

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA

CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA Y FENOTÍPICA DE UNA COLECCIÓN DE  
*Paspalum dilatatum* ssp. *flavescens*.

por

Pablo SANDRO

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

MONTEVIDEO  
URUGUAY  
2014

Tesis aprobada por:

Director:

-----  
Ing. Agr. (Ph.D.) Pablo Speranza

-----  
Ing. Agr. (Ph.D.) Lucia Gutiérrez

-----  
Ing. Agr. (Ph.D.) Ariel Castro

Fecha: 22 de diciembre 2014

Autor:

-----  
Pablo Sandro

## AGRADECIMIENTOS

Esta tesis es el resumen del trabajo de muchas personas que de distinta manera aportaron a la causa a las que tengo que agradecer y con quienes siempre estaré en deuda. Comienzo por mi familia quienes me dieron la oportunidad de hacer esta carrera. A mis tutores por la confianza y la paciencia. A Soledad por aguantar tener un novio casi por recibirse durante mucho tiempo. A toda la gente que colaboro con trabajo físico y psicológico haciendo posible cumplir con los objetivos. En resumen gracias a todos los que me han tenido que aguantar y especialmente a todos los asociados al LEDP.

## TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES.....	VII
I. <u>INTRODUCCIÓN</u> .....	1
A. OBJETIVOS .....	3
1. <u>Objetivos generales</u> .....	3
2. <u>Objetivos específicos</u> .....	3
a. Objetivo 1 .....	3
b. Objetivo 2 .....	3
c. Objetivo 3 .....	3
II. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u> .....	4
A. PRADERAS .....	4
1. <u>Incorporación de especies estivales</u> .....	4
2. <u><i>Paspalum dilatatum</i></u> .....	5
3. <u>Mejoramiento de <i>Paspalum dilatatum</i></u> .....	5
d. Recursos fitogenéticos de <i>Paspalum dilatatum</i> .....	6
4. <u>Los tetraploides del grupo Dilatata</u> .....	6
e. <i>P. dilatatum</i> biotipo <i>Virasoro</i> .....	7
f. <i>P. dilatatum</i> biotipo <i>Vacaria</i> .....	7
g. <i>P. dilatatum</i> spp. <i>flavecens</i> .....	7
h. <i>P. urvillei</i> .....	8
i. <i>P. dasypleurum</i> .....	8
j. Homología genómica.....	9
5. <u>Apomixis</u> .....	9
6. <u>Domesticación</u> .....	10
7. <u>Germoplasma</u> .....	11
8. <u>Propiedades de los descriptores</u> .....	12
9. <u>Diversidad genética</u> .....	13
a. Dinámica de las poblaciones naturales .....	13

b. Estructura poblacional de la diversidad molecular ( $F_{ST}$ ).....	15
c. Estructura poblacional de la diversidad morfológica ( $Q_{ST}$ ).....	16
d. Comparación entre la estructura poblacional para caracteres morfológicos vs moleculares ( $Q_{ST}$ vs $F_{ST}$ ).....	16
III. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u> .....	18
A. MATERIAL VEGETAL .....	18
1. <u>Colección</u> .....	18
2. <u>Síntesis de la colección viva</u> .....	18
3. <u>Instalación del ensayo</u> .....	19
4. <u>Caracterización morfológica</u> .....	19
a. Número de medidas por carácter .....	19
b. Toma de medidas .....	19
c. Variables medidas.....	20
B. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR.....	21
C. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	22
1. <u>Heredabilidad</u> .....	22
2. <u>Análisis de correlaciones</u> .....	23
3. <u>Análisis discriminante</u> .....	24
a. Stepwise.....	24
d. Análisis canónico .....	24
IV. <u>RESULTADOS</u> .....	25
D. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR.....	25
E. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA .....	28
1. <u>Heredabilidad</u> .....	28
2. <u>Estadístico F</u> .....	29
3. <u>Correlaciones</u> .....	29
4. <u>Análisis discriminante</u> .....	30
e. Procedimiento Stepwise .....	30
f. Análisis Canónico .....	31
5. <u>Estructura de la diversidad morfológica (<math>Q_{ST}</math>)</u> .....	32
6. Comparación entre $Q_{ST}$ y $F_{ST}$ .....	34

V.	<u>DISCUSIÓN</u> .....	35
A.	CARACTERIZACIÓN MOLECULAR.....	35
1.	<u>Estructura de la variabilidad molecular (<math>F_{ST}</math>)</u> .....	35
B.	VARIABILIDAD MORFOLÓGICA.....	36
1.	<u>Variabilidad entre líneas</u> .....	36
a.	Heredabilidades.....	36
2.	<u>Estadístico F</u> .....	36
a.	Análisis y propuesta de descriptores .....	37
3.	<u>Variabilidad entre poblaciones</u> .....	39
a.	Análisis discriminante .....	39
b.	Estructura poblacional de las variables morfológicas ( $Q_{ST}$ ) .....	40
c.	Comparación entre estructura poblacional para caracteres morfológicos vs moleculares ( $Q_{ST}$ - $F_{ST}$ ).....	40
VI.	<u>CONCLUSIONES</u> .....	43
VII.	<u>RESUMEN</u> .....	44
VIII.	<u>SUMMARY</u> .....	45
IX.	<u>BIBLIOGRAFÍA</u> .....	46

## LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Cuadro No.	Página
1. Lista de medidas y relaciones morfológicas realizadas.....	20
2. Diversidad alélica (A), Heterocigosis observada ( $H_o$ ) y Heterocigosis esperada ( $H_e$ ) para cada una de las 12 poblaciones de <i>P. dilatatum</i> ssp. <i>flavescens</i> .....	25
3. Análisis de la varianza molecular (AMOVA) para población e individuos de la población.....	26
4. Análisis multivariado de la varianza para caracteres morfológicos con procedimiento Stepwise y selección de variables. Heredabilidad en sentido amplio por variable. F por variable analizada. Valor de $Q_{ST}$ y relación con $F_{ST}$ para cada variable morfológica analizada en <i>P. dilatatum</i> ssp. <i>flavescens</i> .....	31
 Figura No.	
1. Ubicación geográfica de las poblaciones analizadas, ( ) Punto donde la población fue colectada, Número; identificación de la población.....	18
2. Representación gráfica de las probabilidades de pertenecía de cada genotipo a cada grupo utilizando el programa STRUCTURE con un K de 5. Cada barra vertical corresponde a un individuo, el color indica la probabilidad de pertenecer a un pool génico particular.....	26
3. Distribución geográfica de los valores diversidad alélica (número promedio de alelos por locus) para las poblaciones de <i>P. dilatatum</i> ssp. <i>flavescens</i> .....	27

4. Distribución de geográfica de los valores de heterocigosis esperada para las poblaciones de <i>P. dilatatum</i> ssp. <i>flavescens</i> .....	27
5. Distribución geográfica de las poblaciones de <i>P. dilatatum</i> ssp. <i>flavescens</i> y su probabilidad de pertenecía a un grupo genético. Cada barra vertical corresponde a un individuo y cada conjunto de barras representa una población. Cada color representa un pool génico diferente al cual el programa asignó cada individuo.....	28
6. Nivel de correlación y significancia de la correlación entre las variables morfológicas analizadas en <i>P. dilatatum</i> ssp. <i>flavescens</i> .....	30
Gráfico No.	
1. Representación gráfica de la Variable canónica 1 Vs Variable Canónica 2.....	32
2. Comparación de valores de $Q_{ST}$ para las variables analizadas clasificadas según su relación con el $F_{ST}$ .....	34

## I. INTRODUCCIÓN

El Genero *Paspalum* es reconocido ampliamente por la diversidad de sus especies y el potencial forrajero de un gran número de ellas, dentro de las cuales se encuentra *P. dilatatum* (Pizarro, 2000). Esta especie forma parte de un complejo especies con formas apomíticas pentaploides y hexaploides y además tetraploides sexuales, todas cercanamente relacionadas (Speranza, 2009). *Paspalum dilatatum* representa uno de los mejores compromisos para una gramínea C<sub>4</sub> entre alta producción estival de forraje y calidad. Además, presentan una excepcional resistencia al daño por heladas lo que no es frecuente en las especies estivales disponibles en los mercados internacionales (Rowley et al. 1975, Campbell et al. 1999). La forma pentaploide apomítica más común, *P. dilatatum* ssp. *dilatatum* presenta problemas productivos por su baja producción de semilla, asociado al ataque por *Claviceps paspali* el cual invade los ovarios fértiles no fecundados. La colección uruguaya de este biotipo ha sido extensamente estudiada y caracterizada molecular, morfológica, fisiológica y agrónomicamente y el nivel de variabilidad que se ha podido muestrear en ella es mucho mayor que trabajos precedentes (Speranza 2009, Michelini 2010, Rodríguez 2010, Cuña et al. 2012, Quintans 2013, Glison et al. 2014). A pesar de ello las evaluaciones realizadas no muestran variabilidad genética para su limitante más importante; la baja producción de semilla. Este es un problema compartido con todas las forrajeras C<sub>4</sub>, sumando a la presencia de dormición en la semilla lo que limita el proceso de domesticación (Adkins et al., 2002) dificultando su adopción a nivel de sistemas de producción.

Entre las formas tetraploides se encuentra *Paspalum. dilatatum* ssp. *flavescens* que se distribuye en el Sur del Uruguay y el Este de la Provincia de Buenos Aires. Se reproduce sexualmente por autogamia y muestra muy baja susceptibilidad a *Claviceps* y una excelente producción de semilla de calidad. Esta subespecie se encuentra cercanamente relacionada con la forma pentaploide de *P. dilatatum*. Se han realizado estudios en la variabilidad morfológica de la especie, estos sin embargo fueron llevados a cabo utilizando muy poca variabilidad dentro del biotipo (Milot 1969, Savidan 1987, García y Arturini 2001, Alonso y Monterubbianesi 2003, Alonso y Monterubbianesi 2006). A pesar del poco interés que han mostrado los mejoradores por estas formas sexuales, recientemente el estudio de su potencial agrónomico ha crecido en las instituciones públicas de la región (UdelaR, Universidad de Buenos Aires; Universidad Federal de Rio Grande do Sul) (Schrauf y Blanco 2003, Baréa y Scheffer-Basso 2007, Sawasato et al. 2008, Speranza 2009).

Las poblaciones se encuentran constituidas por mezclas de líneas puras poco relacionadas genéticamente (Speranza, 2009). Debido a lo variada composición de las poblaciones para las distintas líneas puras la exploración de la variabilidad genética debe incluir una exhaustiva exploración intra poblacional (Speranza, 2005).

