



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

Desarrollo de poblaciones de mapeo para uso y domesticación de recursos fitogenéticos nativos

Ing. Agr. Pablo Andrés Sandro García

Magíster en Ciencias Agrarias opción Ciencias
Vegetales

Dic 2020

Tesis aprobada por el tribunal integrado por PhD. Ariel Castro, PhD. Paola Gaiero, y PhD. Gustavo Schrauf, el 2 de diciembre de 2020. Autor: Ing. Agr. Pablo Sandro. Director PhD. Pablo Speranza, Co-directora PhD. Lucía Gutiérrez.

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis representa el final de un ciclo el cual estoy muy feliz de cerrar. Es posible cerrar este ciclo por el soporte y apoyo de mucha gente que participó directamente e indirectamente en el proyecto. A mi familia por el apoyo durante toda mi carrera como estudiante. A Cybill, Germán, Inés, Paola, Venancio, ayudarme a revisar este trabajo y por el apoyo durante este proceso. Debo agradecer a Gina, Nicolás, Pablo Posada por compartir el trabajo en el desarrollo de la población. A Lucía por el apoyo y comprensión en el último empujón para sacar este trabajo adelante. A todas las personas (que son muchas) que estuvieron involucradas en algún momento en este proceso que no estoy nombrando directamente, pero a los cuales voy a estar siempre agradecido.

TABLA DE CONTENIDO

página

<u>PÁGINA DE APROBACIÓN</u>	II
<u>AGRADECIMIENTOS</u>	III
 <u>RESUMEN</u>	 6
<u>SUMMARY</u>	7
<u>1. INTRODUCCIÓN</u>	8
1.1. DOMESTICACIÓN Y EL DESARROLLO DE CULTÍGENOS	8
1.2. TRANSFERENCIA DE CARACTERES DESDE PARIENTES SILVESTRES	11
1.3. POBLACIONES DE MAPEO	13
1.4. MARCADORES MOLECULARES	15
<u>1.5. OBJETIVOS</u>	17
<u>2. DEVELOPMENT OF A RECOMBINANT INBRED LINES POPULATION BETWEEN TWO SUBSPECIES OF <i>PASPALUM DILATATUM</i> POIR.</u>	20
2.1. CORE IDEAS	20
2.2. SUMMARY	20
2.3. INTRODUCTION	21
2.4. MATERIALS Y METHODS	23
2.5. RESULTS	27
2.7. CONCLUSIONS	31
2.8. CONFLICT OF INTEREST STATEMENT	32
2.9. AUTHOR CONTRIBUTION	32
2.10. REFERENCES	32
<u>3. DESARROLLO DE HERRAMIENTAS PARA MEJORAR LA EFICIENCIA DE UTILIZACION DE UNA POBLACION RECOMBINANTE DE <i>SOLANUM COMMERSONI</i></u>	42
3.2. INTRODUCCIÓN	43
3.3. MATERIALES Y MÉTODOS	44

3.4. RESULTADOS	46
3.5. DISCUSIÓN	48
<u>3.7. BIBLIOGRAFÍA</u>	<u>52</u>
<u>4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES</u>	<u>57</u>
<u>7. BIBLIOGRAFÍA GENERAL</u>	<u>59</u>

RESUMEN

Desarrollo de poblaciones de mapeo para uso y domesticación de recursos fitogenéticos nativos

Uruguay presenta una alta riqueza genética en número de especies y géneros, así como dentro de las especies. El uso de los recursos fitogenéticos depende del conocimiento que se tenga de ellos. Además, es importante conocer la arquitectura genética de los caracteres de interés para utilizarlos. Las poblaciones biparentales son la herramienta para comprender la arquitectura genética. La disponibilidad de tecnología en la generación de marcadores moleculares en especies no modelo aumenta la efectividad de las poblaciones biparentales. Ejemplos de especies bien caracterizadas son *Paspalum dilatatum* y *Solanum commersonii*. El objetivo de este trabajo es generar una población biparental de líneas endocriadas recombinante para *P. dilatatum* y valorizar y agregar información a una población biparental recombinante F1 de *S. commersonii*. Se utilizó descendencia por una semilla para generar la población de *P. dilatatum*, la cual fue fenotipada para fecha de floración y genotipada usando GBS. La población de *S. commersonii* fue fenotipada para resistencia a *R. solanacearum* y se desarrollaron marcadores moleculares a partir de secuencias de GBS. *P. dilatatum* mostró segregación transgresiva para fecha de floración y además se logró generar secuencias de GBS. Mientras tanto la población de *S. comersonii* mostró segregación para la resistencia a *R. solanacearum* y se desarrolló un conjunto de marcadores y el primer borrador del mapa de ligamiento para la especie. Ambas poblaciones representan un avance en la valorización y utilización de recursos genéticos nativos y representan un insumo para la generación de conocimiento. Fue posible aplicar técnicas de secuenciación de última generación lo cual consolida la posibilidad de desarrollar e incorporar grandes números de marcadores moleculares. Existen proyectos continuando el trabajo realizado, analizando, incorporando nueva información y mejorando la información ya existente.

Palabras clave: Recursos fitogenéticos, *Paspalum*, *Solanum*, poblaciones biparentales, genética.

SUMMARY

Development of mapping populations for use and domestication of native plant genetic resources

Uruguay has a high genetic richness in several species and genera and within species. The use of genetic resources depends on the knowledge available about them. Also, knowing the genetic architecture behind the traits of interest is the next step in the utilization process. Biparental populations are the most widely used tool in the characterization of genetic architecture. The availability of technology for the generation of molecular markers in non-model species increases the effectiveness of biparental populations. Examples of well-characterized species are *Paspalum dilatatum* and *Solanum commersonii*. The aim of this work is to generate a biparental population of recombinant inbred lines for *P. dilatatum* and to value and add information to a recombinant F1 biparental population of *S. commersonii*. Single seed descent was used to generate the population of *P. dilatatum* which was phenotyped for flowering date and genotyped by means of GBS. The *S. commersonii* population was phenotyped for resistance to *R. solanacearum* and molecular markers were developed from GBS sequences. *P. dilatatum* showed transgressive segregation for flowering date and in addition, genotyping sequences were generated by sequencing a population of 182 individuals. Meanwhile, the population of *S. comersonii* a wide range of segregation for resistance to *R. solanacearum* and an important set of markers was developed with which a draft linkage map for the species was developed. Both populations represent an advance in the valorization and use of native genetic resources. In addition, they represent an input for the generation of knowledge. State-of-the-art sequencing techniques could be applied, which consolidates the possibility of developing and incorporating large numbers of

molecular markers. There are projects continuing the work done, analyzing, incorporating new information, and improving existing information.

Key words: Genetic resources, *Paspalum*, *Solanum*, biparental populations, genetics.

1. INTRODUCCIÓN

Uruguay se encuentra en el área de conjunción entre el ecosistema de la mata atlántica y la pradera pampeana y presenta una alta riqueza genética en número de especies y géneros, así como dentro de las especies (FAO, 2007). En el conjunto existen varias especies que presentan potencial para ser domesticadas, así como parientes silvestres de especies cultivadas los cuales representan una importante fuente de germoplasma (FAO, 2011). La utilización de recursos genéticos nativos adaptados a condiciones locales es central para los esfuerzos de la agricultura para adaptarse y mitigar los efectos del cambio climático. Las primeras etapas de colecta, caracterización y creación de colecciones son vitales para poder utilizar los recursos genéticos de una manera eficiente (Abadie y Beretta, 2001). Colecciones que representen la diversidad genética útil son la base desde donde generar planes de acción para incorporar los recursos genéticos de manera eficiente en programas de mejoramiento genético y finalmente en la agricultura (FAO, 2007). Esto implica que la utilidad de los recursos genéticos está determinada por la información que de ellos se posea, así como de contar con una estrategia para su utilización. La sola descripción de las bondades de una especie o su diversidad no es suficiente para que sean utilizadas de forma apropiada (FAO, 2011). Se requiere ir más allá y conocer cuáles son los mecanismos genéticos que explican la diversidad genética existente para definir las estrategias de utilización más adecuadas para el tipo de herencia, modo de reproducción y ploidía. Por ejemplo la transferencia de características determinadas por uno o pocos genes con efecto mayor será mucho más simple que la transferencia de una característica explicada por varios genes con efecto menor (Stuber et al., 1999). Las posibilidades de domesticación o transferencia de recursos genéticos al pool genético primario y su disponibilidad para el mejoramiento dependen de conocer la estructura genética de las características

1.1. DOMESTICACIÓN Y EL DESARROLLO DE CULTÍGENOS

Las plantas cultivadas son especies que no se encuentran en la naturaleza y se definen como cultígenos. La palabra cultígeno fue acuñada por Bailey en 1918, y es utilizada para definir plantas que han sido modificadas por acción de la selección humana durante el proceso de domesticación (Spencer y Cross, 2007). Las diferencias entre especies silvestres y cultivadas están dadas por un conjunto de características asociadas a la domesticación, como son la reducción del desgranado, la falta de dormición en la semilla, pérdida de respuesta al fotoperiodo, maduración sincronizada, entre otros cambios fisiológicos y morfológicos que facilitan la propagación y el cultivo en un ambiente antrópicamente modificado (Allaby, 2014; De Wet y Harlan, 1975). Además, muchos de los cultivos actuales como el trigo, la papa, la frutilla y los cítricos son cultígenos que no derivan de una especie silvestre sino de una combinación híbrida que sólo se conoce en su forma cultivada (Hancock, 2012). Por otro lado, en las especies forrajeras el objetivo de selección no es el grano/semilla o las estructuras reproductivas y esto tiene como consecuencia que muchas especies forrajeras perennes presenten un grado de domesticación incipiente con problemas en la propagación (Gepts, 2006). En los cultivos mayores el conjunto de caracteres asociados al síndrome de domesticación se desarrolló en un periodo extendido de tiempo (Allaby, 2014). Se sugiere que estos caracteres fueron apilados mediante selección como por ejemplo la pérdida del desgranado en arroz (*Oryza sativa* L.) (Fuller et al., 2010), trigo (*Triticum aestivum* L.) (Fuller et al., 2010; Tanno, 2006) y cebada (*Hordeum vulgare* L.) (Fuller et al., 2010). Para estos cambios se sugiere un periodo de tiempo de 3000 a 4000 años (Fuller et al., 2010). Otro ejemplo es la respuesta al fotoperiodo en soja para la que se propone un periodo de 3000 años para la acumulación secuencial de genes modificadores del fotoperiodo (Lu et al., 2020). A través del uso de la batería de técnicas disponibles, estas características pueden ser identificadas en líneas individuales y apiladas utilizando métodos clásicos de mejoramiento, cruza, retrocruza y selección, acelerar el proceso de domesticación. Un ejemplo del uso de técnicas para acelerar el proceso de

domesticación es el trabajo en la domesticación de *Thlaspi arvense* L. (pennycress) (Chopra et al., 2020). Además, existen diferentes propuestas para acelerar el proceso de domesticación de nuevos cultivos o incorporar diversidad por medio de la re-domesticación de cultivos (Chopra et al., 2020; Crain et al., 2020; L. DeHaan et al., 2018, 2020; L. R. DeHaan y Van Tassel, 2014; Van Tassel et al., 2017; Zsögön et al., 2018). También existen ejemplos en especies forrajeras donde se combinaron características por cruzamientos entre diferentes especies en el género *Paspalum* (Novo et al., 2020; Schrauf et al., 2003) así como también otras combinaciones híbridas incluso comercializadas en Uruguay como el caso del *Festulolium*. El común denominador de los procesos de domesticación de nuevas especies es la aplicación de tecnología de manera intensiva para reducir el tiempo necesario para obtener una especie que pueda ser incorporada en los esquemas agrícolas actuales.

Paspalum dilatatum Poir. es un ejemplo de una especie nativa en proceso de domesticación. Si bien fue una de las primeras gramíneas forrajeras estivales que se intentó domesticar con esfuerzos que datan de principios del siglo XX (Star y Brooking, 2006) esto no se ha logrado completamente. La principal barrera en la domesticación de esta especie se debe al sistema reproductivo de tipo apomíctico. La apomixis es un tipo particular de reproducción asexual por medio de semilla donde el embrión se desarrolla a partir de una célula somática sin reducir. En *P. dilatatum*, este tipo de reproducción resulta en una barrera para la hibridación, recombinación y creación de variabilidad limitando el potencial para generar innovación en los materiales disponibles. Además, el retardo en la fecundación hace a las espiguillas susceptibles a la infección por *Claviceps* lo cual reduce la calidad de la semilla y genera problemas de fitotoxicidad. Si bien, a lo largo de los años se han liberado cultivares de *P. dilatatum* (Burson et al., 2009; Millot, 1969; Schrauf et al., 2003), la mayoría de estos cultivares resultan en diferentes líneas clonales dentro del clon más extendido para la especie (Speranza, 2009). A pesar de lo anterior, *P. dilatatum* pertenece a un complejo alopoliploide que, además de varios biotipos apomícticos, contiene cinco biotipos tetraploides sexuales. Los biotipos tetraploides sexuales

presentan la misma fórmula genómica y pueden ser hibridados artificialmente con grados variables de fertilidad (revisado en Speranza, 2009). Además, el grado de homología cromosómica entre los biotipos tetraploides es alto y la transferibilidad de marcadores de tipo microsatélite entre ellos es eficiente (Speranza y Malosetti, 2007).

Al comienzo, los biotipos sexuales fueron utilizados en los estudios genéticos como un sustituto citológico de los biotipos apomícticos (Bennett y Bashaw, 1966; Millot, 1969) o como fuentes de sexualidad para el mejoramiento de los apomícticos (Burton y Hanna, 1992). En los últimos años existen ejemplos de cruzamientos interespecíficos entre especies sexuales (Schrauf et al., 2003) y entre especies sexuales y apomícticas (Novo et al., 2020) dentro del género con el objetivo de combinar y transferir caracteres de interés agronómico. Hasta más recientemente no se había prestado atención al potencial agronómico de estos materiales y sus posibles combinaciones para facilitar la domesticación. Lamentablemente la posibilidad de acelerar el proceso de domesticación en muchas especies forrajeras se condiciona en la ausencia de información previa sobre el tipo de herencia de las características y cuáles son los factores genéticos que explican la variación observada. Sin conocer los mecanismos de herencia y la arquitectura génica detrás de las características de interés el proceso de producir y seleccionar cultígenos a partir de combinaciones híbridas por medios convencionales sería muy lento. Por lo cual es imperativo desarrollar tecnología y herramientas que permitan comprender los mecanismos genéticos que explican la variabilidad genética en los caracteres que nos interesan y hacer uso de la variabilidad genética disponible en el proceso de domesticación de una manera eficiente.

