM, extendido con secuencia M13 (Boutin-Ganache et al., 2001), cebador reverso 4,5μM, BSA 0,80μg, Taq (Thermo Scientific) 0,60U/μL, ADN 150ng y H₂O hasta completar un volumen de 15μL. El ciclo de amplificación para todos los cebadores consistió en una etapa inicial de desnaturalización a 95 °C durante 5', 50 ciclos de 94 °C por 30 s, 51 °C por 30 s y 72 °C por 30 s y una extensión final de 72 °C por 5 min, seguida por 10 °C de tiempo indefinido hasta el almacenamiento a -20 °C.

El producto de amplificación se corrió en un gel de agarosa al 1% a 150 V durante 1 h, posteriormente teñido con bromuro de etidio durante 5 min y lavado en agua durante 10 min. Confirmada la amplificación del fragmento objetivo, las muestras fueron acondicionadas y enviadas al servicio de secuenciación del DNA Fragment Analysis Facility de la universidad de Yale. La lectura y genotipado se realizó con los programas Geneious R9© y Peak Scanner™ Version: 1.0. En primera instancia se genotiparon los padres *P.*

² Sandro, P.; Glison, N. 2020. Com. personal.

dilatatum subsp. *flavescens* (Pf1s) y *P. dilatatum* biotipo Virasoro (V), y luego en la progenie se identificaron los alelos de cada padre.

D. MARCADORES MOLECULARES

A partir de un conjunto de marcadores SSR desarrollados para el grupo *Dilatata* por Speranza y Malosetti (2007), Rebollo (2017), se probaron 27 marcadores microsátélites polimórficos entre los padres en la progenie. En este trabajo se seleccionaron 15 de estos marcadores (Representados en el Cuadro 1) teniendo en cuenta que superaran los 66 individuos genotipados con éxito y sin ambigüedad en la interpretación de los datos (Cuadro 1). Los marcadores Pdfl 22 y Pdva 5 amplifican más de un *locus*.

Cuadro 1. Marcadores moleculares utilizados en este trabajo

Marcador	Desarrollado	Segregación probada	Número de individuos
Pdfl 8	Speranza y Malosetti (2007)	Sí	43
Pdfl 22	Speranza y Malosetti (2007)	Sí	43
Pdfl 28	Speranza y Malosetti (2007)	Sí	43
PUR 1	Rebollo (2017)	Sí	30
PUR 5	Rebollo (2017)	Sí	29
PUR 6	Rebollo (2017)	Sí	31
PUR 11	Rebollo (2017)	Sí	32
PUR 12	Rebollo (2017)	Sí	32
PUR 13	Rebollo (2017)	Sí	32
PUR 14	Rebollo (2017)	Sí	32
PUR 15	Rebollo (2017)	Sí	32
PUR 20	Rebollo (2017)	No	0
Pdva 5	Rebollo (2017)	Sí	31
Pdva 6	Rebollo (2017)	Sí	32
Pdva 7	Rebollo (2017)	Sí	30

Se representan los 15 marcadores SSR seleccionados para el análisis de segregación. Se describe en que trabajo fueron desarrollados los marcadores, se indica si la segregación fue probada previamente en estos trabajos y en cuántos individuos de la generación F_2 del cruzamiento entre *P. dilatatum* biotipo Virasoro y *P. dilatatum* subsp. *flavescens* descrito en Speranza y Malosetti (2007) fue probada la segregación

E. AJUSTE A HERENCIA MENDELIANA

Para confirmar la herencia mendeliana en generaciones avanzadas, se aplicó el test de Chi cuadrado (χ^2). En el análisis se realizaron pruebas de χ^2 para cada marcador molecular, utilizando información observada y esperada del número de individuos homocigotas para uno de los alelos de los progenitores así como la cantidad de individuos heterocigotas. Las proporciones esperadas de heterocigotas para la progenie en este caso es de 3,125% debido a que se trata de la generación F_6 , mientras que el porcentaje esperado de individuos homocigotas para el alelo de cada padre es de 48,4%. La prueba de χ^2 fue realizada con el valor crítico utilizando dos grados de libertad y un valor α de 0,05.

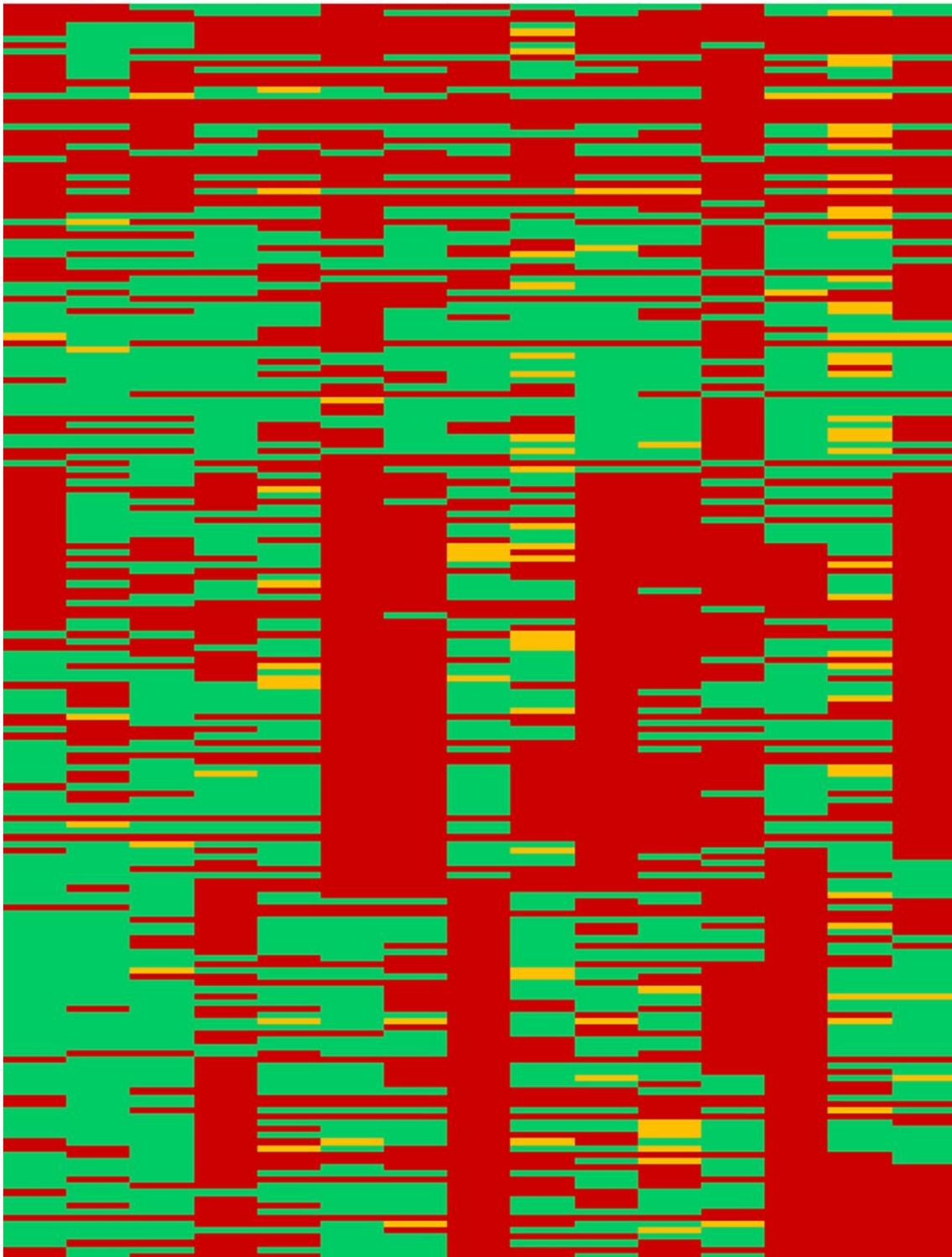
F. ANÁLISIS DE LIGAMIENTO

Se realizó una limpieza de los datos, donde aquellos genotipos y marcadores con una proporción mayor al 50% de datos faltantes fueron removidos. Para el análisis de ligamiento se utilizó el paquete r/qt1 (Broman et al., 2003) implementado en R (R Core Team, 2020). Se calcularon las frecuencias de recombinación pareadas entre marcadores usando la función est.rf de dicho paquete.

IV. RESULTADOS

Se analizó una población F₆ de 198 líneas, derivada del cruzamiento de *P. dilatatum* subsp. *Flavescens* x *P. dilatatum* biotipo Virasoro. De los 198 individuos analizados, 14 no tuvieron amplificación para ningún marcador, otros 72 tuvieron amplificación para menos de 7 marcadores y 112 individuos mostraron amplificación para 7 o más marcadores. De los marcadores que amplifican más de un *locus* Pdfl 22 amplifica dos *loci*, uno de ellos conteniendo un alelo nulo y Pdva 5 amplifica dos *loci*, uno polimórfico y otro con alelos idénticos para ambos padres. Por este motivo para cada uno de estos marcadores se reporta un solo *locus* en los resultados. De los 15 marcadores, 5 fueron amplificados exitosamente en al menos el 60% de la población (PUR 5, 6, 12, 20 y Pdfl 22). Se realizaron 2970 reacciones, de los cuales 1495 fueron exitosas, indicadas en color verde y amarillo y 1475 no tuvieron éxito o arrojaron resultados dudosos, indicadas en color rojo (Figura 2). Las reacciones que no fueron exitosas no se volvieron a repetir.

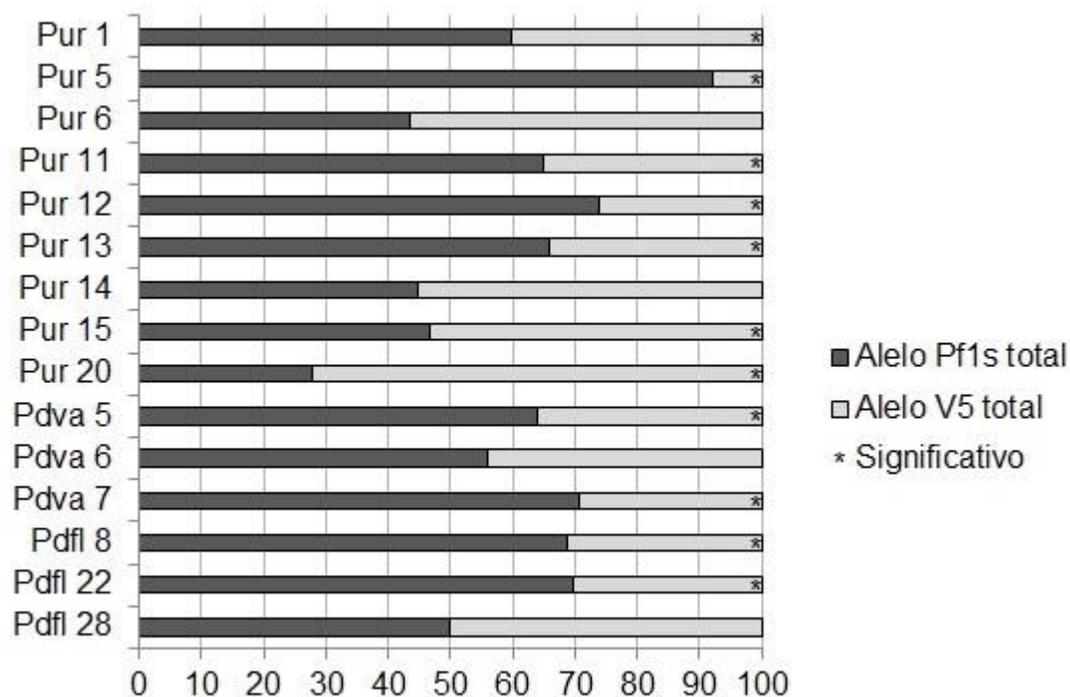
PUR 1 PUR 5 PUR 6 PUR 11 PUR 12 PUR 13 PUR 14 PUR 15 PUR 20 Pdva 5 Pdva 6 Pdva 7 Pdva 8 Pdf1 22 Pdf1 28



Las reacciones en las que no hubo amplificación se representan en color rojo. Las reacciones que resultaron homocigotas para el alelo del padre Pf1s o para el alelo del padre V se representan en color verde y las reacciones con ambos alelos (heterocigotos) en color amarillo.

Figura 2. Mapa de éxito de amplificación para 198 individuos y 15 marcadores moleculares sin repetición de las reacciones

De los individuos que efectivamente tuvieron amplificación se observó en 751 casos el alelo del padre *flavescens* (55%) con un rango de (21-90%), en 518 casos el alelo del padre Virasoro (38%) con un rango de (6-55%, Cuadro 2). Dentro de los 15 marcadores microsatélites con los que se trabajó en la progenie, 10 superan el 50% de alelos del padre *flavescens* (Pf1s) como se puede observar en la Figura 3.



Representadas en gris oscuro y padre Virasoro (V) representadas en gris claro para los 15 *loci* microsatélites evaluados en la progenie F₆. Con asteriscos (*) se representan las desviaciones significativas ($p \leq 0,05$) según el test de χ^2 detallado en el Cuadro 2.

Figura 3. Distribución de frecuencias alélicas de alelos del padre *flavescens* (Pf1s)

Según los resultados de la prueba estadística de χ^2 (Cuadro 2), para los marcadores Pur 6,13, y Pdfl 28 las frecuencias observadas no son significativamente diferentes de la segregación mendeliana esperadas para F₆. El porcentaje de heterocigotos esperado para la progenie en este caso es de 3,125% debido a que se trata de la generación F₆, mientras que el porcentaje esperado de individuos homocigotas para el alelo de cada padre es de 48,4%, en ausencia de migración, selección y deriva. En el caso de los marcadores Pur 1, 5, 11,12,14,15,20, Pdva 5,6,7, Pdfl 8 y 22 las frecuencias observadas son significativamente diferentes de las esperadas ($p \leq 0,05$) por lo que los patrones de segregación se ven desviados de la segregación mendeliana esperada.

Cuadro 2. Frecuencias genotípicas y alélicas observadas para 15 marcadores SSR en la población de líneas F₆ derivadas de un cruzamiento en *Paspalum dilatatum* y p-valores obtenidos por el cálculo de χ^2 para las frecuencias observadas

Marcador	n total	Frecuencias genotípicas (0.485:0.485:0.03)				Frecuencias alélicas (1:1)		
		Obs. F	Obs. V	Obs. H	p-valor	Obs. F	Obs. V	p-valor
Pur 1	111	0,59	0,40	0,01	0,0455	0,60	0,40	0,0350
Pur 5	139	0,91	0,06	0,03	<0,0001	0,92	0,08	<0,0001
Pur 6	131	0,43	0,56	0,02	0,1891	0,44	0,56	0,1288
Pur 11	91	0,65	0,35	0,00	0,0044	0,65	0,35	<0,0001
Pur 12	127	0,72	0,24	0,05	<0,0001	0,74	0,26	<0,0001
Pur 13	66	0,64	0,32	0,05	0,1795	0,66	0,34	0,0062
Pur 14	78	0,41	0,51	0,08	0,0206	0,45	0,55	0,2200
Pur 15	86	0,34	0,41	0,26	<0,0001	0,47	0,53	0,0004
Pur 20	146	0,21	0,66	0,13	<0,0001	0,28	0,72	<0,0001
Pdva 5	89	0,62	0,34	0,04	0,0136	0,64	0,36	0,0049
Pdva 6	92	0,51	0,39	0,10	<0,0001	0,56	0,44	0,0985
Pdva 7	58	0,69	0,28	0,03	0,0046	0,71	0,29	0,0011
Pdfl 8	88	0,66	0,28	0,06	0,0003	0,69	0,31	<0,0001
Pdfl 22	124	0,23	0,52	0,25	<0,0001	0,35	0,65	<0,0001
Pdfl 28	69	0,48	0,48	0,04	0,7500	0,50	0,50	0,7000

El "n total" indica el número total de individuos genotipados por marcador

A través de una matriz representando el análisis de ligamiento elaborado a partir de la frecuencia de recombinación para cada par de marcadores (Cuadro 3), se ve que la mayoría de los marcadores no están ligados y se pueden observar dos grupos de ligamiento, el primero (color azul) involucrando a los marcadores PUR 13 y Pdfl 28 y el segundo involucrando tres

marcadores, PUR 5, PUR 12 y Pdfl 8 (color rojo). Los marcadores ligados deben tener un valor de FR menor al 0,5 y un valor de puntuación LOD mayor o igual a 3, indicando que es mil veces más probable que estén ligados a que no lo estén. Para el caso del grupo de ligamiento dos, representado en color rojo, el valor de puntuación LOD del Pdfl 8 con el PUR 5 es significativamente menor a 3, sin embargo, como el PUR 5 está ligado a PUR 12 y éste al Pdfl 8, resulta que Pdfl 8 y PUR 5 también están ligados. Los valores de FR también dan una idea de cuán cercano es el ligamiento, cuanto más se acerque el valor a 0,5, más cercano es. En este caso ninguno de los dos grupos de ligamiento fue demasiado cercano, ya que FR tomó valores entre 0,10) y 0,28 para los 4 marcadores involucrados en grupos de ligamiento.

