



Facultad de Ciencias
Universidad de la República



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

TESINA PARA OPTAR POR EL GRADO DE LICENCIADO EN
CIENCIAS BIOLÓGICAS

***Paspalum notatum* Flügge (Poaceae): estudio comparativo del comportamiento cromosómico en meiosis y tamaño y viabilidad de granos de polen en dos grupos de diferente contenido de ADN.**

Vivian Cuns Suárez

Orientadora:

Dra. Cristina Mazzella

Profesora Agregada de Genética DT

Laboratorio de evolución y domesticación de las plantas

Departamento de Biología Vegetal

Facultad de Agronomía - UDELAR

Diciembre de 2014

AGRADECIMIENTOS

- ✓ Agradezco a mi orientadora, la Dra. Cristina Mazzella, por sus valiosas enseñanzas y por impulsarme a continuar.
- ✓ A los integrantes del tribunal evaluador Paola Gaiero y Pablo Speranza por sus sugerencias y comentarios al corregir este trabajo.
- ✓ A Paola Gaiero, Magdalena Vaio, por sus aportes y apoyo desinteresado.
- ✓ A Sandra Vázquez por estar siempre dispuesta a compartir sus conocimientos y por su apoyo.
- ✓ A los compañeros del Laboratorio de Evolución y Domesticación de las Plantas por el buen clima de trabajo que todos contribuyen a crear.
- ✓ Agradezco a los técnicos Sres. Julio Sburlatti y Matías Antuoni, por el cuidado y mantenimiento del material vegetal.
- ✓ Quiero agradecer a *Paspalum notatum* por todo lo que aprendí en el proceso de tratar de entenderlo.
- ✓ Finalmente quiero agradecer a mi madre, amigos, estudiantes y colegas por creer en mí.

RESUMEN

Las gramíneas son vegetales ampliamente distribuidos en diversos hábitats en el planeta y son los más abundantes en nuestra pradera. Dentro de esta familia, uno de los géneros con mayor número de especies (más de 400) es *Paspalum* L. Su distribución es mayoritariamente sudamericana, desde el norte de Estados Unidos hasta el sur de Argentina, se distribuye en una amplia variedad de hábitats: costas arenosas, humedales, pajonales, savanas, praderas, incluso zonas forestadas. Una de las especies de importancia económica y ecológica es *P. notatum*, conocida comúnmente como bahiagrass, common bahía, y también pasto horqueta por la forma de su panoja, cuyo centro de origen fue sugerido para el sur de Brasil, Uruguay, noreste de Argentina y Paraguay. Es una especie forrajera estival que florece en nuestra región a partir de noviembre hasta marzo. Funciona bien como especie pionera en suelos degradados y por ello es utilizada para controlar la erosión. Presenta buena tolerancia al frío, su sistema radicular profundo le confiere buena respuesta ante la sequía y resiste bien el pastoreo. Debido a la presencia y abundancia de poblaciones naturales bien adaptadas en nuestra pradera es que se viene desarrollando un programa nacional (INIA) para la domesticación y mejora de *P. notatum*. Las accesiones colectadas en todo el país son tetraploides. En dichos estudios se encontraron accesiones con diferencias en el contenido de ADN cuantificado como índice de ploidía (IP). Un grupo de accesiones (Grupo 2 en este trabajo) tienen un IP similar al esperable al comparar con el control diploide (*P. notatum* denominada Pensacola), y otras (Grupo 1) con un contenido menor. Esto llevó a cuestionamientos sobre su sistema reproductivo y sobre el origen de las distintas poblaciones de la especie. Para conocer más sobre el comportamiento reproductivo y origen estas accesiones se planteó

este trabajo donde se analizó el comportamiento de cromosomas y asociaciones de multivalentes durante la meiosis en las células madre de polen en plantas silvestres de *P. notatum* de distintas accesiones de ambos Grupos con técnicas de citogenética clásica. También se analizó el tamaño y la viabilidad de los granos de polen, por medio de la reacción fluorocromática con fluorocromo FDA y observación al microscopio. Las observaciones del comportamiento meiótico en accesiones de *P. notatum* permiten concluir que no ocurre meiosis normal o regular con formación de 20 bivalentes en ninguna de ellas. Comparando ambos Grupos, el proceso de la meiosis es similar, ambos presentan con mayor frecuencia en Metafase I tetravalentes en número de 1 a 3. Las anomalías en las segregaciones en anafase, si bien no cuantificadas, fueron de muy baja frecuencia. La viabilidad de polen en el genotipo del Grupo 2 estudiado fue mayor (69,2%) mientras que el promedio de este valor en la planta del Grupo 1 fue de 14,1%. Este trabajo no permite realizar conclusiones definitivas, y es necesario continuar estudiando su citología ampliando la muestra así como incorporando estudios moleculares.

TABLA DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS.....	I
RESUMEN.....	II
TABLA DE CONTENIDOS.....	IV
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Género <i>Paspalum</i> L.....	2
1.1.1. Sistemas de reproducción.....	3
1.1.2. Meiosis.....	5
1.1.2.1. Anomalías en la meiosis.....	6
1.1.3. Número cromosómico y contenido de ADN.....	8
1.2. <i>Paspalum notatum</i> Flüggé (Grupo Notata).....	9
1.2.1. Niveles de ploidía, contenido de ADN y microesporogénesis.....	12
1.2.2. Viabilidad y tamaño del grano de polen.....	17
1.3. FUNDAMENTACIÓN.....	18
1.4. OBJETIVO GENERAL.....	20
1.5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
2.1. Materiales.....	22
2.2. Métodos.....	25
2.2.1. Análisis de la meiosis en células madre de polen (CMP).....	25
2.2.1.1. Metodología I.....	25
2.2.1.2. Metodología II.....	26
2.2.2. Análisis del tamaño y de la viabilidad de los granos de polen.....	28
2.2.2.1. Tinción clásica con carmín acético.....	29
2.2.2.2. Técnica de reacción fluorocromática (FCR).....	29
3. RESULTADOS.....	31
3.1. Consideraciones generales y metodológicas.....	32
3.2. Aspectos generales de la meiosis en <i>P. notatum</i>	33
3.3. Asociaciones cromosómicas en primera metafase meiótica.....	38
3.3.1. Análisis de cada uno de los genotipos, Grupo 1 y Grupo 2.....	38
3.3.2. Análisis conjunto de los genotipos del Grupo 1 y del Grupo 2.....	41
3.4. Viabilidad y tamaño de los granos de polen.....	42
3.4.1. Aspectos metodológicos.....	42
3.4.2. Viabilidad del polen.....	44
3.4.3. Tamaño del polen.....	44
4. DISCUSIÓN.....	47
4.1. Análisis de la meiosis en células madre de polen y asociaciones cromosómicas en Metafase I.....	49
4.2. Viabilidad y tamaño del grano de polen.....	54
4.3. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	55
5. BIBLIOGRAFÍA.....	58
6. ANEXOS.....	68

1 Introducción

Las gramíneas son vegetales ampliamente distribuidos en diversos territorios o ecosistemas del planeta. Los taxónomos han denominado a esta familia Poaceae o Gramineae. La misma incluye plantas herbáceas y leñosas con cañas con nudos y entrenudos, de sección circular, hojas con lígula, espiguillas con dos glumas y su fruto es un cariopse. En Uruguay las gramíneas son un componente importante de las pasturas naturales, sobre un total de 2500 especies vasculares presentes en todo el país. Las pasturas representan el principal recurso natural de nuestro país, representan aproximadamente el 85% de nuestro territorio y son la base del sistema productivo nacional (carne, leche, cuero, lana y derivados) (Millot, 1995). Una de sus características es la gran cantidad de especies que las componen, más de 400 tipos distintos siendo las principales gramíneas, compuestas, ciperáceas y euforbiáceas. Las gramíneas constituyen la familia mejor representada y entre las estivales *Paspalum notatum*, *P. dilatatum* y *P. plicatulum* son de las especies más abundantes, junto con especies de los géneros *Axonopus*, *Andropogon*, *Coelorhachis*, *Andropogon*, *Bothriochloa* y *Eragrostis* (Pereira Machin, 2011).

1.1. Género *Paspalum* L.

Dentro de esa familia, uno de los géneros más grandes en número de especies es *Paspalum* L., que comprende cerca de 400 especies (Pizarro, 2005; Cidade et al., 2013). Integra la tribu Paniceae, dentro de la subfamilia Panicoideae (<http://www.virtualherbarium.org/grass/gpwg/>). Su distribución es mayoritariamente americana, desde el norte de Estados Unidos hasta el sur de Argentina, siendo en mayor número las de localización sudamericana desde Bolivia hasta Argentina (Chase, 1929) Son muy pocas, como *P. scrobiculatum*, las que no son de origen americano. La misma autora indica la gran variedad de hábitats que colonizaron las distintas especies, desde costas arenosas, humedales, pajonales, savanas, praderas, incluso zonas forestadas. Millot et al. (1987)

plantean que es el género más representativo del campo uruguayo, siendo uno de los de mayor importancia económica dentro de la familia, muchas de sus especies tienen amplio uso forrajero, con gran tolerancia al estrés ambiental.

Las especies de este género *Paspalum* fueron agrupadas en varios grupos taxonómicos informales por Chase (1929), basándose en sus similitudes morfológicas, entre ellos los grupos Dilatata, Paniculata, Plicatula así como el grupo Notata. En las siguientes décadas y hasta hoy en base a múltiples revisiones y sobre todos a abordajes moleculares muchos investigadores han ido cambiando algunas de las especies en relación a la localización inicial de Chase, en otros casos confirmaron su clasificación (Scataglini et al., 2014).

En vegetales varios géneros forman los denominados complejos agámicos que se caracterizan por tener sistemas reproductivos asexuales como la reproducción vegetativa o la apomixis. En particular el género *Paspalum* es un complejo agámico y apomíctico. Aproximadamente 80% de las especies del género son poliploides, algunas autógamas y otras alógamas. Además dentro del género más del 50% (para Adamowski et al., 2005 esta cifra es del 94%) de los poliploides estudiados son tetraploides y la mayoría de ellos presentan reproducción por apomixis (Quarin, 1992; Quarin, 2004).

1.1.1. Sistemas de reproducción

Una particularidad del sistema reproductivo en las gramíneas es que es común la coexistencia de reproducción sexuada y reproducción vegetativa, incluso es frecuente en el grupo la apomixis. Además de esta familia este último modo de reproducción está muy extendida en las familias Asteraceae y Rosaceae, entre las tres se considera que incluyen el 75% de los casos de apomixis estudiados (Bricknell and Koltunow, 2004).

El género *Paspalum* en particular desarrolló varias estrategias, junto con los niveles de ploidía. Todas las especies diploides producen semillas sexuales y son base firme de mantenimiento de la variabilidad genética. Muchas especies surgieron por hibridaciones interespecíficas y otras por autoploidización (Scataglini et al., 2014). A su vez es un género donde algunas especies también tienen reproducción asexual por estolones y rizomas, estrategia que muchas veces es la predominante para mantenerse en un ecosistema así como para colonizar territorios. Es también característica la formación de semillas, tanto sexuadas o asexuals apomícticas. La apomixis es una forma de reproducción asexual en la que se forman semillas a partir de la célula madre del megasporofito sin pasar por meiosis, o a partir de una célula de la nucela que no requiere ser fertilizada. Los productos de las semillas son por ello clones de la planta materna. El análisis de la estructura de los sacos embrionarios permite identificar el origen de éstos, si son apospóricos o meióticos. Aparte de la posición, orientación y número de embriones por saco embrionario, hay diferencias estructurales. Los sacos embrionarios apospóricos no presentan antípodas y los sacos embrionarios meióticos presentan aparato filiforme, antípodas y célula central binucleada (Espinoza et al., 2006).

Quarin et al. (2001) indica que en *Paspalum* la expresión de la apomixis es generalizada en los citotipos tetraploides pero no en los diploides de las especies, y esto se debe a que es necesario un genoma poliploide (coexistencia en un mismo núcleo de más de dos genomas) para la expresión de la característica apomíctica. La aposporia y la pseudogamia incluidas en la apomixis parecen heredarse a partir de un solo factor dominante localizado en una zona con recombinación restringida (Martínez et al., 2001). Laspina et al. (2008) describieron en arroz la presencia de un grupo de 5 genes que se encuentran silenciados en plantas apomícticas, e indican que se conoce también una región sinténica que gobierna la aposporia en *P.*

notatum y *Brachiaria brizantha* (este último género pertenece también a la tribu Paniceae). Los mismos autores indican que también se han mapeado cuatro genes que se expresan diferencialmente en plantas sexuales y apomícticas.

La determinación de los sistemas reproductivos de las distintas especies es de enorme importancia para toda investigación basada en el mejoramiento de especies o biotipos potencialmente útiles para la producción. Su resolución no es simple y se ha basado en análisis diversos, desde morfológicos, estudios del tipo de espiguillas, citológicos como conteos cromosómicos, estudios del comportamiento cromosómico en la meiosis durante la microesporogénesis y con mayor dificultad durante la macroesporogénesis y en las últimas décadas han sido fundamentales los estudios con marcadores moleculares.

1.1.2. Meiosis

La meiosis en este género, como en general en vegetales, suele ser estudiada con más facilidad en la microesporogénesis que en la macroesporogénesis. Esto se debe a que en los sacos polínicos de las anteras se encuentran cientos de microsporocitos o células madre del polen, y además es simple determinar con alta probabilidad por el aspecto exterior de la espiguilla, el momento en que dicho proceso ocurre. Una dificultad que presenta este tipo de estudios en todo el género *Paspalum* es que los cromosomas son pequeños, de unos 4 μm , y muy similares en morfología entre sí, difíciles de diferenciar en general en metafases somáticas (Vaio et al., 2007) y por ello también en meiosis.

En cada flor o espiguilla, cada célula madre de los granos de polen luego de la meiosis da por resultado 4 células hijas que mientras se mantienen asociadas entre sí por una sustancia denominada calosa,

constituyen una tétrada o esporada que es un conjunto de cuatro micrósporas. Se denomina citocinesis a la división del citoplasma que sucede al terminar la meiosis. Según el momento en que se formen las paredes y cómo se orienten los husos acromáticos, las cuatro células resultantes de la meiosis (tétrada), pueden disponerse de distinta forma: una es la denominada citocinesis sucesiva, que es la que presentan las especies del género *Paspalum*, y en el resto de Monocotiledóneas, donde cada división es sucedida por una división de citoplasma. Las micrósporas quedan dispuestas en un mismo plano. La primera división meiótica da lugar a dos células hijas unidas por capas de calosa que las envuelven, mientras que luego de la segunda división meiótica las tétradas pueden ser tetragonales, romboidales, lineares o en forma de T, también asociadas aún por calosa. La otra forma es la que ocurre típicamente en las Dicotiledóneas y se denomina citocinesis simultánea y es cuando las paredes se forman recién al terminar la segunda división meiótica, donde las micrósporas quedan dispuestas en varios planos. Las tétradas pueden ser tetraédricas o decusadas. En los granos de polen resultantes se establece un eje polar, con el polo proximal hacia el centro de la tétrada y el polo distal hacia la periferia.

En *Paspalum* luego de la primera división meiótica se produce una citocinesis que da lugar a dos células hijas independientes, cuyo conjunto queda asociado por la calosa denominándose Diada. La segunda división meiótica también es sincrónica y cada hemidiada da lugar a otras dos células hijas, las cuatro asociadas aún por la calosa se denominan Tétrada. La meiosis regular o normal es reduccional, o sea cada microesporocito de la tétrada tiene la mitad de los cromosomas iniciales, es decir hubo segregación de los mismos.

1.1.2.1. Anomalías en la meiosis

En general, en plantas y animales, la meiosis llamada normal o regular es un proceso altamente organizado que da lugar como ya se indicó a cuatro núcleos reducidos y con variabilidad genética entre ellos y con respecto al núcleo que los originó. Típicamente durante la profase I de la meiosis, etapa crucial y altamente organizada, se determina en parte la genética que resulta en cada gameto. Involucra cohesión de cromátidas hermanas, alineamiento de los cromosomas homólogos, apareamiento, sinapsis y recombinación (Hamant et al., 2006). Otras fases definitorias de qué composición tendrán los gametos son las anafases, I y II, momentos donde segregan los cromosomas homólogos y las cromátidas hermanas, respectivamente.

En la naturaleza se dan alteraciones o cambios en el proceso denominado normal de la meiosis ya sea por alteraciones debidas a rearrreglos cromosómicos, mutaciones genéticas, etc. Un buen resumen sobre este tema lo presenta Pagliarini (2000), según la autora las anomalías meióticas más frecuentes en vegetales son irregularidades en la segregación cromosómica, pegajosidad cromosómica, fallas en el huso y por ello en la citocinesis. Las irregularidades en la segregación cromosómica pueden generar micronúcleos por segregación precoz (por finalización temprana de la sinapsis, o la presencia de genes que impidan o anulen una buena sinapsis) o segregación tardía de cromosomas. La misma autora al trabajar en el género *Paspalum* observó anormalidades en la formación de husos y por tanto en la citocinesis, las cuales dan como producto díadas y tríadas, y no las tétradas esperadas. Esto además permite dar una explicación a la ocurrencia de poliploidía en el género por la formación de gametos no reducidos.

En relación al comportamiento de los cromosomas durante la meiosis en autotetraploides y debido a la presencia de 4 copias del genomio básico se deben esperar en meiosis asociaciones cromosómicas de bi, tri y tetravalentes visibles en meta y anafase I, así como univalentes (Singh, 1993). Stein et al. (2004) estudia la meiosis completa de una planta de *P. notatum* apomíctica natural y obtiene un promedio de

49% (rango de 10 a 80%) de tetravalentes y un 5,5% de univalentes, y un 55,6% de anormalidades en anafase I. A su vez Podio et al. (2012), estudiando cinco accesiones apomicticas 4x de la misma especie de *Paspalum* y analizando fundamentalmente el comportamiento en la segregación de la primera división meiótica encuentra un promedio de 44,4% de los núcleos con anormalidades, univalentes rezagados causados por separación temprana o puentes cromosómicos, que indican separaciones tardías de bivalentes, y los micronúcleos son en algunos casos tan pequeños que sugieren estar formados por fragmentos cromosómicos.

1.1.3. Número cromosómico y contenido de ADN

El género *Paspalum* se desarrolló evolutivamente a partir del número básico de cromosomas $x=10$. Según Pagliarini et al. (1999) el género presenta por ello números cromosómicos que varían entre $2n=12$ a $2n=160$. Más del 80% de sus especies son poliploides, con niveles que varían de $3x$ a $8x$. La condición tetraploide es la más frecuente, considerada por algunos casi del 50% y a su vez en general los tetraploides presentan apomixis (Hojsgaard et al., 2009). Así, en Uruguay se conocen especies e híbridos naturales con citotipos $2x=20$, $3x=30$, $4x=40$, $5x=50$, $6x=60$, $7x=70$. Secundariamente surgieron algunas especies con número básico $x=6$ cromosomas, entre otras la primera descrita fue *P. alatum* ($2n=12$) y luego otras especies $4x$, $8x$, también se han descrito especies con número básico $x=9$ y $x=16$, todos se consideran evolutivamente derivados del $x=10$ por rearrreglos cromosómicos (Podio, 2012; Scataglini et al., 2014).