Agronómicamente la exploración de la diversidad en estas poblaciones se puede realizar por medio del estudio de variables morfológicas que permitan identificar y diferenciar líneas y poblaciones. Un carácter morfológico que sea efectivamente discriminante se transforma en un descriptor y este debe de reflejar las diferencias entre las accesiones que se deben a efectos genéticos. La heredabilidad representa la proporción de la varianza observada en la población que se debe a efectos genéticos. La caracterización de la variabilidad genética existente en una colección, la vuelve disponible para los mejoradores y por lo tanto valoriza ampliamente la colección.

La distribución de la variabilidad genética en poblaciones naturales no es uniforme y se encuentra afectada por diversos fenómenos como la migración, flujo génico, deriva y selección (Loveless y Hamrick, 1984). Existen diversos estimadores que proporcionan información sobre la distribución de la diversidad genética a nivel poblacional la mayoría de ellas derivadas de los estadísticos F propuestos por Wright (1951). Entre ellos se destacan el  $F_{ST}$  como estimador de la subdivisión poblacional estimado a partir de marcadores moleculares neutros y el  $Q_{ST}$  como estimador de la subdivisión poblacional para caracteres cuantitativos con herencia aditiva. La comparación entre estos dos estimadores de estructuración de la diversidad genética permite determinar los procesos que podrían estar originando el patrón de distribución geográfica de la diversidad genética (Merilä y Crnokrak 2001, McKay y Latta 2002, Leinonen et al. 2008, Leinonen et al. 2013). El conocimiento sobre la estructura de la variabilidad genética y las fuerzas evolutivas que le dan origen, permiten hacer un uso racional y eficiente de los recursos fitogenéticos, así como optimizar los esfuerzos de conservación (McKay y Latta, 2002).

## A. OBJETIVOS

### 1. Objetivos generales

Determinar la distribución de la variabilidad genética para el biotipo sexual *P. dilatatum* ssp. *flavescens* e interpretar su distribución en el espacio.

### 2. Objetivos específicos

#### a. Objetivo 1

Estudiar la variabilidad genética para marcadores moleculares de la colección y determinar la estructura para la variabilidad genética.

#### b. Objetivo 2

Estudiar la variabilidad para caracteres morfológicos en la colección. Determinar la capacidad de discriminación entre líneas y poblaciones para los distintos caracteres. Proponiendo grupo de descriptores con utilidad en la identificación de líneas.

#### c. Objetivo 3

Comparar la distribución de la variabilidad genética estimada a partir de marcadores moleculares con la estimada a partir de caracteres morfológicos de forma de poder determinar la historia evolutiva de los caracteres cuantitativos y las diferentes estrategias de distribución de la diversidad genética.

## II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### A. PRADERAS

La disponibilidad de forraje, en cantidades suficientes, a lo largo de todo el año es uno de los principales problemas de la producción ganadera en Uruguay. La producción del campo natural se concentra en los meses de primavera, verano y otoño, durante el invierno se produce el mayor déficit en la oferta de forraje (Beretta 1991, Carámbula 1991). En la segunda mitad del siglo XX la intensificación de los sistemas de producción y la necesidad de cubrir el déficit invernal motivó el cambio en la matriz productora de forraje hacia las praderas permanentes y verdeos anuales. Estas opciones pueden ofrecer forraje en mayor volumen y calidad que el campo natural, pero con un mayor costo en utilización de energía y tecnología. Las mezclas típicas en los sistemas de producción involucran la utilización de varias especies donde cada una de ellas tiene características particulares y complementarias con las demás (Carámbula, 2002). Estas mezclas permiten utilizar los recursos de mejor manera, complementar el uso de nutrientes, balancear la dieta del ganado y la oferta de forraje a lo largo del año (Carámbula, 2002). Estas mezclas forrajeras y principalmente las gramíneas perennes existentes en el mercado son principalmente de tipo C<sub>3</sub> con ciclo invernal. Por este motivo las praderas no tienen la capacidad de utilizar los recursos disponibles durante el período estival y estos recursos son aprovechados por las malezas. Las consecuencias de la disponibilidad de estos recursos devienen en una invasión temprana y una reducción de la vida útil de la pastura.

En la agricultura forrajera la tendencia a la utilización de monocultivos con una gran producción instantánea se desarrolla con menor velocidad que en la agricultura tradicional principalmente por temas logísticos y de costos. La diversidad en los sistemas pastoriles permite mejorar la estabilidad y resiliencia del sistema. Existen dos formas de aumentar la diversidad, la primera consiste en la incorporación de variabilidad intraespecífica, es decir la utilización de más de un genotipo o una población diversa para la especie manteniendo su plasticidad (Henry, 2014). La otra opción es la utilización de cultivos multiespecie de tipo perenne que son diversos, se mantienen en el tiempo y ocupan diferentes nichos ecológicos de manera de que no se superpongan y no compiten entre sí mejorando la utilización de los recursos, la resiliencia y productividad del sistema (Díaz y Cabido, 2001).

#### 1. Incorporación de especies estivales

La incorporación de especies estivales en las mezclas utilizadas en nuestros sistemas de producción ha sido propuesta en diversas ocasiones (Millot 1969, García 1995, Carámbula 2002). En situaciones de clima templado y templado cálido como el

nuestro, la presencia de especies estivales de metabolismo C<sub>4</sub> juega un rol fundamental en la estabilidad ecológica del sistema debido a la complementariedad de los ciclos de crecimiento entre las gramíneas invernales y estivales (Johnston 1996, Campbell et al. 1999, Tejera 2014). Nuestras praderas naturales bajo pastoreo se encuentran claramente dominadas por especies C<sub>4</sub>. Las especies C<sub>4</sub> nativas o introducidas invaden la pastura y ocupan el nicho ecológico que se encuentra vacante. Entre estas malezas *Cynodon dactylon* es frecuentemente citada como la principal maleza en el Uruguay (Ríos, 2001) y su invasión es uno de los principales motivos de la corta duración de la fase de pradera en las rotaciones forrajeras en nuestro país (Santiñaque 1979, García 1995). Introducir en las mezclas una gramínea estival, además de incrementar su producción estival podría contribuir a alargar la vida productiva de las praderas (Tejera, 2014) reduciendo así el área a sembrar en otoño y por lo tanto la alta proporción de la superficie que no puede ser pastoreada en esta época del año. Se prevé además que este problema tienda a agravarse en un escenario de cambio climático.

## 2. *Paspalum dilatatum*

*Paspalum dilatatum* es una de las gramíneas nativas considerada como uno de los mejores cultivos forrajeros estivales potenciales. A nivel mundial fue una de las primeras gramíneas estivales que se intentaron domesticar aunque desde un comienzo se identificó su baja producción de semillas y susceptibilidad a *Claviceps* como una de sus principales limitantes (Skerman y Riveros, 1992). Esta especie representa uno de los mejores compromisos para una gramínea C<sub>4</sub> entre alta producción estival de forraje, calidad y resistencia al frío (Dall’Agnol y Gomes 1987, Campbell et al. 1999).

Aunque en Uruguay existe la percepción en el sector privado de que estos problemas son sólo inherentes a *P. dilatatum*, las Panicoideas, subfamilia a la que pertenece la mayor parte de las gramíneas forrajeras estivales cultivadas, presentan una problemática común relacionada con la producción de semillas (Loch y Ferguson, 1999) y en particular un difícil establecimiento (McCormick et al., 2009).

## 3. Mejoramiento de *Paspalum dilatatum*

El mejoramiento convencional de esta especie no es posible debido a su forma de reproducción apomíctica. La etapa de exploración primaria del germoplasma (Millot, 1969) culminó con la liberación de 4 cultivares. De acuerdo con Pizarro (2002) el rechazo a la adopción comercial de los mismos puede haber estado influido por la baja producción de semillas y la escasa información agronómica generada. La caracterización de colecciones variables llevadas a cabo en Brasil mostraron una gran variabilidad en producción de materia seca (Dall’Agnol y Gomes, 1987). Sin embargo, la búsqueda de materiales resistentes a *Claviceps* ha constituido el principal objetivo de mejoramiento, aunque no se han encontrado materiales con un significativo grado de resistencia (Pearson et al. 1981, Burson 1991). Otro enfoque consistió en generar mutaciones a

través de radiación (Bashaw y Hoff 1962, Burton y Jackson 1962) o variación somaclonal y fusión de protoplastos (Akashi y Adachi 1992, Davies y Cohen 1992, Burson y Tischler 1993), sin lograr obtener variantes de importancia agronómica. Producto de un esfuerzo prolongado por parte de nuestro grupo se evaluaron colecciones desarrolladas especialmente para explorar en forma sistemática y eficiente la variabilidad del biotipo común (Speranza, 2005). Si bien se observaron niveles de variabilidad mayores a los reportados anteriormente (Rodríguez 2009, Michelini 2010, Quintans 2013), las limitantes mencionadas se mantienen.

#### d. Recursos fitogenéticos de *Paspalum dilatatum*

*Paspalum dilatatum* pertenece a un complejo aloploiploide que, además de varios biotipos apomícticos, contiene cinco biotipos tetraploides sexuales. Subsiste un rezago en el reconocimiento taxonómico, estos rezagos interfieren con la representatividad y dificultan la utilización del germoplasma (Camadro, 2012). Esto ha sido particularmente relevante para los “biotipos sexuales”, enlenteciendo la generación de información relevante en otras áreas como la ecología. Desde el punto de vista taxonómico en el complejo Dilatata se reconocen formalmente cuatro especies, *P. urvillei* Steud., *P. dasypleurum* Kunze ex Desv., *P. pauciciliatum* (Parodi) Herter, y *P. dilatatum* Poir; esta última con dos subespecies diferenciadas por la pigmentación de las anteras (Zuloaga y Morrone, 2005). Todas estas entidades presentan un alto nivel de identidad en el ADN plastidial (Speranza y Malosetti, 2007), lo que sugiere un origen común (Rua et al., 2010). *Paspalum dilatatum* ssp. *dilatatum* comprende biotipos pentaploides y hexaploides apomícticos de anteras moradas, entre ellos el “común”. Por su parte, *P. dilatatum* ssp. *flavescens* (Roseng., Arrill. y Izag.), incluye las formas de anteras amarillas de *P. dilatatum*, estos son los tres biotipos sexuales “Flavescens”, “Vacaria” y “Virasoro”. A pesar de la enorme cantidad de información citogenética acumulada a lo largo de varias décadas (Speranza, 2009), la taxonomía del grupo Dilatata aún no está clara, ya que especies biológicas bien caracterizadas dentro del complejo, como los tres biotipos sexuales, no son formalmente reconocidas.