Cuadro 3. Resultados del cálculo de frecuencias de recombinación entre los marcadores

	PUR1	Pdva6	PUR13	Pdf128	Pdva5	Pdf18	PUR12	PUR5	PUR11	PUR6	PUR14	PUR15	PUR20
PUR1	-	0,02	0,96	0,83	0,45	0,06	0,29	0,21	0,00	0,27	0,34	0,06	0,03
Pdva6	0,47	-	0,23	0,39	1,42	0,26	0,82	0,75	0,33	0,12	1,29	0,28	0,17
PUR13	0,26	0,38	-	2,97	0,78	0,01	0,26	1,22	0,01	0,19	0,47	0,00	0,33
Pdf128	0,26	0,67	0,23	-	0,02	0,54	0,13	0,00	0,01	0,61	0,00	0,21	0,00
Pdva5	0,34	0,80	0,28	0,44	-	0,12	1,41	0,73	0,00	0,71	1,64	0,16	0,55
Pdf18	0,43	0,36	0,45	0,84	0,61	-	2,99	1,95	0,45	0,01	0,51	0,07	0,16
PUR12	0,38	0,28	0,36	0,40	0,24	0,23	-	8,37	0,47	1,67	0,76	0,70	1,35
PUR5	0,40	0,32	0,26	0,52	0,32	0,28	0,10	-	1,15	0,03	0,07	0,53	2,95
PUR11	0,50	0,36	0,54	0,47	0,48	0,35	0,34	0,28	-	0,02	0,09	1,08	0,68
PUR6	0,64	0,42	0,38	0,31	0,74	0,81	0,26	0,54	0,53	-	0,57	0,08	0,06
PUR14	0,35	0,78	0,32	0,50	0,23	0,81	0,94	0,58	0,61	0,75	-	0,03	0,05
PUR15	0,59	0,70	0,50	0,72	0,38	0,43	0,28	0,32	0,28	0,60	0,44	-	0,46
PUR20	0,55	0,61	0,79	0,50	0,69	0,62	0,75	0,81	0,71	0,42	0,44	0,70	-

En el triángulo inferior se muestran los valores de frecuencia de recombinación (FR) para cada par de marcadores. En el triángulo superior se ubican los valores de puntuación LOD, calculados como el logaritmo en base diez de un cociente entre probabilidad que dos loci estén ligados y probabilidad que no estén ligados. Se identifican dos grupos de ligamiento, el grupo de ligamiento 1 marcado en color azul y el grupo de ligamiento 2 en color rojo

V. DISCUSIÓN

El presente trabajo contribuye a los estudios genéticos y genómicos en *Paspalum* al caracterizar el modo de herencia y ligamiento en una población F_6 proveniente del cruzamiento entre *P. dilatatum* subsp. *flavescens* y *P. dilatatum* biotipo Virasoro. Fue posible analizar el modo de herencia de los marcadores previamente desarrollados para la especie. Los marcadores que utilicé en este trabajo fueron seleccionados de acuerdo con trabajos anteriores por presentar alelos diferentes entre los padres del cruzamiento (Speranza et al. 2007, Speranza 2009, Rebollo 2017). Este trabajo confirma la herencia disómica de 15 de estos marcadores SSR e identifica a aquéllos con segregación independiente. Es particularmente importante en especies aloploiploides demostrar la herencia disómica de los marcadores ya que debido a la presencia de *loci* homeólogos pueden generarse fragmentos no alélicos que son difíciles de interpretar. Los resultados permitieron detectar con seguridad ligamiento entre algunos marcadores y afirmar que la mayoría aportan información de regiones independientes del genoma.

En este trabajo se complementó la información disponible para 15 de los marcadores previamente desarrollados. El número de marcadores utilizados varía según las características de las poblaciones y los objetivos a alcanzar. En datos relevados por Varshney et al. (2005) se muestra que para especies como centeno, festuca, y arroz los microsatélites utilizados en diferentes artículos van de 100 a 145. En otros estudios, el número de marcadores utilizados varía según las características de las poblaciones y los objetivos a alcanzar. Para el estudio de diversidad genética en especies silvestres del acervo genético de trigo y de cebada se utilizaron 15 y 11 microsatélites respectivamente (Medini et al. 2005, Wang et al. 2009). Para estudiar el modo de herencia y el ligamiento en una población biparental de *S. commersonii* se utilizaron 13 microsatélites (Sandro et al., 2016). El número de marcadores incluidos en este estudio por lo tanto puede utilizarse para varias aplicaciones.

La cantidad de datos por individuo no fue muy alta, debido a que no se repitieron las reacciones que no fueron exitosas. Si bien podría haber logrado una matriz de resultados más completa, en el análisis se decidieron descartar todos aquellos resultados que no pudieron ser genotipados sin ambigüedad de manera que se obtuvo una matriz final de datos por individuo no muy alta, pero sí confiable. Las reacciones que aparecen de color rojo en la Figura 2 corresponden no solamente a reacciones sin amplificación sino también a resultados ambiguos o dudosos. De esta manera, de 27 marcadores microsatélites probados en la progenie, inicialmente, 15 marcadores fueron analizados y estos son los datos que se presentan en esta tesis.

Los resultados obtenidos son congruentes con la herencia disómica de los marcadores en este cruzamiento previamente observada en Speranza y Malosetti (2007). Sin embargo, podrían mostrar evidencia de distorsión en la segregación, ya que los alelos del padre *flavescens* aparecen en mayor proporción para la mayoría de los marcadores estudiados (Figura 3). O por lo menos la mitad de ellos si se utilizó una corrección de Bonferroni para realizar una prueba más rigurosa.

Este fenómeno se define como una desviación de la proporción mendeliana esperada de individuos en una clase genotípica dada, dentro de una población segregante (Sandler y Novitski 1957, Sandler y Golic 1985, Lyttle 1991). Se ha documentado en una amplia gama de organismos, incluidas las plantas (Cameron y Moav 1957, Loegering y Sears 1963, Rick 1966, Tsujimoto y Tsunewaki 1985) y en particular se han observado numerosos ejemplos de frecuencias alélicas inesperadas en *loci* de marcadores moleculares en los últimos años. La distorsión en la segregación puede ser detectada con un amplio espectro de marcadores genéticos, incluidos isoenzimas y marcadores de ADN (Zamir y Tadmor 1986, Abe y Tsuda 1987, Konishi et al. 1990, Xu et al. 1997). Este fenómeno puede surgir de causas genéticas, fisiológicas y / o ambientales y la contribución relativa de cada uno de estos factores puede diferir en poblaciones específicas (Xu et al., 1997). Frecuentemente el alelo masculino puede mostrar pérdida de habilidad competitiva (Xu et al. 1997), en Shanmugavadivel (2013) el alelo paterno estuvo menos representado en la población F_6 . La base genética del fenómeno puede ser el aborto de gametos masculinos o femeninos, o la fertilización selectiva de genotipos gaméticos particulares (Xu et al., 1997), también puede darse post-fecundación por embriones o plántulas con marcada reducción de viabilidad (Fishman y McIntosh, 2019). La segregación distorsionada es frecuentemente observada en poblaciones de líneas endocriadas recombinantes derivadas de la descendencia de una sola semilla, representa el efecto acumulativo de factores genéticos y ambientales, como selección natural o artificial en múltiples generaciones (Xu et al., 1997), por lo tanto, es difícil distinguir las causas genéticas de las ambientales de las frecuencias alélicas distorsionadas en las poblaciones de líneas endocriadas (Xu et al., 1997). Pese a que los marcadores con distorsión de segregación afectan negativamente la correcta estimación de distancias genéticas en la construcción de mapas de ligamiento, existen varios paquetes estadísticos que controlan esta limitación y permiten la construcción de mapas robustos e identificación de QTL (“Quantitative trait loci” o “loci de caracteres cuantitativos”, Shanmugavadivel et al., 2013).

En cuanto a la asociación entre los marcadores, se obtuvieron valores de estimaciones de recombinación muy por encima del valor esperado para la

segregación independiente de los loci (0,5). Se atribuyen estos valores al carácter incompleto de la matriz de datos debido a los datos faltantes y al hecho de que los conjuntos de individuos efectivamente genotipados para cada locus son diferentes. Este análisis deberá ser repetido con una matriz más completa. A pesar de esto, los resultados sugieren que hay grupos de marcadores que están ligados y otros que no se encuentran cercanamente ligados (Cuadro 2). Por lo tanto, se afirma que la información que pueden dar los marcadores PUR 1, Pdva 6, Pdva 5, PUR 11, PUR 6, PUR 14, PUR 15 y PUR 20 no es redundante, sino que se distribuyen ampliamente por el genoma, segregando de forma independiente. Las frecuencias de recombinación observadas entre los marcadores ligados variaron entre 10 y 28% por lo que en todos los casos existieron algunos individuos que no presentaban las combinaciones parentales originales. La utilización de un marcador de cada uno de los dos grupos identificados también proporcionará información independiente. En los casos en que hay distorsión en la segregación se recomienda analizar la asociación entre la segregación entre los marcadores de diferentes loci en base a una prueba de cocientes de máxima verosimilitud. En esta tesis se eligió presentar las estimaciones de frecuencias de recombinación porque resultan más fácilmente interpretables. Sin embargo los datos fueron analizados por ambos enfoques metodológicos y se observa la misma evidencia de asociación entre los mismos conjuntos de loci. En el Anexo 1 se muestra este resultado.

VI. CONCLUSIONES

El presente trabajo contribuye a generar información para los marcadores moleculares desarrollados para *Paspalum*. Se concluye con confianza acerca del modo de herencia de 15 marcadores microsátélites. 10 de los 15 marcadores mostraron distorsión de segregación de leve a alta, el alelo más frecuente fue el materno (*flavescens*). 10 de los 15 marcadores mostraron segregación independiente entre sí, mientras que los otros 5 cosegregan en dos grupos de ligamiento.

Si bien este trabajo no buscó determinar las causas la distorsión en la segregación, se sugieren futuros análisis para investigar estas causas. A partir de la observación de la segregación en meiosis de los cromosomas pertenecientes a cada biotipo parental, utilizando marcadores citogenéticos que los diferencien, se podría evidenciar si la distorsión se produce en este proceso. Adicionalmente se podrían analizar la viabilidad de los gametos durante el esquema de avance generacional.

Este trabajo partió de un conjunto de marcadores desarrollados por diferentes métodos, cuya forma de herencia había sido analizada en pocos individuos en la generación F₂. Se logró confirmar la herencia disómica en 15 marcadores moleculares, se detectó sesgo hacia alelos maternos de *flavescens* luego de 6 generaciones de autofecundación que no había sido detectado en los estudios anteriores. El análisis de la cosegregación de los marcadores indica que los 15 marcadores cubren 12 regiones diferentes del genoma. Este subconjunto de marcadores podrá ser utilizado en diversas aplicaciones tales como mapeo genético y de QTL, mejoramiento asistido por marcadores moleculares, identificación de individuos, selección de parentales y estudios de diversidad y parentesco, por lo que representan importantes herramientas para la domesticación de *P. dilatatum*.

VII. RESUMEN

La incorporación de especies estivales de metabolismo C4 a los sistemas pastoriles del Uruguay aportaría enormemente a la estabilidad ecológica del sistema. La especie con mayor potencial para cumplir ese rol es *Paspalum dilatatum* Poir o “pasto miel”. Sin embargo, tiene algunas limitantes para su adopción como la baja producción de semillas debido a su susceptibilidad a *Claviceps paspali* y la dormición de las mismas. El grupo Dilatata de *Paspalum* representa un complejo aloploiploide de especies, con sistemas reproductivos sexuales y apomícticos. Cinco tetraploides sexuales con fórmulas genómicas equivalentes IJJJ no presentan estas las limitantes por lo que son una gran reserva genética para el programa de mejoramiento de *P. dilatatum*. Los microsatélites son herramientas importantes para evaluar las mejoras genéticas del grupo. En el presente trabajo se estudió el modo de herencia y ligamiento de 15 marcadores microsatélites en una población F₆ desarrollada a partir de un cruzamiento entre *P. dilatatum* subsp. *flavescens* y *P. dilatatum* biotipo Virasoro. De acuerdo con resultados previos, se observó herencia disómica para todos los marcadores. 12 microsatélites mostraron una segregación distorsionada. En total, los alelos de *P. dilatatum* subsp. *flavescens* tuvieron más representación que los alelos de *P. dilatatum* biotipo Virasoro. Con la excepción de cinco marcadores, todos mostraron segregación mendeliana, sin ligamiento cercano, proporcionando información no redundante. Estos cinco marcadores se asignaron a dos grupos de ligamiento diferentes. Se agregó valor a esta herramienta, reuniendo un subconjunto de marcadores con el potencial para diferentes aplicaciones hacia el estudio y domesticación de *P. dilatatum*.

Palabras clave: *Paspalum*; Alotetraploides; Segregación; Microsatélites.

VIII. SUMMARY

The incorporation of a warm-season grass with C4 metabolism to the pastoral systems of Uruguay would contribute to the ecological stability of the system. One of the species with great potential to fulfill this role is *Paspalum dilatatum* Poir. However, it has some limitations for its adoption, such as low seed production due to its susceptibility to *Claviceps paspali* and seed dormancy. The Dilatata group of *Paspalum* represents an allopolyploid complex of species with both sexual and apomictic mode of reproduction. Five sexual tetraploids with equivalent IIJJ genomic formulas do not present these limitations resulting in a large genetic reservoir to the *P. dilatatum* breeding program. Microsatellite markers are important tools to assess the genetic improvement of the group. In the present work we studied the mode of inheritance and linkage of 15 microsatellite markers in an F₆ population developed from a cross between *P. dilatatum* subsp. *flavescens* (Pf1) and *P. dilatatum* biotype Virasoro (V). In agreement with previous results, disomic inheritance was observed for all markers. 12 markers exhibited distorted segregation. Altogether *flavescens* alleles were more represented than Virasoro. With the exception of five markers, all showed Mendelian segregation, showing no close linkages and thus providing non-redundant information. These five linked markers were assigned to two different linkage groups. We added value to these markers, putting together a subset that has potential for different applications towards the study and domestication of *P. dilatatum*.

Key words: *Paspalum*; Alotetraploids; Segregation; Microsatellites.

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Abe, J.; Tsuda, C. 1987. Genetic analysis for isozyme variation in the section *Vulgares* genus *Beta*. *Japanese Journal of Breeding*. 37(3):253-261.
2. Abdelkrim, J.; Robertson, B. C.; Stanton, J. A. L.; Gemmell, N. J. 2009. Fast, cost-effective development of species-specific microsatellite markers by genomic sequencing. (en línea). *BioTechniques*. 46(3):185-192. Consultado jun. 2020. Disponible en doi:10.2144/000113084.
3. Agarwal, M.; Shrivastava, N.; Padh, H. 2008. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. (en línea). *Plant Cell Reports*. 27(4):617-631. Consultado abr. 2020. Disponible en doi:10.1007/s00299-008-0507-z.
4. Akemi Hoshino, A.; Pereira Bravo, J.; Macedo Nobile, P.; Alessandra Morelli, K. 2012. Microsatellites as tools for genetic diversity analysis. (en línea). In: Mahmut, C. ed. *Genetic diversity in Microorganisms*. Rijeka, Croatia, InTech. pp. 151-165. Consultado mar. 2020. Disponible en doi:10.5772/35363.
5. Alm, V.; Fang, C.; Busso, C. S.; Devos, K. M.; Vollan, K.; Grieg, Z.; Rognli, O. A. 2003. A linkage map of meadow fescue (*Festuca pratensis* Huds.) and comparative mapping with other Poaceae species. (en línea). *Theoretical and Applied Genetics*. 108(1):25-40. Consultado abr. 2020. Disponible en doi:10.1007/s00122-003-1399-5.
6. Anderson, E. C.; Garza, J. C. 2006. The power of single-nucleotide polymorphisms for large-scale parentage inference. (en línea). *PubMed*. 172(4):2567-2582. Consultado abr. 2020. Disponible en doi:10.1534/genetics.105.048074.
7. Antonius, K.; Nybom, H. 1995. Discrimination between Sexual Recombination and Apomixes Automixis in a *Rubus* Plant Breeding Programme. (en línea). *Hereditas*. 123(3):205-213. Consultado abr. 2020. Disponible en doi:10.1111/j.1601-5223.1995.00205.x.