En los últimos años se ha incorporado la cuantificación del contenido de ADN como un parámetro muy útil para relacionar genomas distintos dentro de especies diploides del género *Paspalum*, así como investigar si existe correlación entre el tamaño del genoma y

diferentes características biológicas. Al ser una herramienta importante en estudios de complejos poliploides, Vaio et al. (2007) concluyen trabajando con distintos biotipos (2x, 3x, 4x, 5x) de la especie *Paspalum quadrifarium* (del grupo Quadrifaria) que el proceso de poliploidización puede originar pérdida de ADN genómico. Es decir, las plantas tetraploides por ejemplo no necesariamente contiene el doble de ADN genómico que una planta diploide. Se denomina valor "Cx" al valor C del número básico de cromosomas y es útil como unidad de comparación. La reducción del contenido de ADN o "genome downsizing" ha sido detectado en muchas especies poliploides (Leitch and Bennett, 2004) y parece ser una respuesta frecuente a la poliploidización, así los valores Cx de muchos poliploides naturales son menores que el valor Cx del diploide asociado. Los mecanismos que se han propuesto para explicar este hecho son varios, recombinación no homóloga, activación de transposones y eliminación de secuencias específicas de ADN (Vaio et al., 2007).

Asimismo, Galdeano et al. (2012) determinaron el contenido de ADN en picogramos (pg) por citometría de flujo en 46 especies del género *Paspalum*, analizando 75 entidades (31 con reproducción sexual y 44 apomícticas, 16 diploides y 59 poliploides). La comparación del contenido ADN promedio de las entidades sexuales (Cx=0.68 pg) o apomícticas (Cx=0.69 pg) y las entidades pentaploides (Cx=0.57 pg) o diploides (Cx=0.74 pg), no mostró variaciones significativas en ninguno de los dos casos. Se analizaron también las diferencias entre accesiones de los grupos: Dilatata, Notata y Plicatula, las cuales sí dieron diferencias significativas. Los resultados no permiten concluir que el tamaño del genoma en el género *Paspalum* está relacionado con el modo reproductivo o nivel de ploidía, pero sí con los eventos que llevaron a las diferencias morfológicas de las distintas agrupaciones actuales (Galdeano et al., 2012). El contenido de ADN

del diploide $2n=2x=20$ *P. notatum* var. *saurae* fue estimado en 0.57 pg/C (que corresponde a 554 Mbp) (Jarret et al., 1995).

1.2. *Paspalum notatum* Flügge (Grupo Notata)

Chase en 1929 creó el grupo Notata con varias especies como *Paspalum notatum*, *P. pumilum* Ness, *P. arsenei* Chase. Posteriormente otros autores incorporaron más especies como *P. ionanthum* Chase, *P. lineare* Trin., *P. cromyorrhizon* Trin ex Doell y otras (Gates et al., 2004). Con los avances en los estudios citológicos y fundamentalmente moleculares, muchas especies de cada grupo fueron reubicadas (Rua et al., 2010; Scataglini et al., 2014). Según los autores el número de especies que se incluyen en el grupo Notata varía entre 24 (Zuloaga et al., 2004) y 12 (Espinosa et al., 2006), siendo para éste último la de mayor importancia económica y ecológica *P. notatum*.

P. notatum es conocida comúnmente como “bahiagrass”, “common bahía”, en nuestro país y la región también se le denomina “pasto horqueta” por la forma de su panoja. El centro de origen de *P. notatum* fue sugerido por Parodi (1937) para el sur de Brasil, Uruguay, noreste de Argentina y Paraguay. Se distribuye desde México a Argentina, incluyendo las islas del Caribe (Burton, 1967; Espinoza et al., 2006; Reyno et al., 2012).



P. notatum es denominado pasto horqueta por la forma de su panoja. Fotografía de panoja, del ensayo de Facultad de Agronomía en 2012.

En nuestro país es la especie de ese género más frecuente y es un integrante que aporta a la buena productividad de nuestras praderas naturales (Pereira Machin, 2011; Reyno et al., 2012). Desde el punto de vista de su clasificación morfológica algunos autores reconocen tres taxones subespecíficos: *P. notatum* var. *notatum*, *P. notatum* var. *latiflorum* Döll, *P. notatum* var. *saurae* Parodi. Las dos últimas se distinguen entre sí porque la var. *saurae* tiene hojas más angostas y espiguillas de menor tamaño que la var. *latiflorum*, mientras que la var. *notatum* tiene hojas angostas pero más cortas (http://www.tropicalforages.info/key/Forages/Media/Html/Paspalum_notatum.htm). Para nuestro país Rosengurtt et al. (1970) mencionan dos de los taxa subespecíficos mencionados que son *P. notatum* var. *notatum* (lígula más larga que ancha, y extendida en todo el país) y *P. notatum* var. *latiflorum* (lígula más ancha que larga y menos frecuente en el país que la variedad anterior).

Paspalum notatum es una gramínea tropical y subtropical, perenne, altamente persistente debido a su hábito rizomatoso y la longevidad de los macollos (Pakiding and Hirata, 2001). En la planta los estolones semejan rizomas, con entrenudos cortos, fuertemente arraigados y los entrenudos se encuentran cubiertos con las vainas de las hojas secas y viejas. Los tallos son geniculados en el nudo ubicado entre el primer y segundo entrenudo elongado, el resto es erecto de entre 10 a 60 cm de altura. Los macollos son de base comprimida y las hojas dispuestas de forma radiada. Las hojas son envolventes en la base con ausencia de pelos o glándulas o con pequeños cilios marginales; las láminas usualmente planas, de forma lanceolada de 3 a 30 cm de longitud y 3 a 12 cm de ancho. La inflorescencia es subconjugada con un eje común casi imperceptible, con 2 racimos, en raras ocasiones 3, que miden de 3 a 14 cm de longitud. El raquis es glabro, flexible, de color verde o purpúreo. Las espiguillas son solitarias, dispuestas en dos filas una a cada lado del raquis, obovadas u ovadas, brillantes y glabras, de 2,5 a 4 mm de largo y 2 a 2,8 mm de ancho. Las anteras y

el estigma son usualmente de color púrpura y el fruto es oval de 1,8 mm de largo y 1,2 mm de ancho (Gates et al., 2004).

Es una especie forrajera estival que florece a partir de noviembre hasta marzo. Su gran potencial forrajero hace que funcione bien como especie pionera en suelos degradados, también es utilizada para controlar la erosión en taludes a los costados de la carretera o en campos de recreación (Pizarro, 2005; Pozzobon and Valls, 1997). Tolera bien el frío, su sistema radicular profundo le confiere resistencia a la sequía. Se adapta bien a suelos livianos y arenosos con baja fertilidad y una alta saturación de aluminio (Pizarro, 2005). Es dominante en campos bajo pastoreo continuo, resiste bien el pastoreo y el pisoteo desarrollando macollos apretados contra el suelo (Rosengurtt, 1946). Es una planta con metabolismo C4, lo que implica mejor captación y uso del dióxido de carbono y menor pérdida de agua. Estudios de Wilson et al. (1990) sobre producción forrajera de *P. notatum* creciendo bajo plantaciones de *Eucalyptus*, indicaron que dicha combinación puede aumentar en la gramínea su crecimiento, comparado con el que se generaría a campo abierto. Esto se analizó ya que aumentó la producción de hojas verdes, de N, de P y de humedad.

Las raíces de *P. notatum* tienen la característica, como otras del mismo género, de desarrollar asociaciones con hongos arbusculares micorrícicos (AMF) y con la bacteria libre diazotrófica (que fija nitrógeno), *Azotobacter paspali*. Estudios realizados indican que la fijación por *A. paspali* se estima en el orden de 10-20 kg/ha/año de N, y puede llegar en algunos casos a 90 kg/ha/año. (Extraído de la página www.tropicalforages.info/key/Forages/Media/Html/Paspalum_notatum.htm web: www.tropicalforages.info/key/Forages/Media/Html/Paspalum_notatum.htm).

1.2.1. Niveles de ploidía, contenido de ADN y microesporogénesis

En la especie *Paspalum notatum* se conocen la mayoría de sus accesiones tetraploides, pero también hay diploides, triploides y pentaploides (Daurelio et al., 2004; Pozzobon and Valls, 1997). Fue Burton (1948) quien originalmente describió que la mayor parte de las especies de este género en su distribución natural eran tetraploides con 40 cromosomas, apomícticas, pseudogámicas, apospóricas. Los citotipos tetraploides son considerados como la forma típica de esta especie. Dentro de los citotipos diploides, $2n=20$, se ha seleccionado productivamente la variedad *saurae* que se denomina comúnmente como bahiagrass “Pensacola” y que se cultiva en Estados Unidos para forraje y cobertura en suelos de bajo mantenimiento, por ejemplo a los costados de carreteras, en realidad originaria del noreste argentino y llevada a Estados Unidos en los barcos con ganado (Burton, 1967). En nuestra región se encuentran poblaciones naturales diploides en islas del río Paraná y sus tributarios, al este de la provincia de Santa Fé, oeste de Entre Ríos y Corrientes en Argentina. También se colectaron diploides en poblaciones naturales de Rio Grande do Sul pero se interpreta como un posible transporte de semillas de “Pensacola” por los ríos Uruguay y Jacuí, ya que este cultivar se ha incorporado a las praderas artificiales del sur de Brasil (Pozzobon and Valls, 1997). Sin embargo, también se han colectado diploides en Uruguaiana (en el límite con Argentina) y en Capivari do Sul (zona costera de Rio Grande do Sul), en esas zonas se ha invertido dinero para recobrar las praderas naturales lo que hace muy difícil que este diploide se deba a un escape de “Pensacola” (Cidade et al., 2008). Las poblaciones salvajes de la variedad *saurae* están restringidas a suelos húmedos y arenosos en las márgenes de los ríos o islas arenosas del río Paraná. En Uruguay el único registro hasta hoy aparece en una reciente tesis de maestría realizada en el sur de Brasil (Fachinetto, 2010) en donde se

analizaron múltiples accesiones de *P. notatum* colectadas en Brasil, y otras solicitadas al banco de germoplasma USDA de Estados Unidos. En base a este trabajo surge un único registro de planta diploide de una accesión numerada 87N de Paysandú en Uruguay (registro de USDA PI404863), en base a recuento cromosómico en diacinesis de la meiosis y según dicho autor estaría en la que es considerada región de origen de la var. *saurae*. Deben realizarse búsquedas sistematizadas en Uruguay para confirmar la existencia y localización del citotipo diploide de esta especie (P. Speranza, com. pers.).

Para denominar la fórmula genómica del citotipo diploide *Paspalum notatum* var. *saurae* se usa la nomenclatura $2n=2x=NN$ (Burson, 1981), y por lo tanto cuando se identifica un autotetraploide la fórmula es $2n=4x=NNNN$ (Quarin et al., 1984). Las formas diploides se reproducen sexualmente y requieren de polinización cruzada debido a su sistema autoincompatible de reproducción, mientras que los autotetraploides se reproducen por apomixis apospórica (Stein et al., 2007). *P. notatum* 4x es apomítico y pseudogámico, es decir, tiene fecundación de un núcleo masculino y dos núcleos polares dando lugar al endosperma. Hay dos estudios (Quarin et al., 1984; Espinoza et al., 2006) que indican que algunas plantas de *P. notatum* 4x son apomíticas facultativas, los segundos autores analizaron el desarrollo del saco embrionario en varias plantas, encontraron algunas que presentan sólo sacos apomíticos o sea planta apomíticas obligadas, y otras que también tienen sacos sexuales, a estas se las denomina apomíticas facultativas. Se han reportado ocasionalmente triploides ($2n=3x=30$) y pentaploides ($2n=5x=50$) colectados en poblaciones naturales (Daurelio et al., 2004; Gould, 1966; Quarin et al., 1989; Tischler and Burson, 1995). En otro trabajo donde se estudiaron 44 accesiones, mayoritariamente tetraploides pero la muestra incluyó también accesiones 2x, 3x, 5x y 6x, la mayor parte colectadas en la naturaleza, se determinó que eran apomíticos obligatorios o facultativos (Espinoza et al., 2006). En dicho trabajo se

encontró que la mayoría eran facultativos con gran variabilidad de sexualidad residual con presencia de sacos embrionarios meióticos (0 y 23,3%), pocas eran sólo apomícticas.

Acuña et al. (2000) confirmaron un evento de poliploidización espontánea dentro de una especie de *Paspalum* (*P. lenticulare*). Quarin (1992) y luego Daurelio (2004), opinan que el origen de los tetraploides debió ser en dos pasos a partir de poblaciones diploides, con generación de algunos gametos no reducidos (oóferas) fecundadas por un anterozoide haploide, se generó un individuo triploide. Para el mismo autor los gametos no reducidos de un triploide fecundaron gametos reducidos de un diploide. La ausencia de tetraploides sexuales en la naturaleza no ha sido aún explicada, posiblemente de deba a una fuerte selección natural contra las plantas sexuales 4x en poblaciones naturales (Espinoza et al., 2006).

En los últimos años los análisis comparativos tanto para relacionar especies entre sí como para análisis de divergencias intraespecíficas han tenido aportes interesantes al estimar el contenido de ADN de los tejidos somáticos, estimando así su peso en picogramos, también analizando contenido de ADN en polen. Hay varios trabajos realizados en materiales del género *Paspalum*, Jarret et al. (1995) reporta valores comprendidos entre 1.02 a 3.86 pg, similar a lo encontrado por Vaio et al. (2007) para otras especies de nuestro país. Para *P. notatum* el único trabajo sobre contenido de ADN se refiere a comparaciones de niveles de ploidía, tomando al diploide "Pensacola" como control (Reyno et al., 2012). Con el objetivo de analizar el nivel de ploidía (y no el contenido de ADN), se compararon muestras de plantas colectadas en accesiones naturales de todo el Uruguay con una especie control que se sabe es diploide, el cultivar Pensacola 7453 de *P. notatum* (USDA7453, de Estados Unidos). Este trabajo se realiza poniendo en el mismo frasco hojas cortadas de la muestra conjuntamente con hojas cortadas de la planta diploide. El índice de ploidía se calcula como el cociente entre la media de la muestra

desconocida y la media del control interno utilizado. En dicho trabajo se indica que los valores menores de índice de ploidía que fueron detectados en algunas accesiones, podrían deberse a que eran individuos aneuploides, lo cual fue desechado al comprobarse que tenían 40 cromosomas y eran eutetraploides (Reyno et al., 2012). En ese mismo artículo se presentan los números cromosómicos de las plantas utilizadas para este trabajo, los que fueron determinados por Pablo Hernández. Se realizaron los conteos cromosómicos mediante métodos tradicionales a partir de meristemo radicular, en el Departamento de Biología Vegetal de la Facultad de Agronomía, dando todos los conteos $2n=40$ cromosomas. Este análisis se realizó luego de obtener resultados dudosos al analizar el contenido de ADN de las plantas. En base a estos resultados donde todas las plantas fueron tetraploides se desechó una de las primeras hipótesis propuestas, la de la aneuploidía.

Podio et al. (2012) realizaron un análisis del comportamiento meiótico en anafase I en accesiones apospóricas naturales e individuos experimentales tetraploides sexuales de *P. notatum*. Sus resultados muestran que en estos casos un 44,4% de las meiosis de los individuos apospóricos y un 29,7% de las meiosis individuos sexuales presentaron anomalías. Las mismas fueron en anafase I de cromosomas y univalentes rezagados, separaciones tardías de homólogos y puentes de cromatina entre bivalentes, mientras que en telofase I en ambos grupos se observó la presencia de micronúcleos.

Dahmer et al. (2008) analizaron el comportamiento meiótico de *P. notatum* y demostraron que las configuraciones de apareamiento en diacinesis son bastante variables, principalmente en accesiones 4x, encontrándose uni, bi, tri y tetraivalentes, pero con mayor frecuencia tétradas normales. Lo mismo fue descrito para otras especies del género por Adamowski (2005) y Reis et al. (2008). Dahmer et al. (2008) analizaron las configuraciones cromosómicas en diacinesis y en metafase I meiótica y encontraron que variaban entre distintas

accesiones tetraploides, encontrando desde plantas con sólo bivalentes hasta plantas con alta frecuencia de tetravalentes. También analizaron los mismos autores la fertilidad del polen, y encontraron que variaba entre 82.5 a 95.9% entre accesiones diploides, y de 72.4 a 97.9% entre accesiones tetraploides. Al ser la forma de reproducción de esta especie apomíctica por semillas, las irregularidades meióticas pueden ser mantenidas y toleradas por las plantas sin afectar su propagación. Estos mismos autores interpretan que a la vez, la alta fertilidad de polen observada debe asegurar un buen desarrollo del endosperma, ya que la especie es pseudógama. Ellos indican que desde el punto de vista del mejoramiento, estas accesiones serían potencialmente dadoras de polen en un programa de cruzamientos. En ese mismo trabajo de Dahmer et al. (2008), dos de las accesiones 4x analizadas provenían de Uruguay, son: i) *P. notatum* (acc. 66) se encontraron 20 II (15 células analizadas), y 16 II + 2 IV (9 células) con viabilidad de polen de 88.9%; ii) *P. notatum* (acc. 67) con 20 II (12 células), 18 II + 1 IV (22 células), y 16 II + 2 IV (7 células), con viabilidad de polen de 89.7% (el colector responsable es MD: Miguel Dall'Agnol, UFRGS, Porto Alegre). En el artículo de Pagliarini et al. (2001) trabajaron con seis accesiones diploides de *P. notatum* y en una sola (acc. BRA-006173) encontraron univalentes en diacinesis, de 0 a 8 I pero en muy baja frecuencia e indican que en general la presencia de univalentes daría lugar a migraciones tardías, eventualmente micronúcleos.

En resumen y en relación al sistema reproductivo diremos que *P. notatum* citotipo tetraploide es considerado apomíctico obligado por varios autores (Bashaw et al., 1970; Burton, 1948; Burton, 1955; Daurelio et al., 2004) y apomíctico facultativo por investigadores que lo han estudiado extensamente como Quarin (1992). A ésta última conclusión también se unen Reyno et al. (2012) ya que supone que el citotipo tetraploide apomíctico está integrado por una serie de clones, que actúan en algún grado como apomícticos facultativos. En

condiciones experimentales la sexualidad remanente en tetraploides apomícticos varía entre 3 y 8% (Ortiz et al., 1997).

1.2.2. Viabilidad y tamaño del grano de polen

En *Paspalum notatum* se han realizado estudios de viabilidad y tamaño de polen, trabajando en cada caso con materiales regionales y con diversas metodologías para el análisis de viabilidad (carmín acético, FDA). No se encuentra ningún trabajo que realice un estudio amplio de toda la especie, y cuando se analiza tamaño, lo clasifican en “normales” y “pequeños”, sin realizar mediciones en micras. Los que siguen son algunos de los trabajos realizados en la temática.

En *P. notatum* se ha reportado para accesiones colectadas mayoritariamente en Brasil viabilidad del polen de 72,4 al 97,9% en accesiones tetraploides y de 82,47 al 95,93% en accesiones diploides (Dahmer et al., 2008). En el estudio realizado en accesiones tetraploides, apospóricas naturales e individuos sexuales obtenidos experimentalmente se obtuvieron los siguientes valores de viabilidad de polen: 64,7% en las accesiones apospóricas naturales y 72,6% en los genotipos sexuales, obtenidos experimentalmente (Podio et al., 2012).