1.2. TRANSFERENCIA DE CARACTERES DESDE PARIENTES SILVESTRES

El concepto de pariente silvestre es amplio y puede ser abordado de diferentes maneras. Maxted et al., (2006) definen a los parientes silvestres como una especie integrante del mismo género que es utilizada como fuente de diversidad para

especies cultivadas. Últimamente esta definición y el valor relativo de los parientes silvestres se ha ampliado gracias al desarrollo de tecnologías que permiten la modificación de las secuencias genéticas de interés desde los parientes silvestres (Meilleur y Hodgkin, 2004) y el desarrollo de técnicas que facilitan el proceso de transferencia (Gaiero et al, 2018; Prohens et al., 2017). Esto genera interés en la valorización de estos recursos y a su vez, hace urgentes e importantes los esfuerzos de conservación, colecta y caracterización de parientes silvestres debido a la amenaza incipiente de una fuerte pérdida de diversidad inter e intra específica como consecuencia de actividades antrópicas y el cambio climático (Jarvis et al., 2008, FAO 2007). Lamentablemente, esta situación es compleja porque la diversidad genética para la gran mayoría de los parientes silvestres se encuentra subrepresentada en los sistemas de conservación de germoplasma (Castañeda-Álvarez et al., 2016). En Uruguay existen especies emparentadas a cultivos mayores como *Solanum commersonii* Dun. y *Arachis spp*, en las cuales se ha realizado un esfuerzo sostenido en coleccionar, caracterizar y conservar dicha diversidad. *S. commersonii* ha resultado de particular interés por su resistencia a estreses bióticos y abióticos y su potencial para ser transferidas al pool genético de la papa cultivada (*Solanum tuberosum* L.) (Gaiero et al., 2018).

La papa cultivada se encuentra dentro del grupo de cultivos con mayor aporte a la dieta de la sociedad moderna y se trata de una de las especies con mayor disponibilidad de parientes silvestres (Castañeda-Álvarez et al., 2016). Esto pone a disposición una vasta diversidad genética con un amplio rango de resistencias a estreses bióticos y abióticos (Machida-Hirano, 2015), así como características fisiológicas y fenológicas (Castañeda-Álvarez et al., 2016). La papa cultivada comercialmente cuenta con un pool genético reducido respecto a la variabilidad potencial disponible (Hardigan et al., 2017), debido a la propagación clonal y a los diferentes cuellos de botella que ha sufrido desde su domesticación (Glendinning, 1983; Kloosterman et al., 2013; Mendoza et al., 1974) reduciendo la variabilidad genética presente en sus parientes silvestres mayor relevancia.

Una vez identificados genotipos y regiones genómicas con genes de interés es necesario desarrollar las estrategias para hacer disponibles estos genes para el mejoramiento de la especie cultivada. La introgresión de material genético puede ser realizada por medio de cruzamientos y/o con técnicas de biología molecular. La introgresión es el método clásico en el caso de especies alógamas el uso de un sistema de retrocruzas como el utilizado por Carputo et al., (2009). Si el cruzamiento directo no es posible se puede utilizar un cruzamiento puente con una tercera especie inter-fértil entre el dador y el recurrente (Bamberg et al., 1994). Dada la complejidad de las hibridaciones interespecíficas es necesario realizar el seguimiento del material genético de interés se trata de reducir la cantidad de material genético indeseado (revisado en Gaiero et al, (2018)). La segunda alternativa es identificar la secuencia genética específica del gen o factor de expresión que da lugar a la resistencia y utilizar técnicas de ingeniería genética para incorporar la secuencia por medio de transformación (Schouten, 2007; Park et al 2009) edición genómica (Zsögön et al., 2018), o mutaciones dirigidas (Jia et al., 2017). Tanto para la introgresión como para la modificación genética es necesario conocer en profundidad la arquitectura génica que explica la variación observada en los caracteres que estamos interesados en introgresar.

En el caso específico de la papa cultivada, el nivel de ploidía tetraploide ($2n=2x=48$) y las diferencias en número de balance endospermico (EBN *S. tuberosum* =4, EBN *S. commersonii* = 1, EBN *S. chacoense* = 2, EBN *S. malmeanum* = 1) dificultan la hibridación directa con muchos de los parientes silvestres disponibles (Camadro et al., 2004). En Uruguay *S. commersonii* es uno de los parientes silvestres con mayor interés ya que ha mostrado resistencia a estreses bióticos y abióticos, y específicamente genotipos con distintos niveles de resistencia a enfermedades bacterianas como la marchitez bacteriana (agente causal *Ralstonia solanacearum*) y la podredumbre blanda (agente causal *Pectobacterium* ssp.) (González, 2010; Barone et al., 2001; Boschi et al., 2017; Gaiero et al, 2018; Muthoni et al., 2014; Siri et al., 2004, 2009). *S. commersonii* es parte del pool genético terciario de la papa cultivada,

debido a las barreras a la hibridación asociadas a su nivel de ploidía diploide ($2n=2x=24$) y EBN 1. Se han intentado diferentes métodos para la transferencia de la resistencia a la marchitez bacteriana a la papa cultivada como el uso de cruzamientos puente (Gaiero et al., 2017; González, 2010). Si bien hasta ahora no se ha logrado la transferencia completa de la resistencia a la enfermedad se continúa el trabajo en el desarrollo de herramientas que ayuden a facilitar la transferencia del material genético.

1.3. POBLACIONES DE MAPEO

A lo largo de los años se han desarrollado diferentes tipos de poblaciones para identificar los factores genéticos que explican la variación observada en los caracteres de importancia para la producción (Holland, 2007; Stuber et al., 1999). Estos métodos se basan en la utilización y desarrollo de diferentes tipos de poblaciones de diseño, desde las más sencillas poblaciones biparentales a conjuntos de poblaciones diversas con diferentes orígenes (Gupta et al., 2014; Holland, 2007; Stuber et al., 1999).

Las poblaciones biparentales son utilizadas en selección asistida por marcadores y presentan una historia de recombinación conocida y compartida lo cual permite que sean utilizadas en estudios de asociación de marcadores a caracteres complejos. El sistema reproductivo de la especie con la que se está trabaja determina la estructura y tipo de poblaciones que se pueden generar, así como las posibilidades de recombinación (Flint-Garcia et al., 2003). Las poblaciones F_1 son útiles cuando se realizan entre dos individuos heterocigotas, aunque tienen el nivel más bajo de recombinación de este tipo de estudios (Flint-Garcia et al., 2003). Las poblaciones F_2 son utilizadas cuando el cruzamiento original es realizado a partir de dos individuos homocigotas y presenta el mismo nivel de recombinación que la F_1 . Las desventajas de las poblaciones F_1 y F_2 es que las líneas no pueden mantenerse por reproducción sexual y la resolución es baja debido al menor nivel de recombinación (Flint-Garcia et al., 2003). Las poblaciones de retrocruza consisten en la obtención de una

población F_1 que es luego retrocruzada con uno de los padres originales. Estas poblaciones son útiles para acelerar el proceso de identificación de regiones genómicas así como la introgresión de los caracteres de interés (Krishna et al., 2020; Ma et al., 2020; Tanksley et al., 1995). El último tipo de poblaciones son las líneas endocriadas recombinantes (RILs por sus siglas en inglés). Las poblaciones tipo RIL requieren de varios eventos de recombinación para alcanzar la homocigosis. Con cada recombinación mejora la precisión debido a la reducción del tamaño de los bloques de recombinación (Hospital, 2005). Otra fortaleza de las RILs es que luego de obtenidas pueden ser mantenidas por semilla y pueden evaluarse indefinidamente para distintos caracteres y/o ambientes. Las poblaciones de tipo RIL presentan la mejor resolución entre las poblaciones biparentales. Cuando se trata de diseccionar caracteres complejos con muchos genes con pequeños efectos, las poblaciones biparentales se encuentran limitadas por el tamaño poblacional y esta es su principal limitante (Bernardo, 2010). Esta limitante puede ser levantada por medio de estudios de asociación del genoma completo (GWAS por su sigla en inglés) (Korte y Farlow, 2013). En GWAS se utilizan poblaciones de mapeo donde la historia de recombinación entre los genotipos no es uniforme o incluso es desconocida, pudiendo utilizarse poblaciones de diseño o con genotipos con origen variado. Ejemplos de esto son la utilización de poblaciones de mejoramiento o estrategias como la generación de poblaciones de tipo MAGIC (Multi-Parent Advanced Generation Inter-Cross) formadas por cruzamientos entre un conjunto de padres homocigotas y sus híbridos F_1 (Bandillo et al., 2013; Huang et al., 2015). Esta tecnología presenta la promesa de realmente entregar un gran volumen de información, pero también requiere de una gran inversión en dinero, infraestructura y trabajo, combinación difícil de obtener en especies huérfanas.

En el conjunto, esto genera que las poblaciones biparentales sean la mejor herramienta para diseccionar la arquitectura genética en especies no modelo que no cuentan con mapas genéticos. Todas estas estrategias son herramientas que permiten la asociación directa entre marcadores y características, lo cual es muy útil por

ejemplo en los esfuerzos para incorporar germoplasma desde especies silvestres porque permite realizar selección asistida y reducir o conocer la cantidad de ADN que contribuye el padre silvestre.

1.4 MARCADORES MOLECULARES

En los últimos años se ha generado un avance muy importante en la disponibilidad de tecnología para cultivos no modelo. Los avances en las tecnologías de secuenciación de nueva generación (NGS por su sigla en inglés) y sus costos decrecientes hacen posible la incorporación de estas tecnologías y una aceleración sin precedentes en los procesos de mejoramiento (Allendorf et al., 2010; Davey et al., 2011). Por otra parte, existen instituciones que prestan servicios de construcción de bibliotecas y secuenciación masiva por montos accesibles, incluso para especies silvestres ya que no requieren información previa sobre su organización genómica (Ekblom y Galindo, 2011; Kim et al., 2015; Zemlo, 2012).

El genotipado por secuenciación (GBS) es un sistema sencillo que permite analizar una alta cantidad de genotipos combinando la digestión enzimática del ADN con secuenciación de última generación permitiendo la identificación simultánea y el genotipado de marcadores del tipo SNP (del inglés, Single Nucleotide Polimorfism) (Elshire et al., 2011). El genotipado por secuenciación resulta en la obtención de lo que hasta hace un tiempo se consideraba enormes números de marcadores SNPs (Single nucleotide polymorphisms) en especies que cuentan con muy poca información previa (Davey et al., 2011; Ekblom y Galindo, 2011; Kumar et al., 2011). Esto abre las puertas a la posibilidad de generar e incorporar grandes cantidades de información genómica en especies silvestres o que se encuentran en proceso de domesticación. También permite conocer las secuencias y variantes genéticas específicas que se encuentran actuando sobre las características de interés, abriendo la puerta a la utilización de tecnologías como CRISPR-Cas9 con la cual se puede realizar edición genómica sobre caracteres que faciliten por ejemplo la domesticación (Khan et al., 2019).

Tanto *P. dilatatum* como *S. commersonii* cuentan con diversidad genética disponible en colecciones que han sido evaluadas y caracterizadas. A su vez, la disponibilidad de tecnología de secuenciación de última generación hace posible generar marcadores moleculares abundantes e informativos. En este contexto es posible generar la información necesaria para comprender la arquitectura genética de los caracteres interesantes en cada especie. El desarrollo de poblaciones de mapeo en combinación con marcadores moleculares y caracterización fenotípica es uno de los pasos que facilitarán la utilización de los recursos fitogenéticos.

1.5. OBJETIVOS

1. Desarrollar la primera población de mapeo biparental para *Paspalum dilatatum* Poir. para ayudar en la comprensión de la herencia de caracteres de interés para la domesticación de la especie.
2. Desarrollar herramientas sobre una población de mapeo para *Solanum commersonii* Dunal. para facilitar la comprensión de la estructura genética de la resistencia a la marchitez bacteriana (agente causal *Ralstonia solanacearum*).

2. DEVELOPMENT OF A RECOMBINANT INBRED LINES POPULATION BETWEEN TWO SUBSPECIES OF *PASPALUM DILATATUM* POIR.

Pablo Sandro¹, Lucia Gutierrez², Pablo Speranza¹.

1. Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Garzón 780, Montevideo, Uruguay e-mail: pasp@fagro.edu.uy.

2. Agronomy Department, University of Wisconsin, MooreHall 1575 Linden, Madison, WI, USA

2.1. CORE IDEAS

1. Domestication of forage grasses can be accelerated using available tools to understand the genetic of complex traits.
2. The Single Seed Descent method was successfully used to generate a RIL population in a perennial species.
3. The population generated showed high genetic diversity and was successfully sequenced using Genotyping by Sequencing.

2.2. SUMMARY

There have been significant efforts to domesticate *Paspalum dilatatum* Poir.. The efforts have not yielded the expected results. This is a consequence of poor seed quality, problems with the crop establishment and susceptibility to *Claviceps paspali*. *P. dilatatum* is part of the Dilatata group, along with other apomictic biotypes and tetraploid species with sexual reproduction. Among the tetraploid species, *P. dilatatum* subsp. *flavescens* and *P. dilatatum* biotype Virasoro show particular interest because of their forage quality, resistance to ergot and sexual reproduction. A mapping population could help to dissect the genetic architecture of complex traits. The objective of this work is to develop a mapping population of recombinant inbred lines from the cross between the subspecies *flavescens* and the biotype Virasoro. We developed a population of 180 recombinant inbred lines (RILs) by the single seed descendant method (SSD). The population was sequenced using genotyping by sequencing (GBS) technology. At the same time, a characterization trial was conducted. To determine the diversity of the population, we analyzed the heading date (HD). The trait HD showed a heritability of 0.8. We developed a protocol for the development of populations of RILs by the SSD method in a perennial warm season

forage species. The genotypic variation for quantitative traits is high. The GBS was successful, and it is the first time it has been developed in this type of population for the species. This population will help in the process of dissecting complex traits and speed the domestication of *P. dilatatum*.

Key words: Paspalum. RILs, biparental populations, diversity, domestication.

2.3. INTRODUCTION

The domestication syndrome is the accumulation of mutations through human selection that leads to an easier harvest and human propagation. This is the first step from a wild species towards a domesticated crop (Harlan, 1992). The sometimes-competing goals over reproductive and vegetative structures bring forage grasses to a state of incipient domestication (Gepts, 2004). This has created challenges to seed production in several of the forage grass species where the harvest and propagation structures are different (i.e. forage biomass/seed). *Paspalum dilatatum* Poir. is one of the first warm-season forage grasses with domestication efforts in modern times (Star & Brooking, 2006). *P. dilatatum* has warm-season forage production and cold resistance, a desirable and uncommon combination among warm-season grasses (Campbell, Mitchell, & Field, 1999). However, the main limitations for its productive adoption have been problems in seed production, susceptibility to ergot (Caused by *Claviceps paspali*) (Skerman & Riveros, 1992), and difficulties in crop establishment associated with seed dormancy and seed quality (McCormick, Boschma, & Scott, 2009). These problems are shared with other warm forage grasses in the Panicoideae tribe (Fairey et al. 1997). To speed up the domestication process of *P. dilatatum* it would be necessary to understand the genetic architecture of domestication traits (Chopra et al., 2020; L. DeHaan et al., 2020). *P. dilatatum* is part of an allopolyploid complex that includes apomictic clones and five allotetraploid biotypes with the sexual reproductive system (Speranza, 2009). Tetraploid species do not have problems in seed production and show very low levels of infection with ergot (Schrauf et al., 2003).