#### 4. Los tetraploides del grupo Dilatata

Se llevaron a cabo diversos trabajos de caracterización de la variabilidad genética, morfológica y agronómica de las especies apomícticas (Speranza 2009, Michelini 2010, Rodríguez 2010, Quintans 2013). También se está realizando un importante esfuerzo en comprender el comportamiento de la fisiología pre cosecha de la semilla (Cuña et al., 2012) así como la fisiología de la post cosecha de la semilla de todos los biotipos (Glison et al., 2014).

Al comienzo los biotipos sexuales fueron utilizados en los estudios genéticos como un sustituto citológico de los biotipos apomícticos sin considerarlos una alternativa agronómicamente viable (Bennett y Bashaw 1966, Millot 1969). Estos primeros estudios agronómicos fueron llevados a cabo utilizando muy poca variabilidad

dentro de cada biotipo (Savidan, 1987). Los biotipos sexuales fueron considerados fuentes de sexualidad para el mejoramiento de los apomícticos debido a que la combinación de apomixis-sexualidad puede resultar una ventaja para el mejorador (Burton y Hanna, 1992). Sin embargo, la obtención de plantas fértiles a partir de cruzamientos entre formas sexuales o entre sexuales y apomícticas en el género *Paspalum* ha sido poco frecuente y la cruzabilidad muy baja (Burson 1991, Burson 1992, Burton y Hanna 1992). La cruzabilidad entre formas sexuales del grupo Dilatata es variable pero mucho mayor (Speranza, 2009). Esta es una aproximación ya que la utilización y la exploración de la variabilidad genética de estos materiales es aún incipiente. A continuación se describen algunas características de estos materiales.

e. *P. dilatatum* biotipo *Virasoro*

*Paspalum dilatatum* Virasoro fue reconocido y descrito por primera vez en la localidad de Gobernador Virasoro en la República Argentina por Caponio y Quarín (1987). Presenta espiguillas de mayor tamaño que la ssp. *flavescens* así como cantidad mayor de nervaduras en lema y pálea (Caponio y Quarín, 1987). Es sexual con un sistema reproductivo fuertemente autógeno (Hickenbick y Flores 1992, Speranza 2009). Presenta cualidades como forrajera que la han hecho una especie de interés siendo objeto de estudio en varios trabajos mostrando variabilidad y potencial para la producción de forraje (Da Costa y Scheffer-Basso 2003a, Da Costa y Scheffer-Basso 2003b, Baréa y Scheffer-Basso 2007) y muestra una excelente producción y geminación de semillas (Souza-Chies y Cavalli-Molina 1995, Baréa y Scheffer-Basso 2007). Este biotipo presenta un nivel de dormición de las semillas menor al de *flavescens* y otros biotipos (Glison et al., 2014).

f. *P. dilatatum* biotipo *Vacaria*

*Paspalum dilatatum* Vacaria fue descrito por primera vez en 1968 (Moraes-Fernandez et al., 1968). Es originario de la región de “Campos de Cima da Serra” en la provincia de Rio Grande del Sur y el Planalto Catarinense (Valls y Pozzobon, 1987). Desde el punto de vista agronómico posee gran potencial forrajero y es un componente importante en las pasturas naturales (De Patta Pillar et al., 2009) y sin embargo es la menos estudiada. Se han reportado la hibridación natural entre el biotipo Vacaria y *P. urvillei* en las aéreas donde estos son simpátricos (Valls y Pozzobon 1987, Speranza 2009). En la actualidad se ha vuelto difícil encontrar poblaciones del biotipo Vacaria debido a la alta perturbación ambiental y la mayor aptitud de los híbridos interespecíficos con *P. urvillei* para competir en condiciones de perturbación (De Patta Pillar et al., 2009).

g. *P. dilatatum* spp. *flavescens*

*Paspalum dilatatum* ssp. *flavescens* se distribuye en el sur de Uruguay y noreste de la provincia de Buenos Aires en la República Argentina (Rosengurtt, 1970). Presenta un menor potencial forrajero y su pico de producción de forraje es más primaveral que

en la ssp. *dilatatum* (Milot, 1969). Esta información se ha basado en unas pocas poblaciones poco representativas (Milot 1969, Burson et al. 1973, Alonso y Monterubbianesi 2006). Su caracterización molecular mostró que el biotipo es altamente autógeno (Speranza, 2009) y la variabilidad genética se encontró repartida por igual tanto entre como dentro de las poblaciones, sin una estructura geográfica determinada. Las poblaciones están en ocasiones formadas por una sola línea pura o grupos de líneas puras genéticamente divergentes. La Facultad de Agronomía cuenta con una extensa colección de la especie que está siendo caracterizada y a partir de la cual se desarrollará, en base a la caracterización molecular y morfológica, una colección más reducida para ser evaluada agrónomicamente.

#### h. *P. urvillei*

*Paspalum urvillei* es nativa en Argentina, Brasil y Uruguay y además se la puede encontrar en zonas templadas del globo donde se comporta como subespontánea (Sánchez, 1981), convirtiéndose en algunos casos en maleza (CABI, 2014). Se han realizado estudios de caracterización molecular y morfológica de la especie principalmente en la zona de Rio Grande del Sur donde es muy abundante en zonas perturbadas (Scheffer-Basso et al. 2002, Sawasato et al. 2008). Es una planta apetecible como forrajera durante su período vegetativo, mientras que en su etapa reproductiva disminuye la relación hoja-tallo reduciéndose la calidad (Scheffer-Basso et al., 2002). Se la ha propuesto como buena productora de heno dada la gran cantidad de materia seca que es capaz de acumular en un corto período de tiempo resultado de su alta tasa de crecimiento y el tamaño de las matas. Otro importante punto que llama la atención en *P. urvillei* es la gran resistencia a la infección con *Claviceps*. Caponio y Quarín (1990) cruzaron Virasoro y *P. urvillei* generando variabilidad que ha sido utilizada en el mejoramiento (Schrauf y Blanco, 2003). Algunas accesiones de *P. urvillei* presentan una muy baja susceptibilidad a *Claviceps* (Madina y Schrauf, 1999). Institutos públicos de la región se encuentran trabajando sobre esta especie (Universidad de Buenos Aires. Facultad de Agronomía. Cátedra de Genética. UdelaR. Facultad de Agronomía, Instituto de Botánica del Nordeste).

#### i. *P. dasypleurum*

*Paspalum dasypleurum* se distribuye en el centro y sur de Chile desde la V hasta la X región, esta es la distribución más austral del grupo (Zuloaga y Morrone, 2005) y es común en Chile aunque ocurre ocasionalmente en Argentina (Zuloaga y Morrone, 2005). Su citología y comportamiento reproductivo han sido descritos (Quarín y Caponio, 1995), aunque la especie no ha sido muy estudiada. Su sistema reproductivo posiblemente sea menos autógeno que el de las otras especies (Speranza, 2009). No se conocen trabajos de caracterización molecular o morfológica así como de utilización y/o manejo para esta especie. En Uruguay ha sido difícil cultivarla a campo (observaciones personales Speranza).

## j. Homología genómica

Debido a que todos estos materiales presentan fórmulas genómicas equivalentes y un alto grado de apareamiento entre sus cromosomas, en conjunto representan una reserva de germoplasma de enormes dimensiones. A esto se agrega la homología cromosómica parcial que muestran con las especies de *Paspalum* del grupo Virgata (Burson et al. 1978, Burson et al. 1982), que convierte a este grupo Dilatata, en un único y gigantesco acervo genético que puede ser explotado en diferentes combinaciones para obtener cultígenos adecuados a una amplísima gama de ambientes y propósitos productivos.

## 5. Apomixis

La apomixis formalmente conocida como agamosperma es un fenómeno que ocurre en el ovario de algunas Angiospermas y su resultado es; La reproducción asexual a través de semilla. Nogler (1984) la clasifica en esporofítica y gametofítica respondiendo al origen de la célula a partir de la cual se desarrolla el embrión. Lo que determina la necesidad de fecundación para el desarrollo del embrión o para el desarrollo del endospermo (Nogler 1984, Savidan 2000). La apomixis se encuentra distribuida en 300 especies de 35 familias de plantas (Bashaw y Hanna, 1990) abarcando desde especies silvestres como *Taraxacum* a cultivos de importancia económica como los cítricos. La apomixis es común en especies forrajeras estivales encontrándose específicamente en 11 de 20 géneros de importancia (Carrillo, 2010).

La posibilidad de propagar un clon por medio de semilla resulta muy atractivo dadas las facilidades y ventajas que presenta para su manejo (Barcaccia y Albertini, 2013). Lo que resulta más atractivo para los mejoradores es la posibilidad de fijar genotipos híbridos facilitando el manejo y reduciendo los insumos necesarios para la producción de semilla (Barcaccia y Albertini, 2013). Dando la posibilidad de utilizar híbridos en cultivos donde no es rentable hacerlo o cambiando la propagación vegetativa de los cultivos clonales a multiplicación por semilla (Barcaccia y Albertini, 2013). Algunos autores sugieren que la transferencia de la apomixis a cultivos mayores significaría una revolución similar a la revolución verde, cambiaría los sistemas de producción, mejoraría el acceso de países subdesarrollados al germoplasma y aumentaría la diversidad del germoplasma utilizado (Jefferson, 1994). Existe un abanico de propuestas para el uso de la apomixis en la agricultura, las consecuencias del uso de la apomixis no son claras y las ventajas son relativas.

Hasta la fecha no se ha logrado transferir con éxito la apomixis a cultivos mayores a partir de parientes silvestres (Savidan, 2000). Esto se debe principalmente a que la apomixis se encuentra asociada a la poliploidía y/o hibridación inter específica y se trata de un carácter de herencia simple con estructura compleja asociado a regiones cromosómicas y grupos de expresión (Barcaccia y Albertini, 2013). Carman (1997) propone que la apomixis se debe a desajustes en la expresión de genes asociados a la

regulación de la reproducción como consecuencia de la hibridación interespecífica y la poliploidía. Los resultados en la transferencia de la apomixis no han sido exitosos augurando que la apomixis es una herramienta teórica que no es viable de ser utilizada en la práctica.

El mejoramiento de especies apomíticas y sus intentos de ser utilizada o transferida a cultivos ha sido infructuosa. En torno a las especies apomíticas naturales existen asociadas especies emparentadas las cuales se han estudiado de manera secundaria como parte del complejo al que pertenece la especie apomítica. Se desconoce el potencial de las especies emparentadas, existe la posibilidad de que la respuesta a los problemas planteados se encuentre estas especies. Sin que la utilización directa de la especie apomítica la cual resulta imposible mejorar sea necesario.