Forbes and Burton (1961) analizan también la viabilidad de polen (con tinción acetocarmín) en poblaciones naturales (observan polen viable en un rango entre 40 y 70%), dos de las accesiones provienen de Uruguay. También analizan autotetraploides inducidos a partir de *P. notatum* Pensacola (con 100% granos de polen viables), e híbridos que surgen del cruzamiento de los inducidos y una variedad 4x (con viabilidad entre 63 y 98%). A su vez, Moraes Fernandes et al. (1973) en los estudios de viabilidad de polen (con tinción carmín acético) trabajaron con 12 poblaciones tetraploides de la misma especie, con una viabilidad entre 0 y 85,3%.

En referencia al tamaño de los granos de polen, en la biblioteca de polen que se encuentra en la página web: <http://www.pollenlibrary.com>, los datos que aparecen son sobre el género *Paspalum* L. y se indica que los granos de polen varían en su forma de esféricos a ovales y en su diámetro entre 22 y 122 μm , pero esta información es muy amplia porque los datos se generalizaron a todo el género y no está la base de datos original, ni ninguna especie en particular. En muy pocos trabajos aparecen datos sobre morfología de polen en *P. notatum*. Para el género *Paspalum* estudiando ocho especies distintas, entre ellas *P. notatum*, se concluye que los granos de polen son esferoidales y con un diámetro promedio entre 34 y 50 μm (Ma et al., 2001). En otro estudio de Ma et al. (2009) se analiza como dato morfológico el número de aperturas o poros del polen y su relación con el modo de reproducción de especies de *Paspalum* y otras panicoideas. Dichos autores encuentran que en *P. notatum* 2x de reproducción sexual el polen es todo uniporado y en otras especies de *Paspalum* de ploidía mayor, hay también multiporados (2 o 3 poros). Ello les lleva a postular que la presencia de polen multiporado podría ser un indicador preliminar de apomixis.

1.3. Fundamentación

En el proyecto marco que dio lugar a esta tesis, *P. notatum* fue la especie de *Paspalum* L que se estudió como forma de iniciar en Uruguay el proceso de domesticación de especies naturales, potenciales candidatos para incorporar al cultivo en Uruguay (P. Speranza com. pers.). Para el desarrollo de planes de hibridación entre materiales seleccionados así como de conservación de germoplasma nativo es necesario mayor conocimiento de la citología, variabilidad genética y comportamiento reproductivo de las especies (Adamowski et al., 2005; Witt et al., 2008). En dicho proyecto, las investigaciones de poblaciones distribuidas en todo el país de *P.*

notatum concluyeron que se trataba de plantas tetraploides (y no diploides) y en base al análisis de contenido de ADN por citometría de flujo de genotipos silvestres se encontraron entre las accesiones dos grupos de plantas con diferente contenido de ADN (Narancio, 2008; Reyno et al., 2012). Un grupo presentó el contenido de ADN esperado para una tetraploide, es decir si el doble del contenido de una diploide como lo es el cultivar Pensacola 7453 de *P. notatum* (USDA7453, de Estados Unidos) que posee 20 cromosomas, y otro grupo de plantas que presentaron un contenido menor al esperado. Tratando de interpretar los resultados que surgieron por citometría de flujo, el grupo de plantas con menor contenido del esperado generó la pregunta sobre si su origen sería por hibridación dentro del género y en ese caso si tendría alguna consecuencia detectable citológicamente. Estas plantas son parte de un programa de mejoramiento de INIA donde se analizó previamente el número cromosómico de los mismos (P. Hernández, P. Speranza, com. pers.), así como caracteres de variabilidad a nivel molecular (Narancio, 2008; Reyno et al., 2012).

Este trabajo de tesis consiste en responder esa pregunta que surgió. Se analizará si la diferencia en el contenido de ADN de la colección de INIA de accesiones *P. notatum* de todo el Uruguay se manifiesta en diferencias en el comportamiento meiótico de cromosomas y tetravalentes en las células madre de granos de polen así como el tamaño de los granos de polen, y su viabilidad. Por ello los estudios consistirán en el estudio de la microesporogénesis con énfasis en el comportamiento de los cromosomas en la meiosis, y análisis de tamaño y viabilidad polen. La hipótesis es que al haber poblaciones naturales de *P. notatum* tetraploides con diferente contenido de ADN, ello podría deberse a que su origen es distinto y por ello revelarían alguna diferencia a nivel de las sinapsis en la meiosis y a nivel de la viabilidad de polen.

1.4. OBJETIVO GENERAL

Analizar la biología de la especie nativa *Paspalum notatum* Flüggé, con el fin de aportar a las estrategias para su mejoramiento genético.

1.5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Comparar el comportamiento de cromosomas y asociaciones de multivalentes durante la primera división meiótica de células madres de polen en dos grupos de plantas silvestres de *Paspalum notatum* con diferente contenido de ADN, usando técnicas de tinción clásicas.
2. Analizar en cada grupo de plantas de *Paspalum notatum* con diferente contenido de ADN el tamaño y la viabilidad de los granos de polen, por medio de la reacción fluorocromática con fluorocromo FDA.

2. Materiales y Métodos

2.1. Materiales

Para este trabajo se usaron en total 15 plantas (genotipos) de la especie *Paspalum notatum*. Son parte de una colección mayor que formó parte de la tesis de Licenciatura en Bioquímica del Ing. Agr. Rafael Narancio (2008), y fueron gentilmente proporcionadas por dicho investigador. Todas son tetraploides, excepto una de ellas, la Pn7453 que se usó como control diploide, ya que es $2n=2x=20$. Para nuestro trabajo se utilizaron 13 plantas silvestres y una planta del USDA la Pn7459 (USDA7459). De estas 14 plantas tetraploides, dos tienen un nivel de ploidía considerado por ese mismo autor como el esperado (Grupo 2) y el resto de las 12 plantas tienen un nivel de ploidía menor (Grupo 1) (Tabla 1).

Tabla 1. Plantas de *P. notatum* utilizadas. Código original de planta (nº de individuo), número de la accesión de origen, lugar del país donde se colectó, Departamento, coordenadas de GPS, Grupo al que pertenece, todos datos extraídos de la tesis del Ing. R. Narancio. Código de maceta, es el usado en este trabajo para cada planta.

Nº de individuo	Accesión	Sitio de la colecta	Depto.	Lat-S	Lon-W	Código de maceta	Grupo
URPN015-2	15	Ruta 5, km 449	Rivera	31°32'	55°39'	Pn61	1
URPN019-1	19	Ruta 26, km 362,9 Caraguatá	Tacuarembó	32°16'	54°53'	Pn74	1
URPN023-2	23	Ruta 44, km 39,9	Cerro Largo	32°11'	54°29'	Pn98	1
URPN024-1	24	Ruta 44, km 64,9	Cerro Largo	32°01'	54°44'	Pn100	1
URPN024-2	24	Ruta 44, km 64,10	Cerro Largo	32°01'	54°44'	Pn101	1
URPN027-1	27	Camino al Abrojal, 1km de R27	Rivera	31°37'	54°54'	Pn106	1
URPN027-2	27	Camino al Abrojal, 1km de R27	Rivera	31°37'	54°54'	Pn108	1
URPN053-1	53	Ruta 14, km 166	Flores	33°23'	56°32'	Pn220	1
URPN062-1	62	Ruta 14, km 293,3	Lavalleja	33°34'	54°41'	Pn259	1
URPN062-5	62	Ruta 14, km 293,3	Lavalleja	33°34'	54°41'	Pn263	1
URPN067-2	67	Ruta 9, km 203,5	Rocha	34°30'	54°20'	Pn273	1
USDA7439	7439	--	USDA			Pn7439	1
URPN032-3	32	Ruta 5, km 373,5 Bonilla	Tacuarembó	31°50'	55°59'	Pn120	2
URPN086-1	86	Ruta 14, km 92,5	Flores	33°19'	57°09'	Pn354	2
Control		Pensacola diploide	USDA			Pn7453	

Desde INIA, que es la institución que aportó el material, se enviaron 19 genotipos, pero cuatro de ellos se debieron retirar de este trabajo,

los que tenían código de maceta Pn30, Pn89, Pn105 y Pn184, por no lograr en dos años consecutivos encontrar células que transitaran en Metafase I. Se descartaron y no se incorporaron en la Tabla 1. Las 13 plantas silvestres de Uruguay fueron colectadas en diferentes regiones que se presentan en el mapa de la Fig. 1. Esta tesis formó parte de un proyecto FPTA177 (2009- 2012, responsable: Ing. Agr. Ph D Pablo Speranza).

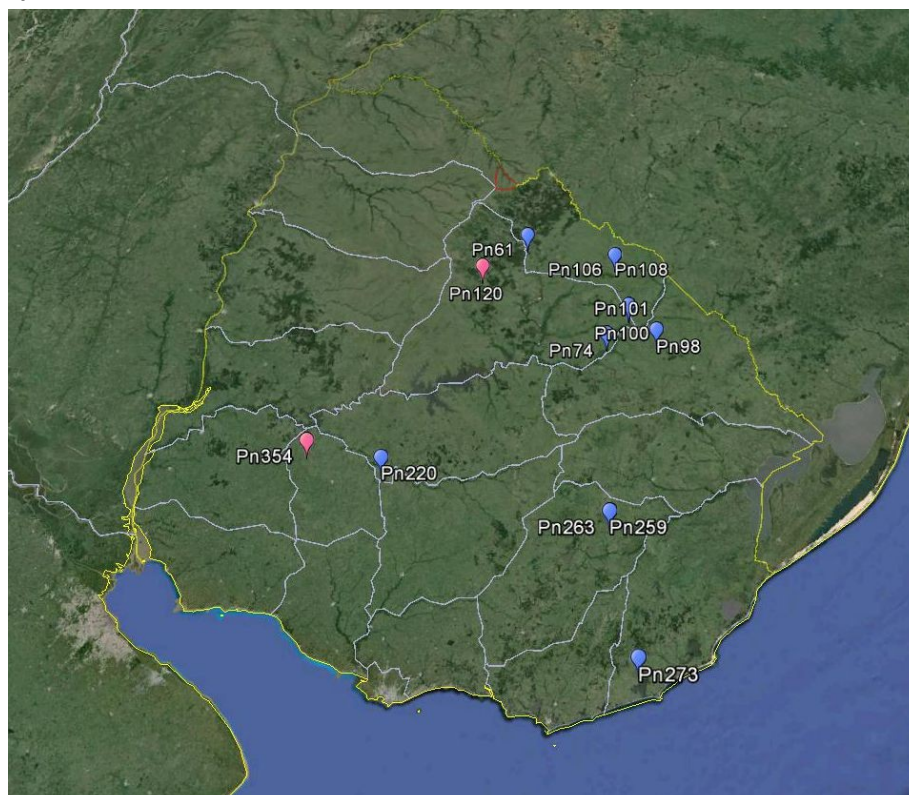


Figura 1. Mapa del Uruguay donde se indican con sus códigos el origen de cada genotipo de *P. notatum* colectados por el INIA. En color magenta los dos del Grupo 2 y en azul los del Grupo 1

Las plantas se mantuvieron desde comienzos del 2010 en macetas adecuadamente rotuladas y numeradas en el invernáculo de Facultad de Agronomía. En setiembre del 2010 se replicaron las plantas y se realizó un jardín de introducción pasando réplicas de cada accesión a campo, en un predio contiguo al invernáculo. Las plantas se adaptaron y desarrollaron en el campo y panojaron en los veranos de 2010-2011 y 2011-2012, momentos en que se cosecharon para este trabajo. El cuidado y mantenimiento de todo el material vivo estuvo a

cargo de los técnicos Srs. Julio Sburlatti y Matías Antuoni. (Fig. 2)

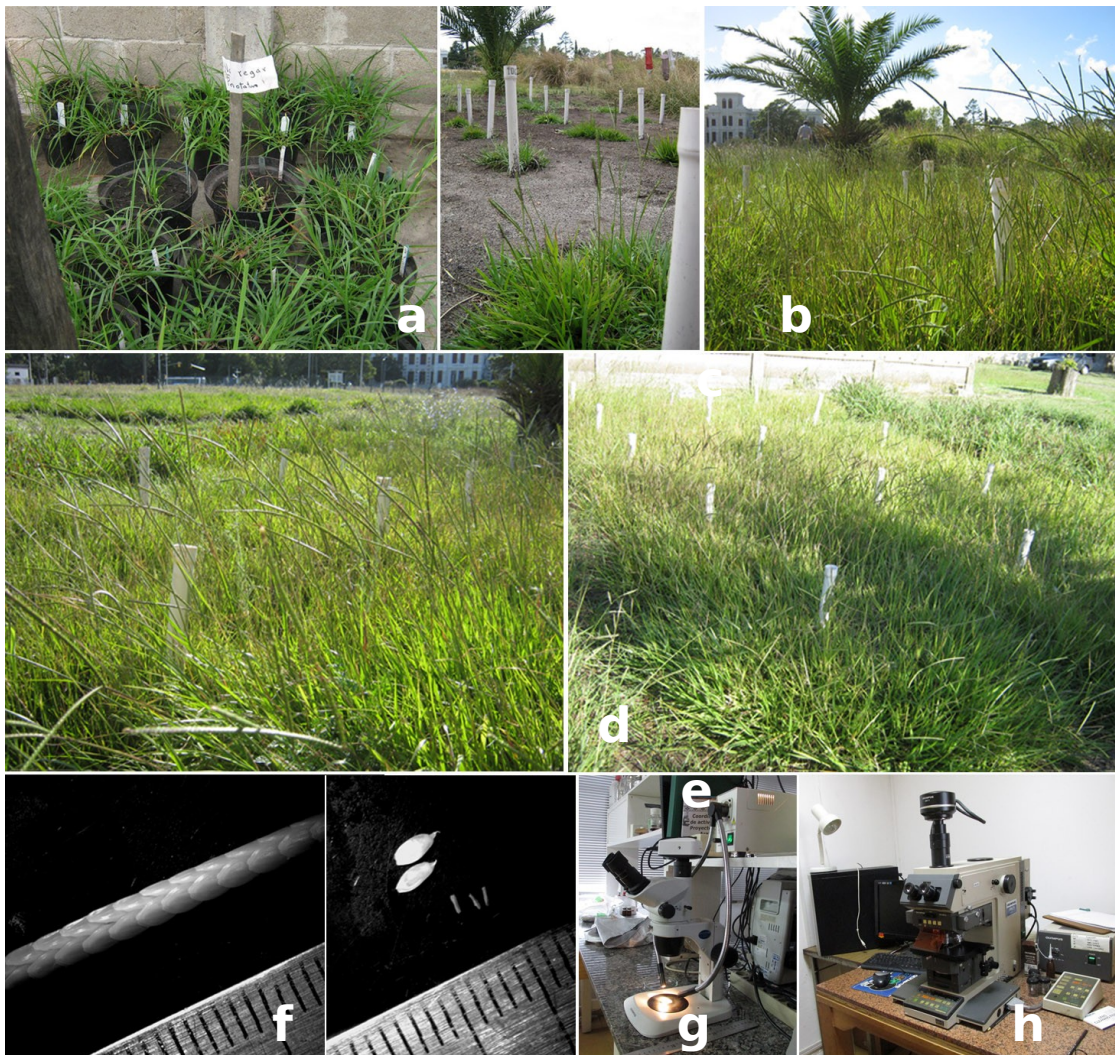


Figura 2. **a.** Plantas en invernáculo **b-e.** Ensayo a campo de las distintas accesiones de *P. notatum* utilizadas. **f-g.** Espiguillas de *P. notatum*, disección bajo lupa, extracción de anteras. **h.** Lupa estereoscópica. **i.** Microscopio óptico con equipo de fluorescencia.

Para esta tesis se utilizaron dos microscopios ópticos y una lupa. El microscopio con equipo de epifluorescencia es un Olympus new Vanox AH-3 que tiene una cámara digital de fotografía DP71, y las fotografías se procesaron en el programa de computación DP Image. A su vez con otro programa, Image J, se realizaron las mediciones de los granos de polen. El otro microscopio óptico es un Olympus CH41 que po-

see sistema de contraste de fases y tiene con una máquina digital de fotos Infinity1 con programa de obtención de imágenes Infinity. La lupa estereoscópica es Olympus modelo SZ a la que se le instala la misma cámara fotográfica Infinity1. (Fig. 2. d- e).

2.2. Métodos

2.2.1. Análisis de la meiosis en células madre de polen (CMP)

Para analizar el comportamiento de los cromosomas y de los bivalentes durante la meiosis se usaron dos metodologías diferentes. En ambos casos se colectaron previamente inflorescencias muy jóvenes (panojas) cuando aún se encontraban envueltas en la hoja bandera. Luego se retiraron las hojas y se fijó cada panoja depositándola en un tubo de ensayo que contiene solución Carnoy (3:1, alcohol absoluto: ácido acético glacial), por último se introdujo en cada tubo una etiqueta escrita con lápiz indicando número de maceta, fecha de colecta de la panoja e iniciales del responsable de dicha colecta y se dejó en heladera hasta su utilización.

Se inició el trabajo y puesta a punto con la que llamaremos Metodología I, y luego se realizó un estudio comparativo aplicando en algunas plantas la Metodología II. Se comenzó por el reconocimiento de todas las fases de la meiosis, tanto meiosis I como meiosis II, de forma de identificar claramente las metafases I (por ejemplo no confundirlas con las metafases II), y específicamente analizar un mínimo de 50 metafases I por genotipo, tomando como datos en cada núcleo el número de univalentes, bivalentes, trivalentes, tetravalente u otra asociación mayor.

Se realizó el análisis estadístico correspondiente con el Programa Excel de Office, obteniéndose un histograma con las medias.

2.2.1.1. Metodología I

Para la realización de preparados se siguió el protocolo de Speranza

et al. (2003) con pequeñas modificaciones. Se retiró la panoja de la solución Carnoy y se la colocó sobre la tapa de una caja de Petri. Observando con una lupa binocular se saca una espiguilla. Se abrió la espiguilla y se extrajeron las tres anteras, las que se colocaron sobre un portaobjetos limpio con 2 μ L (una pequeña gota) de ácido acético 45%. Por medio de dos agujas histológicas se disgregaron bien las anteras de forma de liberar las células. Luego de unos minutos en que se evaporó el ácido acético, se agregaron 4 μ L de Orceína lactopropiónica al 2% (2 gr de Orceína Sigma en una mezcla de 50 mL de ácido láctico y 50 mL de ácido propiónico). Se homogeneizó bien realizando círculos con una aguja histológica, y así se va tiñendo. Se le colocó a la preparación un cubreobjetos (22x22 mm) y se dejó teñir unos minutos. Luego de controlar si estaba teñida mirando al microscopio (objetivo x20), se procedió al aplastado que consiste en colocar papel de filtro encima del cubreobjetos. Se aplastó firmemente haciendo presión con el dedo pulgar sobre una superficie bien lisa. Se controló mirando al microscopio (objetivo 40x), y sólo si era necesario se repitió con cuidado el aplastado hasta que la cromatina esté en un solo plano. Cuando se logró el aplastado deseado se fijó el portaobjeto al preparado con esmalte y luego que se secó se observó al microscopio con objetivo 60x o 100x de inmersión.