8. Bashaw, E. C.; Forbes, I. 1958. Chromosome Numbers and Microsporogenesis in Dallisgrass *Paspalum dilatatum* Poir. (en línea). *Agronomy Journal*. 50(8):441-445. Consultado abr. 2020. Disponible en doi:10.2134/agronj1958.00021962005000080006x.
9. Becker, J.; Vos, P.; Kuiper, M.; Salamini, F.; Heun, M. 1995. Combined mapping of AFLP and RFLP markers in barley. (en línea). *Molecular & General Genetics*. 249(1):65-73. Consultado abr. 2020. Disponible en doi:10.1007/BF00290237.
10. Behjati, S.; Tarpey, P. S. 2013. What is next generation sequencing?. (en línea). *Archives of Disease in Childhood: education and Practice Edition*. 98(6):236-238. Consultado abr. 2020. Disponible en doi:10.1136/archdischild-2013-304340.
11. Bennett, H. W.; Burson, B. L.; Bashaw, E. C. 1969. Intraspecific hybridization in dallisgrass, *Paspalum dilatatum* Poir. (en línea). *Crop Science*. 9:807-809. Consultado abr. 2020. Disponible en <https://doi.org/10.2135/cropsci1969.0011183X000900060042x>
12. Bonnacarrère, V.; Quero, G.; Monteverde, E.; Rosas, J.; Pérez de Vida, F.; Cruz, M.; Corredor, E.; Garaycochea, S.; Monza, J.; Borsani, O. 2015. Candidate gene markers associated with cold tolerance in vegetative stage of rice (*Oryza sativa* L.). (en línea). *Euphytica*. 203(2):385-398. Consultado jun. 2020. Disponible en doi:10.1007/s10681-014-1290-2.
13. Bradshaw, H. D.; Villar, M.; Watson, B. D.; Otto, K. G.; Stewart, S.; Stettler, R. F. 1994. Molecular genetics of growth and development in *Populus*. III. A genetic linkage map of a hybrid poplar composed of RFLP, STS, and RAPD markers. (en línea). *Theoretical and Applied Genetics*. 89(2-3):167-178. Consultado abr. 2020. Disponible en doi:10.1007/BF00225137.
14. Bretó, M. P.; Ruiz, C.; Pina, J. A.; Asíns, M. J. 2001. The diversification of *Citrus clementina* Hort. ex Tan. A vegetatively propagated crop species. (en línea). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 21(2):285-293. Consultado abr. 2020. Disponible en doi:10.1006/mpev.2001.1008.

15. Broman, K. W.; Wu, H.; Šaunak, S.; Churchill, G. A. 2003. R/qtl: QTL mapping in experimental crosses. (en línea). *Bioinformatica*. 19:889-890. Consultado jul. 2020. Disponible en <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12724300/>
16. Burson, B. L.; Lee, H.; Bennett, H. W. 1973. Genome relations between Tetraploid *Paspalum dilatatum* and four diploid *Paspalum* Species. (en línea). *Crop Science*. 13(6):739-743. Consultado oct. 2020. Disponible en doi:10.2135/cropsci1973.0011183x001300060045x.
17. _____. 1983. Phylogenetic investigations of *Paspalum dilatatum* and related species. (en línea). In: International Congress (14th., 1983, Lexington, KY). Proceedings. Boulder, CO, Westview. pp. 170-174. Consultado may. 2020. Disponible en <http://orton.catie.ac.cr/cgi-bin/wxis.exe/?IscScript=CATALCO.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=047310.&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=047310.>
18. _____. 1991. Homology of chromosomes of the X genomes in common and Uruguayan dallisgrass, *Paspalum dilatatum*. (en línea). *Genome*. 34(6):950-953. Consultado abr. 2020. Disponible en doi:10.1139/g91-147.
19. Campbell, B. D.; Mitchell, N. D.; Field, T. R. O. 1999. Climate profiles of temperate C3 and subtropical C4 species in New Zealand pastures. (en línea). *New Zealand Journal of Agricultural Research*. 42(3):223-233. Consultado abr. 2020. Disponible en doi:10.1080/00288233.1999.9513373.
20. Cameron, D. R.; Moav, R. 1957. Inheritance in *Nicotiana tabacum*. XXVII. Pollen killer, an alien genetic locus inducing abortion of microspores not carrying it. (en línea). *Genetics*. 42:326-335. Consultado sept. 2020 Disponible en <https://www.genetics.org/content/42/3/326>
21. Caponio, I.; Quarín, C. L. 1987. El sistema genético de *Paspalum simplex* y de un híbrido interespecífico con *P. dilatatum*. (en línea). *Kurtziana*. 19:35-45. Consultado abr. 2020. Disponible en <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IscScript=catalco.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=035352>

22. Carámbula, M. 1977. Producción y manejo de pasturas sembradas. (en línea). Montevideo, Hemisferio Sur. 464 p. Consultado abr. 2020. Disponible en <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?lsisScript=sibur.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=011270>.
23. _____. 1991. Aspectos relevantes para la producción forrajera. (en línea). Montevideo, INIA. 47 p (Serie Técnica no. 19) Consultado abr. 2020. Disponible en <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/2921/1/111219220807114541.pdf>
24. _____. 1996. Pasturas naturales mejoradas. (en línea). Montevideo, Hemisferio Sur. 524 p. Consultado abr. 2020. Disponible en <http://www.ainfo.inia.uy/consulta/busca?b=pc&id=40600&biblioteca=vazio&busca=autoria:%22Car%C3%A1mbula,%20M.%22&qFacets=autoria:%22Car%C3%A1mbula,%20M.%22&sort=autoria-sort&paginacao=t&paginaAtual=4>
25. _____. 2002. Pasturas y forrajes: insumos, implantación y manejo de pasturas. (en línea). Montevideo, Hemisferio Sur. 357 p. Consultado oct. 2020. Disponible en <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=UY2006005245>.
26. Castoe, T. A.; Poole, A. W.; de Koning, A. P. J.; Jones, K. L.; Tomback, D. F.; Oyler-McCance, S. J.; Fike, J. A.; Lance, S. L.; Streicher, J. W.; Smith, E. N.; Pollock, D. D. 2012. Rapid microsatellite identification from illumina paired-end genomic sequencing in two birds and a snake. (en línea). PLOS ONE. 7(2):s.p. Consultado oct. 2020. Disponible en doi:10.1371/journal.pone.0030953.
27. Chakravarthi, B. K.; Naravaneni, R. 2006. SSR marker based DNA fingerprinting and diversity study in rice (*Oryza sativa. L*) (en línea). African Journal of Biotechnology. 5(9):684-688. Consultado oct. 2020. Disponible en doi:10.5897/AJB05.172.
28. Collard, B. C. Y.; Mackill, D. J. 2008. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century, Philosophical. (en línea). Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. 363(1491):557-572. Consultado oct. 2020. Disponible en doi:10.1098/rstb.2007.2170.

29. Collins, G.; Symons, R. 1992. Extraction of nuclear DNA from grape vine leaves by a modified procedure. *Plant Molecular Biology*. 10(3):233-235.
30. Cosson, P.; Dirlwanger, E.; Graziano, E.; Joobeur, T.; Garriga-caldere, F.; Howad, W.; Aru, P. 2004. Comparative mapping and marker-assisted selection in *Rosaceae* fruit crops. (en línea). *PNAS*. 101(26):9891-9896. Consultado jul. 2020. Disponible en <https://doi.org/10.1073/pnas.0307937101>.
31. Costa, N. 2015. Efecto de la Incorporación de dos gramíneas perennes estivales en mezclas forrajeras convencionales. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Universidad de la República. Facultad de Agronomía. 42 p.
32. Da Costa, D. I.; Scheffer-Basso, S. M. 2003. Caracterização morfofisiológica e agrônômica de *Paspalum dilatatum* poir. biótipo virasoro e *Festuca arundinacea* schreb. Desenvolvimento morfológico. (en línea). *Revista Brasileira de Zootecnia*. 32(5):1054-1060. Disponible en doi:10.1590/s1516-35982003000500004.
33. Darvasi, A.; Soler, M. 1994. Selective DNA Pooling for Determination of Linkage Between a Molecular Marker and a Quantitative Trait Locus. (en línea). *Genetics*. 138(4):1365-1373. Consultado ago. 2020. Disponible en <https://www.genetics.org/content/138/4/1365.short>.
34. Deleu, W.; Esteras, C.; Roig, C.; González-To, M.; Fernández-Silva, I.; Gonzalez-Ibeas, D.; Blanca, J.; Aranda, M. A.; Ars, P.; Nuez, F.; Monforte, A. J.; Pic, M. B.; Garcia-Mas, J. 2009. A set of EST-SNPs for map saturation and cultivar identification in melon. (en línea). *BMC Plant Biology*. 9:1-9. Consultado oct. 2020. Disponible en doi:10.1186/1471-2229-9-90.
35. Denham, S. 2005 Revisión sistemática del subgenero *Harpostachys* de *Paspalum* (Poaceae: Panicoideae: Paniceae). (en línea). *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 92(4):463-532. Consultado oct. 2020. Disponible en <https://www.jstor.org/stable/40035738>.
36. Devey, M. E.; Beil, J. C.; Smith, D. N.; Neale, D. B.; Moran, G. F. 1996. A genetic linkage map for *Pinus radiata* based on RFLP, RAPD, and

- microsatellite markers. (en línea). *Theoretical and Applied Genetics*. 92(6):673-679. Consultado sept. 2020. Disponible en doi:10.1007/BF00226088.
37. Doyle, J. J.; Doyle, J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry*. 19:11-15.
 38. Duvall, M. R.; Noll, J. D.; Minn, A. H. 2001. Phylogenetics of Paniceae (*Poaceae*). (en línea). *American Journal of Botany*. 88(11):1988-1992. Consultado ago. 2020. Disponible en doi:10.2307/3558426.
 39. Fishman, L.; McIntosh, M. 2019. Standard Deviations: The Biological Bases of Transmission Ratio Distortion. (en línea). *Annual Review of Genetics*. 11(615):347-372. Consultado oct. 2020. Disponible en doi:10.1146/annurev-genet-112618-043905.
 40. Gao, L. F.; Jing, R. L.; Huo, N. X.; Li, Y.; Li, X. P.; Zhou R. H.; Chang, X. P.; Tang, J. F.; Ma, Z. Y.; Jia, J. Z. 2004. One hundred and one new microsatellite loci derived from ESTs (EST-SSRs) in bread wheat. (en línea). *Theoretical and Applied Genetics*. 108(7):1392-1400. Consultado oct. 2020. Disponible en doi:10.1007/s00122-003-1554-z.
 41. Gao, Z.; Wu, J.; Liu, Z.; Wang, L.; Ren, H.; Shu, Q. 2013. Rapid microsatellite development for tree peony and its implications. (en línea). *BMC Genomics*. 14(1):2-11. Consultado oct. 2020. Disponible en doi:10.1186/1471-2164-14-886.
 42. Garcia, A. F. A.; Benchimol, L. L.; Barbosa, A. M. M.; Geraldj, I. O.; Souza, Jr. C. L.; de Souza, A. P. 2004. Comparison of RAPD, RFLP, AFLP and SSR markers for diversity studies in tropical maize inbred lines. (en línea). *Genetics and Molecular Biology*. 27(4):579-588. Consultado jul. 2020. Disponible en <https://doi.org/10.1590/S1415-47572004000400019>.
 43. García, J. A. 1995. Gramilla y praderas. (en línea). Montevideo, INIA. 15 p. (Serie Técnica no. 67). Consultado ago. 2020. Disponible en <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/9488/1/111219240807134846.pdf>.
 44. Glison, N.; Viega, L.; Cornaglia, P.; Gutiérrez, L.; Speranza, P. 2015. Variability in germination behaviour of *Paspalum dilatatum* Poir.

- seeds is genotype dependent. (en línea). *Grass and Forage Science*. 70(1):144-153. Consultado jul. 2020. Disponible en doi:10.1111/gfs.12119.
45. Gómez-Martínez, R.; Culham, A. 2000. Phylogeny of the subfamily *Panicoideae* with emphasis on the tribe *Paniceae*: evidence from the trnL-F cpDNA region. (en línea). Collingwood, Victoria, Australia, Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization (CSIRO). pp. 136-140. Consultado abr. 2020. Disponible en <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20001616578>
 46. Guichoux, E.; Lagache, L.; Wagner, S.; Chaumeil, P.; Léger, P.; Lepais, O.; Lepoittevin, C.; Malausa, T.; Revardel, E.; Salin, F.; Petit, R. J. 2011. Current trends in microsatellite genotyping. (en línea). *Molecular Ecology Resources*. 11(4):591-611. Consultado ago. 2020. Disponible en doi:10.1111/j.1755-0998.2011.03014.x.
 47. Gupta, P.; Balyan, H.; Sharma, P.; Ramesh, B. 1996. Microsatellites in plants: a new class of molecular markers. (en línea). *Current Science*. 70(1):45-54. Consultado may. 2020. Disponible en <http://www.jstor.org/stable/24097472>.
 48. Hanslik, S.; Harr, B.; Brem, G.; Schlötterer, C. 2000. Microsatellite analysis reveals substantial genetic differentiation between contemporary New World and Old World Holstein Friesian populations. (en línea). *Animal Genetics*. 31(1):31-38. Consultado abr. 2020. Disponible en doi:10.1046/j.1365-2052.2000.00569.x.
 49. Hauser, L.; Baird, M.; Hilborn, R.; Seeb, L. W.; Seeb, J. E. 2011. An empirical comparison of SNPs and microsatellites for parentage and kinship assignment in a wild sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) population. (en línea). *Molecular Ecology Resources*. 11(1):150-161. Consultado jun. 2020. Disponible en doi:10.1111/j.1755-0998.2010.02961.x.
 50. Hazen, S. P.; Leroy, P.; Ward, R. W. 2002. AFLP in *Triticum aestivum* L.: Patterns of genetic diversity and genome distribution. (en línea). *Euphytica*. 125(1):89-102. Consultado jul. 2020. Disponible en doi:10.1023/A:1015760802026.

51. Hickenbick, M. C. M.; Flores, A. I. P.; Cavalli-Molina, S.; Weber, L. H.; Kersting, A. C. O.; Costa, L. S.; Chies, T. T. de S.; Albarus, M. H. 1992. Mode of reproduction and seed production in *Paspalum dilatatum* Poir Virasoro biotype-Dilatata group (*Gramineae*). *Revista Brasileira de Genetica*. 15(1):85-102.
52. Hiroshi, T.; Yoshimura, A.; Harushima, Y.; Nagamura, Y.; Kuraya, N., Yano, M.; Sasaki, T.; Iwata, N. 1996. RFLP Framework Map Using Recombinant Inbred Lines in Rice. (en línea). *Breeding Science*. 46:279-284. Consultado ago. 2020. Disponible en https://www.istage.jst.go.jp/article/jsbbs1951/46/3/46_3_279/pdf/char/ja.
53. Hodel, R. G. J.; Segovia-Salcedo, M. C.; Landis, J. B.; Crowl, A. A.; Sun, M.; Liu, X.; Gitzendanner, M. A.; Douglas, N. A.; Germain-Aubrey, C. C.; Chen, S.; Soltis, D. E.; Soltis, P. S. 2016. The Report of My Death was an Exaggeration: a Review for Researchers Using Microsatellites in the 21st Century. (en línea). *Applications in Plant Sciences*. 4(6):1-13. Consultado jul. 2020. Disponible en doi:10.3732/apps.1600025.
54. Jennings, T. N.; Knaus, B. J.; Mullins, T. D.; Haig, S. M.; Cronn, R. C. 2011. Multiplexed microsatellite recovery using massively parallel sequencing. (en línea). *Molecular Ecology Resources*. 11(6):1060-1067. Consultado jul. 2020. Disponible en doi:10.1111/j.1755-0998.2011.03033.x.
55. Jones, C. J.; Edwards, K. J.; Castiglione, S.; Winfield, M. O.; Sala, F.; Van der Wiel, C.; Vosman, B. L.; Matthes, M.; Daly, A.; Brettschneider, R.; Bettini, P.; Buiatti, M.; Maestri, E.; Marmiroli, N.; Aert, R. L.; Volckaert, G.; Rueda, J.; Vazquez, A.; Karp, A. 1998. Reproducibility Testing of RAPDs by a Network of European Laboratories. (en línea). *Euphytica*. 132(4):176-179. Consultado ago. 2020. Disponible en doi:10.1007/978-94-009-0019-6_35.
56. Jones, O. R.; Wang, J. 2010. COLONY: A program for parentage and sibship inference from multilocus genotype data. (en línea). *Molecular Ecology Resources*. 10(3):551-555. Consultado jul. 2020. Disponible en doi:10.1111/j.1755-0998.2009.02787.x.
57. Kalia, R. K.; Rai, M. K.; Kalia, S.; Singh, R., Dhawan; A. K. 2011. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants

- (en línea). *Euphytica*. 177(3):309-334. Consultado jul. 2020. Disponible en doi:10.1007/s10681-010-0286-9.
58. Kashi, Y.; Soller, M. 1998. Functional roles of microsatellites and minisatellites. In: Goldstein, D. B.; Schlotterer, C. eds. *Microsatellite evolution and application*. Oxford, Oxford University. pp. 10-23.
 59. Konishi, T.; Abe, K.; Matsuura, S.; Yano, Y. 1990 Distorted segregation of the esterase isozyme geotypes in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Japanese Journal of Genetics*. 65:411-416.
 60. Kuleung, C.; Baenziger, P. S.; Kachman, S. D.; Dweikat, I. 2006. Evaluating the genetic diversity of triticale with wheat and rye SSR markers. (en línea). *Crop Science*. 46(4):1692-1700. Consultado jul. 2020. Disponible en doi:10.2135/cropsci2005.09-0338.
 61. Li, Y. C.; Korol, A. B.; Fahima, T.; Beiles, A.; Nevo, E. 2002. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. (en línea). *PubMed*. 11(12):2453-2465. Consultado ago. 2020. Disponible en <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1365-294X.2002.01643.x>
 62. Loegering, W. Q.; Sears, E. R. 1963. Distorted inheritance of stem-rust resistance of timstein wheat caused by a pollen-killing gene. (en línea). *Canadian Journal of Genetics and Cytology*. 5(1):65-72. Consultado jul. 2020. Disponible en doi:10.1139/g63-010.
 63. Lübberstedt, T.; Melchinger, A. E.; Duple, C.; Vuylsteke, M.; Kuiper, M. 2000. Relationships among early European maize inbreds: IV. Genetic diversity revealed with AFLP markers and comparison with RFLP, RAPD, and pedigree data. (en línea). *Crop Science*. 40(3):783-791. Consultado jun. 2020. Disponible en doi:10.2135/cropsci2000.403783x.
 64. Lyttle, T. W. 1991. Segregation distorters. (en línea). *Annual Review of Genetics*. 25:511-585. Consultado nov. 2020. Disponible en <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.ge.25.120191.002455>

65. Marulanda, M. L.; López, A. M.; Aguilar, S. B. 2007. Genetic diversity of wild and cultivated *Rubus* species in Colombia using AFLP and SSR markers. (en línea). *Crop Breeding and Applied Biotechnology*. 7(3):242-252. Consultado jul. 2020. Disponible en doi:10.12702/1984-7033.v07n03a03.
66. Mazzella, C.; Speranza, P. R. 1997. Meiotic behavior of univalents in *Paspalum dilatatum*. (en línea). *Brazilian Journal of Genetics*. 20:1-15. Consultado ago. 2020. Disponible en https://www.researchgate.net/publication/226026621_Evolutionary_patterns_in_the_Dilatata_group_Paspalum_Poaceae
67. Mazzucato, A.; Barcaccia, G.; Pezzotti, M.; Falcinelli, M. 1995. Biochemical and molecular markers for investigating the mode of reproduction in the facultative apomict *Poa pratensis* L. (en línea). *Sexual Plant Reproduction*. 8(3):133-138. Consultado jul. 2020. Disponible en doi:10.1007/BF00242256.
68. Medini, M.; Hamza, S.; Rebai, A.; Baum, M. 2005. Analysis of genetic diversity in Tunisian durum wheat cultivars and related wild species by SSR and AFLP markers. (en línea). *Genetic Resources and Crop Evolution*. 52(1):21-31. Consultado jul. 2020. Disponible en doi:10.1007/s10722-005-0225-0.
69. Merritt, B. J.; Culley, T. M.; Avanesyan, A.; Stokes, R.; Brzyski, J. 2015. An Empirical Review: characteristics of Plant Microsatellite Markers that Confer Higher Levels of Genetic Variation. (en línea). *Applications in Plant Sciences*. 3(8):1-12. Consultado jul. 2020. Disponible en doi:10.3732/apps.1500025.
70. Miah, G.; Rafii, M. Y.; Ismail, M. R.; Puteh, A. B.; Rahim, H. A.; Islam, N. K.; Latif, M. A. 2013. A review of microsatellite markers and their applications in rice breeding programs to improve blast disease resistance. (en línea). *International Journal of Molecular Sciences*, 14(11):22499-22528. Consultado jun. 2020. Disponible en doi:10.3390/ijms141122499.
71. Millot, J. C. 1969. Mejoramiento de gramíneas forrajeras. (en línea). *Miscelánea CIAAB*. no. 7:101-110. Consultado ago. 2020. Disponible en http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/5923/1/UY.CIAAB.MI_SCELANEA.1969.n.7.pdf

72. _____.; Risso, D.; Methol, R. 1987. Relevamiento de pasturas naturales y mejoramientos extensivos en áreas ganaderas del Uruguay. (en línea). Montevideo, FUCREA. 199 p. Consultado ago. 2020 Disponible en <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IscScript=INIA.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=032582>.
73. Mohammadi, S. A., Prasanna, B. M. 2003. Analysis of Genetic Diversity in Crop Plants. (en línea). Crop Science. 43(4):1235-1248. Consultado jul. 2020. Disponible en doi:10.2135.
74. Nicot, N.; Chiquet, V.; Gandon, B.; Amilhat, L.; Legeai, F.; Leroy, P.; Bernard, M.; Sourdille, P. 2004. Study of simple sequence repeat (SSR) markers from wheat expressed sequence tags (ESTs). (en línea). Theoretical and Applied Genetics. 109(4):800-805. Consultado jul. 2020. Disponible en doi:10.1007/s00122-004-1685-x.
75. Paun, O.; Hörandl, E. 2006 Evolution of hypervariable microsatellites in apomictic polyploid lineages of *Ranunculus carpaticola*: directional bias at dinucleotide loci. (en línea). Genetics. 174(1):387-398. Consultado jul. 2020. Disponible en doi:10.1534/genetics.105.052761.
76. Pearce, S. R.; Knox, M.; Ellis, T. H. N.; Flavell, A. J.; Kumar, A. 2000. Pea Ty1-copia group retrotransposons: transpositional activity and use as markers to study genetic diversity in *Pisum*. (en línea). Molecular and General Genetics. 263(6):898-907. Consultado jul. 2020. Disponible en doi:10.1007/s004380000257.
77. Pizarro, E. 2000. Potencial forrajero del género *Paspalum*. (en línea). Tropical Grasslands. 22(1):38-46. Consultado jul. 2020. Disponible en http://ciat-library.ciat.cgiar.org/Articulos/Ciat/Vol_22_01_08.pdf
78. Putman, A. I.; Carbone, I. 2014. Challenges in analysis and interpretation of microsatellite data for population genetic studies. (en línea). Ecology and Evolution. 4(22):4399-4428. Consultado abr. 2020. Disponible en doi:10.1002/ece3.1305.
79. Quarin, C. L.; Norrmann, G. A. 1987. Cytology and Reproductive Behavior of *Paspalum equitans*, *P. ionanthum*, and Their Hybrids with Diploid and Tetraploid Cytotypes of *P. cromyorrhizon*. (en

- línea). Botanical Gazette. 148(3):386-391. Consultado jun. 2020. Disponible en doi:10.1086/337667.
80. _____.; _____. 1990. Hybrids between five *Paspalum* species. Botanical Gazette. 151(3):366-369.
81. _____.; Caponio, I. 1995. Cytogenetics and Reproduction of *Paspalum dasypleurum* and Its Hybrids with *P. urvillei* and *P. dilatatum* ssp. *Flavescens*. (en línea). International Journal of Plant Sciences. 156(2):232-235. Consultado jul. 2020. en doi:10.1086/297245.
82. El Rabey, H. A.; Alshubaily, F.; Al-Otaibi, K. M. 2015. Phylogenetic relationships of some economically important cereal plants based on genome characterization using molecular markers. (en línea). Caryologia. 68(3):225-232. Consultado jul. 2020. Disponible en doi:10.1080/00087114.2015.1032612.
83. R Core Team. 2020. R: a language and environment for statistical computing. (en línea). Vienna, Austria, R Foundation for Statistical Computing. 12 p. Consultado nov. 2020. Disponible en <http://www.R-project.org/>.
84. Rebollo, M. I. 2017. Diseño y transferencia de microsatélites en los tetraploides sexuales del grupo Dilatata. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Universidad de la República. Facultad de Agronomía. 83 p.
85. Rick, C. M. 1966 Abortion of male and female gametes in the tomato determined by allelic interaction. Genetics. 53(1):85-96.
86. Ríos, A.; Giménez, A.; Carámbula, M.; Cibils, R. 1990. Algunas consideraciones ecofisiológicas y de manejo para el control integrado de gramilla. (en línea). Revista del Plan Agropecuario no. 55:11-19. Consultado ago. 2020. Disponible en <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/8627/1/BD-1-p.-11-19.pdf>
87. Ritschel, P. S.; Cesar, T.; Lins, D. L.; Tristan, R. L.; Salles, G.; Buso, C.; Buso, J. A.; Ferreira, M. E. 2004. Development of microsatellite markers from an enriched genomic library for genetic analysis of melon (*Cucumis melo* L.). BMC Plant Biology. 14:1-14.

88. Röder, M. S.; Plaschke, J.; König, S. U.; Börner, A.; Sorrells, M. E.; Tanksley, S. D.; Ganai, M. W. 1995. Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. (en línea). *Molecular & General Genetics*. 246(3):327-333. Consultado ago. 2020. Disponible en doi:10.1007/BF00288605.
89. Rua, G. H.; Speranza, P. R.; Vaio, M.; Arakaki, M. 2010. A phylogenetic analysis of the genus *Paspalum* (Poaceae) based on cpDNA and morphology. (en línea). *Plant Systematics and Evolution*. 288(3-4):227-243. Consultado jul. 2020. Disponible en doi:10.1007/s00606-010-0327-9.
90. Russell, J. R.; Fuller, J. D.; Macaulay, M.; Hatz, B. G.; Jahoor, A.; Powell, W.; Waugh, R. 1997. Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. (en línea). *Theoretical and Applied Genetics*. 95(4):714-722. Consultado jul. 2020. Disponible en doi:10.1007/s001220050617.
91. Sandler, L.; Novitski, E. 1957. Meiotic drive as an evolutionary force. *American Naturalist*. 41:105-110.
92. _____; Golic, K. 1985 Segregation distortion in *Drosophila*. (en línea). *Trends in Genetics*. 1(C):181-185. Consultado jun. 2020. Disponible en doi:10.1016/0168-9525(85)90074-5.
93. Sandro, P. 2014. Caracterización genotípica y fenotípica de una colección de *Paspalum dilatatum* ssp. *flavescens*. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Universidad de la República. Facultad de Agronomía. 59 p.
94. _____; Rebollo, M. I.; Gaiero, P.; Vaio, M.; Vilaro, F., Speranza, P. 2016. Diseño de microsatélites para *Solanum commersonii* a partir de información genómica. (en línea). In: Congreso Latinoamericano de Genética (16^o., 2016, Montevideo, Uruguay). Proceedings. *Journal of Basic and Applied Genetics*. 27(1): 276-277. Consultado sep. 2020. Disponible en https://www.alagenet.org/alag2016/admin/files/alag2016/upload/files/V.XXVIII_2016_Suppl1_19092016.pdf
95. _____; Gutiérrez, L.; Speranza, P. 2019 Distribution of genetic and phenotypic diversity in the autogamous perennial *Paspalum*

dilatatum subsp. *flavescens* Roseng., Arrill. & Izag. (Poaceae). (en línea). Genetic Resources and Crop Evolution. 66(6):1205-1216. Consultado jul. 2020. Disponible en doi:10.1007/s10722-019-00791-9.

96. Santiñaque, F.; Carámbula, M. 1981. Productividad y comportamiento de distintas mezclas y forrajeras. (en línea). Investigaciones Agronómicas. 2(1):16-21. Consultado jul. 2020. Disponible en <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=AGRINTER.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=066826>.
97. Scheffer-Basso, S. M.; Trentini, V.; Baréa, K. 2007. Manejo de *Paspalum dilatatum* poir. biótipo Virasoro. (en línea). Revista Brasileira de Zootecnia. 36(4):1022-1028. Consultado jun. 2020. Disponible en doi:10.1590/s1516-35982007000500006.
98. Schrauf G. E.; Cornaglia P.S.; Deregibus V.A.; Ríssola M. G. 1995. Improvement in germination behaviour of *Paspalum dilatatum* Poir. New Zealand Journal of Agricultural Research. 38(4):501-509.
99. _____; Blanco, M. A.; Cornaglia, P. S.; Deregibus, V. A.; Madia, M., Pacheco, M. G.; Padilla, J.; García, A. M.; Quarín, C. 2003. Ergot resistance in plants of *Paspalum dilatatum* incorporated by hybridisation with *Paspalum urvillei*. Tropical Grasslands. 37(3):182-186.
100. Sedighi, E.; Rahimmalek, M. 2015. Evaluation of genetic diversity of *Rubus hyrcanus* using Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) and morphological markers. (en línea). Biologia (Poland). 70(3):339-348. Consultado jul. 2020. Disponible en doi:10.1515/biolog-2015-0039.
101. Selkoe, K. A.; Toonen, R. J. 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. (en línea). Ecology Letters. 9(5):615-629. Consultado abr. 2020. Disponible en doi:10.1111/j.1461-0248.2006.00889.x.
102. Silveira, L.; Gamazo, P.; Alonso, J.; Martínez, L. 2016. Effects of afforestation on groundwater recharge and water budgets in the western region of Uruguay. (en línea). Hydrological Processes. 30(20):3596-3608. Consultado jul. 2020. Disponible en doi:10.1002/hyp.10952.

103. Simpson, J. 1997 Marcadores moleculares. (en línea). *Botanical Sciences*. 76(60):1-73. Consultado ago. 2020. Disponible en doi:10.17129/botsoci.1521.
104. Slavov, G. T.; Howe, G. T.; Yakovlev, I.; Edwards, K. J.; Krutovskii, K. V.; Tuskan, G. A.; Carlson, J. E.; Strauss, S. H.; Adams, W. T. 2004 Highly variable SSR markers in Douglas-fir: Mendelian inheritance and map locations. (en línea). *Theoretical and Applied Genetics*. 108(5):873-880. Consultado jun. 2020. Disponible en doi:10.1007/s00122-003-1490-y.
105. Solouki, M.; Mehdikhani, H.; Zeinali, H.; Emamjomeh, A. A. 2008. Study of genetic diversity in Chamomile (*Matricaria chamomilla*) based on morphological traits and molecular markers. (en línea). *Scientia Horticulturae*. 117(3):281-287. Consultado jun. 2020. Disponible en doi:10.1016/j.scienta.2008.03.029.
106. Speranza, P. R.; Malosetti, M. 2007. Nuclear and cytoplasmic microsatellite markers for the species of the Dilatata group of *Paspalum* (*Poaceae*). (en línea). *Plant Genetic Resources*. 5(01):1-14. Consultado abr. 2020. Disponible en doi:10.1017/S1479262107192145.
107. _____. 2009. Evolutionary patterns in the Dilatata group (*Paspalum*, *Poaceae*). (en línea). *Plant Systematics and Evolution*. 282:43-56. Consultado mar. 2020. Disponible en doi:10.1007/s00606-009-0205-5.
108. _____.; Viega, L.; Mazzella, C.; Rivas, M. 2017. Introducción y domesticación de gramíneas forrajeras estivales perennes nativas. (en línea). Montevideo, INIA. 68 p. (Serie Técnica no. 61) Consultado jul. 2020. Disponible en <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/8260/1/Fpta-61-2017.pdf>.
109. Staub, J. E.; Serquen, F. C.; Gupta, M. 1996. Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. (en línea). *HortScience*. 31(5):729-740. Consultado jun. 2020. Disponible en doi:10.21273/hortsci.31.5.729.

110. Sun, Q. B.; Li, L. F.; Li, Y.; Wu, G. J.; Ge, X. J. 2008. SSR and AFLP markers reveal low genetic diversity in the biofuel plant *Jatropha curcas* in China. (en línea). *Crop Science*. 48(5):1865-1871. Consultado jun. 2020. Disponible en doi:10.2135/cropsci2008.02.0074.
111. Symonds, V. V.; Lloyd, A. M. 2003. An Analysis of Microsatellite Loci in *Arabidopsis thaliana*: Mutational Dynamics and Application. *Genetics*. 165(3):1475-1488.
112. Tejera, M.; Speranza, P.; Astigarraga, L.; Picasso, V. 2016. Forage biomass, soil cover, stability and competition in perennial grass-legume pastures with different *Paspalum* species. (en línea). *Grass and Forage Science*. 71(4):575-583. Consultado jul. 2020. Disponible en doi:10.1111/gfs.12208.
113. Temin, R. G.; Ganetzky, B.; Powers, P. A.; Lyttle, T. W., Pimpinelli, S., Dimitri, P., Roma, R. 1991 Segregation distortion in *Drosophila melanogaster*. *Genetic and Molecular Analyses*. 137(3):287-331.
114. Thiel, T.; Michalek, W.; Varshney, R. K.; Graner, A. 2003. Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare* L.). (en línea). *Theoretical and Applied Genetics*. 106(3):411-422. Consultado abr. 2020. Disponible en doi:10.1007/s00122-002-1031-0.
115. Tischler, C.; Burson, B. L. 1999. Seed dormancy and germination of dallisgrass, *Paspalum dilatatum*, stored under differing conditions. *Seed Science and Technology*. 27(1):263-271.
116. Tsujimoto, H.; Tsunewaki, K. 1985 Hybrid dysgenesis in common wheat caused by gametocidal genes. (en línea). *The Japanese Journal of Genetics*. 60(6):565-578. Consultado jun. 2020. Disponible en doi:10.1266/jjg.60.565.
117. Varshney, R. K.; Graner, A.; Sorrells, M. E. 2005. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. (en línea). *Trends in Biotechnology*. 23(1):48-55. Consultado jun. 2020. Disponible en doi:10.1016/j.tibtech.2004.11.005.
118. Venuto, B. C.; Burson, B. L.; Hussey, M. A.; Redfearn, D. D.; Wyatt, W. E.; Brown, L. P. 2003. Forage yield, nutritive value, and grazing tolerance of dallisgrass biotypes. *Crop Science*. 43(1):295-301.