## 6. Domesticación

Los cultivos actuales son el resultado de un largo proceso de domesticación producto de presiones de selección impuestas por el ambiente modificado en que se desarrollan. En la actualidad los proyectos que tienen como objetivo domesticar una nueva especie insumen mucho tiempo, esfuerzo y dinero. Sin embargo, existe abundante literatura sobre los procesos de domesticación de los cultivos mayores. Aproximadamente 500 especies de plantas se han intentado domesticar en un proceso que abarca aproximadamente diez milenios (Gepts, 2004). Este proceso ha producido un conjunto de cambios en la morfología y la fisiología de las plantas, compartido por los cultivos conocido como síndrome de domesticación (Harlan, 1992). Algunas características del síndrome son, pérdida de la forma de dispersión natural, aumento en tamaño del grano, pérdida de la dormición, respuesta al fotoperíodo, entre otras características que facilitan el desarrollo en cultivo. Muchas de estas características son recesivas y con carácter deletéreo en la naturaleza. En consecuencia los cultivos domesticados no son competitivos en ambientes naturales, en contrapartida el hombre es dependiente del alimento producido por los cultivos, generando una relación de mutualismo entre la civilización y los cultivos (Gepts, 2004).

Las especies forrajeras perennes presentan un grado de domesticación incipiente (Gepts, 2004). En estas especies la domesticación comenzó mucho después que en cultivos de grano, consecuencia de que la utilización se limitaba al uso de pasturas naturales como forraje. Con el incremento de la población y consiguiente aumento del área necesaria para cultivo surge la necesidad de mejorar la producción de pasturas aprovechando mejor la superficie disponible, para alimentar al ganado y rotar con las áreas de cultivo (Martino et al., 2008). La domesticación de las especies forrajeras tiene objetivos de selección distintos a los que se pueden tener en cultivos para grano. Entre ellas las gramíneas perennes de ciclo estival presentan un mayor rezago debido a que es común en estas especies la ocurrencia de apomixis e hibridación interespecífica, lo que dificulta el mejoramiento convencional (Bashaw y Hanna, 1990).

Las especies forrajeras comparten algunos caracteres del síndrome de domesticación con los cultivos mayores pero cuando crecen en ambientes silvestres no es posible distinguir a simple vista si se trata de poblaciones naturales o cultivares (Gepts, 2004). Este conjunto de situaciones lleva a que hablar de domesticación en cultivos forrajeros sea un tema de interés para un país como Uruguay donde el ecosistema dominante es la pradera esta es una vía para utilizar y valorizar nuestros recursos fitogenéticos.

En la actualidad se pueden definir una serie de pasos a seguir para domesticar una especie. El conocimiento de los procesos biológicos y la posibilidad de aplicar una gran cantidad de técnicas de apoyo permiten reducir el tiempo de trabajo sobre una especie con potencial (Harfouche et al. 2012, Walter et al. 2012, Shapter et al. 2013). Por tanto se facilita la identificación del potencial para ser domesticada de una especie. Conocer los factores que determinan los niveles de dormición mejora las posibilidades de domesticación para una especie en particular (Adkins et al., 2002). Representando una ventaja cumplir con las etapas de evaluación y desarrollo de tecnología, dado que aumenta las posibilidades de éxito en el proceso de domesticación.

## 7. Germoplasma

Determinar el potencial para ser domesticada de una especie, depende de la capacidad del programa para lograr una muestra representativa de la variabilidad existente. Entonces lo importante en una colección es lograr coleccionar una muestra capaz de captar y evaluar la diversidad biológica presente. La colecta de germoplasma se apoya en el conocimiento sobre la especie que permite por ejemplo las características reproductivas de la especie, nivel de ploidía, parentesco con especies cercanas, diversidad genética, estructuración geográfica, etc. En base las características particulares de cada especie, se define la táctica idónea para obtener la colección, así como su posible optimización a futuro.

La utilización de una colección de germoplasma queda restringida a la información que del mismo se posea. Por esta razón los organismos encargados de la curación de los bancos internacionales de germoplasma presentan grandes esfuerzos en la elaboración de guías y lineamientos para la caracterización del germoplasma (Biodiversity International, 2007). La caracterización es la descripción de la variación existente para caracteres morfológicos y fenológicos de alta heredabilidad (Hintum Van, 1995). Estas características se evalúan por medio de descriptores (Abadie y Berretta, 2001). Se trata de ensayos que insumen mucho tiempo y dinero, por lo tanto se toman en cuenta todos los factores que pueden incidir sobre la precisión, planeándolos de forma de aprovechar al máximo la oportunidad (Van de Wouw et al., 1999). En base a la diversidad de la colección, sistema reproductivo, estructuración geográfica y caracteres que se desea medir se toman decisiones sobre el diseño del ensayo de caracterización. Se decide el número de poblaciones, el número de individuos, evaluación de individuos o parcelas, número de bloques, repeticiones y localidades necesarias para mantener la

representatividad genética y el nivel de precisión deseado. Una vez definidos los términos y condiciones del ensayo, este se implanta en el campo experimental.

La caracterización morfológica es el paso más importante en cadena evaluación ya que es la etapa que define el producto con el que se seguirá trabajando. La falta de precisión en la caracterización morfológica o la elección incorrecta de los descriptores puede ser problemática, ocasionando la incorrecta interpretación de la información recabada, condicionando todo el trabajo futuro del programa al resultado obtenido en esta etapa.

La caracterización agronómica es el segundo paso en el proceso de evaluación. Este paso necesita partir de materiales pre evaluados debido a que existe un límite en la cantidad de materiales que es viable evaluar. Se continúa a partir de la elección de unas pocas líneas promisorias que serán utilizadas en ensayos enfocados en medir características de menor heredabilidad con importancia productiva. Entonces el diseño de los ensayos se hace con repeticiones dentro y entre distintas localidades. A partir de la evaluación agronómica se selecciona un número menor de líneas o poblaciones con las que se continúa el proceso de evaluación. Los materiales evaluados que son desestimados para continuar en el proceso de evaluación, poseen asociada información de evaluación extra que podrían ser útil en el futuro como germoplasma de apoyo al programa.

La última etapa de evaluación de los materiales se realiza en condiciones de producción con tamaños de parcela emulando el ambiente de producción. En estos ensayos se evalúan unas pocas líneas para conocer su comportamiento productivo en situaciones similares a las que se espera que se desarrolle el cultivo de la especie. A partir de esta etapa se realizara la selección de la línea o población que será propuesta para continuar trabajando hacia su liberación al mercado.

El conocimiento del germoplasma disponible para el mejoramiento genético es la base para lograr la incorporación de la diversidad genética existente. Hacer un uso eficiente de la misma para hacer frente a los cambios en el ambiente así como para responder a las necesidades de los agricultores. La diversidad genética, su conocimiento y resguardo, así como la comprensión de los fenómenos que afectan la distribución natural de la diversidad es importante para la sustentabilidad de los sistemas de producción.

## 8. Propiedades de los descriptores

En toda la etapa de evaluación de la diversidad genética a nivel morfológico se utilizan los llamados descriptores. Según la definición de Biodiversity International (2007) *“Atributo, característica o estado medible que puede ser observado en una accesión de un banco de germoplasma. Es utilizado para facilitar la clasificación, almacenamiento, rescate, intercambio y uso del material.”* El descriptor está compuesto

por un nombre, un estado observable o mensurable (lanceolada, oblonga, o longitud en cm) y el método que especifica, dónde, cuándo y cómo debe medirse el descriptor. Los descriptores permiten tener claridad en la comunicación y hacer eficiente el trabajo de campo en los trabajos de caracterización (Biodiversity International, 2007). Un descriptor útil es aquél que es capaz de detectar la variabilidad explicada por efectos genéticos en una colección.

Ese han desarrollado listas de descriptores para una gran cantidad de cultivos, estas cumplen con el objetivo de ser una guía en los procesos de evaluación (Biodiversity International, 2007). Son utilizadas para describir la variabilidad presente en una colección diferenciando individuos o poblaciones, facilitando el intercambio de información entre científicos y optimizando la colecta de datos (Abadie y Berretta, 2001). Estas proveen información útil y relevante para las distintas etapas del manejo del germoplasma desde la colecta hasta el registro de cultivares (Biodiversity International, 2007). Para ser incorporados en una lista los descriptores deben cumplir con determinados requisitos de delimitación, con la finalidad de ser utilizados y comprendidos por cualquier evaluador que trabaje en la especie. En el caso de especies silvestres para las que no existen listas de descriptores disponibles las evaluaciones de germoplasma deben de realizarse eligiendo descriptores en base a conocimiento en especies emparentadas, antecedentes de trabajos previos y consultando expertos en la especie. A su vez la lista de descriptores utilizada depende de la etapa en que se encuentre el programa y de los objetivos del evaluador.

## 9. Diversidad genética

### a. Dinámica de las poblaciones naturales

Las poblaciones naturales se encuentran bajo un continuo de adversidades a las que deben de hacer frente, las cuales determinan el nivel de la presión de selección ejercida por el ambiente sobre la población. El ambiente pone los límites y la población debe responder adaptando su comportamiento a esta limitante o exceso. Esta variabilidad ambiental permite a los genotipos dentro de la población acumular cambios que permiten hacerle frente a la heterogeneidad espacial. La acumulación de esta variación individual se conoce como variabilidad genética (Franco y Hidalgo, 2003). De la combinación de la presión de selección, heredabilidad y variación molecular en la población surge la respuesta a la selección de la población. Dos poblaciones con presiones de selección diferentes y con un nivel de flujo génico inferior a la presión de selección para una característica tenderán a diferenciarse para esta característica.

La diversidad genotípica es el resultado de la acción de la mutación, selección, flujo y deriva génicos, los cuales son afectados por los mecanismos de dispersión, modo de reproducción e historia de vida de la especie en particular (Slatkin, 1994). La distribución de la variabilidad genética en el espacio se ve afectada por diferentes

factores que actúan en conjunto teniendo efectos en la distribución de la diversidad para cada especie (Hamrick y Godt, 1996). El sistema reproductivo y los factores demográficos muestran importantes efectos sobre la estructura de las poblaciones (Loveless y Hamrick, 1984). Las especies alógamas presentan mayores niveles de flujo génico y como consecuencia una menor diferenciación entre poblaciones, mientras que en especies autóгамas ocurre lo opuesto (Loveless y Hamrick 1984, Hamrick y Godt 1996, Crnokrak y Merilä 2002, McKay y Latta 2002, Leinonen et al. 2008). Los factores demográficos que afectan la estructura genética son los que tienen efecto sobre el número efectivo poblacional ( $N_e$ ). Dentro de estos se encuentran, el ciclo de vida, la dormición en las semillas, la forma de dispersión de las semillas, etc. El sistema reproductivo es el principal determinante de la estructura poblacional (Loveless y Hamrick 1984, Hamrick y Godt 1996). Este efecto es muy importante en especies autógamas debido al efecto directo que presenta la autofecundación sobre el  $N_e$  (Pollak 1987, Nordborg 2000).