Among the tetraploids of the complex, subspecies *flavescens* (*Paspalum dilatatum* subsp. *flavescens* Roseng., Arrill. & Izag.) and biotype Virasoro (*Paspalum dilatatum* Poir biotype “Virasoro”) show characteristics that make them suitable for their use as forage species such as size, production, cycle, forage quality, resistance to ergot, and good seed production. Specifically, both Biotype Virasoro and the subspecies *flavescens* have high quality. Different heading dates between the species have been found while biotype Virasoro shows a very low seed dormancy and subspecies *flavescens* has been shown to exhibit local adaptation with high forage yield (Glison, Viega, Cornaglia, Gutiérrez, & Speranza, 2015; González Barrios et al., 2016; Speranza, 2009). Hybridization between subspecies *flavescens* and Biotype Virasoro has been successful (Schrauf et al., 2003; Speranza & Malosetti, 2007; Vaio et al., 2007) as well as with other species of the genus (Novo et al., 2020). Different levels of fertility were observed between artificial hybridizations among individuals of biotype Virasoro and subspecies *flavescens* (Caponio & Quarín, 1990; Quarín & Caponio, 1995). Furthermore, disomic inheritance has been shown in the hybrids between them (Speranza & Malosetti, 2007). This is expected since these tetraploid species share the IIJJ genomic formula (Burson, 1979; Burson & Bennett, 1972; Caponio & Quarín, 1990; Quarín & Caponio, 1995). In their natural distribution, they are geographically isolated with no gene flow among them (Speranza, 2009).

A balanced recombinant inbred line population (RIL) has never been developed before for these *Paspalum* species. The construction of RILs as mapping population to dissect characters with a complex genetic architecture is common practice in breeding programs (Ariyaratne et al., 1999; Florez-Palacios et al., 2020; Gore, Percy, Zhang, Fang, & Cantrell, 2012; Oard et al., 2010; Riera-Lizarazu, Peterson, Wang, & Leonard, 2010; Thompson, Smiley, & Garland-Campbell, 2015; Yuan et al., 2002; Zhang, 2020; Zhang, Idowu, & Wedegaertner, 2020). A recombinant inbred line (RILs) population will help to understand the genetic mechanism behind the characters of interest speeding up the process of domestication (Chopra et al., 2020; L. DeHaan et al., 2020; L. DeHaan & Van Tassel, 2014). The availability of

next-generation sequencing (NGS) technology facilitates the accessibility to high volumes of molecular information (Ekblom y Galindo 2011, Davey et al. 2011, Kumar et al. 2011) even in species without a reference genome (Harfouche et al., 2012; Poland & Rife, 2012; Shapter et al., 2013; Walter, Studer, & Kölliker, 2012). The possibility of having thousands of molecular markers distributed through the genome and the possibility of genotyping thousands of individuals open new possibilities to build a linkage map and the dissection of the genetic architecture using whole-genome association.

In summary, subspecies *flavescens* and biotype “Virasoro” have been reported as very differentiated in their germinative behavior (Glison et al., 2015), heading date (González Barrios et al., 2016), forage quality, and development dynamics (com pers Dr. Pablo Speranza). Understand the inheritance of domestication traits could speed up the domestication process of *P. dilatatum*. The objective of this work is to develop a biparental population of recombinant inbred lines between subspecies *flavescens* and biotype Virasoro to be used as a breeding tool.

2.4. MATERIALS Y METHODS

A cross (accession number 7599) between subspecies *flavescens* (accession number 7218) and biotype Virasoro (accession number 7207) was performed in the year 1993. Genotype Pfl from subsp. *flavescens* and Vir1 for biotype Virasoro were used. Details of the cross are described in Speranza et al. 2007. The F₂ seed was stored in the germplasm bank of Facultad de Agronomía, Universidad de la República in Montevideo, Uruguay. A total of 400 F₂ seeds from a single F₁ plant was germinated in 2015 following Schrauf et al., (1995). Briefly, seeds were imbibed with a 0.2% KO₂ solution and put in a growth chamber with 30-25 C° and 16/8 h of light/dark in a Petri dish plate. For all following generations, once all the viable seeds on the plate had germinated, three random plants were transplanted to a 22 cm diameter pots. After two weeks, when the plants reached the three-leaf stage, and thinning was conducted to a single plant per pot. As the plants reached physiological maturity, their seed was manually harvested until at least 100 viable seeds were obtained. The

subsequent step was to put the lines to germinate again and the process was repeated until F₆.

The plants were grown in the greenhouses of Facultad de Agronomía in Montevideo, Uruguay. Supplementary light and temperature were provided from May to August in a growing chamber with a range of temperature between 18 and 25 °C and compensatory light from 5.00 AM to 11 AM and 4:00 PM to 9:00 PM.

At F₆ generation 180 lines were randomly sampled to conform the final population. This number was arbitrarily determined based on the number of slots available in the sequencing plates for genotyping.

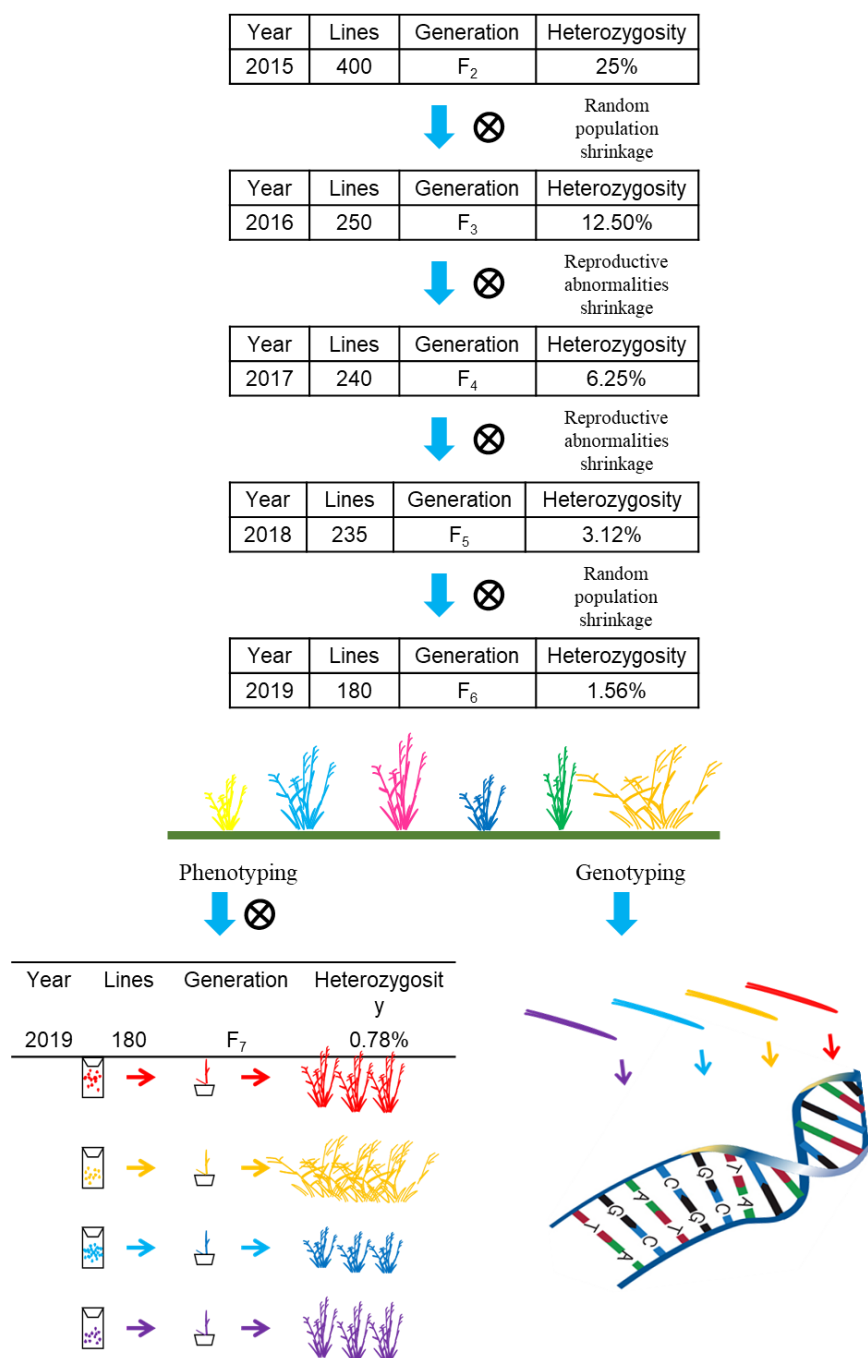


Figure 1. Strategy for the development of a *Paspalum dilataum* biparental population by single seed descendent (SDD). The figure shows the number of lines, generation, % of expected heterozygote loci segregation year. Approximately, 100 seeds of each plant was harvested, 20 seeds were geminated, three plants were transplanted, and one plant growth until maturity at each generation. The cycle was repeated from F₂ to F₆. Tissue was collected from each F₆ plant and DNA was extracted to genetic

analysis.

Both parents and the 180 final recombinants inbred lines (F₆) were germinated and transplanted to pots. Plants were transplanted to the field when they reached tillering stage. The phenotypic trial was planted in Facultad de Agronomía in Sayago Montevideo, Uruguay (Lat 34°50' 13.17"S, Long 56°13' 22.96"O). The field trial was arranged in a randomized complete block design with three repetitions and each plot consisting of three individual plants. Data on phenological traits were taken following the methodology reported (González Barrios et al., 2016). The heading date was taken for each plant in the plot. The number of panicles emerged was counted and the data recorded with the plants being considered fully headed when five panicles emerged (González Barrios et al., 2016). Best linear unbiased estimators (BLUE) were obtained for each line using mixed models correcting for spatial heterogeneity with the following linear mixed model:

$$y_{ijklm} = \mu + G_i + \beta_j + R_k + C_l + \varepsilon_{ijkl} + \delta_{m(ijkl)}$$

where y_{ijklm} is the response variable (i.e. heading date), μ is the overall mean, G_i is the effect of the i^{th} genotype, β_j is the effect of the j^{th} block, R_k is the effect of the k^{th} row, C_l is the effect of the m^{th} column, ε_{ijklm} is the experimental error, and $\delta_{m(ijkl)}$ is the effect of the k^{th} plant nested into the $ijkl^{\text{th}}$ plot, assuming $R_k \sim N(0; \sigma_R^2)$, $C_m \sim N(0; \sigma_C^2)$, $\varepsilon_{ijklm} \sim N(0; \sigma_\varepsilon^2)$, $\delta_{m(ijkl)} \sim N(0; \sigma_p^2)$. σ_R^2 the among row variance, σ_C^2 the among columns variance, σ_ε^2 the experimental error variance, σ_p^2 the among plants variance. Random effects were assumed as independent.

Analyses were performed using R Statistical program (R. Core Team, 2013) with the package *lsmeans* (Lenth, 2016). The information of row and columns was used to capture part of the spatial heterogeneity not controlled for the block.

We cut a piece of 5 cm from the middle leaf of the youngest expanded leaf on the principal tiller and this sample was lyophilized. Population development was not uniform due the wide range of heading time, as consequence, tissue was collected in

two stages. Plates with 96 available wells in each one was filled with 180 individual F_6 plants in each and 10 positions were filled with the parents, having each parent repeated five times in each plate. The objective of this was to ensure good quality data from the parents. The samples were shipped to the DNA Sequencing Facility of the Biological Center in the University of Wisconsin at Madison for DNA extraction, enzyme testing, library construction, and DNA sequencing. A sample of the population was tested for the most common restriction enzymes used in GBS. The digestion of the DNA was successful in all the enzymes tested but the enzyme *ApaI* was chosen because of its high-quality performance and its common use in sequencing de novo. Because $F_{6,7}$ plants were used for genotyping but F_6 plants were used for phenotyping, the phenotyped plants may vary due to the remaining heterozygosity but on average they represent the genotyped individual.

2.5. RESULTS

One population with 180 recombinant inbred lines F_6 was obtained for the interspecific hybrid population of subspecies *flavescens* and Biotype Virasoro using the method of single seed descent of a warm-season perennial forage species. Two random reductions had to be performed to obtain the desired 180 lines. Because plants were grown under optimal growing conditions, fewer plants than expected were lost during the single seed descent process. The population started with 400 lines, after one generation it was reduced to 250 individuals by random sampling. A low percentage (5 to 3%) of infertile lines was observed which could not be explained by pollen or meiosis abnormalities upon preliminary observation. At the F_5 generation a total of 240 individuals were available, and they had to be reduced again to 180 plants by random sampling.

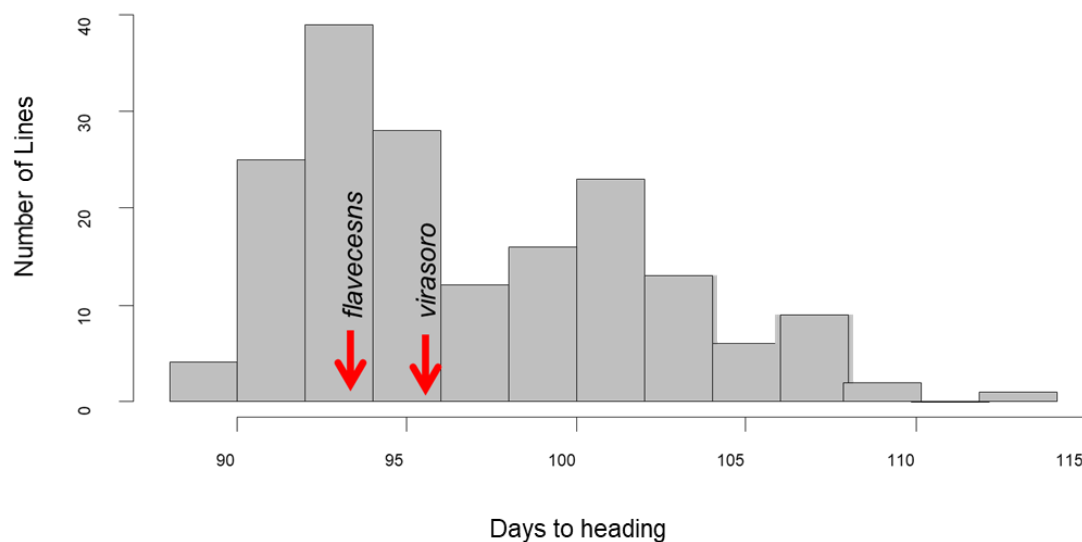


Figure 2. Histogram for heading date in a *P. dilatatum* subsp. *flavescens* x Virasoro biparental population of 180 F₆ RILs.

An unexpected wide range for heading date was found in this population. The population had an average of 97 days to head with a minimum of 88 and a maximum of 113 days to heading (Figure No. 2). The parental lines showed an average of 94 days to heading for the parental line of subspecies *flavescens* and 95 days to heading for biotype Virasoro. The broad-sense heritability for heading date was 0.80 (Table No 1).