119. Wang, A.; Yu, Z.; Ding, Y. 2009. Genetic diversity analysis of wild close relatives of barley from Tibet and the Middle East by ISSR and SSR markers. (en línea). *Comptes Rendus Biologies*. 332(4):393-403. Consultado jun. 2020. Disponible en doi:10.1016/j.crvl.2008.11.007.
120. Weber, J. L.; May, P. E. 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *American Journal of Human Genetics*. 44(3):388-396.
121. Wünsch, A.; Hormaza, J. I. 2002. Cultivar identification and genetic fingerprinting of temperate fruit tree. (en línea). *Euphytica*. 125:59-67. Consultado ago. 2020. Disponible en <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1015723805293>
122. Xu, Y.; Zhu, L.; Xiao, J.; Huang, N.; McCouch, S. R. 1997 Chromosomal regions associated with segregation distortion of molecular markers in F2, backcross, doubled haploid, and recombinant inbred populations in rice (*Oryza sativa L.*). (en línea). *Molecular and General Genetics*. 253(5):535-545. Consultado jul. 2020. Disponible en doi:10.1007/s004380050355.
123. Yamamoto, T.; Yamaguchi, M.; Hayashi, T. 2005. An integrated genetic linkage map of peach by SSR, STS, AFLP and RAPD. (en línea). *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*. 74(3):204-213. Consultado jun. 2020. Disponible en doi:10.2503/jjshs.74.204.
124. Yashitola, J.; Thirumurugan, T.; Sundaram, R. M.; Naseerullah, M. K.; Ramesh, M. S.; Sarmah, N. P.; Sonti, R. V. 2002. Assessment of purity of rice hybrids using microsatellite and STS markers. (en línea). *Crop Science*. 42(4):1369-1373. Consultado abr. 2020. Disponible en doi:10.2135/cropsci2002.1369.
125. Yu, J. K.; La Rota, M.; Kantety, R. V.; Sorrells, M. E. 2004. EST derived SSR markers for comparative mapping in wheat and rice (en línea). *Molecular Genetics and Genomics*. 271(6):742-751. Consultado may. 2020. Disponible en doi:10.1007/s00438-004-1027-3.

126. Zalapa, J. E.; Cuevas, H.; Zhu, H.; Steffan, S.; Senalik, D.; Zeldin, E.; McCown, B.; Harbut, R.; Simon, P. 2012. Using next-generation sequencing approaches to isolate simple sequence repeat (SSR) loci in the plant sciences. (en línea). American Journal of Botany. 99(2):193-208. Consultado may. 2020. Disponible en [doi:10.3732/ajb.1100394](https://doi.org/10.3732/ajb.1100394).
127. Zamir, D.; Tadmor, Y. 1986. Unequal segregation of nuclear genes in plants. (en línea). Botanical Gazette. 147(3):8-355. Consultado sept. 2020. Disponible en <https://www.journals.uchicago.edu/doi/abs/10.1086/337602>
128. Zuloaga, F.; Morrone, O. 2005. Revisión de las especies de *Paspalum* para América del Sur austral (Argentina, Bolivia, Sur del Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay). St. Louis, USA, Missouri Botanical Garden. 297 p.

X. ANEXOS

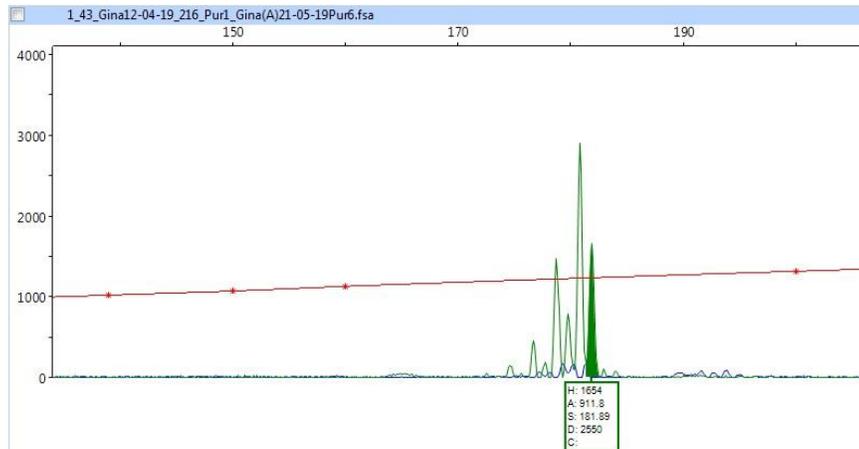
A. Test de máxima verosimilitud

	PUR1	Pdva6	Pur13	Pdf128	Pdva5	Pdf18	Pur12	Pur5	Pur11	Pur6	Pur14	Pur15
Pur1	-											
Pdva6	1,30	-										
Pur13	1,11	1,38	-									
Pdf128	2,39	1,26	3,81	-								
Pdva5	0,48	2,71	0,82	1,65	-							
Pdf18	0,52	0,60	0,48	1,09	1,21	-						
Pur12	0,43	1,33	0,40	0,81	1,80	3,57	-					
Pur5	0,73	0,26	0,00	0,31	0,45	2,26	13,7	-				
Pur11	0,19	0,16	0,41	0,22	0,01	0,44	0,01	0,83	-			
Pur6	0,61	0,41	0,24	1,07	1,18	1,72	2,83	0,33	0,60	-		
Pur14	1,45	2,16	1,49	0,71	2,31	0,48	2,34	0,28	0,51	1,40	-	
Pur15	0,56	0,55	0,36	0,54	0,54	1,06	1,32	0,87	0,68	0,57	0,14	-
Pur20	0,16	1,42	1,85	0,51	0,46	0,86	1,08	0,13	0,17	0,67	0,98	0,23

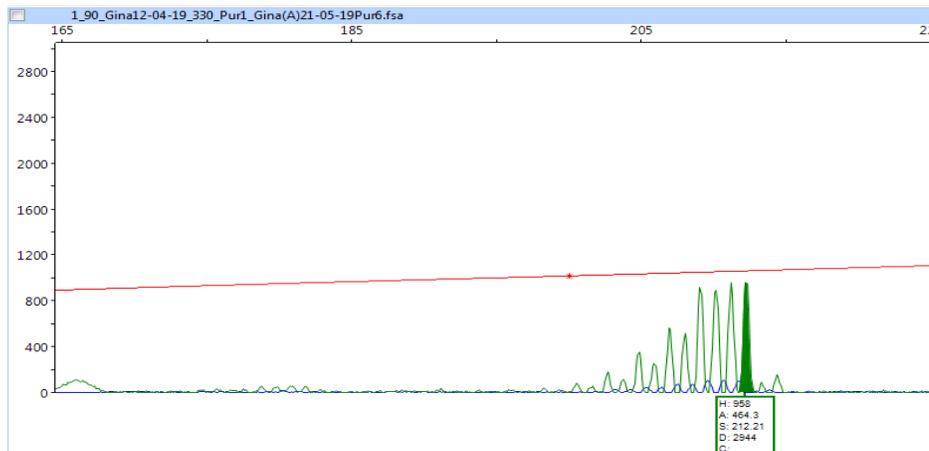
B. Ejemplo de cromatogramas homocigotos y heterocigotos para los alelos Pf1 y V en la progenie F6 del cruzamiento entre *P. dilatatum* biotipo Virasoro y *P. dilatatum* subsp. *Flavescens* para 15 marcadores microsatélites. El tamaño en pares de bases de cada alelo se indica en el recuadro con el valor S.