2.2.1.2. Metodología II

Se utilizaron las inflorescencias jóvenes (panojas) fijadas en solución Carnoy unas 24-48 horas, se pasaron las espiguillas seleccionadas a etanol 70% y se guardaron en heladera a 4°C hasta su uso. En ese momento se sacaron las espiguillas del alcohol y se colocaron en la tapa de una caja de Petri con agua destilada. Bajo lupa se retiró una sola de las 3 anteras de la flor seleccionada y se colocó en un portaobjetos con una gota de carmín acético al 1% (se disuelve 1 gr de carmín en 100 mL de ácido acético al 45%, la disolución se calentó hasta ebullición por una hora, refrigerando los vapores para evitar

variaciones en la concentración). Se seccionó la antera con aguja de disección para liberar las células de su interior y se le colocó un cubreobjeto. Se ubicó el preparado sobre papel toalla y se golpeó suavemente con la parte de atrás de un lápiz para dispersar las células. Se retiró el exceso de carmín acético y se observó bajo microscopio (objetivo 40x) para determinar las fases en la que se encontraban las células madre del polen. Cuando se encontraron células en metafase I meiótica, se procedió a realizar los preparados a analizar siguiendo la técnica descrita por Zhong and de Jong (1996), con las modificaciones introducidas en Szinay et al. (2008). Usando pinza y aguja se retiraron de cada flor las dos anteras restantes y se las colocó en una tapa de caja de cubreobjetos, lavándolas tres veces con agua destilada, luego se retiró el agua con pipeta plástica. Se pasaron a un tubo eppendorf con agua destilada y se guardaron en la heladera de 30 min a overnight (durante una noche). Luego se enjuagaron en 10mM Buffer citrato fosfato (40 mM de ácido cítrico y 60 mM de citrato de sodio, se ajusta a ph 4.5), retirando el mismo succionando con pipeta plástica. Usando una tapa (cubo) de caja de cubreobjetos se colocaron las anteras y se le adicionó de 200 a 400 μ L de buffer con mezcla de enzimas (2% celulasa, 20% pectinasa). Esta mezcla es una combinación de 2% (w/v) de celulasa (Calbiochem, San Diego, Calif.), 1% (w/v) celulasa Onozuka RS (Yakult Pharmaceutical, Japan) y 4% (v/v) pectinase (Sigma, St. Louis, Mo.). Se cubrió el cubo con parafilm para evitar la evaporación y se colocó en estufa a 37° C por 2 -3 horas (el tiempo depende del estado de las anteras). Mientras ocurría la digestión se limpiaron los portaobjetos pretratados (se colocaron los portaobjetos en alcohol al 96% por 24 horas) usando paños de algodón para secar el alcohol, cuidando de no dejar fibras.

Cuando las anteras estuvieron digeridas (observar color, transparencia y consistencia), se retiró la mezcla de enzimas con micropipeta, se agregó agua destilada y se colocó el cubo en un recipiente con hielo para detener la digestión. Se retiró la antera con

aguja y se colocó en un tubo eppendorf con ácido acético al 60%. Con una micropipeta, se pipeteó reiteradas veces hasta observar que la antera se disolvió completamente, obteniéndose así una suspensión de células. Se adicionaron 9 μ L de esta suspensión de células madre de polen sobre un portaobjetos húmedo (que se obtiene colocándolo boca abajo sobre un recipiente de vidrio con agua sobre la placa caliente). Se agregaron 2 o 3 gotas de ácido acético al 60% y se lo colocó sobre la placa caliente (a 52^o C). Mientras el preparado estaba sobre la placa, con una aguja se deslizó la gota de ácido acético con suspensión celular a lo largo del portaobjetos, manteniendo el líquido en movimiento y tratando que la aguja nunca toque el vidrio. Luego de 1 min se retiró el preparado de la placa caliente y se le colocó varias gotas de solución 3:1. Se inclinó el preparado sobre un vaso de bohemia y se lavó con un chorro de la misma solución. Luego de secarlo un minuto en la placa caliente, e igual que en el método anterior, se tiñó con Orceína al 2%, se aplastó y se selló con esmalte.

2.2.2. Análisis del tamaño y de la viabilidad de los granos de polen

Se aplicaron dos metodologías diferentes y se compararon, una es la tinción con carmín acético y la otra la tinción fluorocrómica con Diacetato de fluoresceína (FDA). Los conteos se realizaron con la que dio mejores resultados y fotografías más nítidas. Para este análisis se seleccionó una sola planta de cada genotipo, la Pn7439 de IP menor y la Pn354 de IP esperado, ya que ambas presentaron el año en que se realizó este estudio un alto número de panojas que aseguraban una muestra amplia.

Se contabilizaron un mínimo de 500 granos de polen por genotipo, tomando fotografías de campos seleccionados al azar, y luego se analizaron con el programa Image J. El criterio para distinguir viables de no viables fue que los primeros son aquellos que, con la técnica de

FDA, presentaban forma redondeada (redondos y elípticos), contenido interno homogéneamente teñido y fluorescieron. Se descartaron dentro de este grupo los que se veían rotos o de contornos extremadamente irregulares. Se realizó el análisis estadístico correspondiente con el Programa Excel de Office, obteniéndose un histograma con las medias o promedios de cada genotipo, y media general.

2.2.2.1. Tinción clásica con carmín acético

Se colectaron panojas maduras, de reciente antesis. Bajo lupa se retiraron las tres anteras de la flor seleccionada. Se colocaron en un portaobjetos y con aguja histológica se liberó el polen, se lo cubrió con unas gotas de carmín acético (se disolvió el carmín en ácido acético al 45%, la disolución se calentó hasta ebullición por una hora, refrigerando los vapores para evitar variaciones en la concentración), se calentó a la llama de un mechero Bunsen, hasta que se evaporó totalmente el colorante. Se agregaron más gotas de carmín, se cubrió el preparado con un cubreobjetos. Se calentó nuevamente el preparado hasta que el carmín acético inició ebullición. Se envolvió el preparado en papel toalla y se lo presionó con los dedos índice y pulgar y se observó al microscopio óptico con objetivo primero 20x y luego 40x.

2.2.2.2. Técnica de reacción fluorocromática (FCR)

Se colectó polen fresco de flores en reciente antesis (panojas maduras), es decir, se utilizó polen colectado en el mismo día. En este caso se siguió la técnica descrita por Knox & Heslop-Harrison (1970) en la cual se utiliza un fluorocromo, el diacetato de fluoresceína (FDA),

como colorante. Se debe ajustar la concentración adecuada de solución de sacarosa para la especie estudiada, ya que a esta solución se le adicionará, gota a gota, una solución de diacetato de fluoresceína en acetona (2 mg/ml), hasta que la mezcla se torne persistentemente turbia. La base de esta técnica radica en que determina tanto que esté sana o íntegra la membrana plasmática, así como la correcta actividad enzimática de la célula vegetativa (Dafni and Firmage, 2000). El FDA penetra a la célula vegetativa como un éster de ácido graso y es hidrolizado en su interior. En ese momento libera la fluoresceína que se acumula en el citoplasma, al liberarse fluoresce intensamente. Se consideran viables los granos de polen que brillan intensamente al ser observados al microscopio de fluorescencia.

Bajo lupa binocular se colocaron las anteras en un portaobjeto (previamente lavados) y se las disgregó bien con una aguja histológica, se retiraron los restos. Al polen se incorporó una gota de la solución de FDA y se incubó en cámara húmeda por 10 minutos. Luego de poner un cubreobjetos, se observó con el microscopio de epifluorescencia, utilizando un filtro para el rango de excitación del azul (B). Se seleccionaron al azar como mínimo de cada flor 10 campos que tuvieran al menos 10 granos de polen y se tomaron fotomicrografías de cada campo con un objetivo 10x. Este trabajo de toma fotográfica se realizó inmediatamente de realizado el preparado. A partir de las fotos y en la pantalla de la computadora, se realizaron los recuentos y se calcularon los porcentajes de viabilidad para cada genotipo. Se observaron fluorescentes los granos de polen que eran viables y no fluorescieron los que eran no viables. A partir de estas mismas fotos y con el programa Image J se realizaron mediciones del diámetro de cada grano de polen. Luego se realizaron las estimaciones en micras ya que se contó con una escala en micras al mismo aumento con el que fueron tomadas las fotografías (10x).

3. Resultados

3.1. Consideraciones generales y metodológicas

Al comenzar el trabajo se debió primero realizar la identificación de las características que presentan las espiguillas de *P. notatum* cuyos microesporocitos transitan por divisiones meióticas, necesario según los objetivos de este trabajo. Para ello y luego de observar a la lupa se determinó que las que están en esas condiciones son espiguillas con paleas y lemas de color verde claro y casi transparentes, con sus anteras levemente coloreadas de tono amarillento. A su vez, también se identificaron las espiguillas en las que ya se encuentra polen, éstas son las que tienen paleas, lemas y anteras amarillas. Al colocar estas anteras en un portaobjetos y abrirlas en presencia de ácido acético, se caracterizan porque los granos de polen salen con gran facilidad y presentan aspecto brillante y transparente.

Como se indicó en la sección 2. Materiales y métodos, se utilizaron dos metodologías para ver cuál era más adecuada para la obtención de preparaciones buenas para conteo de asociaciones cromosómicas en metafase I meiótica. Resultó ser la descrita como Metodología I. Luego de realizar las preparaciones y al proceder al recuento en el microscopio óptico de las unidades presentes, univalentes o asociaciones de bi, tri y tetravalentes, se encontró sin embargo que algunos cromosomas igual quedaban superpuestos o muy juntos sin separarse sobre la placa ecuatorial, debido quizá a cierto exceso de citoplasma que se observaba en contrate de fases. Además los univalentes presentan por su pequeño tamaño cierta dificultad para ser identificados, ya que a veces quedan enmascarados por otros. Los tetravalentes son los que se reconocen más fácilmente por su forma tetraédrica típica. La Metodología II que incluía el uso de varias enzimas para ablandamiento general de las células, en nuestro caso y para los ajustes realizados, no dio mejores resultados. Sin embargo sugerimos insistir con ella e intentar su puesta a punto, con más tiempo del que dispusimos para esta tesis. En conclusión, la Metodología I fue la que permitió una mejor identificación y fue la que

se empleó para obtener los resultados que se muestran en este trabajo. De todas formas al no lograr que todos los cromosomas estuvieran en un mismo plano, el análisis debió realizarse en todos los casos necesariamente moviendo el micrométrico del microscopio, lo que dio buenos resultados no visualizables como tales en las fotografías.

En relación al material utilizado, se inició este estudio con el análisis de 18 genotipos tetraploides ($4x=40$) y uno diploide ($2x=20$) de las cuales cinco eran genotipos cuyo contenido de ADN se consideró el esperado o sea el doble que el diploide control y 13 tenían contenido de ADN menor. En cuatro de las plantas tetraploides no se encontraron células que transitaran por metafase I, por lo que debieron descartarse las plantas con código de maceta: Pn30, Pn89 y Pn184 (contenido de ADN considerado esperado) y la Pn105 (contenido de ADN considerado menor). En los tres primeros genotipos fue incluso escasa la formación de panojas, tanto en las plantas a campo como sus clones en maceta. La planta Pn105 es un genotipo con características particulares ya que, a pesar de que se analizó en los ciclos reproductivos de dos veranos consecutivos (2011 y 2012) y en los cuales el resto de los genotipos formó buena cantidad y calidad de panojas, esta planta no formó ninguna panoja. Además ninguna de las plantas clonadas de este genotipo sobrevivieron el año entero, ni la que se mantenía en invernadero ni la que estaba plantada a campo. Estos cuatro genotipos por estas características tan peculiares deberían ser estudiados más en profundidad, con copias que posea el INIA.

3.2. Aspectos generales de la meiosis en *Paspalum notatum*

En las 14 plantas tetraploides analizadas así como en el control diploide se observaron casi todas las diferentes etapas de la meiosis, tanto primera como segunda división meiótica: profase I (paquiteno, diploteno, diacinesis), metafase I, anafase I, telofase I, díadas,

metafase II, anafase II, telofase II, tétradas. En el control diploide $2n=2x=20$, toda la meiosis es normal, se forman siempre 10 bivalentes y la segregación tanto en anafase I como en anafase II es regular, al finalizar la meiosis se observan tétradas normales (Fig. 3A. a - h).

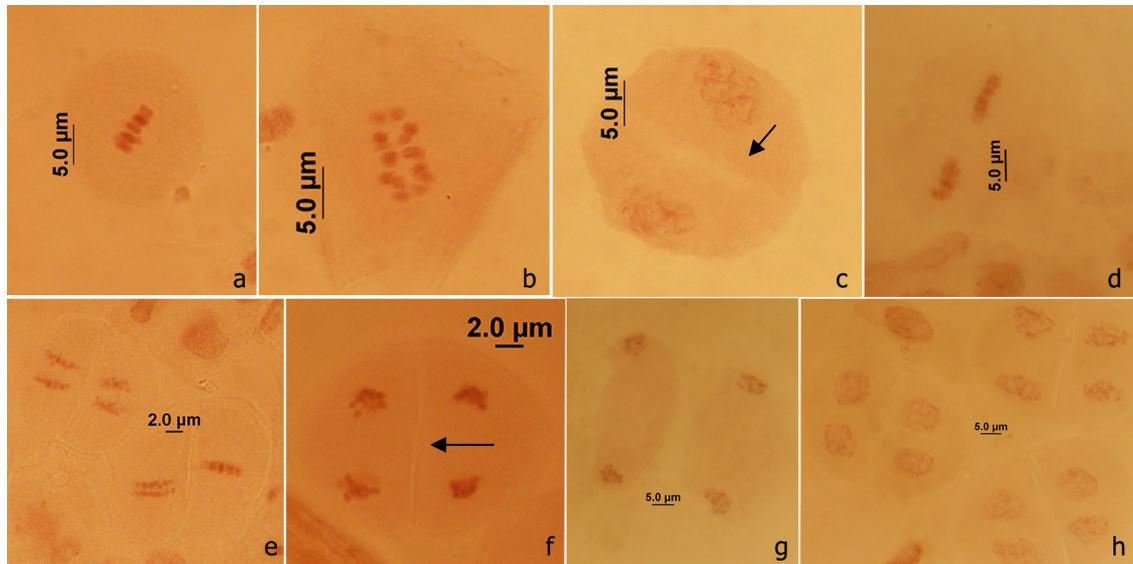


Figura 3A. Planta diploide $2n=2x=20$ (USDA7453): **a.** Metafase I; **b.** Anafase I; **c.** Díada en Interfase II; **d.** Díada en Metafase II; **e.** Díada en Anafase II; **f-g.** Díada en Telofase II; **h.** Tétradas. Flechas indican la separación de las dos primeras células hijas formando una díada escindida. Barras en micras.

En los 14 genotipos $4x$ analizados se observaron casi todas las fases, se muestran algunas fotos representativas en la Fig. 3B., son las mejores fotografías digitales seleccionadas de diversos genotipos. En todos los genotipos y desde paquiteno en adelante se observaron anomalías en baja proporción las que son descritas pero no cuantificadas (Fig. 3B. a -y). Estas alteraciones fueron de distintos tipos: asociaciones cromosómicas distintas a bivalentes, localización espacial de los cromosomas fuera de placa en ambas metafases, así como asimetrías en las etapas de anafases o de segregación cromosómica. Entre ellos y como se verá con más detalle en la sección 3.3, en todos los individuos se encuentran en la metafase I

asociaciones cromosómicas formando tetravalentes y bivalentes, a veces también trivalentes y univalentes. A su vez, en la anafase I se identifican cromosomas que segregan tempranamente o tardíamente, algunos incluso quedando fuera del nuevo núcleo reorganizado. También se encuentran segmentos de cromatina que a modo de puentes unen los núcleos en telofase I (ver Fig. 4).

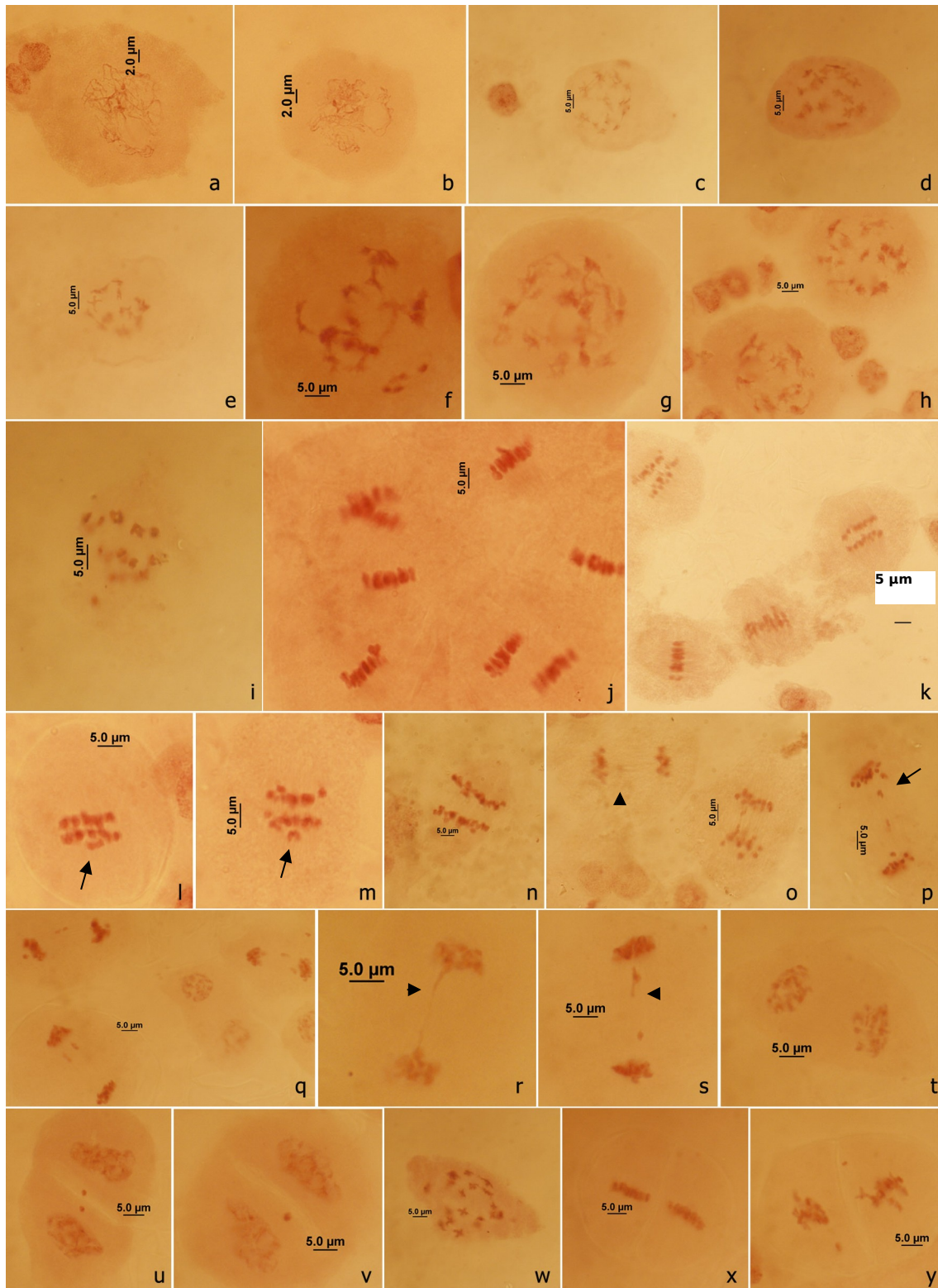


Figura 3B. Microesporogénesis, etapas de la Meiosis I y Meiosis II en *P. notatum*. **a-b.** Paquiteno; **c-f.** Diploteno; **g-i.** Diacinesis; **j-k.** Metáfase I; **l-o.** Anáfase I; **p-t.** Telófase I; **u-v.** Díada en Interfase II; **w.** Hemidíada en Prometáfase II; **x.** Díada en Metáfase II tardía; **y.** Díadas en Anáfase II. Las puntas de flecha indican puentes, las flechas indican retrasos y adelantos,

las flechas abiertas indican micronúcleos. a-b: Pn89, c-e: Pn7439, d-i-n-p-w-x: Pn354, f-g-h-q-r-s-t-y: Pn100, j-l-m: Pn120, k: Pn108, o-u-v: Pn74.