La variación existente en una población se puede medir utilizando distintos estimadores de la diversidad genética como el número de alelos por locus, heterocigosis esperada, heterocigosis observada (Höglund, 2009). La heterocigosis esperada es un parámetro poblacional que expresa el nivel de heterocigosis que se espera encontrar en una población a partir de las frecuencias alélicas existentes, bajo el supuesto de que la población se encuentra en equilibrio Hardy-Weinberg. Los cambios en el  $N_e$ , afectan por consecuencia las frecuencias génicas de la población lo que se reflejan en la heterocigosis esperada (Loveless y Hamrick, 1984). La heterocigosis esperada en una población se encuentra correlacionada positivamente con el número promedio de alelos por locus (Eckert et al., 2008). La heterocigosis observada es la heterocigosis efectivamente encontrada en la población la comparación de ambas heterocigosis permite determinar el  $F_{IS}$  el cual es el coeficiente de endogamia de una población (Wright, 1943). El  $F_{IS}$  observado en una población depende de las frecuencias génicas y del sistema reproductivo de la especie.

La diversidad genética interactúa con el espacio geográfico y su distribución no es uniforme a través del rango de distribución de la especie. Las poblaciones que se encuentran en los bordes del área de distribución presentan mayor probabilidad de diferenciarse genéticamente y mostrar menor diversidad genética que las poblaciones en el centro del área de distribución (Eckert et al., 2008). Las poblaciones en los bordes del área de distribución presentan un  $N_e$  menor lo que aumenta el efecto de la deriva genética, como consecuencia presentan menor diversidad intrapoblacional y ocasiona una fuerte diferenciación genética (Vucetich y Waite, 2003). Posibles consecuencias de esta situación son, la fijación de alelos raros, estos pueden ser neutrales, deletéreos o favorables, es probable que suceda adaptación imperfecta (Excoffier et al., 2009). Las variantes raras recesivas o con baja eficiencia pueden perderse por eventos de recolonización (Excoffier et al., 2009). Es necesario conocer como se genera la variabilidad observada y cómo interactúan los factores que definen la distribución de la

variabilidad y de esta manera poder hacer un uso eficiente de los recursos genéticos enfocando los esfuerzos y valorizando los recursos de una manera eficiente (McKay y Latta, 2002).

b. Estructura poblacional de la diversidad molecular ( $F_{ST}$ )

El nivel de diferenciación entre dos poblaciones para un carácter neutro es producto de la interacción entre la migración y la deriva génica. El flujo de genes mantiene la homogeneidad entre las poblaciones, por lo tanto el grado de diferencia es función del flujo de migrantes, la presión de selección sobre los migrantes. La deriva génica cambia las frecuencias génicas al azar, la magnitud y velocidad del cambio está dada por el tamaño efectivo de la población. En poblaciones con un  $N_e$  pequeño el efecto de la deriva se observa en unas pocas generaciones fijando alelos con una probabilidad igual a  $q$ . En poblaciones con  $N_e$  grandes es necesario un mayor número de generaciones para detectar su efecto. La autofecundación acelera el proceso de reducción del  $N_e$  a una tasa constante dependiente del coeficiente de autofecundación (Pollak 1987, Nordborg 2000). Dos poblaciones muy alejadas entre las que no exista la posibilidad de migración se diferenciarán por acción de la deriva génica variando las frecuencias génicas al azar en cada población.

La diferenciación genética, la estructura genética y dinámica evolutiva de las poblaciones puede ser estimada por medio del  $F_{ST}$  (Holsinger y Weir, 2009). Este estimador fue desarrollado como un índice de fijación por Wright en 1943. Forma parte de un grupo de tres estimadores interrelacionados  $F_{IT}$ ,  $F_{ST}$  y  $F_{IS}$  (Wright, 1951). El  $F_{IT}$  representa la correlación entre gametos dentro de un individuo con respecto a la población; el  $F_{IS}$  representa la correlación entre los gametos que forman un individuo con respecto a la sub-población a la que pertenece y el  $F_{ST}$  representa la correlación entre gametos tomados al azar dentro de una subpoblación con respecto a dos gametos tomados al azar en la población (Holsinger y Weir, 2009). Se han propuesto y desarrollado diferentes estimadores del  $F_{ST}$  en respuesta a distintos casos y situaciones como,  $G_{ST}$  (Nei 1972, Nei 1973),  $\Phi_{ST}$  (Excoffier et al., 1992),  $R_{ST}$  (Slatkin, 1993),  $\theta_{ST}$  (Weir y Cockerham, 1984). Este último estima la co-ancestría entre alelos tomados al azar dentro de una misma subpoblación con respecto a la población. En este desarrollo de Cockerham y Weir (1984) el  $F_{ST}$  es relacionado y estimado a través de los componentes de varianza entre y dentro de poblaciones.

Se calcula como:

$$F_{ST} = \frac{\sigma_b^2}{\sigma_b^2 + \sigma_w^2}$$

Siendo:

$\sigma_b^2$  Varianza entre las poblaciones.

$\sigma_w^2$  Varianza dentro de las poblaciones para las frecuencias alélicas.

El  $F_{ST}$  permite conocer los patrones de flujo génico y estructura poblacional para caracteres neutros.

c. Estructura poblacional de la diversidad morfológica ( $Q_{ST}$ )

El  $Q_{ST}$  es un estimador con análogo al  $F_{ST}$  pero calculado para caracteres cuantitativos y se calcula en base a la varianza aditiva de la población utilizado por Spitze (1993). Permite obtener una medida estandarizada de la diferenciación genética entre las poblaciones para caracteres cuantitativos. Se calcula como:

$$Q_{ST} = \frac{(1 + f) \sigma_b^2}{(1 + f) \sigma_b^2 + 2\sigma_w^2} \text{ (Bonnin et al., 1996).}$$

Siendo:

$f$  coeficiente de endocria en los individuos de la población,

$\sigma_b^2$  varianza entre las poblaciones,

$\sigma_w^2$  varianza dentro de las poblaciones para los caracteres cuantitativos

En este escenario un carácter cuantitativo neutral con una base genética aditiva presentara valores de  $Q_{ST}$  similares a los que se pueden encontrar en la misma población para el  $F_{ST}$  obtenido en base a un locus neutral (Merilä y Crnokrak 2001, Leinonen et al. 2013).

d. Comparación entre la estructura poblacional para caracteres morfológicos vs moleculares ( $Q_{ST}$  vs  $F_{ST}$ )

Las diferencias observadas entre las subpoblaciones para caracteres neutros son explicadas por el flujo y la deriva génica esto permite que el  $F_{ST}$  sea utilizado como hipótesis nula contra la que contrastar (Leinonen et al., 2013). La comparación es posible asumiendo la completa neutralidad de los marcadores moleculares y como iguales las tasas de mutación de todos los alelos estudiados (moleculares y morfológicos). El contraste de los valores de  $Q_{ST}$  y  $F_{ST}$  permite determinar si la

variación entre poblaciones para caracteres morfológicos es igual a la esperada bajo neutralidad. Por lo tanto evidencia si la selección actúa sobre un carácter morfológico en las distintas poblaciones estudiadas ayudando a comprender el desarrollo evolutivo de la especie.

Cuando la selección actúa sobre los caracteres morfológicos puede hacerlo de dos formas, puede existir la misma presión de selección sobre todas las poblaciones (selección estabilizadora) o puede existir diferencias en las presiones de selección para distintas poblaciones (Selección Divergente) (Merilä y Crnokrak, 2001). Estas dos posibilidades afectan la variación existente entre las poblaciones. La selección estabilizadora reduce la variabilidad entre las poblaciones mostrando una menor varianza entre las poblaciones que la esperada por migración y deriva (igual al  $F_{ST}$ ), entonces cuando el  $Q_{ST}$  es menor al  $F_{ST}$  las poblaciones se encuentran bajo selección estabilizadora (Merilä y Crnokrak, 2001). La selección divergente aumenta la varianza entre las poblaciones. Como resultado la estimación del  $Q_{ST}$  es mayor al  $F_{ST}$ . Los caracteres responderán de manera diferente frente al ambiente y las presiones de selección, por lo tanto el balance entre la deriva y la selección es característico del carácter analizado e independiente entre caracteres (McKay y Latta, 2002). La comparación de estos indicadores nos permite determinar la historia evolutiva de los caracteres cuantitativos y las diferentes estrategias de distribución de la diversidad genética

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### A. MATERIAL VEGETAL

##### 1. Colección

Se parte de una colección de *P. dilatatum* ssp. *flavescens* colectada durante la década de los '90 en el área de distribución de la especie en Uruguay (Figura No. 1). La colección se realizó colectando poblaciones en los bordes de rutas y caminos debido a que es imposible distinguir entre las subespecies en zonas bajo pastoreo. En el momento de la colecta se sospechaba que el sistema reproductivo de la especie era autógena, tomando en cuenta esto se maximizó el número de individuos colectando una panoja por individuo. La colección se encuentra almacenada en el Banco de Germoplasma de la Facultad de Agronomía.

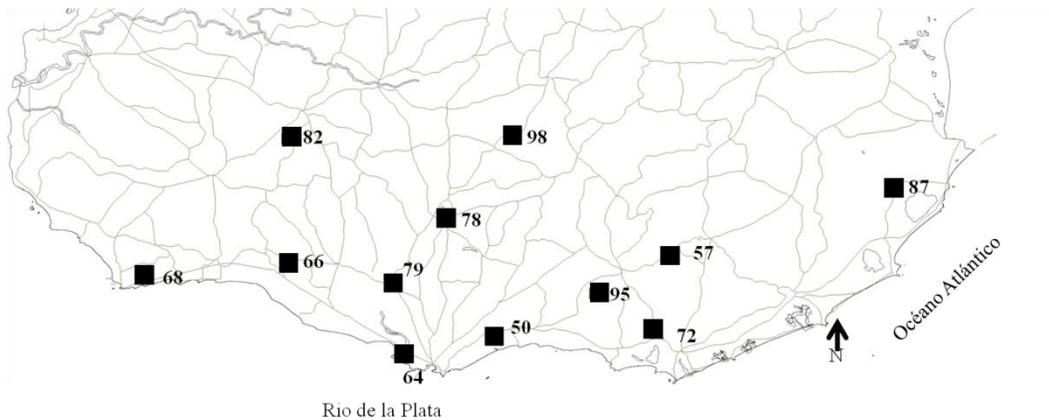


Figura No. 1. Ubicación geográfica de las poblaciones analizadas, (■) Punto donde la población fue colectada, Número; identificación de la población.