1 PUR 1

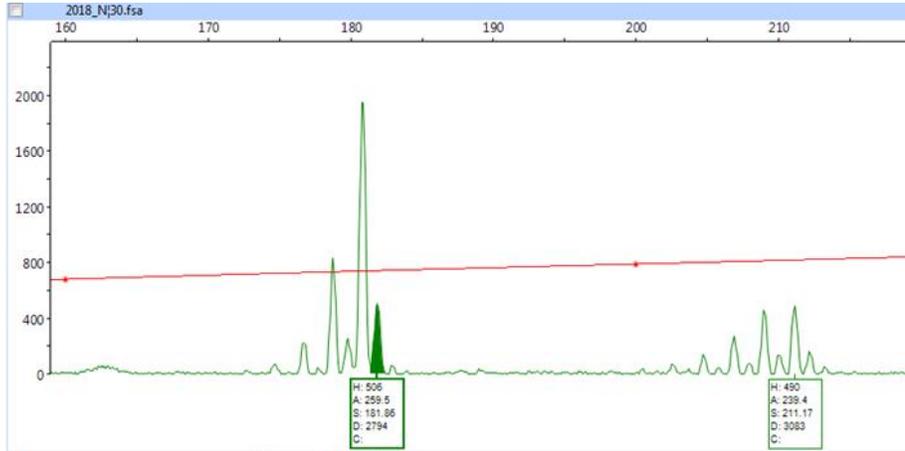
a. Homocigota para el alelo Pf1s



b. Homocigota para el alelo V

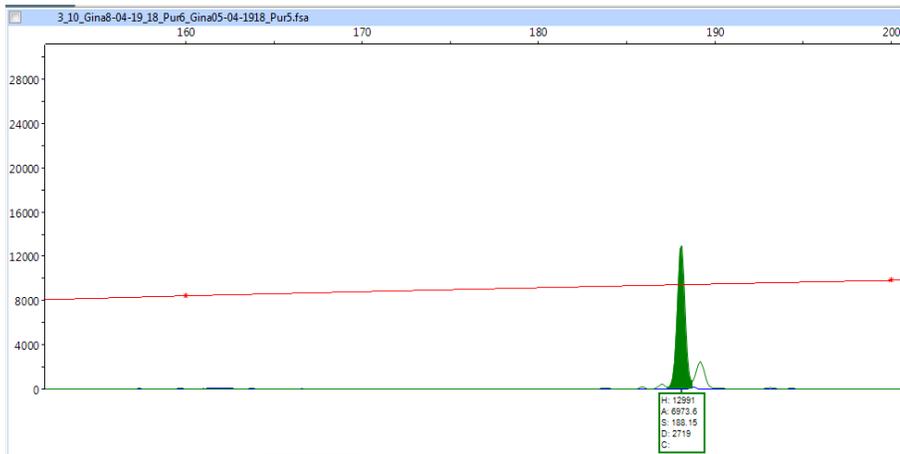


c. Heterocigota

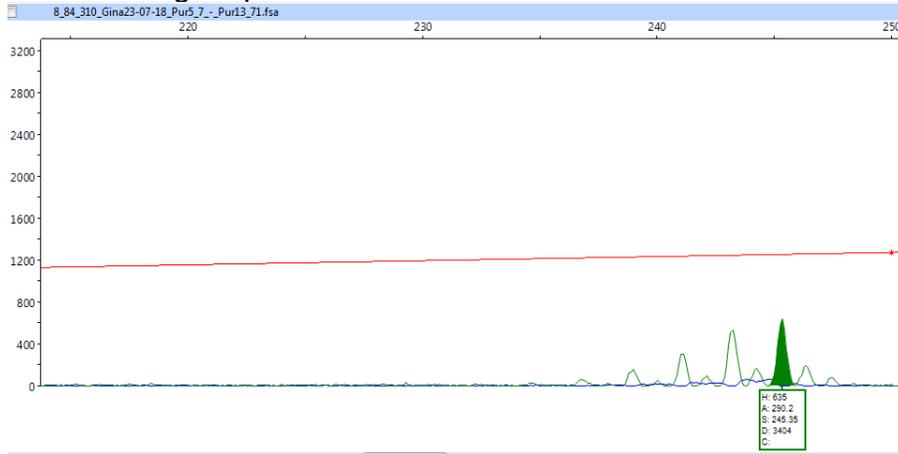


2 PUR 5

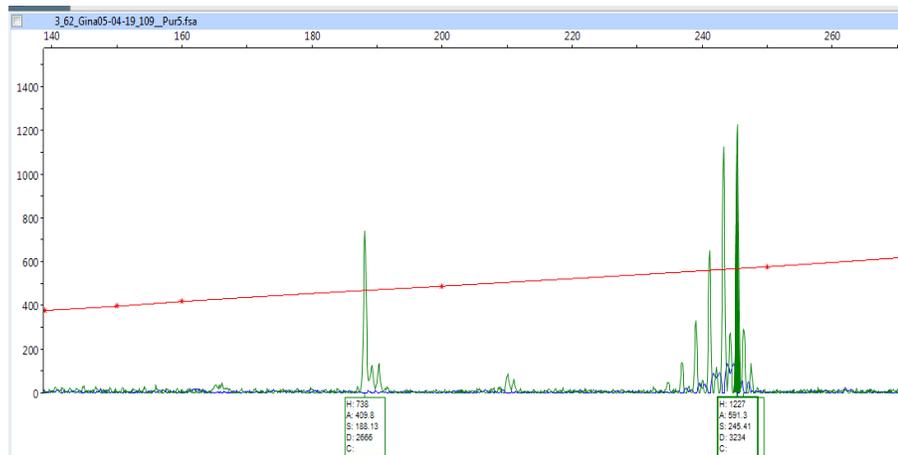
a. Homocigota para el alelo Pf1s



b. Homocigota para el alelo V

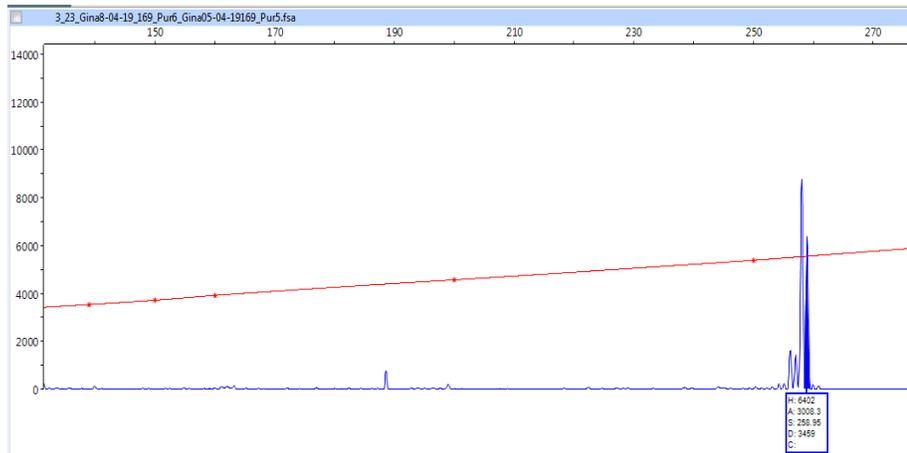


c. Heterocigota

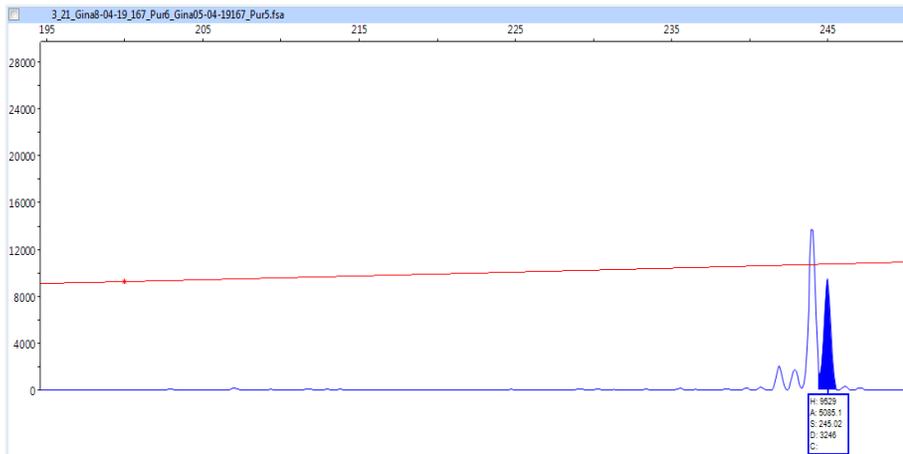


3 PUR 6

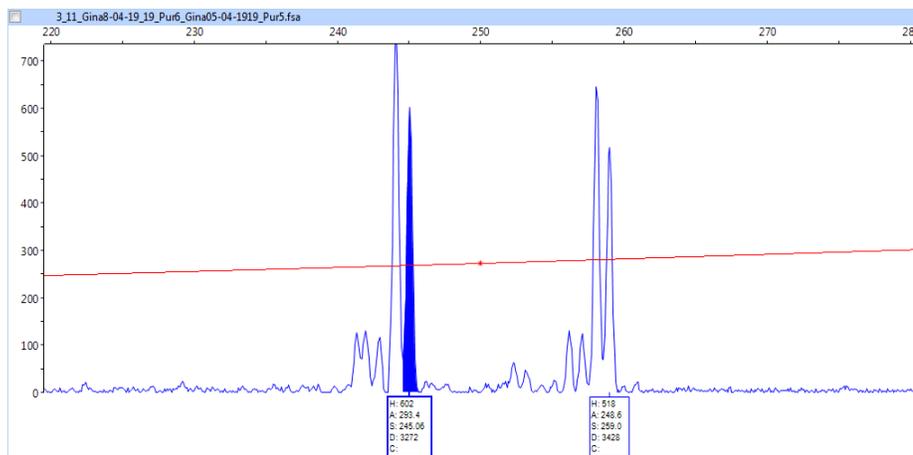
a. Homocigota para el alelo Pf1s



b. Homocigota para el alelo V

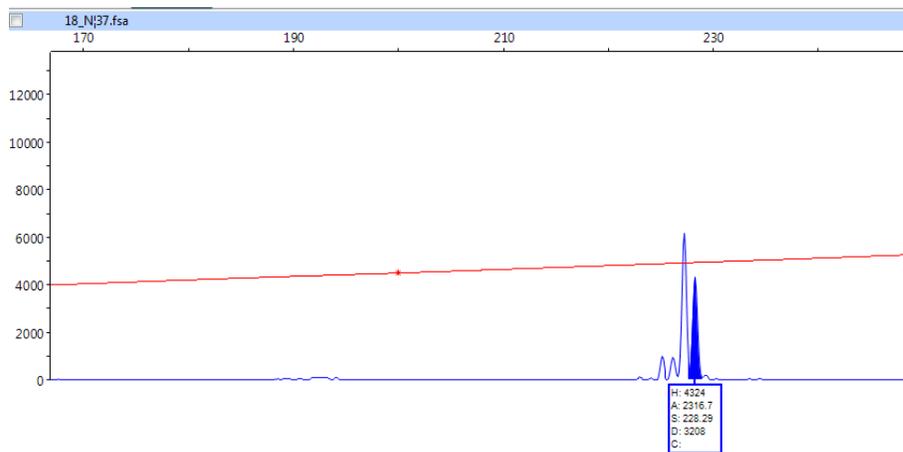


c. Heterocigota

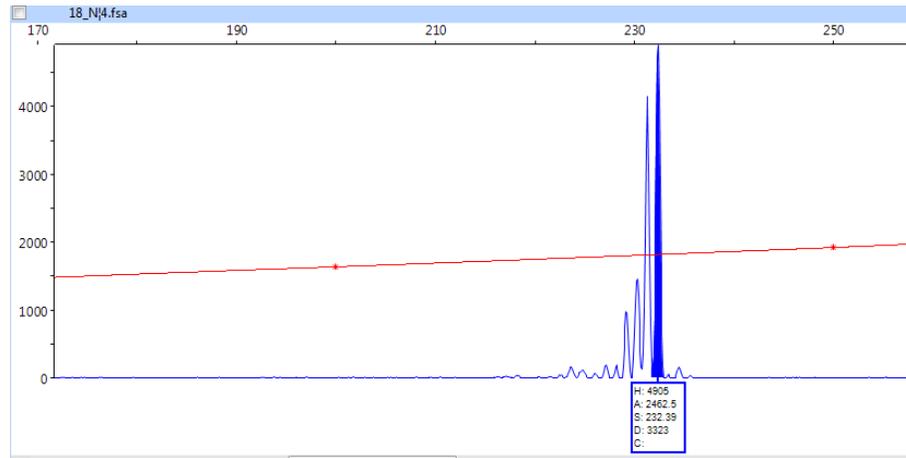


4 PUR 11

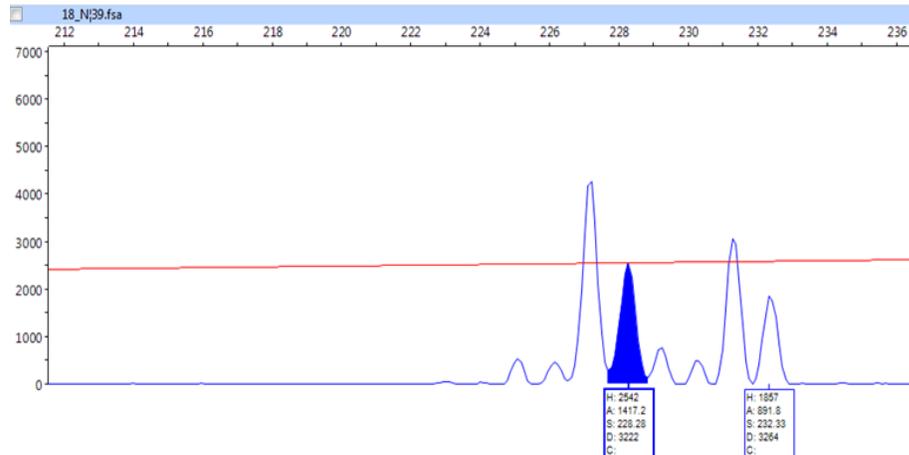
a. Homocigota para el alelo Pf1s



b. Homocigota para el alelo V

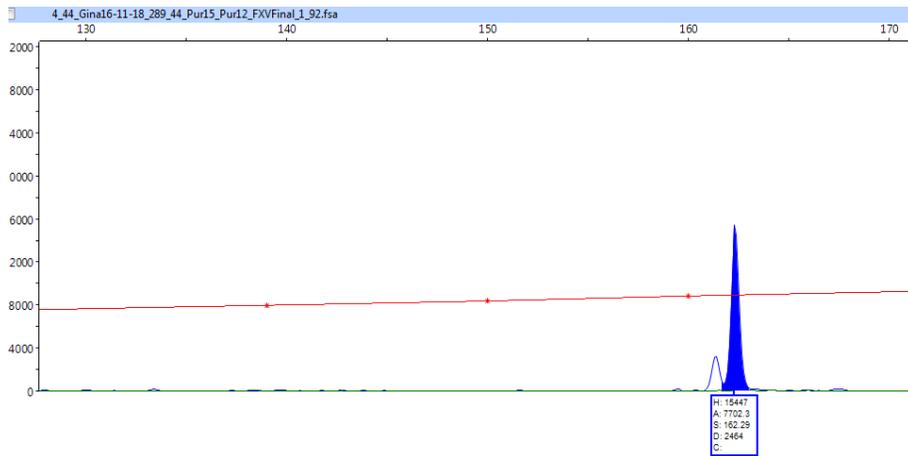


c. Heterocigota

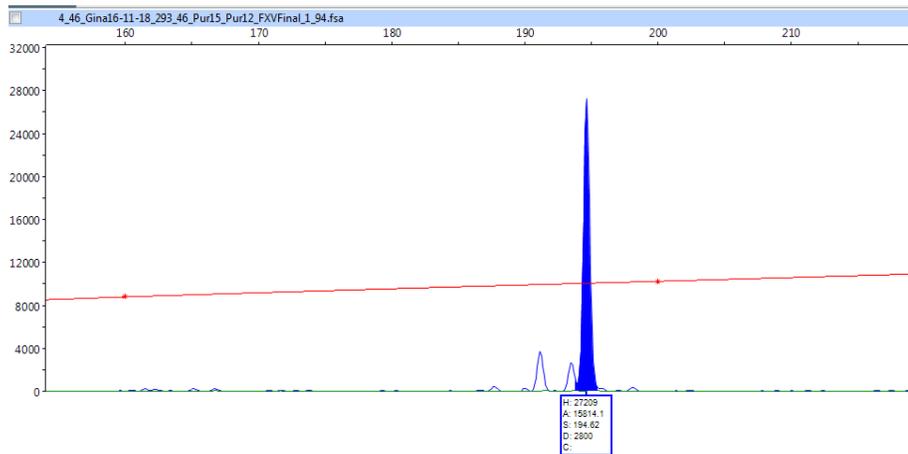


5 PUR 12

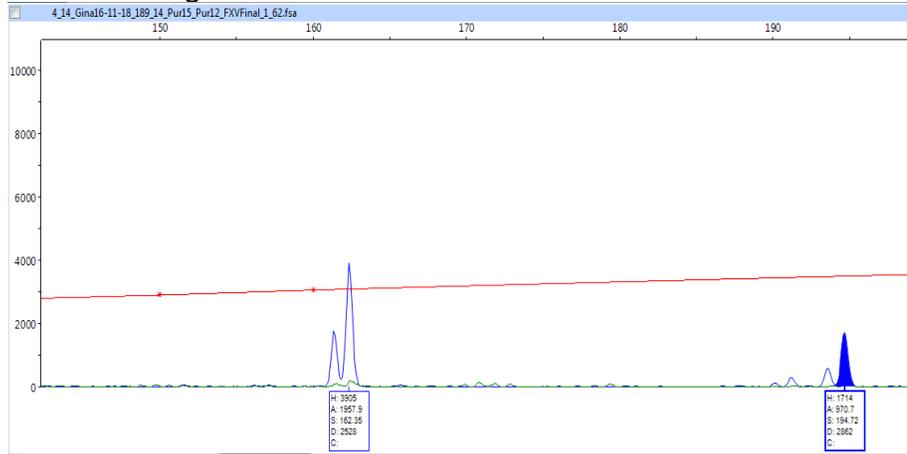
a. Homocigota para el alelo Pf1s



b. Homocigota para el alelo V

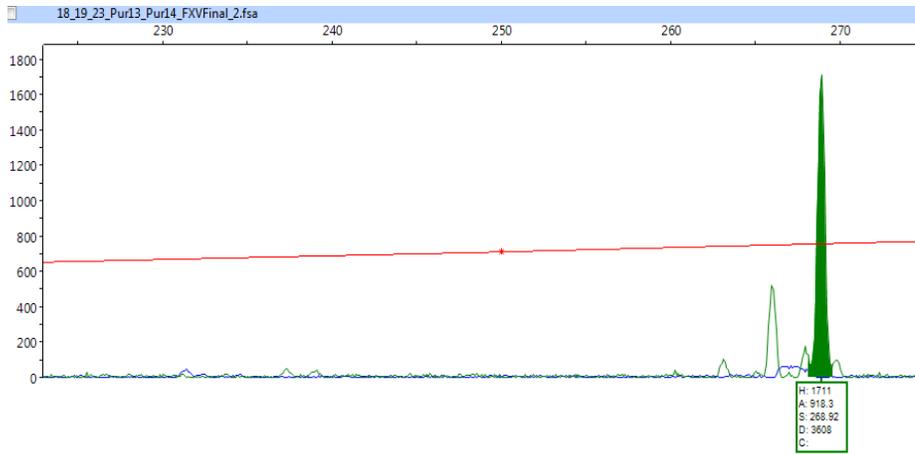


c. Heterocigota