Table 1. Variance components estimation and heritability in *Paspalum dilatatum* Poir. biparental population of 180 RILs.

Source of variance	Variance
Line	23.76
Block	0.18
Row	0.26
Column	1.31
Residual	18.19
Heritability	0.80

We generated a library of sequences by genotyping by sequencing for the mother plants of the phenotyped population. Five enzymes were evaluated during the process of enzyme selection, *apeKI* was chosen for the preparation of the libraries for GBS. *ApeKI* was the enzyme that performed better in our study. The 180 individuals and the parents resulted in 700 Gb of pair-end reads which is currently being processed and analyzed.

2.6. DISCUSSION

A recombinant inbred population in a warm-season perennial forage species was obtained through the single seed descent method. This method has been widely used and well known in annual autogamous species (Fehr, Fehr, & Jessen, 1991; Poehlman & Sleper, 2006) since the first outline was proposed by Goulden (1939) and used by first time by Brim (1966), but it has not been popular in perennial species. We created protocol for our work based on recommendations for annual autogamous species (Fehr et al., 1991). Perennial species need favorable conditions to reach flowering, this implies that stress may delay flowering. The consequence of this is that the rate of plants harvested and advanced from F_2 to F_3 was higher than expected based on the available literature. In generation $F_{3,4}$ randomly sampling 150 plants were discarded from the initial 400 lines. Optimal photoperiod and temperature for this species is unknown but grasses have very specific requirements, understanding these requirements could lead to future work for speed breeding protocols (González-Barrios, Bhatta, Halley, Sandro, & Gutiérrez, 2020; Hickey et al., 2019). Our population responded to a photoperiod of 16 light hours (long day conditions) and a temperature between 15 to 25 C° but the population showed a wide range of responses to these conditions.

An unexpected result was the wide range of heading dates on the population. Heading date is one the reasons for choosing the cross between subspecies *flavescens*

and biotype Virasoro in general. We had a particular interest in understanding the genetic structure of heading date since it is related to the seasonality of forage production and quality. In spite of the general behavior of the parental biotypes, the specific lines used in this population did not show big differences in heading date; however, there was a wide variability in heading dates among the RILs. Wide ranges for heading date in segregating populations derived from progenitors with similar phenology have been reported (Castro, Hayes, Viegas, & Vales, 2008; Koide et al., 2019) or different biotypes (Johansen-Morris & Latta, 2006). Also, the population showed a wide range of phenotypical differences (Figure 3) (Data not shown). The range of heading date phenotypes observed among the RIL population suggests wide transgressive segregation, defined as the presence of lines with phenotypes beyond the range shown by the parental lines (Poehlman & Sleper, 2006). This phenomenon is common in cultivated plants but not frequently observed in wild species, probably due to the scarcity of available studies (Rieseberg, Archer, & Wayne, 1999). Also, transgressive segregation has been pointed to be associated with autogamous reproductive systems (Rieseberg et al., 1999), as in the parental biotypes (Sandro, Gutiérrez, & Speranza, 2019; Speranza & Malosetti, 2007; Speranza, 2009). This observation enhances the potential of crosses among sexual biotypes for the domestication of *P. dilatatum* confirming the complementarity between these subspecies and the possibility of generating recombinant lines with new characters, as has been shown in other species of the genus (Novo et al., 2020).

The broad-sense heritability is high, which is coincident with previous works in the same species where high values of heritability were found for this trait (González Barrios et al., 2016). The amount of genetic diversity observed in heading date and other characters would enhance the possibilities of selecting for different cycles in combination with other qualities that make this population valuable not only for understanding complex traits, but also as breeding population.

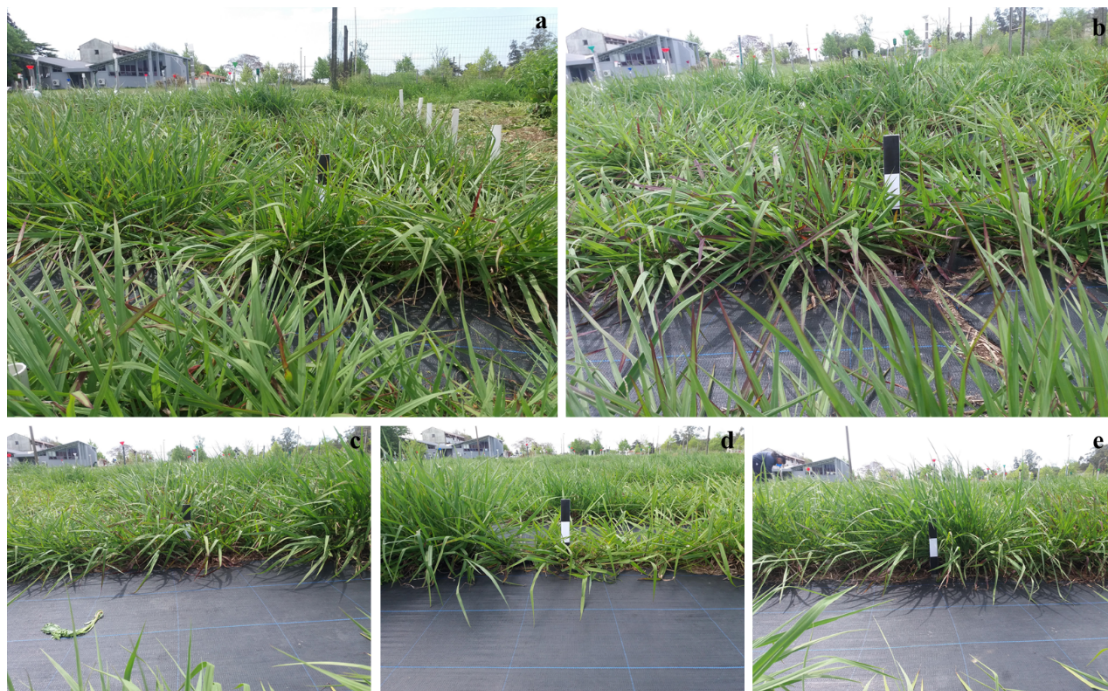


Figure 3. Example of phenotypic variation in a *P. dilatatum* subsp. *flavescens* x Virasoro biparental population of 180 F₇ RILs. a. *P. dilatatum* subsp. *flavescens* b. Virasoro c. RIL FV 140 d. RIL FV 219 e. RIL FV 50.

Although we obtained sufficient amount of data, other enzymes could be used in the future to improve marker coverage. A better coverage would improve the anchoring in the reference genome and would in turn help in the refinement of the reference genome. The marker calling from GBS will generate a volume of genomic information which has never been available in this species before. It is expected that it would be possible to obtain the first high coverage genetic map for the species. When marker data are combined with phenotypic data it will be possible analyze the genetic mechanisms behind complex quantitative traits. This would be a valuable tool in the process of domestication of the species helping in the process of recombining and transferring characters and reducing the time necessary for achieving the domestication of the species. This analysis is currently underway.

2.7. CONCLUSIONS

The development of this population provides a valuable tool for the domestication of *Paspalum dilatatum* and recombining the diverse sources of germplasm in an

efficient way. This population would help dissect the genetic architecture of complex traits. The transgressive segregation observed for heading date represents an important characteristic for adding variability to the forage production and breeding. The GBS data available represents an invaluable tool that would enhance the knowledge of this species.

2.8. CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare do not have any conflict of interest regard this investigation.

2.9. AUTHOR CONTRIBUTION

Pablo Speranza. Idea original, project, read and commented on the manuscript.

Lucía Gutiérrez. Intellectual contributor read and commented on the manuscript.

Pablo Sandro. Executed the project, wrote the manuscript.

2.10. REFERENCES

- Ariyaratne, H. M., Coyne, D. P., Jung, G., Skroch, P. W., Vidaver, A. K., Steadman, J. R., Miklas, P. N., & Bassett, M. J. (1999). Molecular mapping of disease resistance genes for halo blight, common bacterial blight, and bean common mosaic virus in a segregating population of common bean. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 124(6), 654–662. <https://doi.org/10.21273/JASHS.124.6.654>
- Berke, T. G., & Rocheford, T. R. (1995). Quantitative trait loci for flowering, plant and ear height, and kernel traits in maize. *Crop Science*, 35(6), 1542–1549. <https://doi.org/10.2135/cropsci1995.0011183X003500060004x>
- Brim, C. A. (1966). A Modified pedigree method of selection in soybeans. *Crop Science*, 6(2), 220–220. <https://doi.org/10.2135/cropsci1966.0011183X000600020041x>
- Burson, B. L. (1979). Cytogenetics of *Paspalum urvillei* × *P. intermedium* and *P. dilatatum* × *P. paniculatum* hybrids. *Crop Science*, 19(4), 534–538.

- Burson, B. L., & Bennett, H. W. (1972). Genome relations between an intraspecific *Paspalum dilatatum* hybrid and two diploid *Paspalum* species. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 14(3), 609–613.
- Campbell, B. D., Mitchell, N. D., & Field, T. R. O. (1999). Climate profiles of temperate C3 and subtropical C4 species in New Zealand pastures. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 42(3), 223–233.
- Caponio, I., & Quarin, C. L. (1990). Intra- and interspecific hybridization between dallisgrass and vaseygrass. *Crop Science*, 30(2), 362–364.
- Castro, A. J., Hayes, P., Viegas, L., & Vales, I. (2008). Transgressive segregation for phenological traits in barley explained by two major QTL alleles with additivity. *Plant Breeding*, 127(6), 561–568. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2008.01520.x>
- Chopra, R., Johnson, E. B., Emenecker, R., Cahoon, E. B., Lyons, J., Kliebenstein, D. J., Daniels, E., Dorn, K. M., Esfahanian, M., Folstad, N., Frels, K., McGinn, M., Ott, M., Gallaher, C., Altendorf, K., Berroyer, A., Ismail, B., Anderson, J. A., Wyse, D. L., ... David Marks, M. (2020). Identification and stacking of crucial traits required for the domestication of pennycress. *Nature Food*, 1(1), 84–91. <https://doi.org/10.1038/s43016-019-0007-z>
- Davey, J. W., Hohenlohe, P. a, Etter, P. D., Boone, J. Q., Catchen, J. M., & Blaxter, M. L. (2011). Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. *Nature reviews. Genetics*, 12(7), 499–510. <https://doi.org/10.1038/nrg3012>
- DeHaan, L., Larson, S., López-Marqués, R. L., Wenkel, S., Gao, C., & Palmgren, M. (2020). Roadmap for accelerated domestication of an emerging perennial grain crop. *Trends in Plant Science*, 25(6), 525–537. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.02.004>
- DeHaan, L. R., & Van Tassel, D. L. (2014). Useful insights from evolutionary biology for developing perennial grain crops 1. *American Journal of Botany*, 101(10), 1801–1819. <https://doi.org/10.3732/ajb.1400084>

- Ekblom, R., & Galindo, J. (2011). Applications of next generation sequencing in molecular ecology of non-model organisms. *Heredity*, 107, 1-15. <https://doi.org/0018-067X/11>
- Fairey, D. T., Loch, D. S., Hampton, J. G., & Ferguson, J. E. (1997). *Forage seed production tropical and subtropical species* (Vol. 2). Wallingford: CABI 479p.
- Fehr, W. R., Fehr, E. L., & Jessen, H. J. (1991). Principles of cultivar development. W.R. Fehr.
- Florez-Palacios, L., Mozzoni, L., Orazaly, M., Manjarrez-Sandoval, P., Wu, C., Dombek, D., & Chen, P. (2020). Registration of soybean germplasm R11-7999 with high seed protein content and high yield. *Journal of Plant Registrations*, 14(1), 82–86. <https://doi.org/10.1002/plr2.20019>
- Gepts, P. (2004). Crop domestication as a long-term selection experiment. *Plant breeding reviews*, 24(2), 1–44.
- Glison, N., Viega, L., Cornaglia, P., Gutiérrez, L., & Speranza, P. (2015). Variability in germination behaviour of *Paspalum dilatatum* Poir. Seeds is genotype dependent. *Grass and Forage Science*, 70(1), 144–153. <https://doi.org/10.1111/gfs.12119>
- González Barrios, P., Speranza, P., Glison, N., Piccardi, M., Balzarini, M., & Gutiérrez, L. (2016). Analysis of flowering dynamics heritability in the perennial warm-season grass *Paspalum dilatatum*. *Grass and Forage Science*, 71(1), 123–131. <https://doi.org/10.1111/gfs.12159>
- González-Barrios, P., Bhatta, M., Halley, M., Sandro, P., & Gutiérrez, L. (2020). Speed breeding and early panicle harvest accelerates oat (*Avena sativa* L.) breeding cycles. *Crop Science*, csc2.20269. <https://doi.org/10.1002/csc2.20269>
- Gore, M. A., Percy, R. G., Zhang, J., Fang, D. D., & Cantrell, R. G. (2012). Registration of the TM-1/NM24016 Cotton Recombinant Inbred Mapping

- Population. *Journal of Plant Registrations*, 6(1), 124–127.
<https://doi.org/10.3198/jpr2011.06.0334crmp>
- Goulden, C. H. (1939). Problems in plant selection. Proc. Seventh Genet. Cong. *Cambridge University Press*, 132–133.
- Harfouche, A., Meilan, R., Kirst, M., Morgante, M., Boerjan, W., Sabatti, M., & Mugnozza, G. S. (2012). Accelerating the domestication of forest trees in a changing world. *Trends in plant science*, 17(2), 64–72.
- Harlan, J. R. (1992). Origins and processes of. Grass evolution and domestication, 159.
- Hickey, L. T., N. Hafeez, A., Robinson, H., Jackson, S. A., Leal-Bertioli, S. C. M., Tester, M., Gao, C., Godwin, I. D., Hayes, B. J., & Wulff, B. B. H. (2019). Breeding crops to feed 10 billion. *Nature Biotechnology*, 37(7), 744–754.
<https://doi.org/10.1038/s41587-019-0152-9>
- Johansen-Morris, A. D., & Latta, R. G. (2006). Fitness consequences of hybridization between ecotypes of *Avena barbata*: hybrid breakdown, hybrid vigor, and transgressive segregation. *Evolution*, 60(8), 1585–1595.
<https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2006.tb00503.x>
- Koide, Y., Sakaguchi, S., Uchiyama, T., Ota, Y., Tezuka, A., Nagano, A. J., Ishiguro, S., Takamure, I., & Kishima, Y. (2019). Genetic properties responsible for the transgressive segregation of days to heading in rice. G3#58; *Genes|Genomes|Genetics*, 9(5), 1655–1662.
<https://doi.org/10.1534/g3.119.201011>
- Kumar, U. S., Varghese, G., Jacob, T. M., & Thomas, G. (2011). Stratification and population structure of the genetic resources of ancient medicinal rice (*Oryza sativa* L.) landrace Njavara. *Genetic resources and crop evolution*, 58(5), 697–711.
- Lenth, R. (2016). Lsmeans: Least-squares means. Version 2.23-5. *Comprehensive R Archive Network (CRAN)*.