Parte de la colección fue caracterizada por Speranza (2009) con marcadores moleculares, confirmando el sistema reproductivo autógeno de *P. dilatatum* ssp. *flavescens*, por este motivo cada individuo de cada población es considerado una línea pura diferente.

##### 2. Síntesis de la colección viva

Durante la primavera del año 2010 las líneas fueron germinadas siguiendo el protocolo de germinación descrito por Glison et al. (2014). Se trasplantaron en macetas en invernáculo. Las líneas se cultivaron durante una generación en invernáculo en condiciones similares para evitar efectos maternos asociados al ambiente de origen. La

cosecha de la semilla se realizó manualmente en cada línea. Fue almacenada en un sobre identificado con el número de línea y fecha de cosecha. Los sobres de una misma fecha de cosecha fueron guardados juntos en una bolsa con cierre hermético conteniendo gel de sílice. Cada cabeza de línea se hizo germinar y posteriormente fue trasplantada a tubetes durante el otoño-invierno de 2011, con un número suficiente de individuos para cumplir con las necesidades del ensayo.

### 3. Instalación del ensayo

La colección se instaló en el campo durante diciembre de 2011 en un diseño de bloques generalizados incompletos de plantas aisladas. El mismo se encontraba repetido en dos localidades, en el campus de la Facultad de Agronomía en Sayago, Montevideo, y el Centro Regional Sur en San Jacinto, Canelones. En cada localidad se instalaron 3 bloques con 2 repeticiones por línea para cada genotipo. Cada individuo se instaló en el centro de una parcela con 0.9 m. de largo y 0.6 m. de ancho. El ensayo se conformó por 12 poblaciones con 8 a 14 líneas por población y 8 a 12 individuos por línea.

### 4. Caracterización morfológica

#### a. Número de medidas por carácter

Previo a la caracterización morfológica se realizó un análisis de datos de experimentos anteriores sobre la misma especie de manera de poder determinar el número de submuestreos (No. de panojas por planta, No. de macollos por planta), para obtener una buena precisión. Para los caracteres vegetativos largo y ancho de hoja la cantidad de submuestreos fue de 5 y la cantidad de submuestreos para caracteres reproductivos fue de 3. El único carácter fenológico registrado fue la fecha de floración. Para definir la fecha de floración se registró la emergencia de panojas en las líneas hasta 10 panojas totalmente emergidas cuando se consideró a la planta en floración. También se registró la fecha de floración a partir de la quinta panoja emergida con el objetivo de comparar la efectividad para ambos métodos.

#### b. Toma de medidas

Los caracteres vegetativos fueron tomados sobre las plantas en el campo con las plantas con 3 meses de instaladas durante marzo de 2012. Durante abril de 2012 con las plantas en estado reproductivo se cosecharon 3 panojas por cada planta las cuales se almacenaron y fueron medidas con posterioridad en el laboratorio. De la semilla desprendida de las panojas medidas se tomaron 3 semillas por cada individuo. Posteriormente se digitalizaron mediante escaneo y fueron medidas utilizando el programa ImageJ plus (Abràmoff et al., 2004).

c. Variables medidas

Cuadro No. 1. Lista de caracteres y relaciones morfológicas evaluadas en la población de *P. dilatatum* ssp. *flavescens*.

Variable	Unidad	Significado
Variables Reproductivas		
NRC	Racimos	Número de Racimos de la Panoja
LR	cm.	Largo del raquis, medido desde la inserción del primer racimo basal hasta la inserción del último racimo
LRC1	cm.	Largo del primer racimo
LRC2	cm.	Largo del segundo racimo
LRC3	cm.	Largo de tercer racimo
LRC4	cm.	Largo del cuarto racimo
LR:NRC	cm./Racimo	Separación promedio entre racimos.
LRC1:NRC	cm./Racimo	Largo del primer racimo afectado por el número de racimos
DIFPROM	--	Informa aproximación a la reducción de tamaño progresivo en la panoja.
LRC1:LR	--	Informa sobre la variación en el largo de los racimos con respecto al largo del raquis.
SIMETRIA	cm <sup>2</sup>	Diferencias entre el tamaño del primer racimo y el promedio de los racimos
LE	mm.	Largo de Espiguilla
AE	mm.	Ancho de Espiguilla
Variables Vegetativas		
LH	cm.	Largo de Hoja
AH	cm.	Ancho de Hoja
Variables Fenológicas		
Floración 10 (FLOR10)	Días	Floración hasta 10 panojas
Floración 5 (FLOR5)	Días	Floración hasta 5 panojas

## B. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

Durante el verano de 2011 se colectaron hojas de las plantas cabeza de línea las cuales se secaron y almacenaron con gel de silica. A partir del tejido seco se extrajo ADN mediante el protocolo propuesto por Doyle (1987), Collins y Symons (1992), posteriormente fue almacenado en congelador a -20 C. Se eligieron 6 pares de cebadores de microsatellite entre los reportados para la especie (Speranza y Malosetti, 2007). La amplificación de fragmentos se realizó por medio de PCR utilizando iniciadores extendidos con M13 (Boutin-Garnache et al., 2001). La reacción de PCR consistió en PCR tampón 1X, 15 mM de MgCl<sub>2</sub>, dNTPs 0.15 mM, 0.8 µM M13, 0.05 µM de cebador iniciador, 0.81 µM de cebador reverso, 0.6 U/ µL de Taq. La amplificación para todos los cebadores fue llevada a cabo con un ciclo con dos etapas similar al reportado por Speranza y Malosetti (2007). El producto de amplificación se corrió en un gel de agarosa ([1.5%]) de manera de confirmar la presencia del fragmento objetivo. Confirmada la amplificación, las muestras fueron acondicionadas y enviadas al servicio de secuenciación del instituto Pasteur de Montevideo. La lectura y genotipado se realizó con el programa Peak Scanner™ Software Version: 1.0 © Copyright 2006. Applied Biosystems.

Con los resultados por genotipo se configuró una matriz de datos para el programa GENALEX 6.3.2 y otra matriz para el programa Structure 2.3.0. Se calculó la heterocigosis esperada, número promedio de alelos por locus y el análisis de la varianza molecular (AMOVA) a partir del cual se extrajo la partición de la varianza molecular entre y dentro de las poblaciones para calcular el  $F_{ST}$  utilizando el complemento para Microsoft Excel GenAlEx 6.3.2.

El programa informático Structure (Pritchard et al., 2000) fue utilizado para determinar la ancestría y mezcla de posibles pools genéticos existentes. El K (Número de clúster de agrupamiento) fue calculado para el rango de 2 a 9 poblaciones con 10 iteraciones para cada población. La simulación fue llevada a cabo con 100000 corridas *burn-in* y 500000 replicaciones MCMC. Posteriormente se calculó el K óptimo a partir del procedimiento descrito por Evanno et al. (2005) y se volvió a correr la simulación para el número de poblaciones óptimo.

## C. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La estimación de los componentes de varianza se realizó utilizando el modelo:

$$Y_{ijklmn} = \mu + L_i + \beta_{j(i)} + P_k + G_{l(k)} + \varepsilon_{ijklm} + \delta_{ijklmn}$$

- i: 1, 2.
- j: 1, 2, 3.
- k: 1, 2, ..., 12
- l: 1, 2, ..., 145.
- m: 1, 2.
- n: 1, 2, 3, 4, 5.

Donde  $Y_{ijklmn}$  es la variable de respuesta de la  $i$ -ésima localidad,  $j$ -ésimo bloque dentro de localidad,  $k$ -ésima población,  $l$ -ésimo genotipo dentro de población,  $m$ -ésima parcela dentro de bloque y  $n$ -ésima medida. Representando:  $\mu$ : Media general,  $L_i$ : Efecto de la  $i$ -ésima localidad  $\beta_{j(i)}$ : Efecto del  $j$ -ésimo bloque en la  $i$ -ésima localidad,  $P_k$ : Efecto de la  $k$ -ésima población,  $G_{l(k)}$ : Efecto del  $l$ -ésimo tratamiento,  $\varepsilon_{ijklm}$ : Error experimental,  $\delta_{ijklmn}$ : Error de sub-muestreo. Asumiendo que:  $P_k$ : v.a. iid  $\sim N(0; \sigma^2_P)$ ,  $G_{l(k)}$ : v.a. iid  $\sim N(0; \sigma^2_G)$ ,  $\varepsilon_{ijklm}$ : v.a. iid  $\sim N(0; \sigma^2)$ ,  $\delta_{ijklmn}$ : v.a. iid  $\sim N(0; \sigma^2_S)$ . El análisis se realizó con el software estadístico SAS (SAS Intitute, 2004), aplicando el procedimiento PROC MIXED para estimar los componentes de varianza asociados a población ( $\sigma^2_P$ ) y genotipo ( $\sigma^2_G$ ).

### 1. Heredabilidad

Se estimaron los componentes de la varianza y se calculó la heredabilidad según Holland et al. (1999) para genotipos replicados en más de una localidad. Se estimó la heredabilidad en sentido amplio ya que se trata de líneas puras donde no es posible descomponer la varianza genética.

La heredabilidad se estimó en base a la siguiente ecuación:

$$H^2 = \frac{\sigma_g^2}{\sigma_g^2 + \frac{\sigma_\varepsilon^2}{r} + \frac{\sigma_{ge}^2}{e} + \frac{\sigma_w^2}{re}}$$

Siendo:

$\sigma_g^2$  varianza genética para la población.

$\sigma_\varepsilon^2$  varianza debida a efectos ambientales

$\sigma_{ge}^2$  varianza debida a los efectos de interacción genotipo por localidad

$\sigma_w^2$  varianza dentro de genotipo

$e$  Localidades (ambientes)

$r$  Repeticiones dentro de genotipo

## 2. Estructura poblacional para variables morfológicas ( $Q_{ST}$ )

Con los componentes de varianza entre y dentro de poblaciones fueron estimados para el cálculo del  $Q_{ST}$  (Bonnin et al., 1996).

$$Q_{ST}^2 = \frac{(1+f)\sigma_b^2}{(1+f)\sigma_b^2 + 2\sigma_w^2}$$

Siendo:

$f$  coeficiente de endogamia de la especie

$\sigma_b^2$  varianza entre las poblaciones

$\sigma_w^2$  varianza dentro de las poblaciones

## 3. Análisis de correlaciones

A partir de las medias corregidas por genotipo se realizó un análisis de correlaciones para las variables evaluadas. El análisis se realizó utilizando el programa R (R Development Core Team, 2011) la representación gráfica se realizó utilizando el paquete *Lattice* y la función *Levelplot* (Sarkar, 2008).