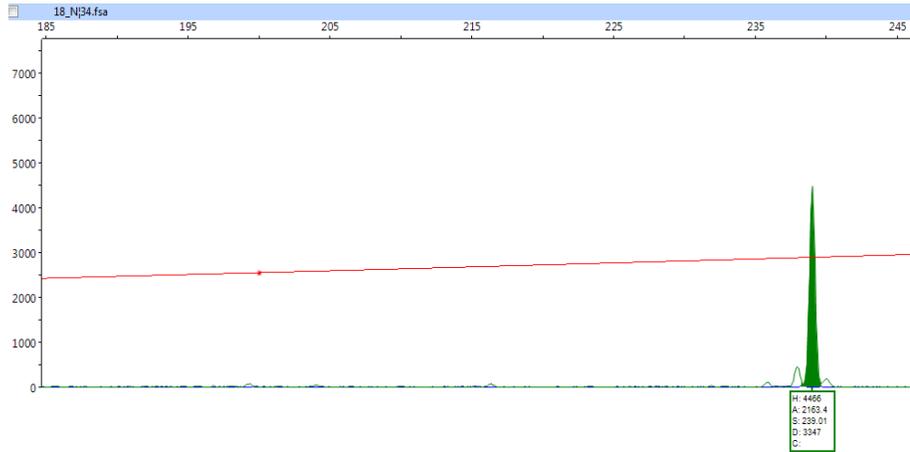


6 PUR 13

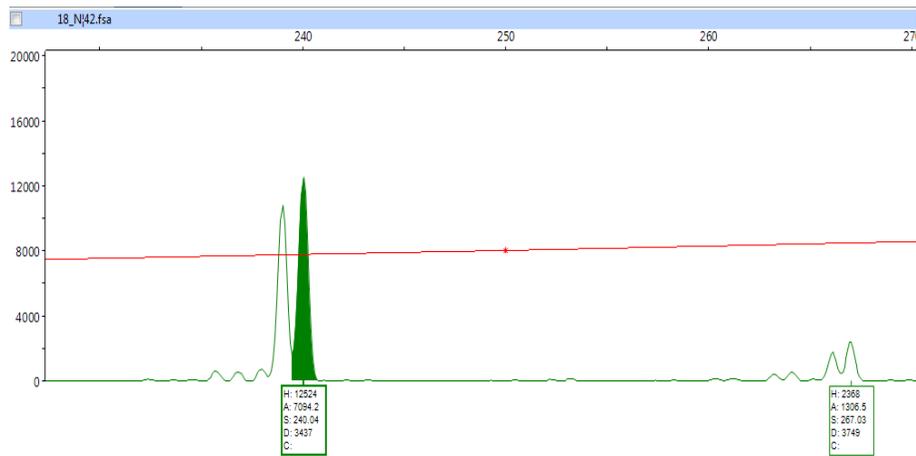
a. Homocigota para el alelo Pf1s



b. Homocigota para el alelo V

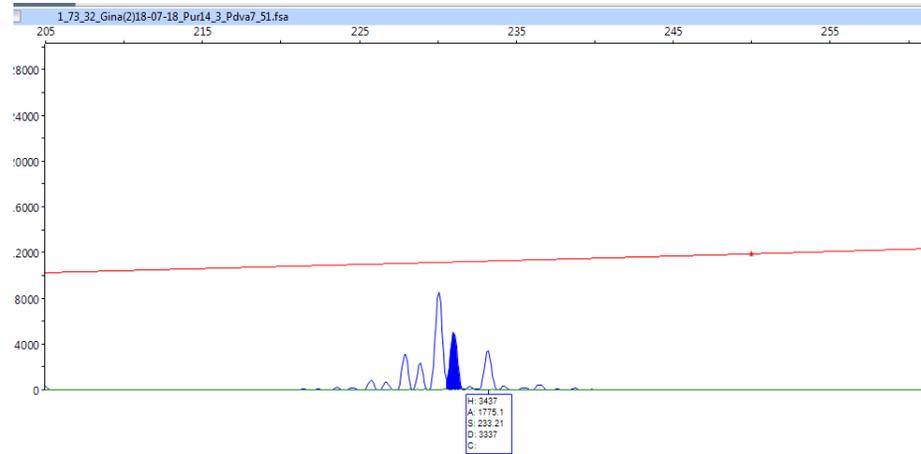


c. Heterocigota

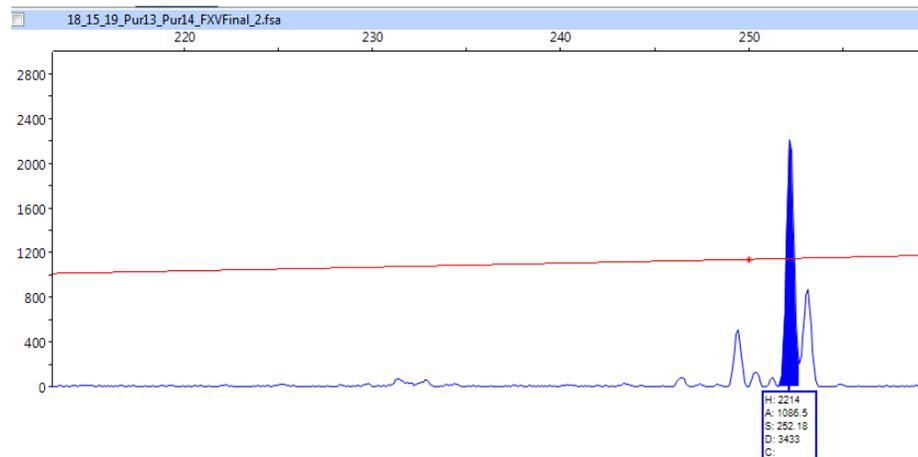


7 PUR 14

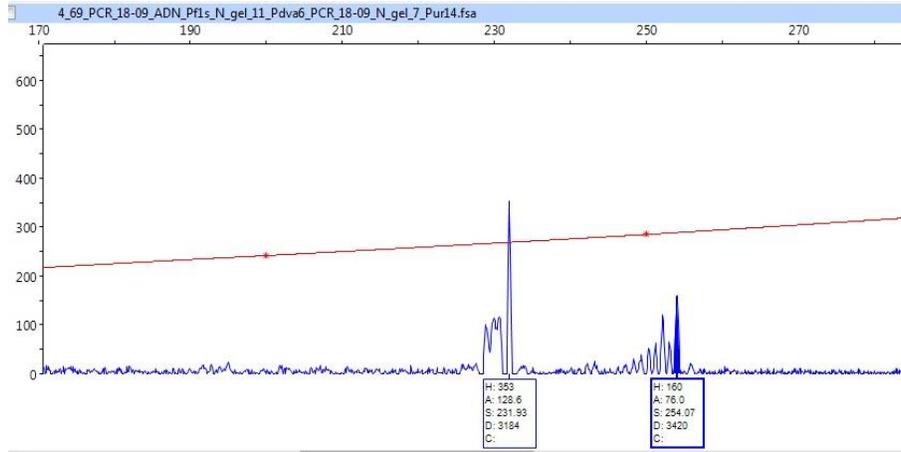
a. Homocigota para el alelo Pf1s



b. Homocigota para el alelo V

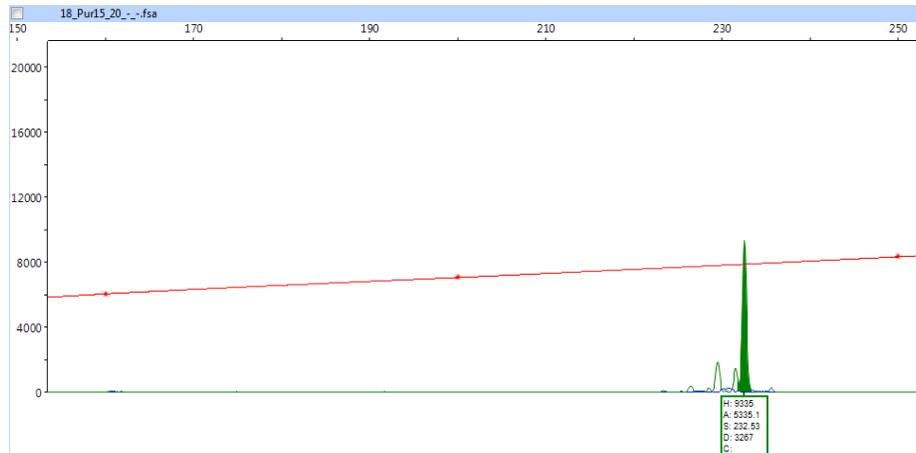


c. Heterocigota

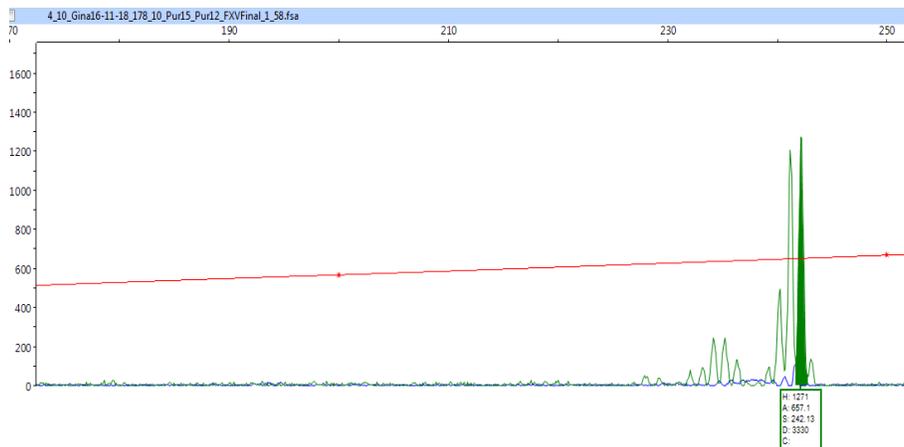


8 PUR 15

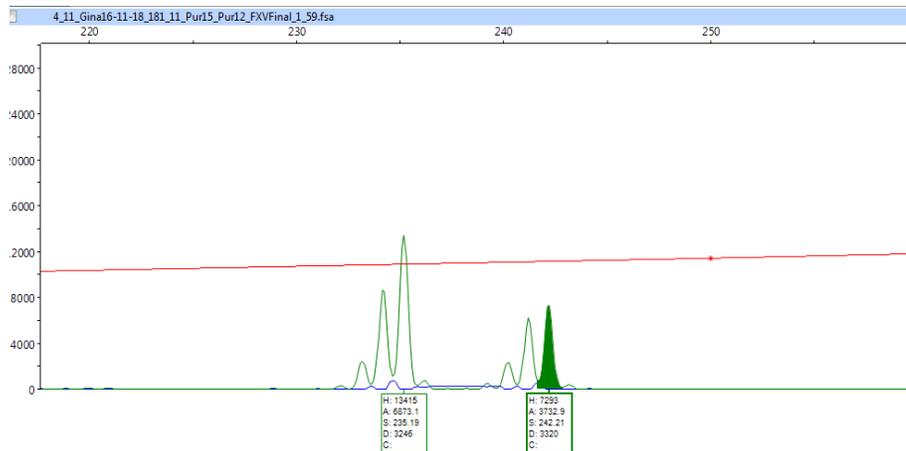
a. Homocigota para el alelo Pf1s



b. Homocigota para el alelo V

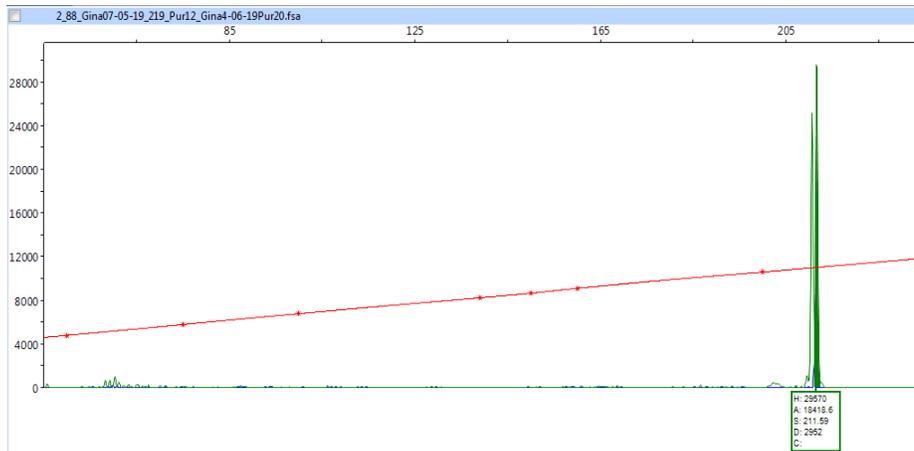


c. Heterocigota

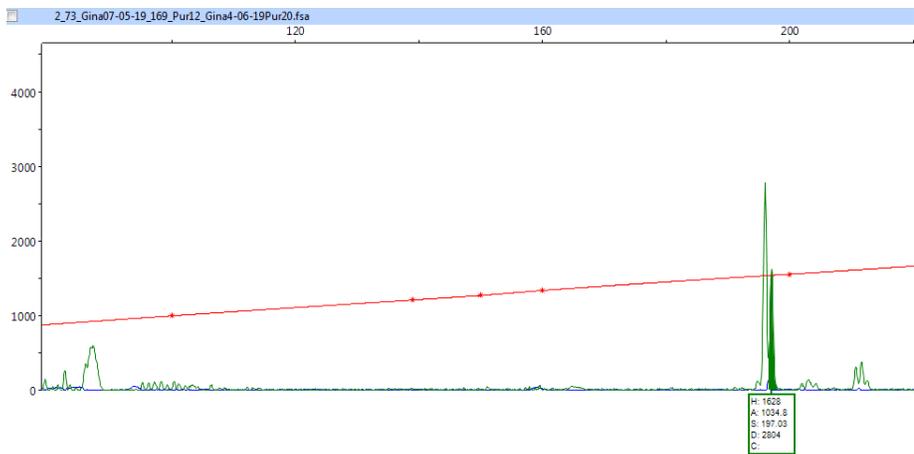


9 PUR 20

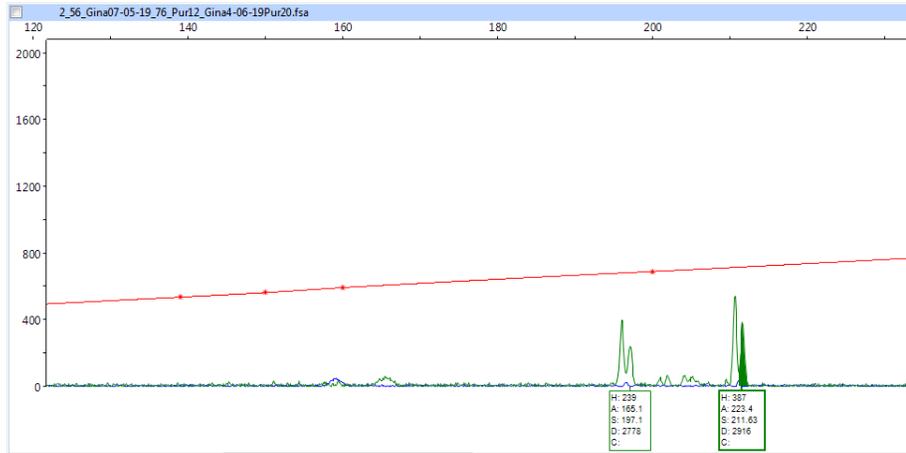
a. Homocigota para el alelo Pf1s



b. Homocigota para el alelo V

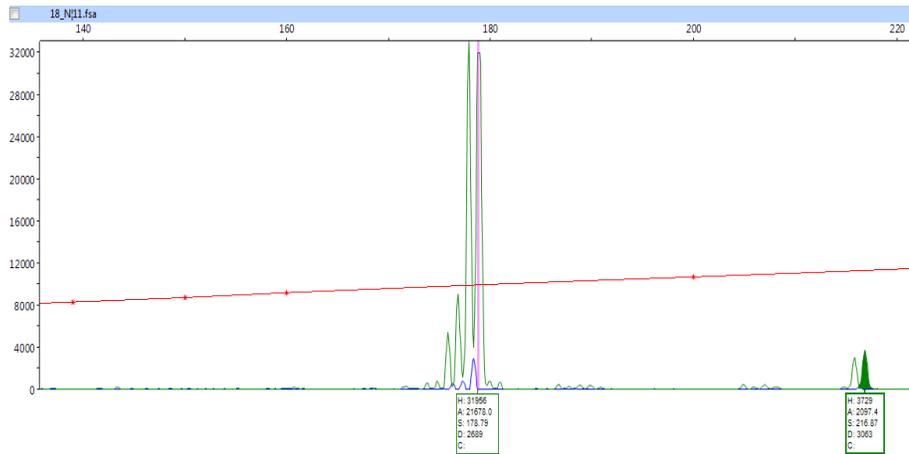


c. Heterocigota

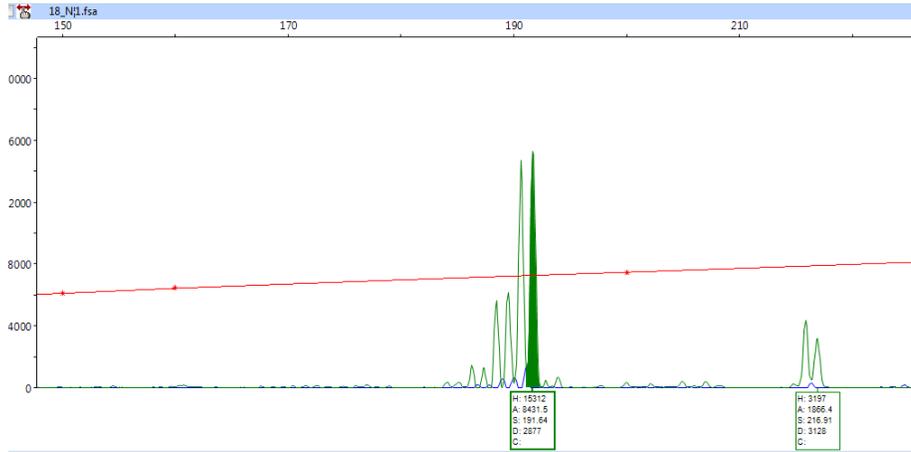


10 Pdva 5

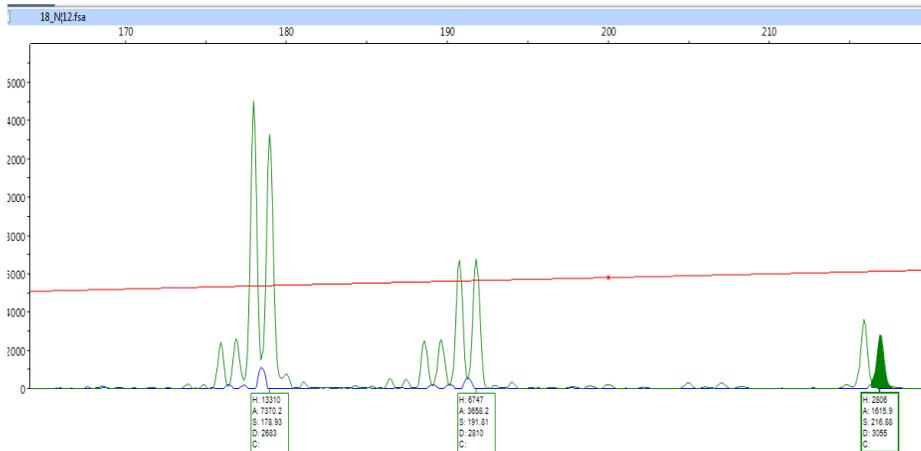
a. Homocigota para el alelo Pf1s



b. Homocigota para el alelo V

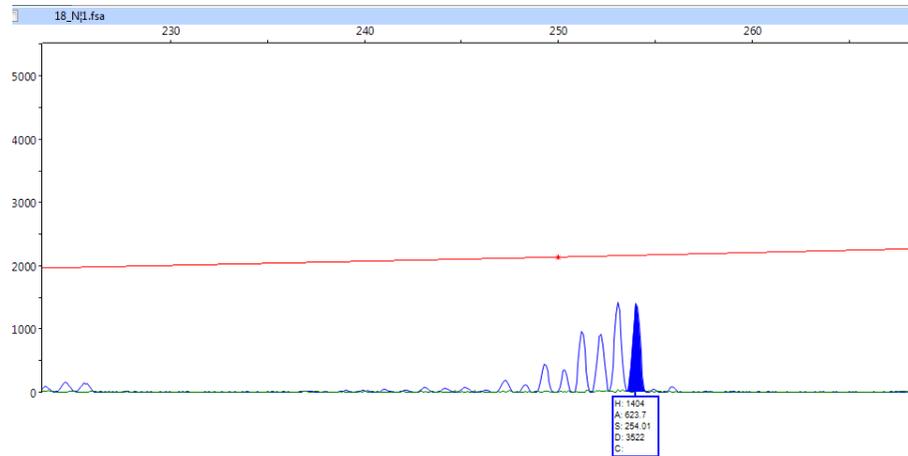