- Mccormick, L. H., Boschma, S. P., & Scott, J. F. (2009). Producer-identified constraints to widespread adoption of sown tropical grass pastures on the north-west slopes of New South Wales. *Tropical Grasslands*, 43, 263–266.
- Novo, P. E., Acuña, C. A., Urbani, M. H., Galdeano, F., Espinoza, F., & Quarín, C. L. (2020). Genetic transfer from several apomictic tetraploid *Paspalum* species to an elite group of sexual plants. *Crop Science*, csc2.20173. <https://doi.org/10.1002/csc2.20173>
- Oard, J. H., Moldenhauer, K., Fjellstrom, B., Nelson, J. C., Scheffler, B., Linscombe, S., Correll, J., Silva, J., & May, G. D. (2010). Registration of the MY2 ‘Cypress’/‘LaGrue’ Rice recombinant inbred line mapping population. *Journal of Plant Registrations*, 4(3), 261–265. <https://doi.org/10.3198/jpr2009.11.0668crmp>
- Poehlman, J. M., & Sleper, D. A. (2006). Breeding field crops (Four).
- Poland, J. A., & Rife, T. W. (2012). Genotyping-by-sequencing for plant breeding and genetics. *The Plant Genome*, 5(3), 92–102.
- Quarín, C. L., & Caponio, I. (1995). Cytogenetics and reproduction of *Paspalum dasyleprium* and its hybrids with *P. urvillei* and *P. dilatatum* ssp. *flavescens*. *International Journal of Plant Sciences*, 156(2), 232–235.
- R. Core Team. (2013). R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria.
- Riera-Lizarazu, O., Peterson, C. J., Wang, G., & Leonard, J. M. (2010). Registration of the OS9XQ36 mapping population of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Plant Registrations*, 4(1), 98–104. <https://doi.org/10.3198/jpr2009.06.0350crmp>
- Rieseberg, L. H., Archer, M. A., & Wayne, R. K. (1999). Transgressive segregation, adaptation, and speciation. *Heredity*, 83(4), 363–372. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6886170>
- Sandro, P., Gutiérrez, L., & Speranza, P. (2019). Distribution of genetic and phenotypic diversity in the autogamous perennial *Paspalum dilatatum* subsp.

- flavescens Roseng., Arrill. & Izag.(Poaceae). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 66(6), 1205–1216.
- Schrauf, G. E., Blanco, M. A., Cornaglia, P. S., Deregibus, V. A., Madia, M., Pacheco, M. G., & Padilla, J. (2003). Ergot resistance in plants of *Paspalum dilatatum* incorporated by hybridisation with *Paspalum urvillei*. 37, 182–186.
- Schrauf, G. E., Cornaglia, P. S., Deregibus, V. A., & Ríssola, M. G. (1995). Improvement in germination behaviour of *Paspalum dilatatum* Poir. Seeds under different pre-conditioning treatments. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 38(4), 501–509.
<https://doi.org/10.1080/00288233.1995.9513152>
- Shapter, F. M., Cross, M., Ablett, G., Malory, S., Chivers, I. H., King, G. J., & Henry, R. J. (2013). High-throughput sequencing and mutagenesis to accelerate the domestication of *Microlaena stipoides* as a new food crop. *PloS one*, 8(12), e82641.
- Skerman, P.J. Riveros, F. (1992). Graminéas Tropicales (FAO, Ed.; Colección). FAO.
- Speranza, P., & Malosetti, M. (2007). Nuclear and cytoplasmic microsatellite markers for the species of the Dilatata group of *Paspalum* (Poaceae). *Plant Genetic Resources*, 5(01), 14. <https://doi.org/10.1017/S1479262107192145>
- Speranza, P. R. (2009). Evolutionary patterns in the Dilatata group (*Paspalum*, Poaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 282(1–2), 43–56.
<https://doi.org/10.1007/s00606-009-0205-5>
- Star, P., & Brooking, T. (2006). Fescue to the Rescue: Chewings Fescue, *Paspalum*, and the Application of Non-British Experience to Pastoral Practice in New Zealand, 1880-1920. En *Agricultural History* (Vol. 80, Número 3, pp. 312–335). <https://doi.org/10.1525/ah.2006.80.3.312>
- Thompson, A. L., Smiley, R. W., & Garland-Campbell, K. (2015). Registration of the LouAu (Louise/IWA8608077) Wheat Recombinant inbred line mapping population. *Journal of Plant Registrations*, 9(3), 424–429.
<https://doi.org/10.3198/jpr2015.01.0002crmp>

- Vaio, M., Mazzella, C., Porro, V., Speranza, P., López-Carro, B., Estramil, E., & Folle, G. A. (2007). Nuclear DNA content in allopolyploid species and synthetic hybrids in the grass genus *Paspalum*. *Plant Systematics and Evolution*, 265(1–2), 109–121.
- Walter, A., Studer, B., & Kölliker, R. (2012). Advanced phenotyping offers opportunities for improved breeding of forage and turf species. *Annals of botany*, 110(6), 1271–1279.
- Yuan, J., Njiti, V. N., Meksem, K., Iqbal, M. J., Triwitayakorn, K., Kassem, My. A., Davis, G. T., Schmidt, M. E., & Lightfoot, D. A. (2002). Quantitative trait loci in two soybean recombinant inbred line populations segregating for yield and disease resistance. *Crop Science*, 42(1), 271–277. <https://doi.org/10.2135/cropsci2002.2710>
- Zhang, J. (2020). Registration of upland cotton cultivar ‘Acala 1517-20’ resistant to Fusarium wilt race 4. *Journal of Plant Registrations*, 14(1), 10–18. <https://doi.org/10.1002/plr2.20022>
- Zhang, J., Idowu, O. J., & Wedegaertner, T. (2020). Registration of glandless ‘NuMex COT 17 GLS’ upland cotton cultivar with Fusarium wilt race 4 resistance. *Journal of Plant Registrations*, 14(1), 1–9. <https://doi.org/10.1002/plr2.20020>

3. DESARROLLO DE HERRAMIENTAS PARA MEJORAR LA EFICIENCIA DE UTILIZACION DE UNA POBLACION RECOMBINANTE DE *SOLANUM COMMERSONII*

3.1. RESUMEN

La marchitez bacteriana (MB) (*Ralstonia solanacearum*) es una de las enfermedades más dañinas para la papa cultivada (*Solanum tuberosum* L.). *S. commersonii* es una especie nativa que presenta resistencia a MB, forma parte del pool genético terciario de la papa cultivada. Utilizar marcadores moleculares y selección asistida en la transferencia de la resistencia. *S. commersonii* es una especie no modelo y los recursos moleculares con los que cuenta son limitados. El objetivo de este trabajo es el desarrollo de herramientas para comprender la arquitectura genética de la resistencia a la MB. Se trabajó con una población biparental entre dos genotipos moderadamente contrastantes para la resistencia a MB. La población se encuentra formada por 192 individuos F₁. Se usó genotipado por secuenciación y se obtuvieron polimorfismos de nucleótido único (SNP). La población se fenotipó en dos ensayos para resistencia a MB. Se obtuvieron 3,154 SNPs de alta calidad utilizados para crear un borrador del mapa de ligamiento de la población. El área debajo de la curva para el desarrollo de la enfermedad (AUDPC) mostró un rango de valores entre 8,7 a 70,3, con los padres mostrando valores de 31,4 y 43,8 para 02.04.1 y 05.05.2.4 respectivamente. Se obtuvieron marcadores de alta calidad que pueden ser utilizados en futuros análisis de asociación. La presencia de individuos con mayor resistencia que el parental resistente permitiría seleccionar individuos para ser utilizados como parentales. Se logró aumentar las herramientas disponibles para esta población de mapeo particular y para la especie *Solanum commersonii* en general.

Palabras claves: Resistencia, diversidad, GBS, SNPs, pariente silvestre.

3.2. INTRODUCCIÓN

La marchitez bacteriana (causada por *Ralstonia solanacearum*) es una de las enfermedades más dañinas para la papa cultivada (*Solanum tuberosum* L.) (Centro Internacional de la Papa, 1996; Elphinstone, 2005) y otras especies cultivadas del género *Solanum* (Mansfield et al., 2012). La introgresión de resistencia desde parientes silvestres al pool genético primario de la papa cultivada se ha intentado en varios programas de mejoramiento utilizando varias especies emparentadas como *S. chacoense* Bitter. (Chen et al., 2013), *S. phureja* Juz. & Bukasov. (Fock et al., 2000; French et al., 1982; Sequeira & Rowe, 1969) y *S. commersonii* Dun. (Carputo et al., 2009; Chen et al., 2013; González et al., 2013; Kim-Lee et al., 2005; Laferriere et al., 1999; Watanabe et al., 1995). Desafortunadamente, para la papa cultivada no se cuenta aún con cultivares comerciales con resistencia estable la marchitez bacteriana (Charkowski et al., 2020). La resistencia presenta una alta variabilidad asociada a factores climáticos y cepa de la bacteria, lo cual sugiere la necesidad de buscar fuentes de resistencia con adaptación local (Huet, 2014). *S. commersonii* (2n=2x=24) es un pariente silvestre de la papa cultivada nativo de Uruguay (Castañeda-Álvarez et al., 2015; Spooner et al., 2014) *S. commersonii* resulta de particular interés como recurso genético porque presenta adaptación local (Hawkes, 1990), resistencia a heladas (Chen et al., 1999; Palta & Li, 1979), resistencia a la marchitez bacteriana (Siri et al., 2004, 2011) y *Pectobacterium spp* (Carputo et al., 2009). *S. commersonii* ha mostrado una amplia variabilidad genética en la respuesta a la marchitez bacteriana (Pianzola et al., 2005; Siri et al., 2004, 2009), además de la expresión específica de ciertos genes cuando es infectada con la marchitez bacteriana (Zuluaga et al., 2015).

El carácter complejo de la herencia de la resistencia a la marchitez bacteriana se encuentra explicada por su carácter poligénico. En *S. phureja* y *S. chacoense* la resistencia a la marchitez bacteriana se ha reportado distribuida en varios QTL mostrando segregación transgresiva (Habe, 2018; Akinyi Ottieno, 2020). Para *S. commersonii* en Uruguay se ha reportado segregación transgresiva para la resistencia

la marchitez bacteriana en cruzamientos entre genotipos silvestres y cruzamientos interespecíficos entre *S. commersonii* y la papa cultivada (González, 2010; González et al., 2013), así como retrocruzas con la papa cultivada (Andino et al in prep.).

En la papa cultivada, el sistema reproductivo alógamo y la baja tolerancia a la endogamia consecuencia de la autoploidía hacen difícil el apilado de genes y la transferencia de la resistencia genética (Muthoni et al., 2014, 2020). La principal limitante es la identificación de la resistencia y material genético no deseado en la población segregante y así evitar la transferencia de efectos negativos o rasgos silvestres (Charkowski et al., 2020; Gaiero et al., 2018). Se han puesto en práctica diferentes estrategias utilizando *S. commersonii* como dador en la transferencia de resistencia a la marchitez bacteriana obteniendo diferentes niveles de éxito (Carputo et al., 2009, 2009; L. Chen et al., 2013; González et al., 2013; Kim-Lee et al., 2005; Laferriere et al., 1999; Watanabe et al., 1995). Las diferencias en el nivel de ploidía y en el número de balance endospermico (EBN por sus siglas en inglés) requiere utilizar diferentes técnicas para transferir exitosamente la resistencia al pool genético de la papa cultivada (Gaiero et al., 2018). A pesar de que no se han encontrado diferencias a nivel genómico que impidan el entrecruzamiento e introgresión entre los genomas de la papa cultivada y *S. commersonii* (Gaiero, Mazzella, et al., 2017; Gaiero, 2018), el éxito ha sido limitado. Por este motivo se han iniciado diferentes trabajos para comprender la herencia y las posibilidades de transferencia de estas características intentando generar un marco de conocimiento que permita el uso efectivo de las diferentes fuentes de resistencia a la marchitez bacteriana y otros caracteres (Gaiero, 2018). Esto permitirá comprender los efectos genéticos que explican la resistencia a la enfermedad y desarrollar estrategias para su transferencia. El objetivo de este trabajo es el desarrollo de herramientas para facilitar la comprensión de la herencia de la resistencia a la marchitez bacteriana en una población segregante de *S. commersonii*.

3.3. MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó el cruzamiento de las accesiones de *Solanum commersonii* 02.04.1 (Departamento de Rocha, Uruguay) y 05.052.4 (Departamento de Canelones, Uruguay) en la estación experimental INIA Las Brujas en el año 2014. La progenie de este cruzamiento (Población F₁) consiste en 190 individuos que fueron mantenidos *in-vitro* en el banco de germoplasma activo de INIA Las Brujas.

Se realizó la extracción de ADN utilizando el kit de extracción Quick-DNA Plant/Seed Miniprep Kit (Zymo Research, cat. number D6020). El genotipado por secuenciación se realizó siguiendo los procedimientos descritos en Elshire et al., (2011). Para la digestión del ADN y generación de la biblioteca se utilizó la enzima ApeKI (New England Biolabs) siguiendo el procedimiento descrito en (Gaiero, 2018). La secuenciación se realizó utilizando un secuenciador HiSeq2500 Paired End 2X100 nucleótidos en la Unidad de Bioinformática aplicada en Wageningen University and Research (WUR).

Las secuencias generadas en este proceso fueron analizadas utilizando el programa bioinformático Tassel 5.0 (Bradbury et al., 2007). Se comprobó la calidad de las secuencias y se filtraron polimorfismos de un único nucleótido (SNP por sus siglas en inglés) usando como genoma de referencia el genoma de *S. commersonii* ensamblado por (Gaiero, 2018). El resultado de estos análisis es un archivo VCF conteniendo alrededor de 100,000 SNPs potenciales. Los SNPs fueron ordenados y filtrados utilizando funciones básicas y el paquete “RQTL” (Broman et al., 2003) en R (v3.3) (R. Core Team, 2013). En un primer paso se descartaron 85,000 marcadores por tener más de un 20% de datos faltantes o porque presentaban inconsistencia con los genotipos de los parentales. En un segundo paso se evaluó la distorsión en la segregación en los 15,000 SNPs restantes, descartando marcadores que se apartaban de lo esperado. Se generó el borrador de un mapa de ligamiento con estos marcadores utilizando R (v3.3)(R. Core Team, 2013) con el paquete “RQTL” (Broman et al., 2003).