En relación a la identificación y conteo realizado en primera metafase, inicialmente se anotó todo tipo de unidad o asociación observada: I, II, III y IV. No en todas pero sí en algunas, se detectó que había un error en la distinción entre bivalentes y trivalentes por un lado, además de cierta dificultad en la identificación de los univalentes pequeños, como ya se indicó. Por ello los datos que se aportan en esta tesis son sólo de tetravalentes, que fueron los claramente distinguibles. Es importante indicar que la proporción de univalentes y trivalentes en aquellos preparados en que sí pudieron ser bien identificadas fue bajo. El número de metafases a considerar se fijó previamente en 50 como mínimo, sólo en dos casos no fue posible en el curso de este trabajo llegar a dicha cifra. En 12 de los genotipos de menor contenido de ADN (Grupo 1) sí se analizaron entre 55 y 112 células, la excepción fue la Pn101 en la que observaron sólo 30 núcleos y Pn74 donde se analizaron 46. En los dos genotipos del Grupo 2 con contenido de ADN esperado se analizaron más de 50 en cada caso (Tabla 2). En la Fig. 4 se muestran fotografías representativas de metafases I meióticas, las que fueron seleccionadas de diversos genotipos.

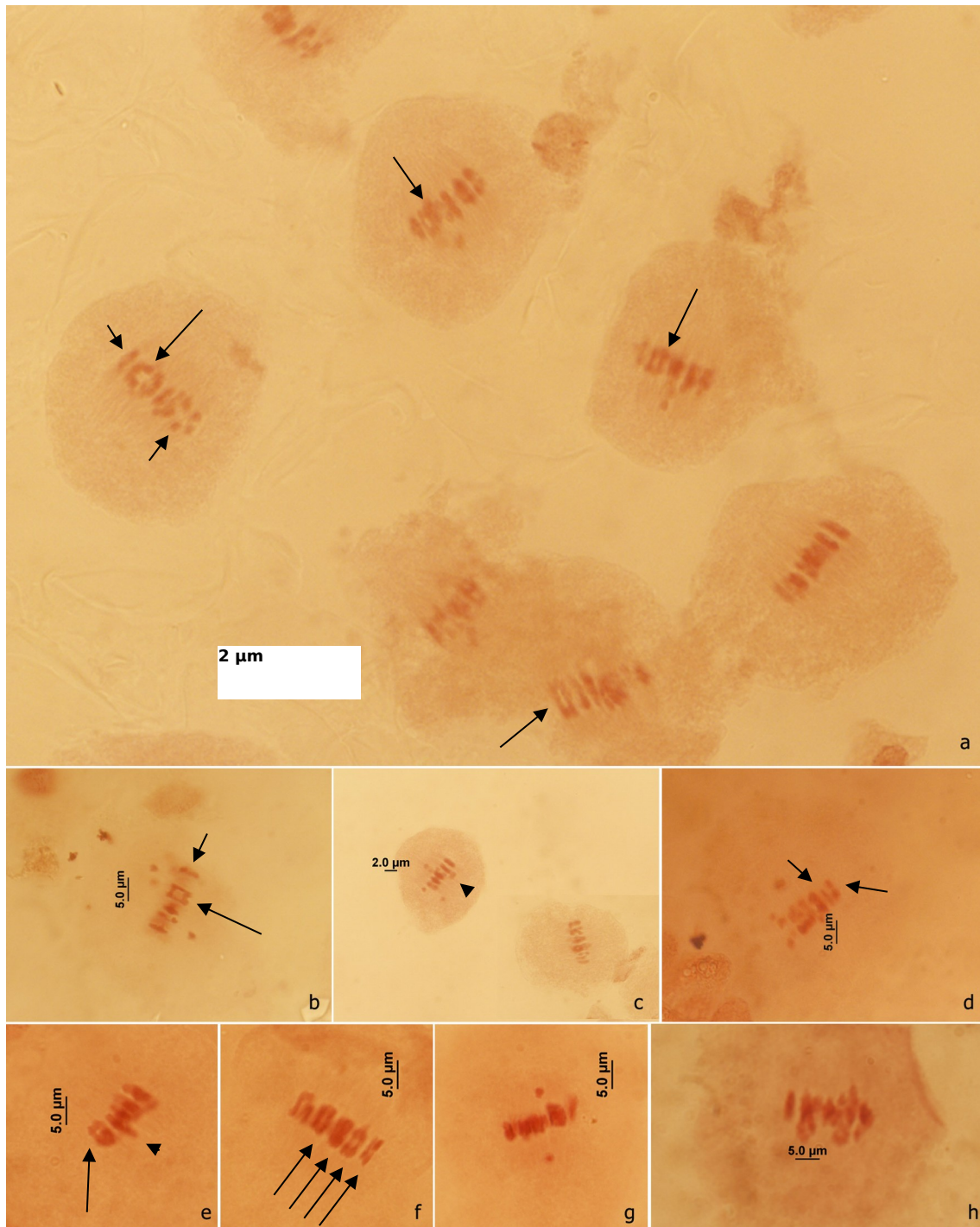


Figura 4. Asociaciones cromosómicas en Metafase I de la meiosis en *P. notatum*. **a-d.** plantas del Grupo 1. **e-h.** plantas del Grupo 2. Las flechas cortas indican bivalentes; las puntas de flecha indican trivalentes; las flechas largas indican tetravalentes. a-c: Pn108, b: Pn273, d: Pn101, e-f-g: Pn120, h: Pn354.

3.3. Asociaciones cromosómicas en primera metafase meiótica

3.3.1. Análisis de cada uno de los genotipos, Grupo 1 y Grupo 2

Los resultados obtenidos al contabilizar las configuraciones cromosómicas de tetravalentes en metafase I en las plantas analizadas se muestran en la Tabla 2. De los 14 genotipos analizados los 12 primeros corresponden a plantas de contenido de ADN considerado menor al esperado para un tetraploide (Grupo 1) y el resto son los que presentaban el contenido esperado (Grupo 2). A partir de los valores de esta Tabla se confeccionaron los gráficos correspondientes de cada genotipo (Fig. 5). En base a la Tabla 2 y la Fig. 5 se deduce que tanto en las plantas de contenido de ADN menor al esperado (Grupo 1) como las de contenido esperado (Grupo 2), siempre se observaron en la metafase I cromosomas sinapsados formando tetravalentes, si bien en ninguno de los genotipos se observaron 10 tetravalentes, que sería el máximo posible si cada grupo de cuatro de los 10 cromosomas del genomio básico se sinapsaran.

Tabla 2. Se presentan los 14 genotipos de *P. notatum* analizados y sus códigos. El número de tetravalentes observados, de 0 a 10, la frecuencia de cada tipo para cada genotipo. Subtotal: núcleos analizados de cada planta; Total: total de núcleos analizados de cada Grupo.

GRUPO 1	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Sub total
1 Pn61		20	30	6								56
		0.36	0.53	0.11								1.00
2 Pn74		15	20	8	2	1						46
		0.33	0.44	0.17	0.04	0.02						1.00
3 Pn98		19	30	7								56
		0.34	0.54	0.12								1.00
4 Pn100		11	33	17								61
		0.18	0.54	0.28								1.00
5 Pn101		8	14	7	1							30
		0.27	0.47	0.23	0.03							1.00
6 Pn106	5	21	31	5								62
	0.08	0.34	0.5	0.08								1.00
7 Pn108	3	72	16	11	5	3	2					112
	0.03	0.63	0.14	0.10	0.05	0.03	0.02					1.00
8 Pn220	4	38	16									58
	0.07	0.65	0.28									1.00
9 Pn259		16	33	16								65
		0.25	0.50	0.25								1.00
10 Pn263	13	14	29	9								65
	0.20	0.21	0.45	0.14								1.00
11 Pn273		35	26									61
		0.57	0.43									1.00
12 Pn7439		13	27	18	6							64
		0.2	0.42	0.28	0.08							1.00
Total												736
GRUPO 2	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Total
13 Pn120				29	12	6	5		4			56
				0.52	0.21	0.11	0.09		0.07			1.00
14 Pn354		2	34	16	2	1						55
		0.04	0.62	0.28	0.04	0.02						1.00
Total												111



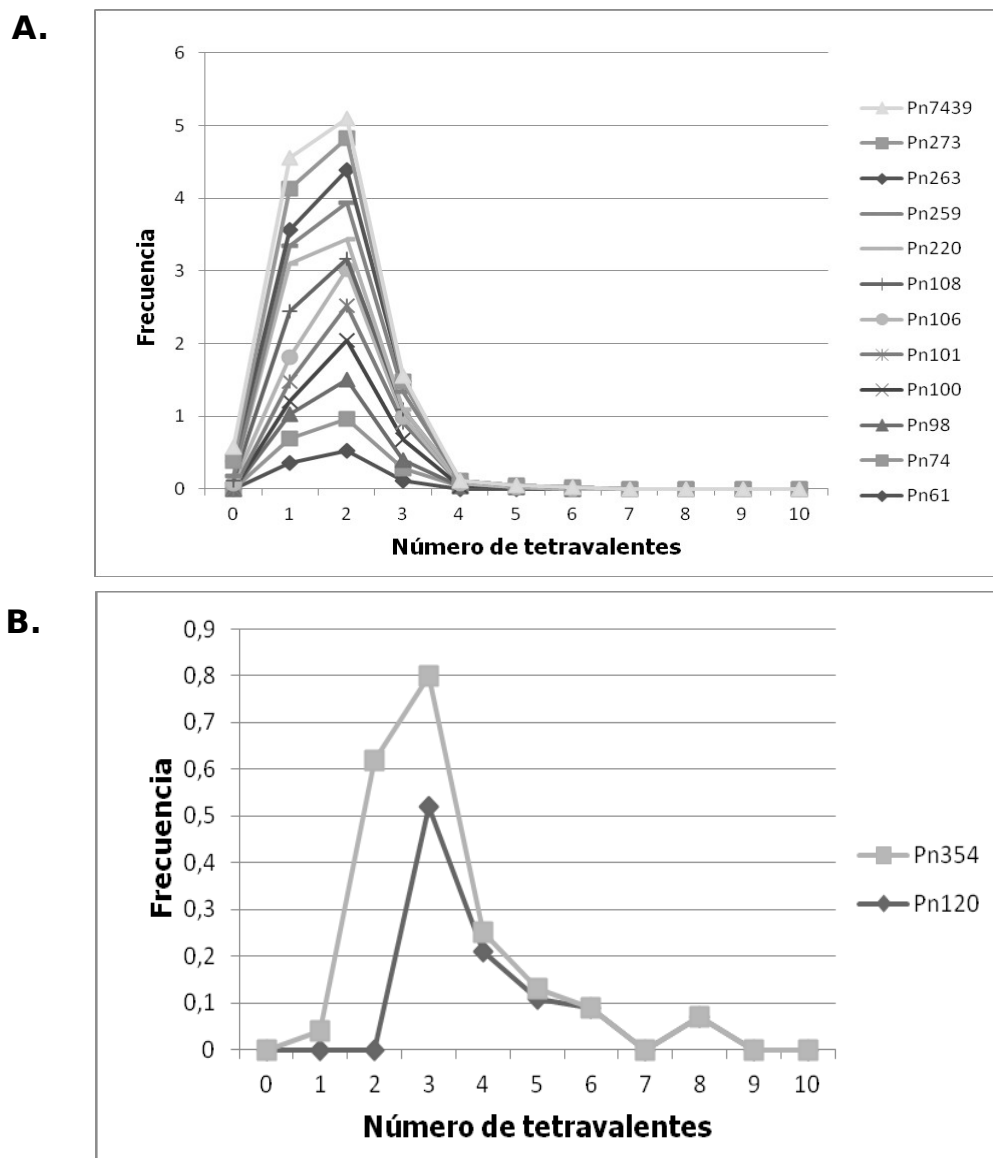


Figura 5. Curvas de frecuencia de tetra-alelos observados en metafase I en los 14 genotipos por separado. **A.** los 12 genotipos del Grupo 1. **B.** los dos genotipos del Grupo 2.

En los 12 genotipos de contenido de ADN menor al esperado (Grupo 1), hay más de 75% de núcleos con uno, dos o tres tetra-alelos. Entre ellos se destacan ocho genotipos donde no se detectaron núcleos sin tetra-alelos, y tres genotipos (Pn106, Pn108, Pn220) con bajo porcentaje de núcleos sin IV (máximo 8%). Por otro lado un genotipo, el Pn263, presenta 20% de células sin IV. Analizando la base de datos original de estos 13 núcleos, 10 presentaban 20 bivalentes (y no se detectaron univalentes ni trivalentes), mientras que los núcleos restantes presentaban 18 bivalentes y se detectó 1 I y 1 III.

En relación a los dos genotipos con contenido de ADN esperado (Grupo 2), no se observan núcleos con cero tetravalentes ni con 9 o 10. Llama la atención el genotipo Pn120 por varios aspectos, por un lado el mínimo de tetravalentes observado es alto (tres), y a su vez de los 14 genotipos es el único que presenta núcleos con más de seis tetravalentes, hasta un total de ocho. En este último genotipo los núcleos con tres tetravalentes son claramente mayoritarios, con el 52%, el resto tiene entre cuatro y ocho IV. El otro genotipo del Grupo 2, Pn354, tuvo un comportamiento similar a los de menor contenido, hay núcleos de uno a cinco IV, teniendo la mayoría (62%) dos IV.

3.3.2. Análisis conjunto de los genotipos del Grupo 1 y del Grupo 2

Al realizar el análisis de todos los genotipos del grupo 1 por un lado y de todos los del grupo 2 por otro, se constata que el total de células analizadas fue de 736 para el primer Grupo y de 111 para el segundo Grupo. A su vez si se analiza comparativamente el conjunto de genotipos de ambos Grupos (Fig. 6), se observa que ambos tienen más del 85% de sus núcleos con uno a cuatro IV, teniendo el primer grupo la mayoría (el 41%) con dos y el segundo grupo la mayoría (también 41%) con tres. La suma en ambos de los núcleos con dos y tres tetravalentes, da para el Grupo 1 un 55,5% y para el Grupo 2 un 71,1%. Los genotipos del Grupo 1 en conjunto presentan solamente un 3,4% de sus núcleos sin tetravalentes, y no se detectaron de este tipo en el Grupo 2. Ninguno de los grupos presentó núcleos con 9 o 10 IV.

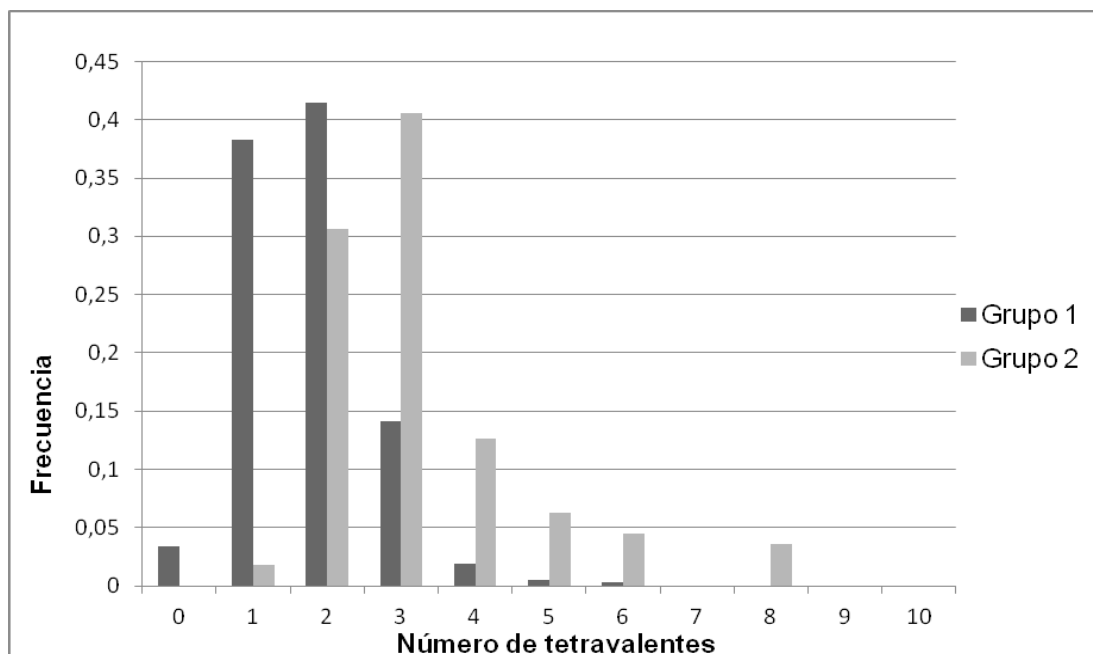


Figura 6. Gráfico conjunto donde se representan las frecuencias de tetraivalentes de ambos grupos.

3.4. Viabilidad y tamaño de los granos de polen

3.4.1. Aspectos metodológicos

El análisis tanto de viabilidad como de tamaño de los granos de polen (su diámetro en micras) se realizó sólo en un genotipo de cada grupo, utilizando las dos plantas que tuvieron mejor floración en el año en que se llevó a cabo este análisis, que fueron la Pn7439 y la Pn354. Como se anotó en la sección 2. Materiales y métodos, para estudiar la viabilidad de los granos de polen se probaron dos técnicas: con carmín acético y la técnica fluorocromática (con FDA o diacetato de flouresceína). Se optó por analizar las fotos tomadas con la técnica FCR, debido a que las obtenidas con carmín acético no eran nítidas y se generaban demasiadas dudas sobre el análisis de viabilidad. Con la técnica de FCR, se contabilizaron como viables los que presentaban forma redondeada, contenido interno homogéneamente teñido y

fluorescían. Se descartaron las de contornos irregulares, aunque tuvieran fluorescencia positiva. Además, debido a que con FDA se obtuvieron preparados con buen número de polen por portaobjeto, se realizaron las mediciones de diámetro de polen con estos mismos preparados.

En la Fig. 7 se muestran fotografías representativas seleccionadas entre las mejores y de ambos genotipos, las mismas se digitalizaron y luego se analizaron en pantalla. El Anexo 1 corresponde al listado de valores obtenidos tanto para viabilidad de polen como para tamaño del polen medido por su diámetro en los dos genotipos analizados.