c. Heterocigota

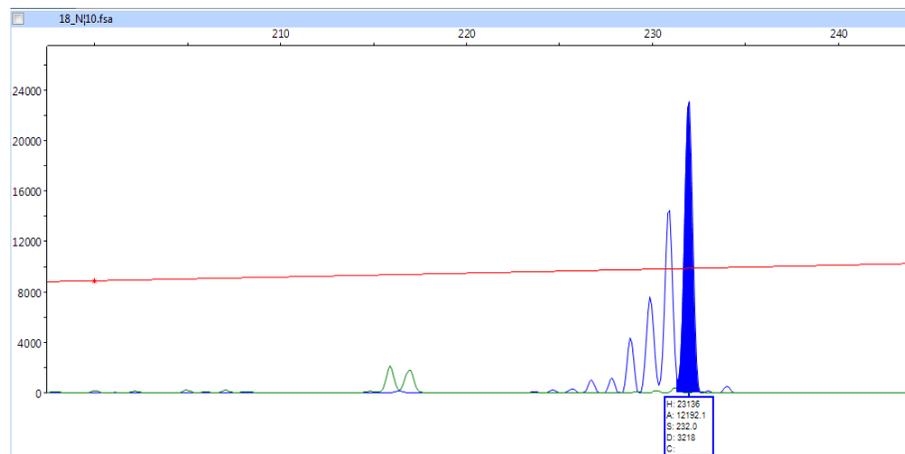


11 Pdva 6

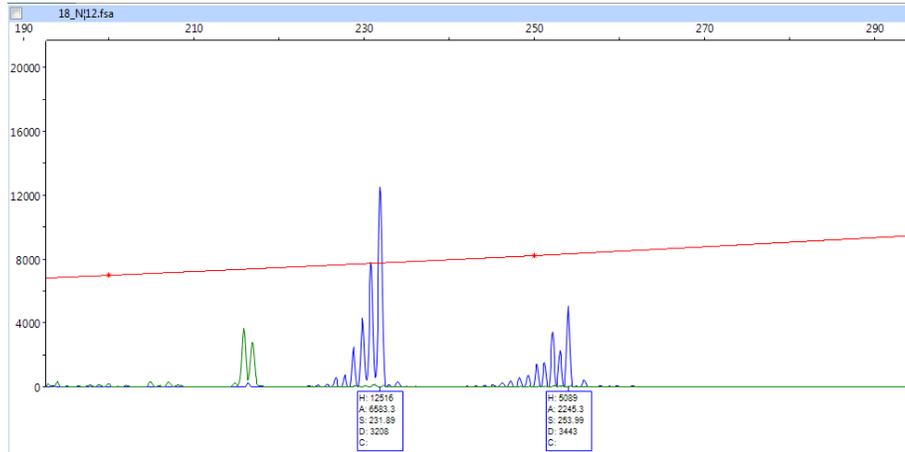
a. Homocigota para el alelo Pf1s



b. Homocigota para el alelo V

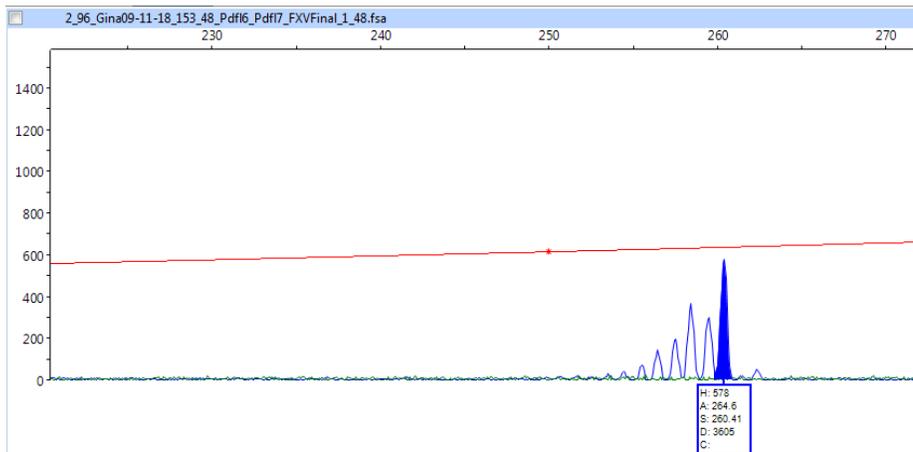


c. Heterocigota

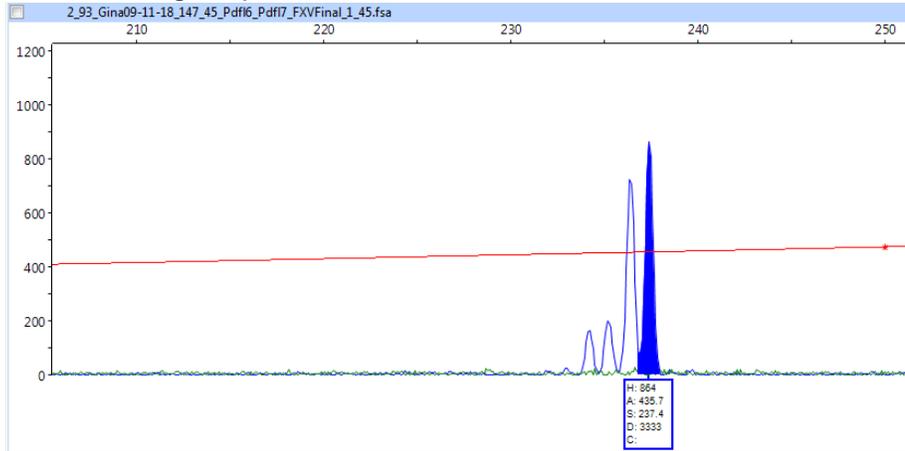


12 Pdva 7

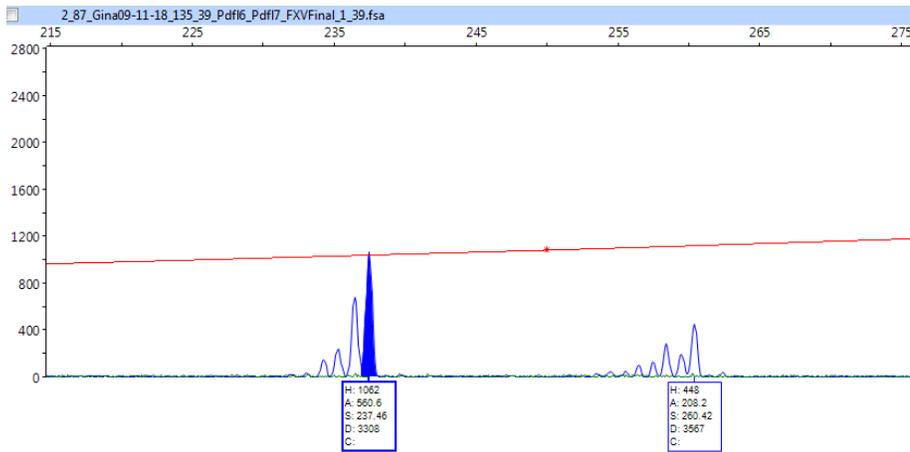
a. Homocigota para el alelo Pf1s



b. Homocigota para el alelo V

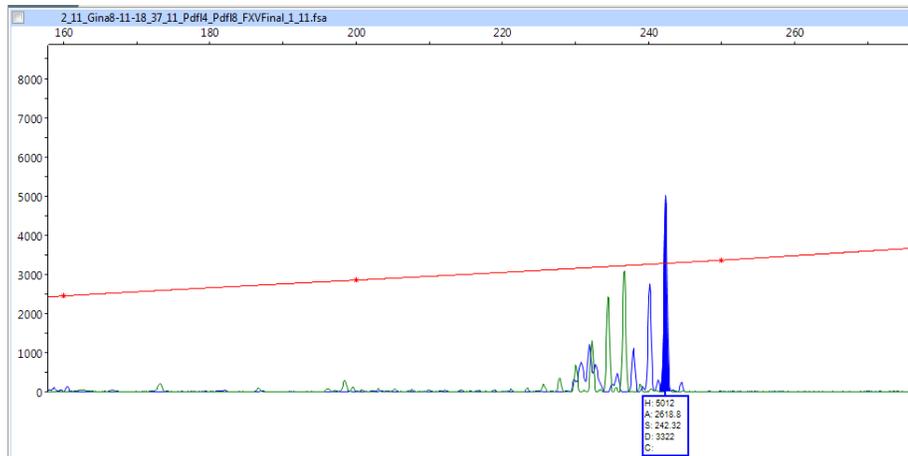


c. Heterocigota

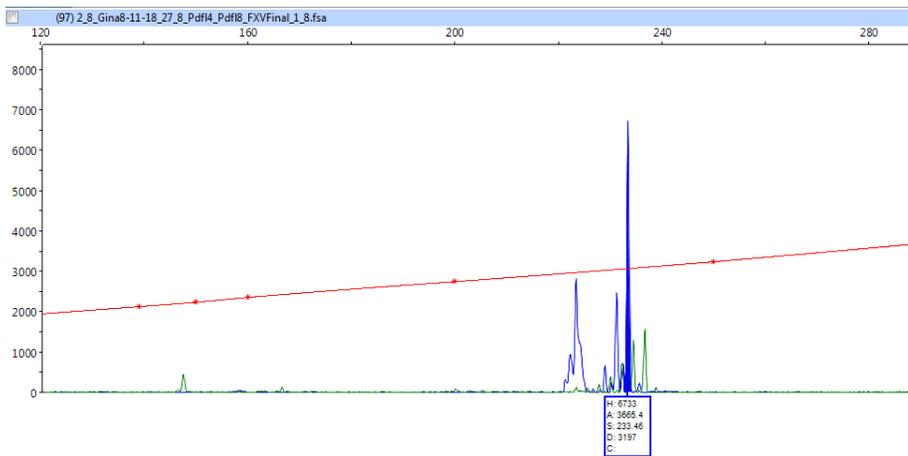


13 Pdf 8

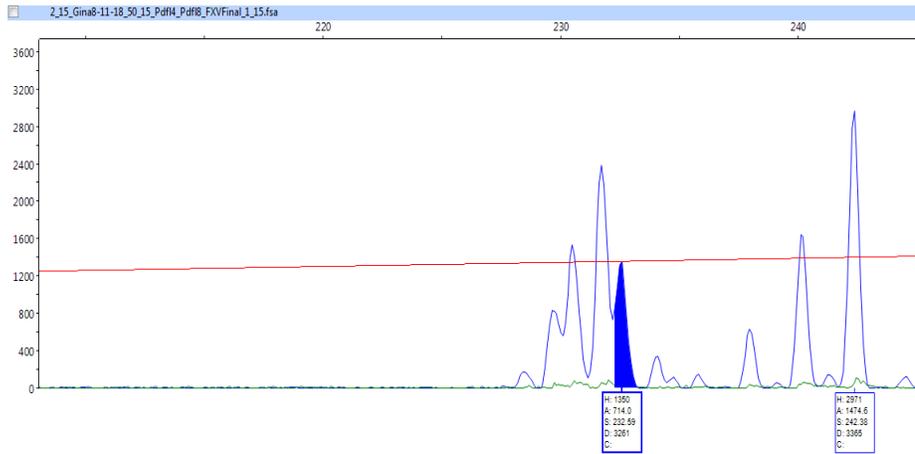
a. Homocigota para el alelo Pf1s



b. Homocigota para el alelo V

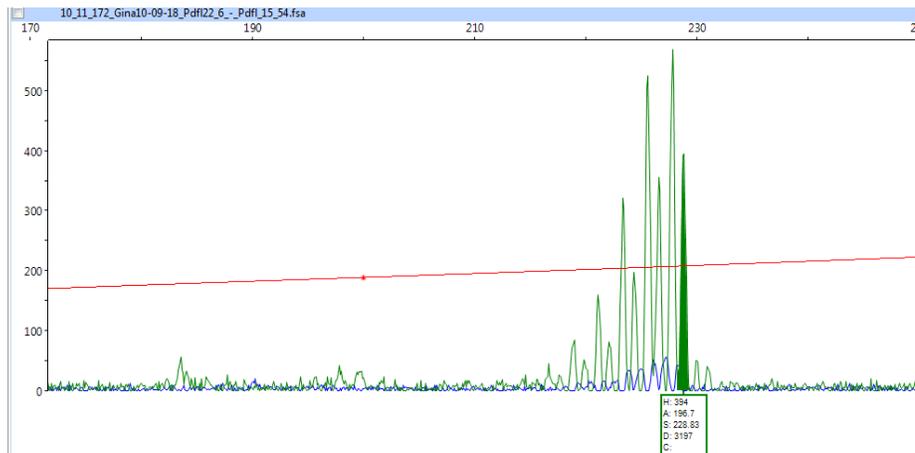


c. Heterocigota

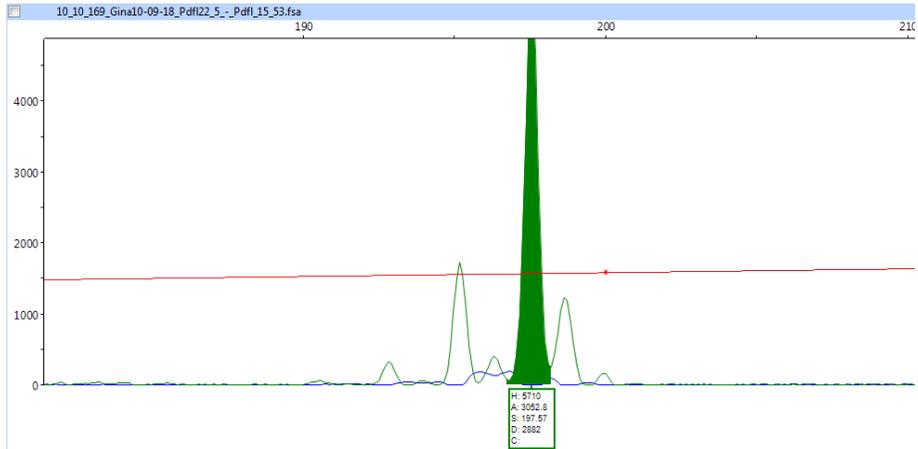


14 PdfI 22

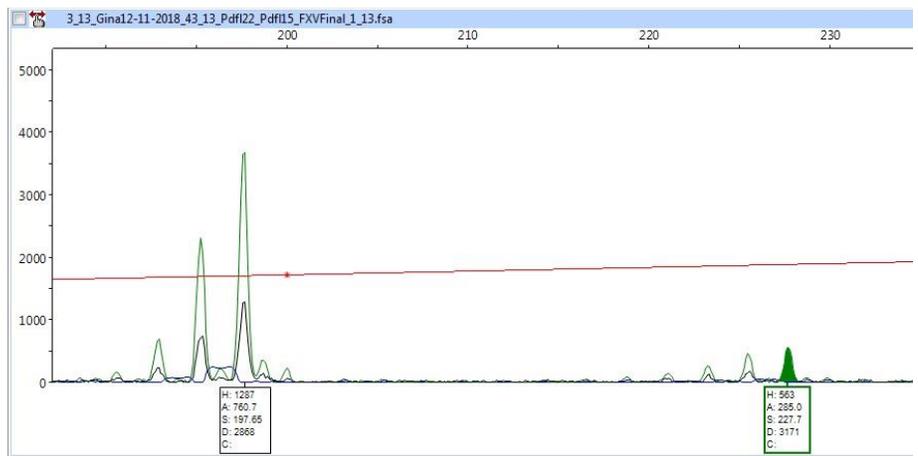
a. Homocigota para el alelo Pf1s



b. Homocigota para el alelo V

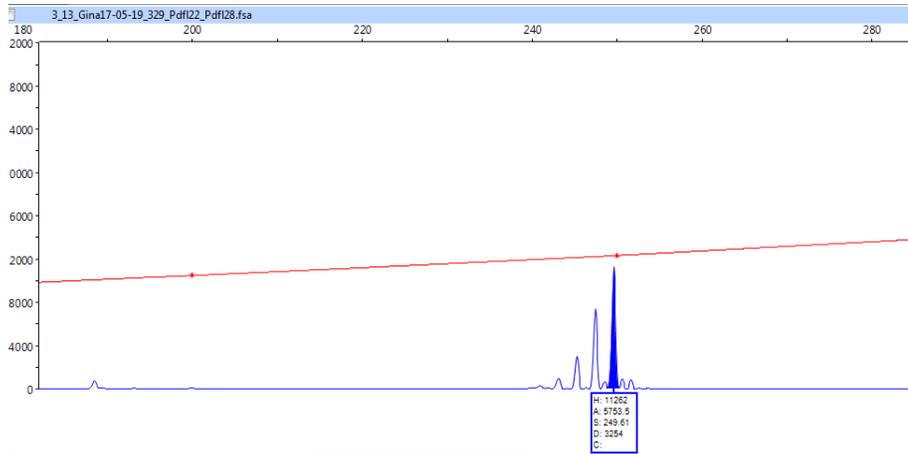


c. Heterocigota

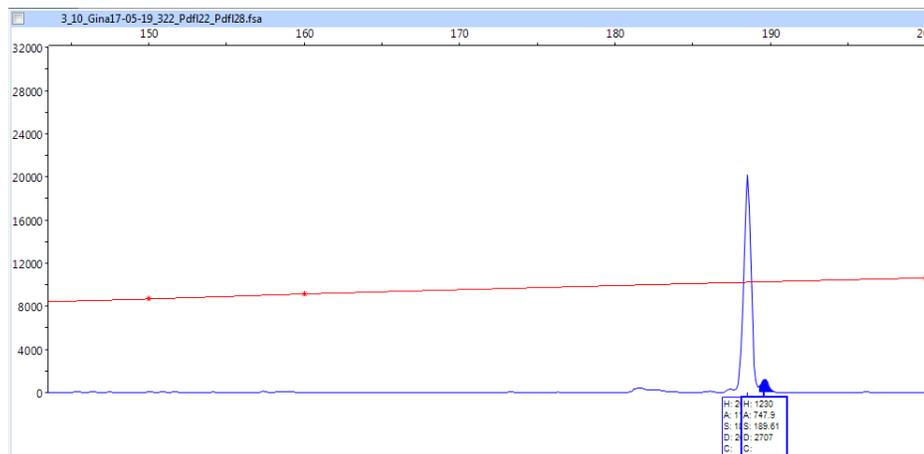


15 Pdf 28

a. Homocigota para el alelo Pf1s



b. Homocigota para el alelo V



c. Heterocigota