Para el fenotipado para resistencia a la marchitez bacteriana evaluaron 2 ensayos, cada uno consistente en dos bloques completos al azar. Cada genotipo contaba con ocho plantas por parcela, la evaluación se realizó a nivel de planta individual. Las plantas fueron inoculadas con una suspensión de *R. solanacearum* cuando las plantas alcanzaron 8 hojas siguiendo el procedimiento descrito por Ferreira et al., (2017). Se utilizó la cepa de UY031 que fue aislada en Uruguay y reportada como la más agresiva del conjunto de cepas aisladas (Siri et al., 2011). Se tomaron datos 14 y 28 días post infección asignando valores en una escala de 0 a 4 según el nivel de infección (Ferreira et al., 2017; Siri et al., 2011). Para considerar el nivel de infección y la evolución en el tiempo se calculó el área debajo de la curva del progreso de la enfermedad (Ferreira et al., 2017). Los mejores estimadores lineales insesgados (BLUE por sus siglas en inglés) para cada individuo fueron calculados utilizando modelos mixtos con el siguiente modelo:

$$y_{ijkl} = \mu + G_i + E_j + \beta_{k(j)} + \varepsilon_{ijk} + \delta_{l(ijk)}$$

donde y_{ijkl} es la variable de respuesta (i.e. área debajo de la curva de infección con marchitez bacteriana), μ es la media poblacional, G_i efecto del i-ésimo genotipo, E_j efecto fijo del j-ésimo experimento, $\beta_{k(j)}$ efecto del k-ésimo bloque anidado en el j-ésimo experimento, ε_{ijk} es el error experimental asociado al i-ésimo genotipo, en el k-ésimo bloque en el j-ésimo ambiente, $\delta_{l(ijk)}$ es el efecto de la l-esima planta anidada en el ijk-esima parcela debida al submuestreo. Asumiendo que: $\delta_{l(ijk)} \sim N(0; \sigma_p^2)$, $\varepsilon_{ijk} \sim N(0; \sigma_\varepsilon^2)$, σ_ε^2 es la varianza del error experimental y σ_p^2 es la varianza de submuestreo de la planta dentro de la parcela. Los BLUEs para la resistencia a marchitez bacteriana fueron obtenidos utilizando el programa estadístico R (v3.3) (R Core Team 2013) con el paquete “lsmmeans” (Lenth, 2016).

3.4. RESULTADOS

La población segregante de *S. commersonii* fue fenotipada para resistencia a *Ralstonia solanacearum* medida como el área debajo de la curva del progreso de la

enfermedad evaluada a los 14 y a los 28 días posteriores a la inoculación. El área debajo de la curva del progreso de la enfermedad mostró un rango de valores entre 8,7 y 70,3. Los parentales de la población evaluada mostraron valores intermedios de área debajo de la curva del progreso de la enfermedad de 31,4 y 43,8 para el parental 02.04.1 y el parental 05.05.2.4 respectivamente (Figura 1).

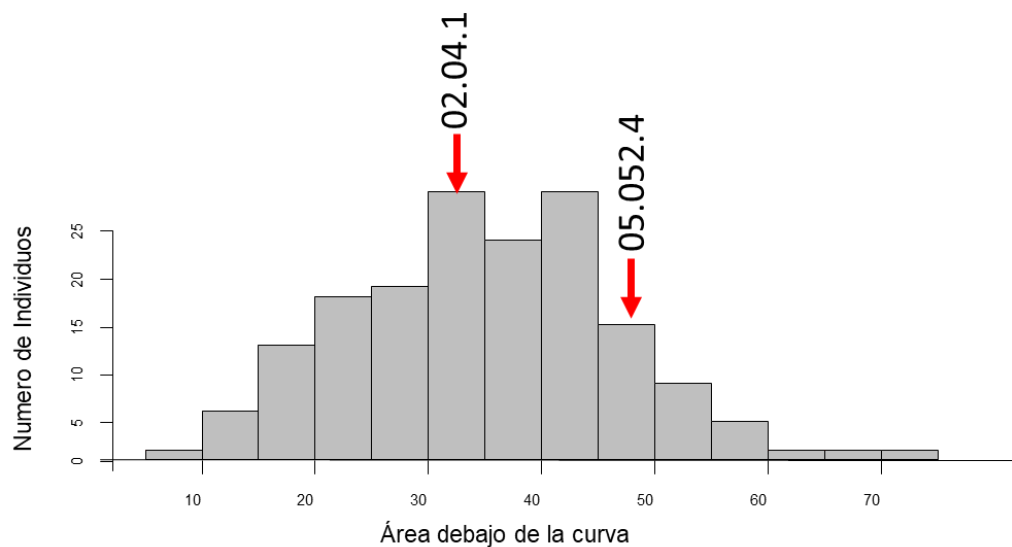


Figura 1. Histograma de frecuencias de individuos según área debajo de la curva del progreso de la enfermedad para la población de clones F_1 de *S. commersonii* fenotipada para resistencia a marchitez bacteriana.

La población segregante de *S. commersonii* fue evaluada genotípicamente a través de un genotipado por secuenciación. Las lecturas (*reads*) fueron separadas por genotipo y alineadas contra el genoma de referencia. Luego se identificaron marcadores moleculares como polimorfismos de nucleótido único (SNPs por su sigla en inglés). Los SNP fueron filtrados por número de datos faltantes y distorsiones en la segregación, obteniéndose un total de 3,154 SNPs para 181 genotipos incluyendo los padres. Dentro de estos SNPs, 246 (7,8%) SNPs presentan 4 alelos y 2,908 (92,2%) SNPs presentan 2 alelos.

Para el conjunto de los 3,154 marcadores SNPs se realizó un análisis de las frecuencias de recombinación entre marcadores para obtener un mapa de ligamiento.

Se obtuvieron un total de 42 grupos mayores de ligamiento, con varios grupos menores formados por uno o pocos marcadores (Figura 2).

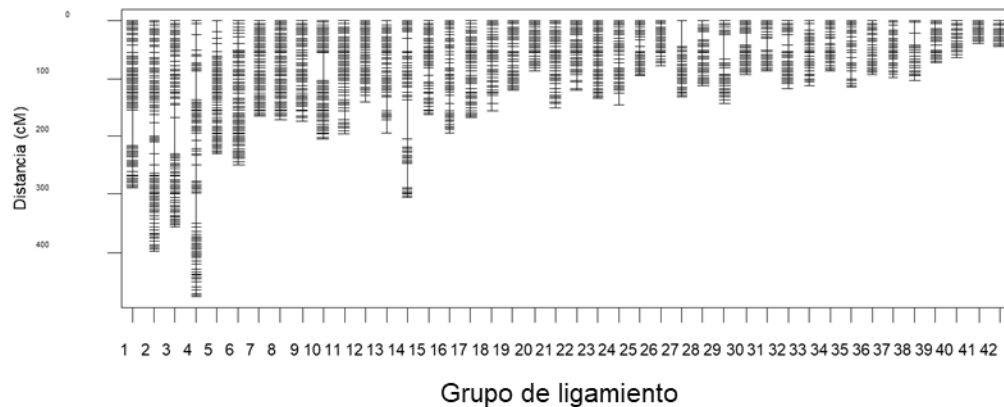


Figura 2. Borrador del mapa genético mostrando los principales grupos de ligamiento contruidos con los SNPs obtenidos en la población segregante de *S. commersonii*.

3.5. DISCUSIÓN

El rango de resistencias a la marchitez bacteriana mostrado por la población es comparable al rango reportado en otras poblaciones biparentales y accesiones silvestres en Uruguay (Ferreira et al., 2017; González, 2010; Siri et al., 2004, 2009; Zuluaga et al., 2015). También coincide con el rango de variación reportado por Akinyi Ottieno (2020) para una población de individuos producidos por autofecundación de un genotipo autocompatible de *Solanum commersonii*. La población muestra valores de susceptibilidad y resistencia más allá del rango de valores mostrado por los padres, lo cual se puede clasificar como segregación transgresiva (Poehlman & Sleper, 2006). Esto coincide con lo reportado previamente para la especie (González, 2010; González et al., 2013) y así como para *S. phureja* y *S. chacoense* (Habe et al., 2019). El fenómeno de segregación transgresiva en especies alógamas es menos frecuente que en especies autógamas pero es comúnmente observado en resistencia a enfermedades y otros caracteres (Rieseberg et al., 1999). Los efectos de la segregación transgresiva en un gran número de casos es explicada por la complementariedad entre diferentes genes (Rieseberg et al.,

1999), así como la herencia cuantitativa de la característica (Akinyi Ottieno, 2020; Habe et al., 2019).

Una forma de generar individuos resistentes a la marchitez bacteriana es combinando resistencia desde diferentes fuentes (Huet, 2014). Para seleccionar los parentales con la mayor cantidad de loci de resistencia de manera eficiente es necesario conocer la ubicación y la cantidad de genes que una línea particular puede aportar. Conocer la cantidad y ubicación de los loci permite conocer cuántos genes y cuánto genoma silvestre remanente tiene cada individuo en la progenie y esto permite avanzar en la retro-cruza utilizando los individuos con mayor número de genes de resistencia y menor proporción de cromatina silvestre.

La fortaleza de esta población radica en la posibilidad de identificar las regiones genómicas asociadas a la resistencia a la marchitez bacteriana. Esto permitiría la utilización de los marcadores moleculares para seguir los genes en su camino a la introgresión y realizar cruzamientos dirigidos que permitan acumular los genes de resistencia en una línea. También utilizar parentales con la mayor cantidad de alelos favorables aumenta la probabilidad de obtener un genotipo con varios alelos de resistencia (Fávero et al., 2020). Generar individuos resistentes la marchitez bacteriana es importante debido a que la resistencia parcial a la enfermedad ayuda a la dispersión de la enfermedad (Huet, 2014).

Se obtuvieron 3,154 marcadores SNPs de alta calidad. Si bien los marcadores de tipo SNP presentan una menor diversidad alélica que otros marcadores como por ejemplo los SSR, son ideales para el estudio de caracteres cuantitativos (Fischer et al., 2017). La población utilizada es una población F_1 producto del cruzamiento de dos individuos heterocigotos, por lo cual es posible detectar SNPs con más que dos alelos. Para que esto sea posible una de las líneas parentales tiene que presentar una transversión (Brookes, 1999). Las transiciones son dos veces más frecuentes que las conversiones (Vera et al., 2013). Además, los marcadores tetra-alélicos tienen mayores probabilidades de error y probablemente tengan un sesgo al momento de ser llamados. Estos marcadores son los más informativos y menos abundantes en el

conjunto de marcadores reportados. El resto de los marcadores (92,2%) presenta dos alelos. Además, se está trabajando en genotipar la población para un conjunto de marcadores tetra-alélicos de tipo microsatélites (SSR) desarrollados por nuestro equipo.

La papa cultivada cuenta con un genoma de referencia publicado (The Potato Genome Sequencing Consortium, 2011) el cual se encuentra en continuo proceso de mejoramiento (The Potato Genome Sequencing Consortium 2020). La caracterización genómica de los recursos fitogenéticos contribuye a la valoración y facilita su utilización. Actualmente existen dos genomas de referencia de *S. commersonii* y tanto nuestro grupo como otros grupos se encuentran trabajando en la obtención de un genoma de referencia para la especie (Aversano et al., 2015; Gaiero, 2018). Otras especies emparentadas como *S. chacoense* tienen niveles similares de recursos disponibles (Leisner et al., 2019). El borrador del mapa de ligamiento encontrado representa una primera aproximación al mapa de ligamiento de la especie, el cual luego de ser mejorado utilizando un genoma de referencia más completo podrá ser utilizado como insumo para realizar análisis de QTL. En nuestro caso, este mapa representa una confirmación de la validez de los marcadores dado que los grupos de ligamiento mayores que se formaron coinciden con el doble del número de cromosomas para un individuo de la especie. Esto implica que es posible que cada grupo de ligamiento representa uno de los brazos cromosómicos. La falta de conexión entre los grupos de ligamiento se puede explicar a que la región pericentromérica, particularmente abundante y rica en heterocromatina en especies de *Solanum* (Chang et al., 2008; Gaiero, Van De Belt, et al., 2017; Szinay et al., 2010) presenta cualidades que la hacen difícil de mapear como la mayor abundancia de secuencias repetidas, la menor abundancia de sitios de recombinación y marcadores (Copenhaver et al., 1998; Ma & Bennetzen, 2006).

Para detectar los marcadores reportados utilizamos un borrador del genoma de referencia para la especie (Gaiero, 2018), el cual se encuentra en proceso de ser mejorado. La nueva versión del genoma de referencia que idealmente pasaría de

scaffolds a pseudo-cromosomas gracias al aporte del mapa de ligamiento construido en este trabajo, entre otras fuentes de información, permitirá mejorar el alineamiento de los marcadores y utilizar secuencias que con esta versión del genoma eran descartadas por tener un pobre alineamiento. Contar con un ensamblado completo del genoma de referencia para la especie ayudará a alinear lecturas de secuencia en estas regiones e identificar nuevos marcadores, retroalimentándose mutuamente con el mapa de ligamiento.

3.6. CONCLUSIONES

El desarrollo de herramientas sobre esta población valoriza los recursos genéticos de *S. commersonii*, además de ayudar en el proceso de utilización y transferencia de la resistencia a la papa cultivada. La información fenotípica y genotípica facilitará el desarrollo de estrategias para la comprensión de la herencia de la resistencia a la marchitez bacteriana.

3.7. BIBLIOGRAFÍA

- Akinyi Ottieno S (2020) Diploid potato breeding-ploidy determination. In: Michigan State University.
- Aversano R, Contaldi F, Ercolano MR, Grosso V, Iorizzo M, Tatino F, Xumerle L, Molin AD, Avanzato C, Ferrarini A, Delledonne M, Sanseverino W, Cigliano RA, Capella-Gutierrez S, Gabaldón T, Frusciante L, Bradeen JM, & Carputo D (2015) The *Solanum commersonii* Genome Sequence Provides Insights into Adaptation to Stress Conditions and Genome Evolution of Wild Potato Relatives. *Plant Cell* 954:968-27
- Bradbury PJ, Zhang Z, Kroon DE, Casstevens TM, Ramdoss Y, & Buckler ES (2007) TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. 3.
- Broman KW, Wu H, Sen S, & Churchill GA (2003) R/qtl: QTL mapping in experimental crosses. *Bioinform.* 889:890-19
- Brookes AJ (1999) The essence of SNPs. *Gene* 177:186-234(2)
- Carputo D, Aversano R, Barone A, Di Matteo A, Iorizzo M, Sigillo L, Zoina A, & Frusciante L (2009) Resistance to *Ralstonia solanacearum* of Sexual Hybrids Between *Solanum commersonii* and *S. tuberosum*. *Am J Potato Res* 196:202-86
- Castañeda-Álvarez NP, de Haan S, Juárez H, Khoury CK, Achicanoy HA, Sosa CC, Bernau V, Salas A, Heider B, Simon R, Maxted N, & Spooner DM (2015) Ex Situ Conservation Priorities for the Wild Relatives of Potato (*Solanum* L. Section Petota) *PLOS ONE*, 10
- Centro Internacional de la Papa (1996) Principales enfermedades, nematodos e insectos de la papa. CIP/SENASA, 1996. 111p.
- Chang SB, Yang TJ, Datema E, Van Vugt J, Vosman B, Kuipers A, Meznikova M, Szinay D, Lankhorst RK, & Jacobsen E (2008) FISH mapping and molecular