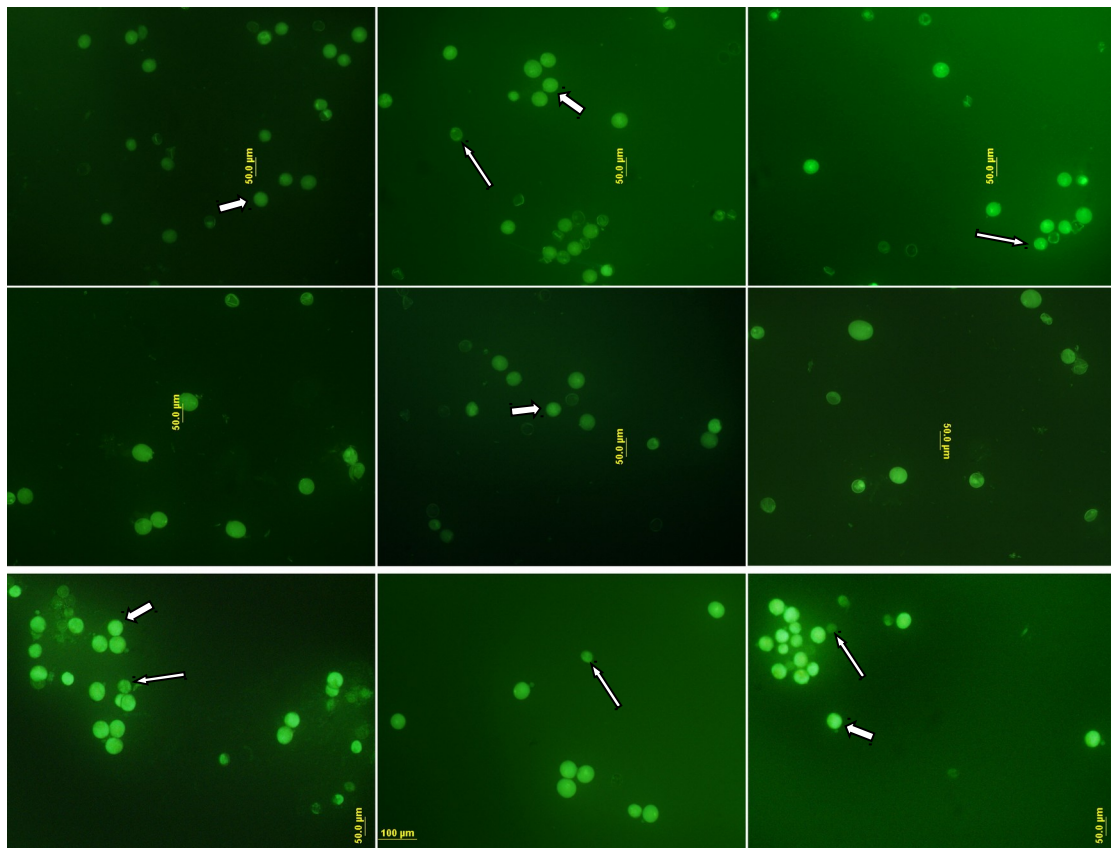


Figura 7. Granos de polen de *P. notatum*, **a-f.** genotipo Pn7439 y **g-i.** Pn354. Se muestran fotografías de polen viable y polen no viable, y los diferentes tamaños observados con la tinción con FDA. Las flechas cortas indican polen viable, las flechas largas indican polen no viable. Barras en micras.

3.4.2. Viabilidad del polen

El resumen de estos resultados se muestra en la Tabla 3. Surge del análisis estadístico realizado en base a los datos del Anexo I de ambos genotipos, del Grupo 1 la planta Pn7439 y del Grupo 2 la Pn354. El porcentaje de polen viable es muy diferente en ambos, menor en el primero, alcanzando un 14,1% mientras que en el segundo fue de 69,2%.

Tabla 3. Viabilidad de granos de polen teñidos con FDA de las dos plantas seleccionadas, número contado y porcentaje en cada caso.

Individuo	Granos de polen viable	Granos de polen no viable	Total
Pn 7439	108	656	764
IP "menor"	14,1%	85,9 %	100%
Pn 354	415	185	600
IP esperado	69,2%	30,8 %	100%

3.4.3. Tamaño del polen

El análisis del tamaño en micras del diámetro de los granos de polen de los genotipos del Grupo 1 la planta Pn7439 y del Grupo 2 la planta Pn354, se resume en la Tabla 4 y se representa en los histogramas correspondientes de la Fig. 8.

Tabla 4. Tamaño en micras (μm) del diámetro de los granos de polen de las dos plantas seleccionadas, con tinción FCR.

Individuo	Media de diámetro de polen viable	Media de diámetro de polen NO viable
Pn7439 (Grupo 1, IP menor)	46,2 μm	40 μm
Pn354 (Grupo 2, IP esperado)	44,3 μm	37,5 μm

La media del diámetro del polen no viable es de 40 μm en el individuo del Grupo 1 y 37,5 μm en el individuo del Grupo 2. En ambos individuos los diámetros del polen viable y no viable, son diferentes, siendo en ambos casos mayores los diámetros de los granos de polen viable. En el individuo de IP menor los diámetros del polen viable y no viable son: 46,2 μm y 40 μm , respectivamente. En el individuo de IP esperado los diámetros del polen viable y no viable son: 44,3 μm y 37,5 μm , respectivamente. A su vez los rangos en ambos individuos dentro de la clase de polen viable fue muy amplio, 29,5 a 67,6 μm en el IP menor, y 26 a 85,5 μm en la planta de IP esperado (Fig. 8 y 9).

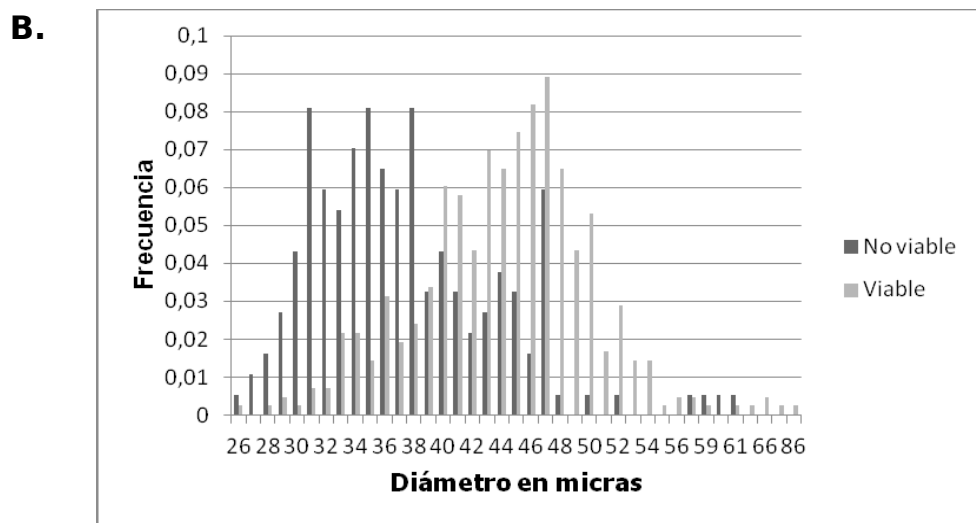
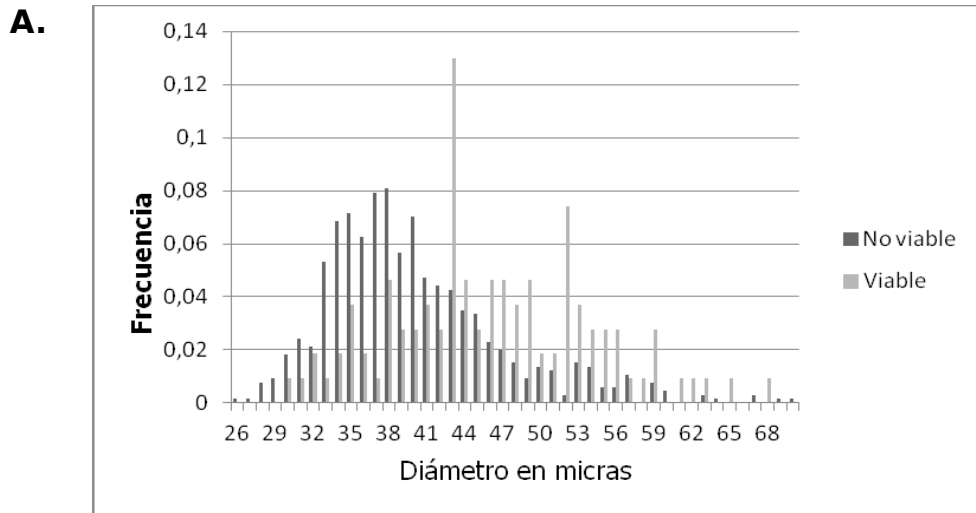


Figura 8. Diámetro del polen en *P. notatum*. Polen viable y no viable. **A.** genotipo Pn7439. **B.** genotipo Pn354.

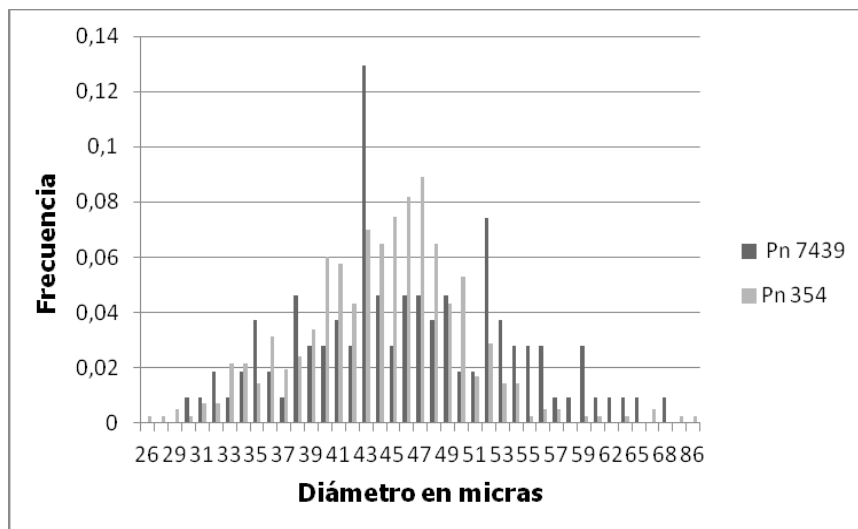
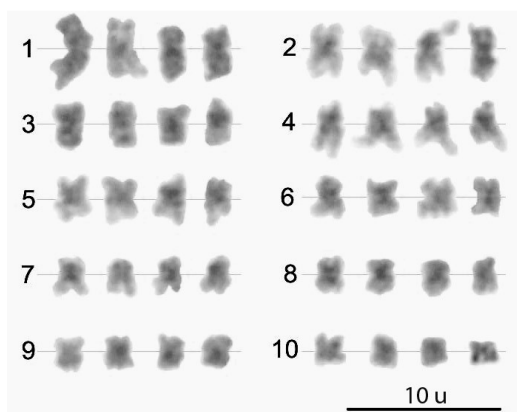


Figura 9. Diámetro de los granos de polen viable en *P. notatum*. Gráfico comparativo conjunto de ambos genotipos Pn354 y Pn7439.

4. Discusión

El origen de los materiales de *Paspalum notatum* con los que se trabajó es parte de una colecta realizada por el INIA en el verano de 2006, la que constaba de 417 individuos pertenecientes a 95 accesiones (accesión hace referencia a su localización geográfica de origen) de todos los departamentos del Uruguay. Los materiales formaron parte de la tesis de grado de R. Narancio y posteriormente parte de los resultados fueron publicados (Reyno et al., 2012). Las plantas se mantuvieron en invernáculos de INIA Tacuarembó y pertenecen al programa de mejoramiento de pasturas de esa institución. En dicha tesis se realizaron trabajos de estudio de variabilidad genética entre y dentro de las poblaciones colectadas, y cuando se comparó estos valores con los agrupamientos por UPGMA, se observó que una mayoría de plantas dieron índices de ploidía (IP) menores a 1,9, por lo que dichos autores las agruparon. De las 95 accesiones colectas por INIA, en el presente trabajo se utilizaron 14 accesiones, 12 con índice de ploidía menor a 1,9 y 2 con índice esperado. En base a estos resultados, se decidió comenzar el estudio de las causas de la diferencia en contenido de ADN entre ambos grupos, viendo si se debía a diferencias en el número de cromosomas, pero estos resultaron en todos los casos ser 40 cromosomas (Reyno et al., 2012). Para este trabajo se armó un cariotipo (S. Vázquez, com. pers.) como modelo, que se muestra a continuación (corresponde a una planta del Grupo 1).



Una particularidad se constató en la planta Pn105, ya que no generó panojas, es una planta de poco vigor, y no sobrevivió más de un par de años. Quarín y Norrmann (1987) describen también en un híbrido entre *P. notatum* diploide ($2n=2x=NN$) y *P. cromyorrhizon* ($2n=2x=N'N'$) que dio lugar a una planta que dichos autores consideran un alotetraploide segmental $2n=4x=NNN'N'$, de aspecto vigoroso al principio y que sólo produjo dos inflorescencias en tres años y murió. Podría tratarse en el caso de la planta Pn105, de un híbrido estéril generado en la naturaleza. Sería interesante estudiar cómo surgen, porque podría dar luz sobre el sistema de generación de poblaciones naturales de *P. notatum* en general.

4.1. Análisis de la meiosis en células madres de polen y asociaciones cromosómicas en Metafase I

Quarín (1992) explicita y define como “meiosis regulares” aquellas donde los cromosomas se encuentran apareados formando bivalentes y por lo tanto en el resto del proceso de división meiótica su comportamiento es regular, y “meiosis irregulares” en las que hay asociaciones multivalentes mayoritariamente tetravalentes, y en casos extremos incluso todos como univalentes (asinapsis). En nuestro caso en las preparaciones microscópicas realizadas de las anteras de las accesiones estudiadas se observaron todas las etapas de la meiosis. Podemos afirmar que en los genotipos tetraploides no encontramos meiosis regulares (normales) ya que ningún genotipo presentó solamente bivalentes.

Los tipos de anomalías meióticas encontradas en este trabajo en *P. notatum* coinciden con las de varios autores (Adamowski et al., 2005; Podio et al., 2012; Forbes and Burton, 1961). Podio et al. (2012), en cinco accesiones naturales apospóricas de *P. notatum*, encuentra anafases normales en 44 a 67% de las células analizadas y

una producción de polen viable en promedio de 65%. Forbes and Burton (1961) analizan en la anafase los rezagos cromosómicos, obteniendo para poblaciones naturales valores entre 32 y 67% de las células, con viabilidad de polen entre 40 y 70%. Estos porcentajes de viabilidad de polen son similares a la planta del Grupo 2.

Debido al pequeño tamaño de los cromosomas (como se observa en el cariotipo de *P. notatum* que se muestra), la observación de las asociaciones cromosómicas en meiosis no permitió distinguir con claridad de qué cromosomas se trataba en cada caso. Las mediciones que realizamos en dicho cariotipo indican que el cromosoma 1 tiene una longitud promedio de 3,6 micras y el cromosoma 10 de 1,8 micras, la mitad que el primero, el resto disminuye en leve gradiente. Forbes and Burton (1961) también hacen mención a que el tamaño de los cromosomas en metafase I no permite estimar de forma inequívoca la frecuencia de los tipos de apareamiento y orientación de los IV en forma de anillo, para poder sacar conclusiones más firmes.

Cuando en plantas tetraploides en la etapa de la primera metafase se observan solamente bivalentes, esto sugiere la presencia de dos genomios distintos, posible alotetraploide, o autotetraploides de poblaciones que han divergido. Por otro lado la presencia constante (en alta frecuencia y de todos los cromosomas) de tetravalentes debido al apareamiento de cromosomas homólogos, apoya la hipótesis de la autotetraploidización. En este trabajo no se encontró ningún núcleo con 10 tetravalentes, esto puede deberse al redimensionamiento del genoma que ocurre luego de la poliploidización (Leitch and Bennett, 2004) o el hecho que se originaron de la aloploidización y no una autoploidización (Quarin, 1992; Quarin, 2004). También es posible que la poliploidización se deba a la formación de gametos no reducidos, que son gametos que tienen el mismo complemento cromosómico que las células somáticas debido a fallas en la meiosis. Martelotto et al. (2005) trabajando en *P.*

notatum con tetrapoliploides sintéticos, autopoliploides, encuentra remodelaciones genéticas y epigenéticas posteriores a la poliploidización que pueden llevar a cambios en el genoma. Esto podría también explicar la ausencia de 10 tetravalentes en las células analizadas.

Al analizar el número de tetravalentes y los porcentajes calculados para los 14 genotipos de los integrantes del grupo 1 encontramos que mayoritariamente los núcleos presentan entre dos y tres tetravalentes, siendo el mínimo 62,5% (Pn7439) y el máximo el 100% (Pn258). Algunos genotipos presentan un alto porcentaje de núcleos con 1, 2 y 3 tetravalentes, 90,6% de los núcleos (Pn7439), 96,7% (Pn101) o 100% (Pn259 y Pn100). Sólo en algunos genotipos se encuentran 4 tetravalentes (Pn101 y Pn7439), 4 y 5 tetravalentes en Pn74 y 4, 5 y 6 en Pn108. Aun cuando los integrantes del Grupo 1 son similares en sus configuraciones cromosómicas en metafase I, no presentan igual comportamiento de sus cromosomas, sino que hay variaciones según genotipos.

Al analizar el número de tetravalentes y el correspondiente porcentaje en los dos genotipos de los integrantes del Grupo 2, Pn354 tiene un 65,4% de sus núcleos con uno o dos tetravalentes y si además consideramos los que presentan tres, ese porcentaje sube a 94,5% de los núcleos. Estos valores son similares a algunos genotipos del Grupo 1 (Pn7439, Pn259, Pn101 y Pn100).

Comparando los porcentajes más altos en ambos grupos, coinciden en que corresponden a la presencia de dos tetravalentes, en el Grupo 1 es 41% y en el Grupo 2 es 40%. Ninguno de los grupos presentó núcleos con 9 o 10 tetravalentes. A partir del número de tetravalentes observados y descartando los trivalentes por su baja incidencia, se estimó el número de bivalentes. Los genotipos del Grupo 1, tendrían el 80% de los núcleos con 16 a 18 II, y los del Grupo 2, tendrían el 71% con 14 a 16 II. (Tabla 5).

Tabla 5. Tetravalentes observados, estimación de bivalentes y estimación de asociaciones cromosómicas en Metafase I. **A.** para el conjunto de genotipos del Grupo 1. **B.** y los del Grupo 2.

A.

Frecuencia de IV	Número de IV obs.	Grupo I Estimación número de II	Asociaciones cromosómicas:
0,034	0	20	20 II + 0 IV
0,383	1	18	18 II + 1 IV
0,414	2	16	16 II + 2 IV
0,141	3	14	14 II + 3 IV
0,019	4	12	12 II + 4 IV
0,005	5	10	10 II + 5 IV
0,003	6	8	8 II + 6 IV
0	7		
0	8		
0	9		
0	10		

B.