#### 4. Análisis discriminante

##### a. Stepwise

Cuando se miden un conjunto de variables con el propósito de discriminar grupos surge la duda de cuál es la redundancia de las variables y cuáles del grupo de variables existentes poseen un mayor poder discriminante entre grupos (Jhonson, 1998). Jhonson (1998) recomienda la utilización del método *backward* para la elección de variables hasta un límite de 15 variables luego de las cuales es recomendable la utilización del método Stepwise. Este método que permite realizar una selección de variables se basa en la combinación de los métodos de selección *forward* y *backward*. Entre las variables medidas y relaciones calculadas el conjunto de variables analizado alcanza el número de 17 variables. Por lo que se planteó utilizar el procedimiento Stepwise, para ello se utilizó el programa SAS con el procedimiento STEPDISC (SAS Intitute, 2004).

##### d. Análisis canónico

Una vez conocidas las variables que mejor diferencian a las poblaciones, se busca la manera de detectar la diferencia entre las poblaciones. Como parte de los análisis discriminantes se encuentra el método de análisis canónico en el que se conforman variables canónicas que diferencian los grupos previamente determinados. Este método busca las combinaciones lineales de variables que permitan obtener la máxima diferenciación entre grupos. Para este objetivo se utilizó el programa SAS (SAS Institute, 2004) con el procedimiento CANDISC. Obteniendo un grupo de variables discriminantes o canónicas de las cuales se tomaron las primeras tres. A partir de las variables canónicas se utilizó el programa R (R Development Core Team, 2011) para graficar pares de variables canónicas.

#### IV. RESULTADOS

##### D. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

El rango en la diversidad alélica (A) se encuentra entre 2-3,8 (Cuadro No. 2). Los valores más bajos se observan en las poblaciones 82, 95, 78 y 98, todas ellas con valores de A menores a 2,3. Mientras que los valores más altos para A se observaron en las poblaciones 65, 68, 72, 50, 57 con valores entre 3,5 y 3,8. La heterocigosis observada ( $H_o$ ) se encuentra cercana a cero en todas las poblaciones (Cuadro No. 2). La heterocigosis esperada ( $H_e$ ) se encuentra en el rango de 0,27 y 0,57. Las poblaciones 95, 78, 82 y 98, presentan con valores de  $H_e$  menores a 0,3. Mientras que las poblaciones 57, 72, 68 y 54 presentan valores de  $H_e$  mayores a 0,5. Se estimó el  $F_{ST}$  que tiene un valor de 0.36 (Cuadro No. 3).

Cuadro No. 2 Diversidad alélica (A), Heterocigosis observada ( $H_o$ ) y Heterocigosis esperada ( $H_e$ ) para cada una de las 12 poblaciones de *P. dialtatum* ssp. *flavescens*

Población	A	$H_o$	$H_e$
50	3,5	0,03	0,49
57	3,5	0,02	0,59
64	3,8	0,01	0,52
66	2,5	0,00	0,38
68	3,7	0,05	0,56
72	3,7	0,00	0,57
78	2,2	0,00	0,28
79	3,0	0,00	0,45
82	2,0	0,00	0,29
87	2,7	0,02	0,45
95	2,0	0,00	0,27
98	2,3	0,00	0,30
Promedio	2,90	0,01	0,43

Diversidad alélica (A), Heterocigosis observada ( $H_o$ ), Heterocigosis esperada ( $H_e$ ).

Cuadro No. 3 Análisis de la varianza molecular (AMOVA) para población e individuos de la población de *Paspalum dilatatum* ssp. *flavescens*.

Fuente	GL	SC	CM	Var.	% Var.
Entre Pob.	11	232,126	21,102	0,770	36%
Entre Indiv.	131	362,965	2,771	1,370	63%
Dentro de idiv.	143	4,500	0,031	0,031	1%
Total	285	599,591		2,172	100%

GL: Grados de libertad, SC: Suma de cuadrados, CM: Cuadrado medio, Var: estimación de la varianza, % Var. Proporción de la varianza entre las poblaciones con respecto a la varianza total.

Las poblaciones se muestran conformadas por individuos provenientes de un solo pool génico como por ejemplo la población 78, por individuos provenientes de más de un pool génico como en la población 82 y por individuos formados por individuos resultados de hibridaciones entre más de un pool génico como la población 64 (Figura No. 2).

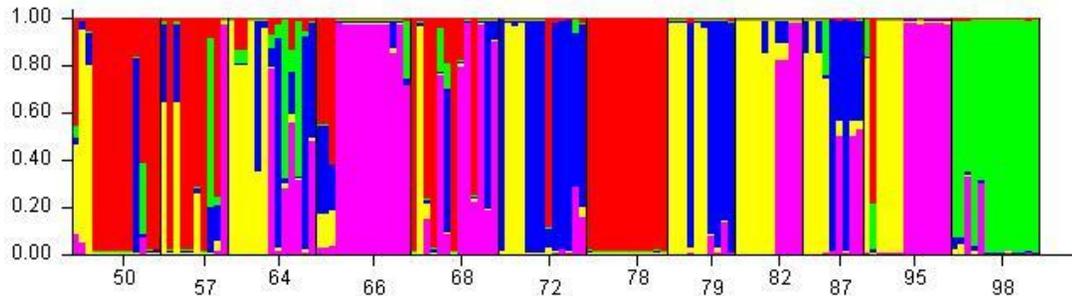


Figura No. 2. Representación gráfica de las probabilidades de pertenencia de cada genotipo a cada grupo utilizando el programa STRUCTURE con un K de 5. Cada barra vertical corresponde a un individuo, el color indica la probabilidad de pertenecer a un pool génico particular para las poblaciones de *P. dilatatum* ssp. *flavescens* analizadas.

La superposición en el espacio de los resultados para Structure, A, H<sub>e</sub>, muestra un patrón de disminución de la diversidad a medida que nos acercamos al borde norte de la distribución de *P. dilatatum* ssp. *flavescens* (Figura No. 3, Figura No. 4, Figura No. 5).

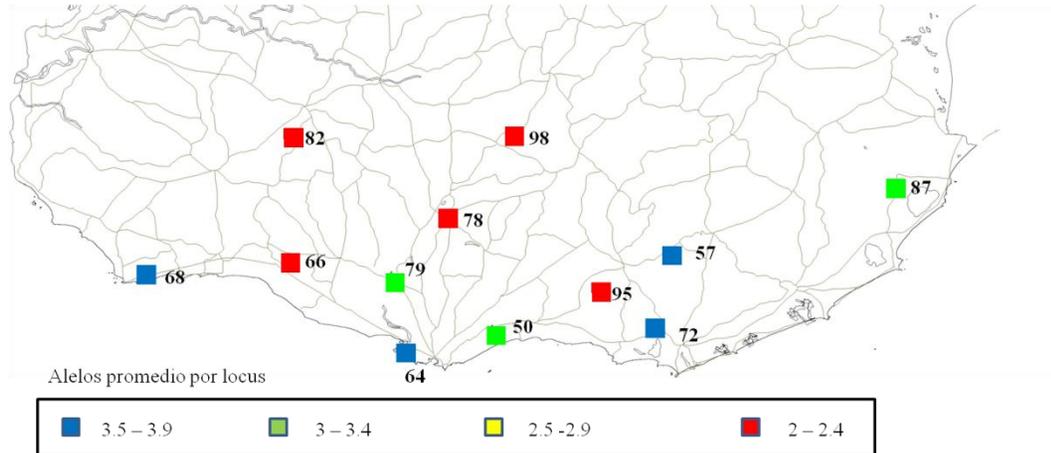


Figura No. 3. Distribución geográfica de los valores diversidad alélica (número promedio de alelos por locus) para las poblaciones de *P. dilatatum* ssp. *flavescens*.

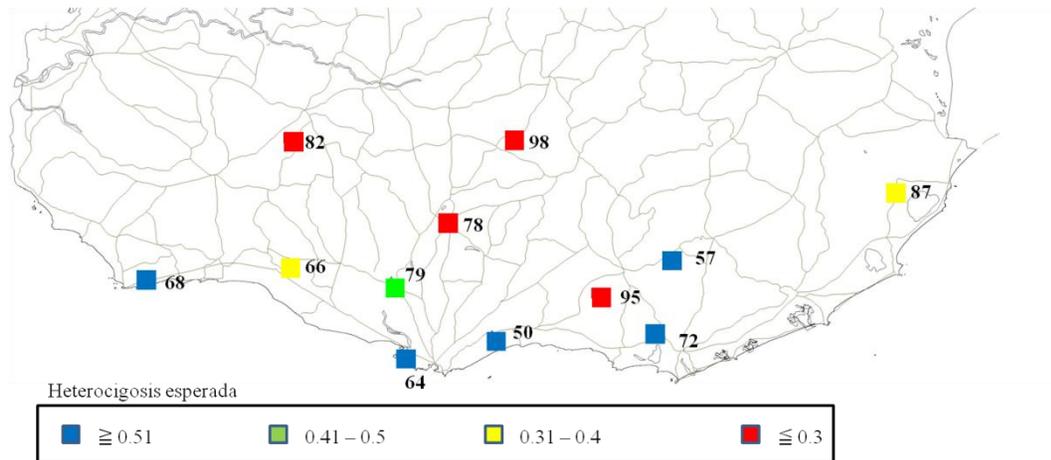


Figura No. 4. Distribución geográfica de los valores de heterocigosis esperada para las poblaciones de *P. dilatatum* ssp. *flavescens*.

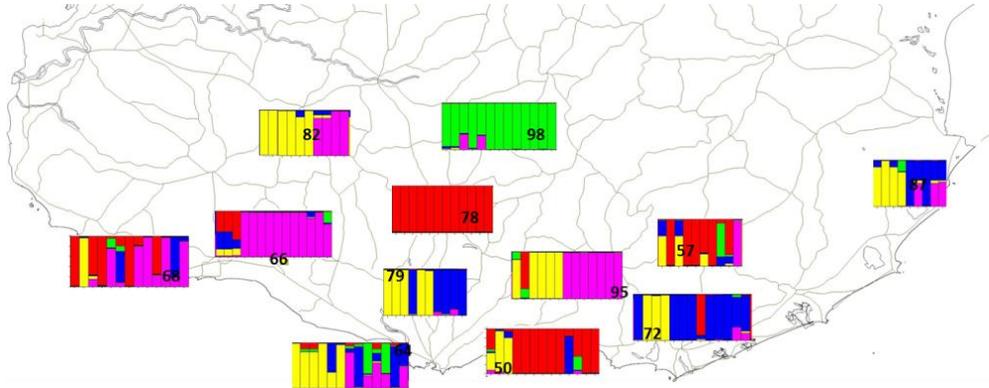


Figura No. 5. Distribución geográfica de las poblaciones de *P. dilatatum* ssp. *flavescens* y su probabilidad de pertenencia a un grupo genético. Cada barra vertical corresponde a un individuo y cada conjunto de barras representa una población. Cada color representa un pool génico diferente al cual el programa asignó cada individuo.