- organization of the major repetitive sequences of tomato. *CHROMOSOME RES*, 919:933-16
- Charkowski A, Sharma K, Parker ML, Secor GA, & Elphinstone J (2020) Bacterial Diseases of Potato. En H. Campos & O. Ortiz (Eds.), Potato Crop 351:388-5
- Chen YK, Palta JP, & Bamberg JB (1999) Freezing tolerance and tuber production in selfed and backcross progenies derived from somatic hybrids between *Solanum tuberosum* L. and *S. commersonii* Dun. *Theor Appl Genet* 100:107-99
- Chen L, Guo X, Xie C, He L, Cai X, Tian L, Song B, & Liu J (2013) Nuclear and cytoplasmic genome components of *Solanum tuberosum* + *S. chacoense* somatic hybrids and three SSR alleles related to bacterial wilt resistance. *Theor Appl Genet* 1861:1872-126
- Copenhaver GP, Browne WE, & Preuss D (1998) Assaying genome-wide recombination and centromere functions with *Arabidopsis* tetrads. *Proc Natl Acad Sci USA* 6.
- Elphinstone JG (2005) The current bacterial wilt situation: A global overview. Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex. 9:28.
- Elshire RJ, Glaubitz JC, Sun Q, Poland JA, Kawamoto K, Buckler ES, & Mitchell SE (2011) A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PloS one* 6.
- Fávero AP, Custodio AR, Dinato NB, Godoy IJ. de Seijo JG, & Michelotto MD (2020) Transference of multiple resistance to peanut through the development of cross-compatible complex hybrids of wild *Arachis*. *Genet Mol* 43
- Ferreira V, Pianzzola MJ, Vilaró FL, Galván GA, Tondo ML, Rodríguez MV, Orellano EG, Valls M, & Siri MI (2017) Interspecific Potato Breeding Lines Display Differential Colonization Patterns and Induced Defense Responses after *Ralstonia solanacearum* Infection. *Front Plant Sci* 1424-8
- Fischer MC, Rellstab C, Leuzinger M, Roumet M, Gugerli F, Shimizu KK, Holderegger R, & Widmer A (2017) Estimating genomic diversity and

- population differentiation – an empirical comparison of microsatellite and SNP variation in *Arabidopsis halleri*. BMC Gen 69:18
- Fock I, Collonnier C, Purwito A, Luisetti J, Souvannavong V, Vedel F, Servaes A, Ambroise A, Kodja H, Ducreux G, & Sihachakr D (2000) Resistance to bacterial wilt in somatic hybrids between *Solanum tuberosum* and *Solanum phureja*. Plant Sci 165:176-160
- French ER & LINDO D (1982) Resistance to *Pseudomonas solanacearum* in potato: Specificity and temperature sensitivity.
- Gaiero, P (2018) Exploring the use of wild relatives in potato breeding through integrated cytogenetic and genomic approaches. Wageningen University
- Gaiero P, Mazzella C, Vilaró F, Speranza P, & de Jong H (2017) Pairing analysis and in situ Hybridisation reveal autopolyploid-like behaviour in *Solanum commersonii* × *S. tuberosum* (potato) interspecific hybrids. Euphytica 137-237
- González, M (2010) La resistencia a la marchitez bacteriana de *Solanum commersonii* Dun. y su utilización en el mejoramiento genético de papa. Tesis Ing Agr Universidad de la República.
- González M, Galván G, Siri MI, Borges A, & Vilaró F (2013) Resistencia a la marchitez bacteriana de la papa en *Solanum commersonii* Dun. Agrociencia Uruguay 45:54-17
- Habe, I (2018) An in vitro assay method for resistance to bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*) in potato. Am J Potato Res 311:316-95
- Habe I, Miyatake K, Nunome T, Yamasaki M, & Hayashi T (2019) QTL analysis of resistance to bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* in potato. Breeding Science 592:600-69
- Hawkes JG (1990) *The potato: Evolution, biodiversity and genetic resources*. Belhaven Press.
- Huet G (2014) Breeding for resistances to *Ralstonia solanacearum*. Front Plant Sci 5

- Kim-Lee H, Moon JS, Hong YJ, Kim MS, & Cho HM (2005) Bacterial wilt resistance in the progenies of the fusion hybrids between haploid of potato and *Solanum commersonii*. *Am J Potato Res* 129:137-82
- Laferriere LT, Helgeson JP, & Allen C (1999) Fertile *Solanum tuberosum*+*S. commersonii* somatic hybrids as sources of resistance to bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. *Theor Appl Genet* 1272:127-98
- Leisner CP, Hamilton JP, Crisovan E, Manrique-Carpintero NC, Marand AP, Newton, L, Pham GM, Jiang J, Douches DS, Jansky SH, & Buell CR (2019) Data from: Genome sequence of M6, a diploid inbred clone of the high glycoalkaloid-producing tuber-bearing potato species *Solanum chacoense*, reveals residual heterozygosity.
- Lenth R (2016) Lsmeans: Least-squares means. Version 2.23-5. Comprehensive R Archive Network (CRAN)
- Ma J, & Bennetzen JL (2006) Recombination, rearrangement, reshuffling, and divergence in a centromeric region of rice. *PNAS* 383:388–103
- Mansfield J, Genin S, Magori S, Citovsky V, Sriariyanum M, Ronald P, Dow M, Verdier V, Beer SV, Machado MA, Toth I, Salmond G, & Foster GD (2012) Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 614:629-13
- Muthoni J, Shimelis H, & Melis R (2020) Conventional breeding of potatoes for resistance to bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*): Any light in the horizon? *Aus J Crop Sci* 485:494-14
- Muthoni J, Shimelis H, Melis R, & Kinyua ZM (2014) Response of potato genotypes to bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* (Smith) (Yabuuchi et al.) In the Tropical Highlands. *Am J Potato Res*, 215:232-91
- Palta JP, & Li PH (1979) Frost-Hardiness in Relation to Leaf Anatomy and Natural Distribution of Several *Solanum* Species 1. *Crop Sci* 665:671-19
- Pianzola MJ, Zarantonelli L, González G, Franco Fraguas L, & Vázquez A (2005) Genetic, phytochemical and biochemical analyses as tools for biodiversity

- evaluation of wild accessions of *Solanum commersonii*. *Biochem Syst Ecol* 67:78-33
- Poehlman JM, & Sleper DA (2006) *Breeding Field Crops* (Four)
- R. Core Team (2013) *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna, Austria.
- Rieseberg LH, Archer MA, & Wayne RK (1999) Transgressive segregation, adaptation, and speciation. *Heredity* 363:372-83
- Sequeira L, & Rowe PR (1969) Selection and utilization of *Solanum phureja* clones with high resistance to different strains of *Pseudomonas solanacearum*. *A Potato J* 451:462-46
- Siri MI, Galván GA, Quirici L, Silvera E, Villanueva P, Ferreira F, Franco Fraguas L, & Pianzola MJ (2009) Molecular marker diversity and bacterial wilt resistance in wild *Solanum commersonii* accessions from Uruguay. *Euphytica* 371:382-165
- Siri MI, Sanabria A, & Pianzola MJ (2011) Genetic Diversity and Aggressiveness of *Ralstonia solanacearum* Strains Causing Bacterial Wilt of Potato in Uruguay. *Plant Disease* 1292:1301-95
- Siri MI, Villanueva P, Pianzola MJ, Fraguas LF, Galván G, Acosta M, & Ferreira F (2004) In vitro antimicrobial activity of different accessions of *Solanum commersonii* Dun. From Uruguay. *Potato Res* 127:138-47
- Spooner DM, Ghislain M, Simon R, Jansky SH, & Gavrilenko T (2014) Systematics, diversity, genetics, and evolution of wild and cultivated potatoes. *The botanical review* 283:383-80.
- Szinay D, Bai Y, Visser R, & de Jong H (2010) FISH applications for genomics and plant breeding strategies in tomato and other solanaceous crops. *Cytogenet Genome Res* 199:210-129
- The Potato Genome Sequencing Consortium (2020) <http://solanaceae.plantbiology.msu.edu/index.shtml> Visited: 10/25/2020

- The Potato Genome Sequencing Consortium (2011) Genome sequence and analysis of the tuber crop potato. *Nature* 189:195-475
- Vera M, Alvarez-Dios JA, Fernandez C, Bouza C, Vilas R, & Martinez P (2013) Development and validation of single nucleotide polymorphisms (SNPs) markers from two transcriptome 454-Runs of turbot (*Scophthalmus maximus*) using high-throughput genotyping. *Int J Mol Sci* 5694:5711-14
- Watanabe KN, Orrillo M, Vega S, Valkonen JPT, Pehu E, Hurtado A, & Tanksley SD (1995) Overcoming crossing barriers between nontuber-bearing and tuber-bearing *Solanum* species: Towards potato germplasm enhancement with a broad spectrum of solanaceous genetic resources. *Genome* 2:35-38
- Zuluaga, AP, Solé M, Lu H, Góngora-Castillo E, Vaillancourt B, Coll N, Buell CR, & Valls M (2015) Transcriptome responses to *Ralstonia solanacearum* infection in the roots of the wild potato *Solanum commersonii*. *BMC Gen* 246-16

4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES

Logramos obtener una población de mapeo para *Paspalum dilatatum* formada por un conjunto de líneas endocriadas que pueden ser mantenidas y evaluadas indefinidamente. Las posibilidades de fenotipado sumadas a la información genotípica que se desarrollará para estas líneas permiten que pueda ser utilizada en análisis de QTL. Los análisis de asociación permiten identificar regiones genómicas asociadas a loci de interés. De esta forma con el genotipado futuras poblaciones será posible conocer que genotipos presentan los loci de interés y realizar selección temprana sobre estos caracteres. La población de mapeo también funciona como una primera población de mejoramiento sobre la cual es posible realizar selección, para ensayos de producción o selección de padres para la combinación de características. La población de mapeo permitirá comprender la arquitectura genética de caracteres de interés y ayudará a acelerar el proceso de domesticación de la especie.

Desarrollamos información y herramientas sobre una población de mapeo para *Solanum commersoni*. La población mostro individuos con niveles de resistencia mayores al padre más resistente. Los individuos segregantes transgresivos resultan útiles como parentales en el proceso de introgresión porque aumentan la probabilidad de transferencia de los loci de resistencia a la marchitez bacteriana. Además, los marcadores obtenidos representan un incremento importante en el número de marcadores moleculares y cobertura del genoma disponibles hasta el momento. La información fenotípica y genotípica obtenida permitirá generar análisis de asociación e identificar loci para resistencia a la marchitez bacteriana. La asociación de marcadores moleculares a loci de resistencia a la marchitez bacteriana permitirá seguir estos loci en el proceso de introgresión. Estas herramientas son importantes en el proceso de utilización de los recursos genéticos nativos disponibles y facilitaran el proceso de transferencia de variabilidad genética al pool genético disponible para el mejoramiento de la papa cultivada.

El tipo de poblaciones con las que manejamos en este trabajo son muy diferentes. En el caso de *P. dilatatum* la población obtenida proviene del cruzamiento entre dos líneas puras y paso por 5 procesos de recombinación durante el proceso de endocria. En cambio, la población de *S. commersonii* está formada por individuos F1 proveniente del

cruzamiento entre dos individuos con sistema reproductivo alógamo, probablemente heterocigotas para una alta proporción de sus genes. Un mayor número de recombinaciones ayuda a reducir el desequilibrio de ligamiento lo cual aumenta la resolución que es posible obtener. Prácticamente esto es una desventaja para la población de mapeo en *S. commersonii*, porque aumenta la probabilidad de perder la asociación marcador carácter debido a que la asociación se debe al desequilibrio de ligamiento y no a ligamiento real. Se deben de planear estrategias para sobrellevar estas limitantes en la población y plantear nuevos tipos de poblaciones que podría ayudar a sobre llevar este problema. Una posibilidad es la creación de poblaciones biparentales en otras especies como *S. chacoense* de forma de obtener comprender otros mecanismos de resistencia. Una segunda opción es generar poblaciones de tipo MAGIC con cruzamientos dirigidos entre un conjunto de padres conocidos, lo cual permitiría mejorar la resolución para detectar QTLs. Otra estrategia es utilizar las poblaciones disponibles con grandes volúmenes de información y seleccionar una población diversa que permita aplicar la técnica de GWAS, lo cual ayudaría en la identificación de QTL con pequeños efectos.

En ambas poblaciones la utilización y desarrollo de técnicas de secuenciación de última generación funcionaron de manera eficiente, pudiendo utilizar tecnología y técnicas disponibles sin la necesidad de desarrollar acomodaciones especiales para estas especies. Desde que estamos trabajando con especies silvestres, la posibilidad de incorporar y utilizar tecnología de última generación representa una ventaja comparativa muy importante dada la facilidad para generar grandes volúmenes de información a un costo económico razonable. Esto abre la puerta para seguir incorporando información en los casos particulares de *P. dilatatum* y *S. commersonii* así como en otras especies silvestres o huérfanas con bajas disponibilidad de tecnología molecular y recursos.

En este trabajo se ha aportado al conocimiento necesario para la utilización y valoración de los recursos genéticos nativos. En el caso de *Paspalum dilatatum* se generó una población que ayudara a generar conocimiento sobre la herencia de caracteres como por ejemplo la dormición de la semilla o la fecha de floraciones los cuales son importantes en el proceso de domesticación. En el caso de *Solanum commersonii*, las herramientas desarrolladas en la población facilitarán la introgresión de diversidad genética en la variabilidad disponible para el mejoramiento de la papa cultivada. Tanto el caso de *P.*

dilatatum como *S. commersonii*, aportan al conocimiento de especies nativas, facilitando la valorización y utilización de la diversidad genética existente.

7. BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Abadie, T.; Beretta, V. 2001. Caracterización y evaluación de recursos fitogenéticos. En *Estrategia en recursos fitogenéticos para los países del Cono Sur* 1.^a ed, Vol. 1, p. 139. PROCISUR.
- Allaby, R. G. 2014. Domestication syndrome in plants. En *Encyclopedia of global archaeology* 2182-2184. Springer New York.
- Allendorf, F. W.; Hohenlohe, P.; Luikart, G. 2010. Genomics and the future of conservation genetics. *Nature reviews. Genetics*, 11:697-709.
<https://doi.org/10.1038/nrg2844>
- Bailey, L.H. 1918. The indigen and cultigen. *Science* ser. 2 47: 306–308.
- Bamberg, J. B.; Hanneman, R. E.; Palta, J. P.; Harbage, J. F. 1994. Using disomic 4 x 2EBN) potato species' germplasm via bridge species *Solanum commersonii*. *Genome*, 37: 866-870.
- Bandillo, N.; Raghavan, C.; Muyco, P.; Sevilla, M. A. L.; Lobina, I. T.; Dilla-Ermita, C.; Tung, C.-W.; McCouch, S.; Thomson, M.; Mauleon, R.; Singh, R.; Gregorio, G.; Redoña, E.; Leung, H. 2013. Multi-parent advanced generation inter-cross (MAGIC) populations in rice: Progress and potential for genetics research and breeding. *Rice*, 61:11.
- Barone, A.; Sebastiano, A.; Carputo, D.; della Rocca, F.; Frusciante, L. 2001. Molecular marker-assisted introgression of the wild *Solanum commersonii* genome into the cultivated *S. tuberosum* gene pool. *Theoretical and Applied Genetics*, 102:900-907.
- Bennett, H.; Bashaw, E. 1966. Interspecific Hybridization with *Paspalum* spp. *Crop Science*, March:52-54.
- Bernardo, R. 2010. *Breeding for Quantitative Traits in Plants* (Second). Stemma Press.
- Boschi, F.; Schwartzman, C.; Murchio, S.; Ferreira, V.; Siri, M. I.; Galván, G. A.; Smoker, M.; Stransfeld, L.; Zipfel, C.; Vilaró, F. L.; Dalla-Rizza, M. 2017. Enhanced Bacterial Wilt Resistance in Potato Through Expression of Arabidopsis EFR and Introgression of Quantitative Resistance from *Solanum commersonii*. *Frontiers in Plant Science*, 8:1642.