Frecuencia de IV	Número de IV obs.	Grupo II Estimación número de II	Asociaciones cromosómicas:
0	0	20	20 II + 0 IV
0,018	1	18	18 II + 1 IV
0,306	2	16	16 II + 2 IV
0,405	3	14	14 II + 3 IV
0,126	4	12	12 II + 4 IV
0,063	5	10	10 II + 5 IV
0,045	6	8	8 II + 6 IV
0	7		
0,036	8	4	4 II + 8 IV
0	9		
0	10		

En el Anexo 2 se resumen los resultados obtenidos por Dahmer et al. (2008) para 35 genotipos tetraploides. Dicha tabla presenta números absolutos (entre 16 y 67 núcleos por genotipo) y estimación de asociaciones cromosómicas de sus núcleos. A partir de los números obtenidos por los autores así como las asociaciones cromosómicas correspondientes, se calcularon las frecuencias. De los genotipos analizados 5 de ellos (14%) presentan meiosis regulares con 20 bivalentes, 17 de los restantes genotipos (49%) tienen más del 60% de sus núcleos con 20 bivalentes, y los genotipos restantes (86% del total) tienen bajo número de tetravalentes. A su vez, el 60% tiene entre 0 y 3 tetravalentes, el 40% restante entre 4 y 7 tetravalentes,

no hay ningún genotipo con 8, 9 o 10 tetravalentes, y de los 31 genotipos uno solo presenta cero bivalentes en sus núcleos.

Si analizamos comparativamente los resultados de Dahmer et al. (2008) y los del presente trabajo (Tabla 2 y Figura 7C) vemos que el Grupo 1 de genotipos presenta con 1 y 2 IV una frecuencia promedio de 0.79 (mínimo 0.62 y máximo 0.93), mientras que en el Grupo 2 presentan un promedio de 0.71 de 2 y 3 IV (mínimo 0.52 y máximo 0.9). Mientras tanto, en las accesiones estudiadas por Dahmer et al. (2008) hay seis accesiones (11PR, 14RS, 26RS, 33RS, 41Argentina, 67Uruguay), con valores similares al Grupo 1 de este trabajo mientras que una sola (la 33) presenta valores que se solapan tanto con el Grupo 1 (en la suma de las frecuencia de 1 y 2 IV), como con el Grupo 2 (sumando las frecuencias de 2 y 3 IV). Si bien en dicho artículo aparecen datos poco precisos del origen de las accesiones, las de Brasil fueron colectadas una en Paraná y otra en Rio Grande do Sul, y dos de Argentina y Uruguay, pero en estas últimas sin más datos. Asimismo, las provenientes de Uruguay son dos, la nº 66, presenta 63% de bivalentes, y el resto de núcleos con 2 tetravalentes y la nº 67 presenta 29% de bivalentes, y el resto de núcleos con 1 o 2 tetravalentes. Otra diferencia llamativa es que en nuestro trabajo de las 14 accesiones no hay ninguna que tenga el 100% de núcleos con bivalentes, y en el trabajo nombrado sí hay 5 accesiones (06, 07, 13, 17, 49) de un total de 39. Por su lado, Adamowski et al. (2005) analizaron 20 células de la accesión BRA-088028 de *P. notatum*, colectada en Santa Catarina, en la que el promedio de II por célula dio 13,55, mientras que el de IV es 2,15, siendo el mínimo encontrado 1 y el máximo 5. También de poblaciones naturales de Brasil, Moraes Fernandes et al. (1974) estudiaron el comportamiento meiótico de distintas especies de *Paspalum* del estado de Rio Grande do Sul. Entre ellas, cuatro accesiones de *P. notatum*: “Común”, “Uruguaiana” y “Giant” tienen entre 0 a 6 IV y 20 y 8 II, mientras que la accesión “Capivari” tiene entre 0 a 2 IV y 20 y 16 II. Para los autores estos valores y la meiosis irregular podrían deberse a un origen

autopoliploide o ser un aloploiploide segmental.

Trabajando además con tetraploides generados artificialmente, Forbes and Burton (1961) obtuvieron a partir de material diploide de Pensacola dos plantas autotetraploides inducidas, encontrando 5 IV en promedio. En el mismo trabajo analizando cinco tetraploides naturales encontraron entre 5-8 IV; en una de las accesiones (MH) originaria de Uruguay el promedio de IV es de 5,69 (siendo el máximo 8). Para las accesiones (MH) y (UR), ambas de Uruguay, analizaron la meiosis completa encontrando en (MH) 32% de células con retrasos y 25% de tétradas con micronúcleos y en (UR) 59% y 72%, respectivamente.

4.2. Viabilidad y tamaño del grano de polen

En los dos únicos genotipos de *P. notatum* analizados para viabilidad de polen, el porcentaje de polen viable fue diferente. En el genotipo Pn7439 (Grupo 1, con índice de ploidía menor al esperado) ese valor fue de 14,1%, y en el genotipo Pn354 (Grupo 2, con índice de ploidía esperado) fue de 69,2%. Sí fueron similares los valores medios del diámetro de los granos de polen, ya que en el genotipo Pn7439 fue de 46,2 μm , mientras que la del genotipo con menor IP o Pn354 fue de 44,3 μm . Comparando viabilidad con tamaño no parece haber una correlación entre ambos parámetros. Para el género *Paspalum*, estudiando ocho especies distintas, entre ellas *P. notatum*, Ma y colaboradores (2001) concluyen que los granos de polen son esferoidales y con un diámetro promedio entre 34 y 50 μm , por lo que podemos deducir que los datos son muy similares y que los de las accesiones que se estudiaron en este trabajo tienen una dispersión algo mayor.

Las irregularidades meióticas (presencia de uni, tri y tetravalentes, migraciones tempranas o tardías de los cromosomas y puentes) llevan a la generación de gametos desbalanceados lo que afectaría la viabilidad del polen (Adamowski et al., 2005). Queda por resolver a

futuro a qué se puede deber la diferencia encontrada entre la viabilidad de las dos plantas. Sin dudas un primer paso es trabajar con una muestra mucho mayor de individuos de cada Grupo.

Al comparar los resultados obtenidos con los de otros autores que trabajaron con la misma especie, un problema que surge es que varios (Moraes Fernandes et al., 1973; Forbes and Burton, 1961) contabilizan a los viables y los separan en tres categorías: los de apariencia normal, tamaño medio y pequeño, y separan como no viables a los pequeños y pobremente teñidos o vacíos, por lo que nosotros unimos las dos primeras categorías de viables para compararlas con nuestros datos. Los valores de viabilidad reportados en esos dos trabajos comparados con los nuestros son similares al del genotipo del Grupo 2 (contenido de ADN esperado). A su vez estos últimos dieron similares a los de Podio et al (2012) trabajando en la misma especie en accesiones naturales e híbridos inducidos, varía entre 60 a 74% y 61 a 79%, respectivamente. Un caso llamativo es el trabajo de Dahmer et al. (2008) que no aprecia correlación en relación a las accesiones 4x que presentan configuraciones IV y las que sólo tienen II. Considerando todas las 35 accesiones que estudiaron, el valor de viabilidad de polen varía entre 72,4 a 97,9%, y sólo considerando las cinco accesiones con 20 bivalentes, la viabilidad del polen varía entre 72,4 y 97,4%.

Forbes and Burton (1961) analizan la viabilidad de polen en poblaciones naturales, la que varía entre 40 y 70%, teniendo las accesiones provenientes de Uruguay, (MH) un 46% y (UR) un 40% de polen viable. A su vez para Moraes Fernandes et al. (1973) la viabilidad de polen varió entre 0 y 84.3% en las 12 poblaciones 4x incluidas en su estudio. En los autotetraploides inducidos a partir de *P. notatum* Pensacola la viabilidad del polen es del 100% (Forbes and Burton (1961). Por la tanto nuestros valores para el genotipo Pn354 son cercanos a los descritos, no así los del genotipo Pn7439 que son muy bajos (14%).

4.3. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Las observaciones del comportamiento meiótico en los 14 genotipos de *P. notatum*, todos tetraploides, permiten concluir que no ocurre meiosis normal o regular con formación de 20 bivalentes en ninguna de las accesiones estudiadas. El máximo de núcleos que presenta solamente bivalentes (es decir 20II) se observó en la accesión Pn263, donde esto ocurre en el 20% de las células analizadas. En el Grupo 1, también la viabilidad de polen que fue muy baja, no así en el Grupo 2. De las dos accesiones analizadas el mínimo lo presenta la Pn7439 (Grupo 1) con 14,1% y el máximo la Pn354 (Grupo 2) con 69,2%. En las 14 accesiones de este trabajo se observan tetravalentes en la meiosis (en diacinesis y en Metafase I). En resumen y luego de analizar los trabajos previos al nuestro sobre el comportamiento cromosómico en microesporogénesis en *P. notatum*, se deduce que la mayor frecuencia de IV es entre 1 y 3. Quarin (1992) sugiere que los tetraploides de *P. notatum* naturales son o de origen autopoliploide o alopoliploide segmental, nuestros resultados si nos guiamos solamente por el comportamiento meiótico apuntarían a lo mismo.

Un aspecto que consideramos de interés es realizar estudios con marcadores cromosómicos que permitan seguir el comportamiento de los cromosomas en la microesporogénesis sabiendo cuál o cuáles de los 10 cromosomas del genoma básico de *P. notatum* se está observando. Esto permitiría deducir si son siempre los mismos que se aparearían formando IV y por tanto los que no lo hacen en la mayoría de accesiones de *P. notatum* 4x. Por ejemplo, alguna fotografía de metafase I nos sugiere que son los cromosomas largos, el 1 y el 2 los que se observan, es un dato preliminar que sería interesante confirmar.

Una posible explicación para los datos aquí obtenidos y que coincide en términos generales con otros estudios en esta misma especie, es la que propuso Quarin (1992) analizando accesiones de *P. notatum* tetraploide y apomíctico con ese mismo comportamiento en la microes-

porogénesis (formación de IV), quien propone un origen autopoliploide o alopoliploide segmental. Quizá se deba a que en la naturaleza pueda haber habido divergencia evolutiva de poblaciones diploides, que luego por gametos no reducidos hibridan y dan un alopoliploide segmental, o que se hubiera dado divergencia genómica en diferentes poblaciones de *P. notatum* autotetraploide natural.

Por otro lado, teniendo en cuenta el análisis de Narancio (2008) y de Reyno et al. (2012) quienes encontraron diferencias significativas en relación al contenido de ADN entre los dos Grupos, el 1 y el 2, nuestro estudio no indica que esa diferencia esté reflejada en diferencias en el tipo o cantidad de anomalías meióticas, ni en la viabilidad del polen. Una posibilidad es que las accesiones con menor contenido sean híbridos intraespecíficos entre poblaciones distintas de *P. notatum*, ellas naturalmente diferenciadas por contenido. Podrían ser producto de poliploidización a partir de poblaciones diploides (no encontradas en Uruguay pero sí presentes en Brasil), o son producto de la reproducción sexual de gametos de poblaciones tetraploides. La presencia de genotipos que presentan contenidos de ADN en picogramos menores al esperado deberá ser motivo de estudios más exhaustivos. Se debería por un lado aumentar el número de individuos por población para realizar un análisis estadístico adecuado luego del análisis por citometría de flujo. A su vez, proponemos realizar un análisis de viabilidad de granos de polen con una técnica que permita distinguir más adecuadamente los granos viables de los no viables, así como realizar este estudio en tres años consecutivos para minimizar el efecto ambiente. Por último y es un dato relevante que permitiría discutir mejor los resultados, resta también resolver cuál es la estrategia reproductiva presente en los distintos materiales nativos de Uruguay de *P. notatum*.

5. Bibliografía

Acuña C., Martínez E.J., Quarín, C.L. (2000). Un triploide espontáneo en *Paspalum* y su implicancia en estudios evolutivos del género. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas, Código 057. Secretaría General de Ciencia y Técnica. Universidad Nacional del Nordeste. Corrientes, Argentina

Adamowski de Victor, E., Suely, M., Mendes, A.B., Rocha, L.A., Montenegro, J.F. (2005). Chromosome number and meiotic behavior of some *Paspalum* accessions. Genetic and Molecular Biology 4:773-780.

Bashaw, E.C., Hovin, A.W., Holt, E.C. (1970). Apomixis, its evolutionary significance and utilization in plant breeding. In: Proceedings of the 11th International Grassland Congress (Norman, M.J.T., ed.). University of Queensland Press, St. Lucia pp. 245-248.

Bicknell, R.A., Koltunow, A.M. (2004). Understanding Apomixis: Recent Advances and Remaining Conundrums. The Plant Cell 16:228-245.

Burton, G.W. (1948). The method of reproduction in common bahiagrass, *Paspalum notatum*. Journal of the American Society of Agronomy 40:443-452.

Burton, G.W. (1955). Breeding Pensacola bahiagrass, *Paspalum notatum*. I Method of reproduction. Agronomical Journal 47:311-314.

Burton, G.W. (1967). A search for the origin of Pensacola Bahiagrass. Economic Botanic 21:379-382.

Chase, A. (1929). The North American species of *Paspalum*. Contributions from the United States National Herbarium 28:1-310.

Chen, Z.J. (2007). Genetic and Epigenetic mechanisms for gene expression and phenotypic variation in plant polyploids. Annual Review of Plant Biology 58:377-406.

Cidade Witt, F., Dall'Agnol, M., Bered, F., Texeira de Souza-Chies, T. (2008). Genetic diversity of complex *Paspalum notatum* Flüggé

(Paniceae: Panicoideae). *Genetic Resources Crop Evolution* 55:235-246.

Cidade Witt, F., Vigna V.Z., de Souza, F., Valls, F., Dall'Ágnol, M., Zucchi, M., Texeira de Souza-Chies, T., Souza, A.P. (2013). Genetic variation in polyploid forage grass: assessing the molecular genetic variability in the *Paspalum* genus. *BMC Genetics* 14-50 (<http://www.biomedcentral.com/1471-2156/14/50>).

Dafni, A, Firmage, D. (2000). Pollen viability and longevity: practical, ecological and evolutionary implications. *Plant Systematics and Evolution* 222:113-132.

Damher, N., Schifino-Witmann, M.T., Dall'Ágnol, M., de Castro, B. (2008). Cytogenetic data for *Paspalum notatum* FLÜGGÉ accessions. *Science Agricultural* 65 (4):381-388.

Dalla Rizza M., Real D., Reyno R., Porro V., Burgueño J., Errico, E., Quesenberry, K.H. (2007). Genetic diversity and DNA content of three South American and three Eurasiatic *Trifolium* species. *Genetics and Molecular Biology* 4: 1118-1124.

Daurelio, L.D., Espinoza, F., Quarin, C.L., Pessino, S.C. (2004). Genetic diversity in sexual diploid and apomictic tetraploid populations of *Paspalum notatum* situated in sympatry or allopatry. *Plant Systematic and Evolution* 244:189-199.

Doval, D.W., Urbani, M.H. (2002). Evaluación agronómica de híbridos con reproducción apomíctica de *Paspalum notatum*. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas, Código A-040. Secretaría General de Ciencia y Técnica. Universidad Nacional del Nordeste. Corrientes, Argentina.

Espinoza, F., Daurelio, L.D., Pessino, S.C., Valle E. M., Quarin, C.L. (2006). Genetic characterization of *Paspalum notatum* accessions by AFLP markers. *Plant Systematic and Evolution* 258:147-159.

Espinoza, F., Urbani, M.H., Martínez, E.J., Quarin, C.L. (2001). The breeding system of three *Paspalum* species with forage potencial. Tropical Grasslands 35:211-217.

Fachinetto J.M. (2010). Caracterização agronômica, molecular, morfológica e determinação do nível de ploidia em uma coleção de acessos de *Paspalum notatum* Flüggé. Tesis de Maestría en Zootecnia. Facultad de Agronomía, UFRGS, Porto Alegre, Brasil.

Feldman, M., Liu, B., Segal, G., Abbo, S., Levy, A.A., Vega, J.M. (1997). Rapid elimination of low-copy DNA sequences in polyploid wheat: a possible mechanism for differentiation of homoeologous chromosomes. Genetics 147:1381-1387.

Forbes Jr. I., Burton, G.W. (1961). Cytology of diploids, natural and induced tetraploids, and intraspecific hybrids of Bahiagrass, *Paspalum notatum* FLÜGGE. Crop Science 1:402-406.

Fortes, N.B., Tcach, M., Acuña, C.A., Martínez, E.J., Quarin, C.L. (2004). Segregación de la apomixis en *Paspalum notatum* a partir de cruzamientos entre una planta sexual autotetraploide inducida y un padre apomíctico. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas, Código A-008. Secretaría General de Ciencia y Técnica. Universidad Nacional del Nordeste. Corrientes, Argentina.

Galdeano, F., Urbani, M., Honfi, A., Matzk F, Quarin, C.L. (2012). Relación entre el contenido de ADN y las características biológicas en *Paspalum*. Ciencias Agronómicas. Revista XX, Año 12, Resúmenes.

Gates, R.N., Quarin, C.L., Pedreira, C.G.S. (2004). Bahiagrass. 651-680 p. In: Warm-Season (C4) Grasses, Nº 45 in the series Agronomy L.E. Moser, B.L. Burson, L.E. Sollenberger eds. USA.

Gould, F.W. (1966). Chromosome numbers of some Mexican grasses. The Canadian Journal of Botany 44:1683-1696.

Grant, V. 1981. Plant speciation. 2nd ed. Columbia University Press, New York. 563 pp.

Hamant, O., Ma, H., Cande, W.Z. (2006). Genetics of Meiotic Prophase I in Plants. Annual Review of Plant Biology 57: 267-302. On line: plant.annualreviews.org.

Hirata, M., Pakiding, W. (2001). Tiller dynamics in bahia grass (*Paspalum notatum*) pasture under cattle grazing. Tropical Grasslands 35: 151-160.

Hojsgaard D., Honfi A.I., Rua G., Daviña J. (2009). Chromosome numbers and ploidy levels of *Paspalum* species from subtropical South America (Poaceae). Genetic Resources and Crop Evolution 56:533-545.

Jarret R.J., Ozias-Akins P., Phatak S., Nadimpalli R., Duncan R., Hiliard S. (1995). DNA contents in *Paspalum* ssp. determined by flow cytometry. Genetic Resources and Crop Evolution 42:237-242.

Knox, R.B., Heslop-Harrison, J. (1970). Direct demonstration of the low permeability of the angiosperm meiotic tetrad using a fluorogenic ester. Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie 62:451-459. In: Shivanna, K.R. & N.S. Rangaswamy. 1992. Pollen Biology. A Laboratory Manual. Springer-Verlag. 119 pp.

Leitch, I.J., Bennett, M.D. (2004). Genome downsizing in polyploid plants. Biological Journal of the Linnean Society 82: 651-653.

Ma, G., [Huang X.](#), [Zhao N.](#), [Hu, X.](#), [Hu Y.](#), [Xu Q.](#) (2001). Pollen morphology and poly-aperture in *Paspalum*. [Journal of Tropical and Subtropical Botany](#) 9 (3): 201-204.

Ma, G., [Zhao N.](#), [Xu Q.](#), Bunn, E. (2009). Multiporate pollen and apomixis in Panicoideae. Pak. J. Bot. 41(5): 2073-2082.