- Burson, B. L.; Venuto, B. C.; Hussey, M. A. 2009. Registration of 'Sabine' Dallisgrass. *Journal of Plant Registrations*, 32:132-137.
- Burton, G. W.; Hanna, W. W. 1992. Using apomictic tetraploids to make a self-incompatible diploid Pensacola bahiagrass clone set seed. *Heredity*, 83.
- Camadro, E. L.; Carputo, D.; Peloquin, S. J. 2004. Substitutes for genome differentiation in tuber-bearing Solanum: Interspecific pollen-pistil incompatibility, nuclear-cytoplasmic male sterility, and endosperm. *Theoretical and Applied Genetics*, 109:1369-1376.
- Carputo, D.; Aversano, R.; Barone, A.; Di Matteo, A.; Iorizzo, M.; Sigillo, L.; Zoina, A.; Frusciante, L. 2009. Resistance to *Ralstonia solanacearum* of Sexual Hybrids Between Solanum commersonii and S. tuberosum. *Am J Potato Res*, 86:196-202.
- Castañeda-Álvarez.; N. P.; Khoury, C. K.; Achicanoy, H. A.; Bernau, V.; Dempewolf, H.; Eastwood, R. J.; Guarino, L.; Harker, R. H.; Jarvis, A.; Maxted, N.; Müller, J. V.; Ramirez-Villegas, J.; Sosa, C. C.; Struik, P. C.; Vincent, H.; Toll, J. 2016. Global conservation priorities for crop wild relatives. *Nature Plants*, 2:16022.
- Chopra, R.; Johnson, E. B.; Emenecker, R.; Cahoon, E. B.; Lyons, J.; Kliebenstein, D. J.; Daniels, E.; Dorn, K. M.; Esfahanian, M.; Folstad, N.; Frels, K.; McGinn, M.; Ott, M.; Gallaher, C.; Altendorf, K.; Berroyer, A.; Ismail, Bv.; Anderson, J. A.; Wyse, D. L.; David Marks, M. 2020. Identification and stacking of crucial traits required for the domestication of pennycress. *Nature Food*, 1:84-91. <https://doi.org/10.1038/s43016-019-0007-z>
- Crain, J.; Bajgain, P.; Anderson, J.; Zhang, X.; DeHaan, L.; Poland, J. 2020. Enhancing crop domestication through genomic selection, a case study of intermediate Wheatgrass. *Frontiers in Plant Science*, 11:319.
- Davey, J. W.; Hohenlohe, P.; Etter, P. D.; Boone, J. Q.; Catchen, J. M.; Blaxter, M. L. 2011. Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. *Nature reviews. Genetics*, 12:499-510.
- De Wet, J. M. J.; Harlan, J. R. 1975. Weeds and domesticates: Evolution in the man-made habitat. *Economic Botany*, 292:99-108.
- DeHaan, L.; Christians, M.; Crain, J.; Poland, J. 2018. Development and evolution of an Intermediate Wheatgrass domestication program. *Sustainability*, 10:1499.

- DeHaan, L.; Larson, S.; López-Marqués, R. L.; Wenkel, S.; Gao, C.; Palmgren, M. 2020. Roadmap for accelerated domestication of an emerging perennial grain crop. *Trends in Plant Science*, 25:525-537.
- DeHaan, L. R.; Van Tassel, D. L. 2014. Useful insights from evolutionary biology for developing perennial grain crops ¹. *American Journal of Botany*, 101:1801-1819.
- Eklom, R.; Galindo, J. 2011. Applications of next generation sequencing in molecular ecology of non-model organisms. *Heredity*, 107:1-15.
- Elshire, R. J.; Glaubitz, J. C.; Sun, Q.; Poland, J. A.; Kawamoto, K.; Buckler, E. S.; Mitchell, S. E. 2011. A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PloS one*, 6: e19379.
- FAO. 2007. *Directrices para la elaboración de una Estrategia Nacional para los Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura*. FAO. <http://www.fao.org/3/i1500e/Uruguay.pdf>
- FAO. 2011. *Plan de acción mundial para los recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura*. FAO.
- Flint-Garcia, S. A.; Thornsberry, J. M.; Buckler, E. S. 2003. Structure of linkage disequilibrium in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 54:357-374.
- Fuller, D. Q.; Allaby, R. G.; Stevens, C. 2010. Domestication as innovation: The entanglement of techniques, technology and chance in the domestication of cereal crops. *World Archaeology*, 42:13-28.
- Gaiero, P. 2018. *Exploring the use of wild relatives in potato breeding through integrated cytogenetic and genomic approaches* [Wageningen University].
- Gaiero, P.; Mazzella, C.; Vilaró, F.; Speranza, P.; de Jong, H. 2017. Pairing analysis and in situ hybridisation reveal autopolyploid-like behaviour in *Solanum commersonii* × *S. tuberosum* (potato) interspecific hybrids. *Euphytica*, 213:137.
- Gepts, P. 2006. Plant genetic resources conservation and utilization: The Accomplishments and Future of a Societal Insurance Policy. *Crop Science*, 46:2278-2292.
- Glendinning, D. R. 1983. Potato introductions and breeding up to the early 20th century. *New Phytologist*, 94:479-505.

- González, M. 2010. La resistencia a la marchitez bacteriana de *DE Solanum commersonii* Dun. Y su utilización en el mejoramiento genético de papa [Tesis Ingeniero Agrónomo]. Universidad de la República.
- Gupta, P. K.; Kulwal, P. L.; Jaiswal, V. 2014. Association mapping in crop plants. En *Advances in Genetics* 85: 109-147.
- Hancock, J. F. 2012. *Plant evolution and the origin of crop species*. CABI.
- Hardigan, M. A.; Laimbeer, F. P. E.; Newton, L.; Crisovan, E.; Hamilton, J. P.; Vaillancourt, B.; Wiegert-Rininger, K.; Wood, J. C.; Douches, D. S.; Farré, E. M. 2017. Genome diversity of tuber-bearing *Solanum* uncovers complex evolutionary history and targets of domestication in the cultivated potato. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114: E9999–E10008.
- Holland, J. 2007. Genetic architecture of complex traits in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 102:156-161.
- Hospital, F. 2005. Selection in backcross programmes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360:1503-1511.
- Huang, B. E.; Verbyla, K. L.; Verbyla, A. P.; Raghavan, C.; Singh, V. K.; Gaur, P.; Leung, H.; Varshney, R. K.; Cavanagh, C. R. 2015. MAGIC populations in crops: Current status and future prospects. *Theoretical and Applied Genetics*, 128:999-1017.
- Jarvis, A.; Lane, A.; Hijmans, R. J. 2008. The effect of climate change on crop wild relatives. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 1261:13-23.
- Jia, H.; Zhang, Y.; Orbović, V.; Xu, J.; White, F. F.; Jones, J. B.; Wang, N. 2017. Genome editing of the disease susceptibility gene *CsLOB1* in citrus confers resistance to citrus canker. *Plant Biotechnology Journal*, 15:817-823.
- Khan, M. Z.; Zaidi, S. S.-A.; Amin, I.; Mansoor, S. 2019. A CRISPR Way for fast-forward crop domestication. *Trends in Plant Science*, 24:293-296.
- Kim, C.; Guo, H.; Kong, W.; Chandnani, R.; Shuang, L.-S.; Paterson, A. H. 2015. Application of genotyping by sequencing technology to a variety of crop breeding programs. *Plant Science*, 4:1-9
- Kloosterman, B.; Abelenda, J. A.; Gomez, Oortwijn, M.; de Boer, J. M.; Kowitzanich, K.; Horvath, B. M.; van Eck, H. J.; Smaczniak, C.; Prat, S. 2013. Naturally

- occurring allele diversity allows potato cultivation in northern latitudes. *Nature*, 495:246-250.
- Korte, A.; Farlow, A. 2013. The advantages and limitations of trait analysis with GWAS: A review. *Plant Methods*, 91:9-29
- Krishna, H, J, N.; Gajghate, R.; Shashkumara, P.; Swetha Singh, D. C.; Sunilkumar, V. P.; Manu, B.; Sinha, N.; Singh, G. P.; Singh, P. K. 2020. QTL mapping for heat tolerance related traits using backcross inbred lines in wheat (*Triticum aestivum* L.. *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding*. 80
- Kumar, U. S.; Varghese, G.; Jacob, T. M.; Thomas, G. 2011. Stratification and population structure of the genetic resources of ancient medicinal rice (*Oryza sativa* L.) landrace Njavara. *Genetic resources and crop evolution*. 58: 697-711.
- Lu, S.; Dong, L.; Fang, C.; Liu, S.; Kong, L.; Cheng, Q.; Chen, L.; Su, T.; Nan, H.; Zhang, D.; Zhang, L.; Wang, Z.; Yang, Y.; Yu, D.; Liu, X.; Yang, Q.; Lin, X.; Tang, Y.; Zhao, X.; Kong, F. 2020. Stepwise selection on homeologous PRR genes controlling flowering and maturity during soybean domestication. *Nature Genetics*, 52: 428-436
- Ma, L.; Su, Y.; Nie, H.; Cui, Y.; Cheng, C.; Ijaz, B.; Hua, J. 2020. QTL and genetic analysis controlling fiber quality traits using paternal backcross population in upland cotton. *Journal of Cotton Research*, 31: 22.
- Machida-Hirano, R. 2015. Diversity of potato genetic resources. *Breeding science*, 651:26-40.
- Maxted, N.; Ford-Lloyd, B. V.; Jury, S.; Kell, S.; Scholten, M. 2006. Towards a definition of a crop wild relative. *Biodiversity and Conservation*, 15:2673-2685.
- Meilleur, B. A.; Hodgkin, T. 2004. In situ conservation of crop wild relatives: Status and trends. *Biodiversity and Conservation*, 13:663-684.
- Mendoza, H. A.; HA, M.; FL, H. 1974. Genetic relationship among potato cultivars grown in the United States.
- Millot, JC. 1969. Mejoramiento de gramíneas forrajeras. *Miscelánea CIAAB*, 7.
- Muthoni, J.; Shimelis, H.; Melis, R.; Kinyua, Z. M. 2014. Response of potato genotypes to bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* (Smith)(Yabuuchi et al.) In the Tropical Highlands. *Am J Potato Res* , 912:215-232.

- Novo, P. E.; Acuña, C. A.; Urbani, M. H.; Galdeano, F.; Espinoza, F.; Quarín, C. L. 2020. Genetic transfer from several apomictic tetraploid *Paspalum* species to an elite group of sexual plants. *Crop Science*, csc2.20173.
- Prohens, J.; Gramazio, P.; Plazas, M.; Dempewolf, H.; Kilian, B.; Díez, M. J.; Fita, A.; Herraiz, F. J.; Rodríguez-Burruezo, A.; Soler, S.; Knapp, S.; Vilanova, S. 2017. Introgressomics: A new approach for using crop wild relatives in breeding for adaptation to climate change. *Euphytica*, 213:158.
- Schrauf, G. E.; Blanco, M. A.; Cornaglia, P. S.; Deregibus, V. A.; Madia, M.; Pacheco, M. G.; Padilla, J. 2003. Ergot resistance in plants of *Paspalum dilatatum* incorporated by hybridisation with *Paspalum urvillei*. 37:182-186.
- Siri, M. I.; Galván, G. A.; Quirici, L.; Silvera, E.; Villanueva, P.; Ferreira, F.; Franco Fraguas, L.; Pianzola, M. J. 2009. Molecular marker diversity and bacterial wilt resistance in wild *Solanum commersonii* accessions from Uruguay. *Euphytica*, 16:371-382.
- Siri, M. I.; Villanueva, P.; Pianzola, M. J.; Fraguas, L. F.; Galván, G.; Acosta, M.; Ferreira, F. 2004. In vitro antimicrobial activity of different accessions of *Solanum commersonii* Dun. From Uruguay. *Potato Res*, 47:127-138.
- Spencer, R. D.; Cross, R. G. 2007. The International Code of Botanical Nomenclature (ICBN), the International Code of Nomenclature for Cultivated Plants (ICNCP), and the cultigen. *TAXON*, 56:938-940.
- Speranza, P.; Malosetti, M. 2007. Nuclear and cytoplasmic microsatellite markers for the species of the Dilatata group of *Paspalum* (Poaceae). *Plant Genetic Resources*, 5:14.
- Speranza, P. R. 2009. Evolutionary patterns in the Dilatata group (*Paspalum*, Poaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 282:43-56.
- Star, P.; Brooking, T. 2006. Fescue to the Rescue: Chewings Fescue, *Paspalum*, and the Application of Non-British Experience to Pastoral Practice in New Zealand, 1880-1920. En *Agricultural History*. 80:312-335.
- Stuber, C. W.; Polacco, M.; Lynn, M. 1999. Synergy of empirical breeding, marker-assisted selection, and genomics to increase crop yield potential. *Crop Science*, 39:1571-1583.

- Tanksley, S. D.; Grandillo, S.; Fulton, T. M.; Zamir, D.; Eshed, Y.; Beck-Bunn, T. 1995. Advanced backcross QTL analysis in a cross between an elite processing line of tomato and its wild relative *L. pimpinellifolium*. *Theoretical and Applied Genetics*, 92: 213-224.
- Tanno, K. 2006. How fast was wild wheat domesticated? *Science*, 311:1886-1886.
- Van Tassel, D. L.; Albrecht, K. A.; Bever, J. D.; Boe, A. A.; Brandvain, Y.; Crews, T. E.; Gansberger, M.; Gerstberger, P.; González-Paleo, L.; Hulke, B. S.; Kane, N. C.; Johnson, P. J.; Pestsova, E. G.; Picasso Risso, V. D.; Prasifka, J. R.; Ravetta, D. A.; Schlautman, B.; Sheaffer, C. C.; Smith, K. P.; Wever, C. 2017. Accelerating domestication: An opportunity to develop new crop ideotypes and breeding strategies informed by multiple disciplines. *Crop Science*, 57:1274.
- Zemlo, T. 2012. Democratizing NGS platforms. *Genetic Engineering & Biotechnology News*, 32:5.
- Zsögön, A.; Čermák, T.; Naves, E. R.; Notini, M. M.; Edel, K. H.; Weinl, S.; Freschi, L.; Voytas, D. F.; Kudla, J.; Peres, L. E. P. 2018. De novo domestication of wild tomato using genome editing. *Nature Biotechnology*, 36:1211-1216.