Martelotto, L.G., Ortiz, J.P.A., Stein, J., Espinoza, F., Quarin, C.L.,

Pessino, S.C. (2005). A comprehensive analysis of gene expression alterations in a newly synthesized *Paspalum notatum* autotetraploid. Plant Science 169:211-220.

Martínez, E.J., Hopp, H.E., Stein, J., Ortiz, J.P.A., Quarín, C.L. (2003). Genetic characterization of apospory in tetraploid *Paspalum notatum* based on the identification of linked molecular markers. Molecular Breeding 12:319-327.

Martínez, E.J., Acuña, C., Coenes, D., Fortes, N.B., Quarín, C.L. (2003). Transmisión de marcadores moleculares ligados a la aposporia en *Paspalum notatum*. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas, Código A-006. Secretaría General de Ciencia y Técnica. Universidad Nacional del Nordeste. Corrientes, Argentina.

Martínez, E.J., Urbani, M.H., Quarín, C.L., Ortiz, J.P. (2001). Inheritance of apospory in bahiagrass, *Paspalum notatum*. Hereditas 135: 19-25.

Millot, J.C. (1995). Pasturas naturales - Posibilidades de producción no contaminada. Cangüé II (4): 2-3.

Millot, J.C., Risso, D., Methol, R. (1987). Relevamiento de pasturas naturales y mejoramientos extensivos en áreas ganaderas del Uruguay. Informe Técnico a la Comisión Honoraria del Plan Agropecuario-CHPA, Consultora FUCREA, Montevideo, Uruguay.

Moraes Fernandes, M.I.B., Barreto, I.L., Salzano, F.M. (1973) Cytogenetic, ecologic and morphologic studies in Brazilian forms of *Paspalum notatum*. Canadian Journal of Genetics and Cytology 15:523-531.

Moraes Fernandes, M.I.B., Barreto, I.L., Salzano, F.M., Sacchet, A.M.O.F. (1974) Cytological and evolutionary relationships in Brazilian forms of *Paspalum* (Gramineae). Caryologia Vol. 27, 4, 455- 465.

Narancio, R. (2008). La apomixis en *Paspalum notatum* Flüggé:

¿existe variabilidad en el germoplasma nativo? Tesis de la Licenciatura de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República.

Ortiz, J.P.A, Pessino, S.C., Leblanc, O., Quarin, C.L. (1997). Genetic fingerprinting for determining the mode of reproduction in *Paspalum notatum*, a subtropical apomictic forage grass. Theoretical and Applied Genetics 95:850-856.

Ozkan, H., Levy, A.A., Feldman, M. (2001) Allopolyploidy-induced rapid genome evolution in the wheat (*Aegilops-Triticum*) group. Plant Cell 13: 1735-1747.

Pagliarini, M.A. (2000). Meiotic behavior of economically important species: the relationship between fertility and male sterility. Genetics and Molecular Biology 23(4):997-1002.

Pagliarini, M.A., Takayama, S.Y., Freitas, P.M., Carraro, L.R., Adamowski, E.V., Silva, N., Batista, L.A.R. (1999). Failure of cytokinesis and 2n gamete formation in Brazilian accessions of *Paspalum*. Euphytica 108:129-135.

Pagliarini, M.A., Carraro, L.R., Freitas, P.M., Adamowski, E.V., Batista, L.A.R., Valls, J.F.M. (2001). Cytogenetic characterization of Brazilian *Paspalum* accessions. Hereditas 135:27-34.

Parodi, L.R. (1937). Contribución al estudio de las gramíneas del género *Paspalum* de la flora uruguaya. Revista del Museo de la Plata, N.S. Bot. 1:211-250.

Pereira Machin, M. (2011). Manejo y conservación de las pasturas naturales del Basalto. Ed. Instituto Plan Agropecuario.78 pp.

Pizarro, E.A. (2005). Potencial forrajero del género *Paspalum*. Pasturas Tropicales 22 (1):38-46.

Podio, M., Siena, L.A., Hojsgaard, D., Stein, J., Quarin, C.L., Ortiz, J.P.A.

(2012). Evaluation of meiotic abnormalities and pollen viability in aposporous and sexual tetraploid *Paspalum notatum* (Poaceae). Plant Systematics and Evolution 298:1625-1633.

Pozzobon, M.T., Valls, J.M. (1997). Chromosome number in germoplasm accessions of *Paspalum notatum* (Gramineae). Brazilian Journal of Genetics 20 (1):29-34.

Quarin, C.L. (1992). The nature of apomixis and its origin in Panicoid grasses. Apomixis Newsletter 5:8-15.

Quarin, C.L. (1999). Effect of pollen source and pollen ploidy on endosperm formation and seed set in pseudogamous apomictic *Paspalum notatum*. Sex Plant Reproduction 11:331-335.

Quarin, C.L., Espinoza, F., Martínez, E.J., Pessino, S.C., Bovo, O.A. (2001). A rise of ploidy level induces the expression of apomixis in *Paspalum notatum*. Sexual Plant Reproduction 13:243-249.

Quarin, C.L., Norrmann, G.A. (1987). Relaciones entre el número de cromosomas, su comportamiento en la meiosis y el sistema reproductivo del género *Paspalum*. Anales del IV Congreso Latinoamericano de Botánica. Colombia. Vol III: 25-34.

Quarin, C.L., Burson, B.L., Burton, G.W. (1984). Cytology of intra- and interspecific hybrids between two cytotypes of *Paspalum notatum* and *P. cromyorrhizon*. Botanical Gazette 145:420-426.

Quarin, C.L., Pozzobon, M.T., Valls, J.F.M. (1996). Cytology and reproductive behavior of diploid, tetraploid and hexaploid germplasm accessions of a wild foregrass: *Paspalum compressifolium*. Euphytica 90:345-349.

Quarin, C.L., Norrmann, G.A., Urbani, M.H. (1989). Polyploidization in aposporous *Paspalum* species. Apomixis Newsletter 2:44-46.

Reis, C.A.O., Schifino-Witmann, M.T., Dall'Agnol, M. (2008).

Chromosome numbers, meiotic behavior and pollen fertility in a collection of *Paspalum nicorae* Parodi accessions. Crop Breeding and Applied Biotechnology 8:212-218.

Reyno, R., Narancio, R., Speranza, P., Do Canto, J., López-Carro, B., Hernández, P., Burgueño, J., Real, D., Dalla Rizza, M. (2012). Molecular and cytogenetic characterization of a collection of bahiagrass (*Paspalum notatum* Flügge) native to Uruguay. Genetic Resources and Crop Evolution 59 (8):1823-1832.

Rosengurtt, B. (1946). Estudio sobre praderas naturales del Uruguay. 5ta. Contribución. Ed. Rosgal, Montevideo. 473 pp.

Rosengurtt, B., Arrillaga de Maffei, B.R., Izaguirre de Artucio, P. eds. (1970). Gramíneas Uruguayas. Universidad de la República, Montevideo. 491 pp.

Rua, G.H., Speranza, P.R., Vaio, M., Arakaki, M. (2010). A phylogenetic analysis of the genus *Paspalum* (Poaceae) based on cpDNA and morphology. Plant Systematics and Evolution 288 (3-4):227-243.

Sartor, M.E., Espinoza, F., Quarín, C.L. (2005). Análisis del sistema reproductivo en plantas autotetraploides inducidos de *Paspalum plicatulum*. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas, Código A-008 Secretaría General de Ciencia y Técnica. Universidad Nacional del Nordeste. Corrientes, Argentina.

Scataglini, M.A., Zuloaga, F.O., Giussani, L.M., Denham, S.S., Morrone, O. (2014). Phylogeny of New World *Paspalum* (Poaceae, Panicoideae, *Paspalum*) based on plastid and nuclear markers. Plant Systematics and Evolution 300 (5):1051-1070.

Shaked, H., Kashkush, K., Ozkan, H., Feldman, M., Levy, A.A. (2001). Sequence elimination and cytosine methylation are rapid and reproducible responses of the genome to wide hybridization and allopolyploidy in wheat. Plant Cell 13: 1749-1759.

- Singh, R.J. (1993). Plant cytogenetics. CRC Press, Inc., USA. 391 pp.
- Speranza, P. (2005). Los desafíos de la exploración de los recursos genéticos en las plantas apomicticas: Lecciones del caso de *Paspalum dilatatum*. *Agrociencia IX (1-2):73-76*.
- Speranza, P., Vaio, M., Mazzella, C. (2003). Karyotypes of two cytotypes of *Paspalum quadrifarium* Lam. (Poaceae). An alternative technique for small chromosomes in plants. *Genetics and Molecular Biology 26:499-503*.
- Stein, J., Pessino, S.C., Martínez, E.J., Rodríguez, M.P., Siena, L.A., Quarin, C.L., Ortiz, J.P.A. (2007). A genetic map of tetraploid *Paspalum notatum* Flüge (bahiagrass) based on single-dose molecular markers. *Molecular Breeding 20:153-166*.
- Stein, J., Quarin, C.L., Martínez, E.J., Pessino, S.C., Ortiz, J.P.A. (2004). Tetraploid races of *Paspalum notatum* show polysomic inheritance and preferential chromosome pairing around the apospory-controlling locus. *Theoretical and Applied Genetics 109:186-191*
- Szinay, D., Chang, S.B., Khrustaleva, L., Peters, S., Schijlen, E., Bai, Y., Stiekema, W.J., van Ham, R.CH.J., de Jong, H., Klein Lankhorst, R.M. (2008). High-resolution chromosome mapping of BACs using multicolour FISH and pooled BAC FISH as a backbone for sequencing tomato chromosome 6. *The Plant Journal 56:627-637*.
- Tischler, C.R., Burson, B.L. (1995). Evaluating different bahiagrass cytotypes for heat tolerance and leaf epicuticular wax content. *Euphytica 84:229-235*.
- 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 265:109-121*.

Veilleux, R. (1985). Diploid and polyploidy gametes in crop plants: mechanisms of formation and utilization in plant breeding. Plant Breeding Review 3:253-288.

Zhong, X.B., de Jong, Z. (1996). Preparation of tomato meiotic pachytene and mitotic metaphase chromosomes suitable for fluorescence *in situ* hybridisation (FISH). Chromosome Research 4:24-28.

Zuloaga, F.O., Pensiero, J., Morrone, O. (2004). Systematics of *Paspalum* group Notata (Poaceae- Panicoideae - Paniceae). Systematic Botany Monographs 71: 1-75.

6. Anexos

ANEXO 1. *P. notatum* Accesoión Pn7439: A. diámetro de granos de polen viables, **B.** diámetro de granos de polen NO viables **Accesión Pn354: C.** diámetro de granos de polen viables, **D.** diámetro de granos de polen NO viables.

Accesión Pn 7439

A. Polen viable

Diam en μm	Frec.
30	0,0093
31	0,0093
32	0,0185
33	0,0093
34	0,0185
35	0,037
36	0,0185
37	0,0093
38	0,0463
39	0,0278
40	0,0278
41	0,037
42	0,0278
43	0,1296
44	0,0463
45	0,0278
46	0,0463
47	0,0463
48	0,037
49	0,0463
50	0,0185
51	0,0185
52	0,0741
53	0,037
54	0,0278
55	0,0278
56	0,0278
57	0,0093
58	0,0093
59	0,0278
61	0,0093
62	0,0093
63	0,0093
65	0,0093
68	0,0093

Media	46,203
D S	7,9075
Varianza	62,529
Rango	38,076
Mínimo	29,549
Máximo	67,625
Suma	4989,9
Cuenta	108

B. Polen no viable

Diam en μm	Frec.
26	0,0015
27	0,0015
28	0,0076
29	0,0091
30	0,0183
31	0,0244
32	0,0213
33	0,0534
34	0,0686
35	0,0716
36	0,0625
37	0,0793
38	0,0808
39	0,0564
40	0,0701
41	0,0473
42	0,0442
43	0,0427
44	0,0351
45	0,0335
46	0,0229
47	0,0198
48	0,0152
49	0,0091
50	0,0137
51	0,0122
52	0,003
53	0,0152
54	0,0137
55	0,0061
56	0,0061
57	0,0107
59	0,0076
60	0,0046
63	0,003
64	0,0015
67	0,003
69	0,0015
70	0,0015

Media	39,996
D S	6,9848
Varianza	48,787
Rango	43,692
Mínimo	26,402
Máximo	70,094
Suma	26238
Cuenta	656

Accesión Pn 354

C. Polen viable

Diam en μm	Frec.
26	0,0024
28	0,0024
29	0,0048
30	0,0024
31	0,0072
32	0,0072
33	0,0217
34	0,0217
35	0,0145
36	0,0313
37	0,0193
38	0,0241
39	0,0337
40	0,0602
41	0,0578
42	0,0434
43	0,0699
44	0,0651
45	0,0747
46	0,0819
47	0,0892
48	0,0651
49	0,0434
50	0,053
51	0,0169
52	0,0289
53	0,0145
54	0,0145
55	0,0024
56	0,0048
57	0,0048
59	0,0024
61	0,0024
63	0,0024
66	0,0048
72	0,0024
86	0,0024

Media	44,2841
D S	6,36414
Varianza	40,5022
Rango	59,5011
Mínimo	25,9998
Máximo	85,5009
Suma	18377,9
Cuenta	415

D. Polen no viable

Diam en μm	Frec.
26	0,0054
27	0,0108
28	0,0162
29	0,027
30	0,0432
31	0,0811
32	0,0595
33	0,0541
34	0,0703
35	0,0811
36	0,0649
37	0,0595
38	0,0811
39	0,0324
40	0,0432
41	0,0324
42	0,0216
43	0,027
44	0,0378
45	0,0324
46	0,0162
47	0,0595
48	0,0054
50	0,0054
52	0,0054
57	0,0054
59	0,0054
60	0,0054
61	0,0108

Media	37,5026
D S	6,60318
Varianza	43,6019
Rango	34,7658
Mínimo	25,9623
Máximo	60,7281
Suma	6937,97
Cuenta	185

Anexo 2. Datos re-analizados a partir de los de la Tabla 1 del artículo de Damher et al. (2008), pg 382-385

Acción	16-17		12-13		14		15		16		17		18		19		20		21		22		23		24		25		26		27		28		29		30		31		32		33		34		35		36		37		38		39		40		41		42		43		44		45		46		47		48		49		50		51		52		53		54		55		56		57		58		59		60		61		62		63		64		65		66		67		68		69		70		71		72		73		74		75		76		77		78		79		80		81		82		83		84		85		86		87		88		89		90		91		92		93		94		95		96		97		98		99		100		101		102		103		104		105		106		107		108		109		110		111		112		113		114		115		116		117		118		119		120		121		122		123		124		125		126		127		128		129		130		131		132		133		134		135		136		137		138		139		140		141		142		143		144		145		146		147		148		149		150		151		152		153		154		155		156		157		158		159		160		161		162		163		164		165		166		167		168		169		170		171		172		173		174		175		176		177		178		179		180		181		182		183		184		185		186		187		188		189		190		191		192		193		194		195		196		197		198		199		200		201		202		203		204		205		206		207		208		209		210		211		212		213		214		215		216		217		218		219		220		221		222		223		224		225		226		227		228		229		230		231		232		233		234		235		236		237		238		239		240		241		242		243		244		245		246		247		248		249		250		251		252		253		254		255		256		257		258		259		260		261		262		263		264		265		266		267		268		269		270		271		272		273		274		275		276		277		278		279		280		281		282		283		284		285		286		287		288		289		290		291		292		293		294		295		296		297		298		299		300		301		302		303		304		305		306		307		308		309		310		311		312		313		314		315		316		317		318		319		320		321		322		323		324		325		326		327		328		329		330		331		332		333		334		335		336		337		338		339		340		341		342		343		344		345		346		347		348		349		350		351		352		353		354		355		356		357		358		359		360		361		362		363		364		365		366		367		368		369		370		371		372		373		374		375		376		377		378		379		380		381		382		383		384		385		386		387		388		389		390		391		392		393		394		395		396		397		398		399		400		401		402		403		404		405		406		407		408		409		410		411		412		413		414		415		416		417		418		419		420		421		422		423		424		425		426		427		428		429		430		431		432		433		434		435		436		437		438		439		440		441		442		443		444		445		446		447		448		449		450		451		452		453		454		455		456		457		458		459		460		461		462		463		464		465		466		467		468		469		470		471		472		473		474		475		476		477		478		479		480		481		482		483		484		485		486		487		488		489		490		491		492		493		494		495		496		497		498		499		500		501		502		503		504		505		506		507		508		509		510		511		512		513		514		515		516		517		518		519		520		521		522		523		524		525		526		527		528		529		530		531		532		533		534		535		536		537		538		539		540		541		542		543		544		545		546		547		548		549		550		551		552		553		554		555		556		557		558		559		560		561		562		563		564		565		566		567		568		569		570		571		572		573		574		575		576		577		578		579		580		581		582		583		584		585		586		587		588		589		590		591		592		593		594		595		596		597		598		599		600		601		602		603		604		605		606		607		608		609		610		611		612		613		614		615		616		617		618		619		620		621		622		623		624		625		626		627		628		629		630		631		632		633		634		635		636		637		638		639		640		641		642		643		644		645		646		647		648		649		650		651		652		653		654		655		656		657		658		659		660		661		662		663		664		665		666		667		668		669		670		671		672		673		674		675		676		677		678		679		680		681		682		683		684		685		686		687		688		689		690		691		692		693		694		695		696		697		698		699		700		701		702		703		704		705		706		707		708		709		710		711		712		713		714		715		716		717		718		719		720		721		722		723		724		725		726		727		728		729		730		731		732		733		734		735		736		737		738		739		740		741		742		743		744		745		746		747		748		749		750		751		752		753		754		755		756		757		758		759		760		761		762		763		764		765		766		767		768		769		770		771		772		773		774		775		776		777		778		779		780		781		782		783		784		785		786		787		788		789		790		791		792		793		794		795		796		797		798		799		800		801		802		803		804		805		806		807		808		809		810		811		812		813		814		815		816		817		818		819		820		821		822		823		824		825		826		827		828		829		830		831		832		833		834		835		836		837		838		839		840		841		842		843		844		845		846		847		848		849		850		851		852		853		854		855		856		857		858		859		860		861		862		863		864		865		866		867		868		869		870		871		872		873		874		875		876		877		878		879		880		881		882		883		884		885		886		887		888		889		890		891		892		893		894		895		896		897		898		899		900		901		902		903		904		905		906		907		908		909		910		911		912		913		914		915		916		917		918		919		920		921		922		923		924		925		926		927		928		929		930		931		932		933		934		935		936		937		938		939		940		941		942		943		944		945		946		947		948		949		950		951		952		953		954		955		956		957		958		959		960		961		962		963		964		965		966		967		968		969		970		971		972		973		974		975		976		977		978		979		980		981		982		983		984		985		986		987		988		989		990		991		992		993		994		995		996		997		998		999		1000	
	0	0.74	0.8	1	0.72	0.25	0.95	0.97	0.73	0.24	0.25	0.25	0.47	0.71	0.88	0.07	0.89	0.17	0.37	0.91	0.61	0.69	0.34	0.31	0.17	0.65	0.62	0.41	0.24	0.4	204+0W																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
1	0.26	0.24	0.6	0.52	0.4	0.05	0.03	0.24	0.25	0.25	0.25	0.22	0.08																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													