## E. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA

### 1. Heredabilidad

Para las variables se obtuvo un rango de heredabilidad de entre 0,4 y 0,78 que se pueden considerar como valores moderados a altos (Cuadro No. 5). Los caracteres con heredabilidades más bajas fueron ancho de espiguilla, largo de espiguilla y largo del cuarto racimo (0,4, 0,43, 0,44, 0,47 respectivamente), mientras que los caracteres con mayor heredabilidad son la LRC1:NRC, LR:NRC, largo del primer racimo, ancho de hoja y SIMETRIA (0,78, 0,76, 0,76, 0,74 y 0,71 respectivamente). La heredabilidad para los caracteres de interés agronómico fue alta, 0,65, 0,65, 0,74 y 0,69 para floración 5, floración 10, largo y ancho de hoja respectivamente. Para caracteres como el largo y ancho de la espiguilla los valores de heredabilidad fueron moderados coincidiendo con los valores más bajos registrados en el ensayo (0,4 y 0,43 respectivamente). Para los caracteres medidos en la panoja y las relaciones calculadas a partir de las mismas el rango de heredabilidad fue amplio (0,44 y 0,78). Las características con heredabilidad más bajas dentro del grupo de variables fueron la DIFPROM y el largo de cuarto racimo con heredabilidad de 0,44 y 0,47 respectivamente. Las variables con mayor heredabilidad dentro de este grupo fueron la LRC1:NRC, largo del primer racimo, LR:NRC y SIMETRIA con heredabilidad de 0,78, 0,76, 0,76 y 0,71 respectivamente. El valor de heredabilidad para la LRC1:NRC se corresponde con el más alto registrado en el ensayo.

## 2. Discriminación de las variables (F)

Las variables morfológicas mostraron diferencias significativas para al menos una de las líneas. Se utiliza el valor F como indicador de la capacidad de discriminación para clasificar entre líneas. Para el valor F por variable, el rango de valores se encuentra entre 2.38 y 9.51 (Cuadro No. 5). El mayor F se observó en las variables largo de hoja, LR:NRC y ancho de hoja, con valores F de 9,51, 8,04, 6,91 respectivamente. Mientras que los valores más bajos de F se presenta en las variables, DIFPROM, LRC1:LR, con valores F de 2,38, 3,25 respectivamente (Cuadro No. 7). Dentro de las fechas de floración, floración 10 (3,37) presenta un valor F menor que floración 5 (4,14). Dentro de las variables medidas en la panoja y sus relaciones muestran una mayor F, LR:NRC, largo del primer racimo, LRC1:NRC, largo de raquis y el largo del segundo racimo. Mientras que las que presentan menor capacidad de discriminación son DIFPROM, LRC1:LR, largo del racimo 4 y el número de racimos.

## 3. Correlaciones

El largo del racimo 1 presenta una correlación entre 0,68 y 0,8 con las variables largo de racimos 2, 3, 4, y con la LRC1:NRC y 5 (Figura No. 5). El largo de raquis presenta correlación negativa de -0,71 y -0,62 con las relaciones 2 y 4 respectivamente (Figura No. 5). La LR:NRC además muestra una correlación entre 0,62 y 0,77 con largo del raquis, largo del racimo 2, LRC1: NRC y DifProm (Figura No. 6).

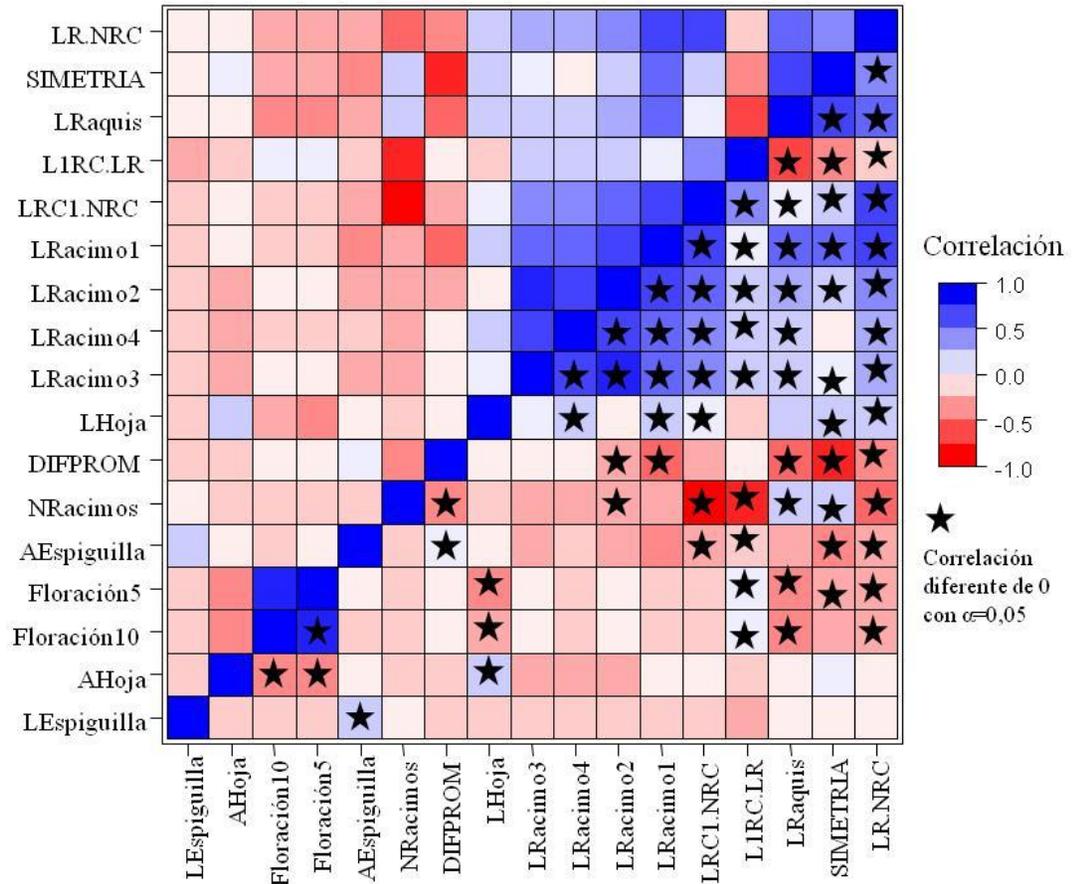


Figura No. 6. Nivel de correlación y significancia de la correlación entre las variables morfológicas analizadas en *P dilatatum ssp. flavescens*

4. Análisis discriminante

e. Procedimiento Stepwise

Existen diferencias significativas entre las poblaciones clasificadas por el grupo de variables. Las variables que explican mejor las diferencias entre las poblaciones son la LR:NRC, la LRC1:NRC, largo de hoja, ancho de hoja, largo del segundo racimo, largo del primer racimo, largo del tercer racimo, fecha de floración 10 y la SIMETRIA (Cuadro No.5)

Cuadro No. 5. Análisis multivariado de la varianza para caracteres morfológicos con procedimiento Stepwise y selección de variables. Heredabilidad en sentido amplio por variable. F por variable analizada. Valor de  $Q_{ST}$  y relación con  $F_{ST}$  para cada variable morfológica analizada en *P. dilatatum* ssp. *flavescens*

Variable	Decisión	Paso	Valor F	Pr>F	H <sup>2</sup>	F	$Q_{ST}$ Vs $F_{ST}$
Floracion1	+	8	3,04	0,0012	0,65	3,37	0,25 < $F_{ST}$
Floracion2	-	--	--	--	0,60	4,14	0,25 < $F_{ST}$
Largo de Hoja	+	3	6,45	<0,0001	0,69	9,51	0,36 = $F_{ST}$
Ancho de Hoja	+	4	6,37	<0,0001	0,74	6,91	0,23 < $F_{ST}$
Ancho de Espiguilla	+	9	2,65	0,0044	0,4	3,37	0,16 < $F_{ST}$
Largo de Espiguilla	-	--	--	--	0,43	4,14	0,23 < $F_{ST}$
Numero Racimos	-	--	--	--	0,64	4,26	0,2 < $F_{ST}$
Largo Raquis	-	--	--	--	0,64	5,63	0,49 > $F_{ST}$
Largo Racimo1	+	6	3,8	0,0001	0,76	5,83	0,62 > $F_{ST}$
Largo Racimo 2	+	5	<0,0001	3,99	0,65	5,43	0,43 > $F_{ST}$
Largo Racimo 3	+	7	3,59	0,0002	0,62	4,66	0,37 = $F_{ST}$
Largo Racimo 4	-	--	--	--	0,47	3,66	0,25 = $F_{ST}$
LR:NRC	+	1	14,47	<0,0001	0,76	8,04	0,6 > $F_{ST}$
LRC1:NRC	+	2	7,03	<0,0001	0,78	5,64	0,57 > $F_{ST}$
X1.2:X3.4	-	--	--	--	0,44	2,38	0,25 < $F_{ST}$
LRC1:LR	-	--	--	--	0,67	3,25	0,48 > $F_{ST}$
SIMETRIA	+	10	1,29	0,2378	0,71	4,36	0,5 > $F_{ST}$

\*+ Ingresado al modelo, - Descartado del modelo.

#### f. Análisis Canónico

El análisis multivariado de la varianza muestra diferencias significativas en al menos una de las poblaciones de *P. dilatatum* ssp *flavescens* con  $\alpha=0.005$ . Las variables canónicas 1, 2 y 3 capturan el 72 % de la variación explicada por los caracteres morfológicos. Los caracteres que tienen mayor incidencia sobre la variable canónica 1 son el cociente LR:NRC, largo de hoja (LH), ancho de espiguilla (AE), fecha de floración 5 (FLOR5), largo del raquis (LR) , largo del racimo 1(LRC1), largo del racimo 3 (LRC3), largo del racimo 4 (LRC4). En la formación de la variable canónica 2 las características que mayor peso tienen son la LRC1:LR, número de racimos, LRC1:NRC, LH, LRC3, largo del racimo 2 y la DIFPROM. Las variables que mayor efecto tienen sobre la variable canónica 3 son LH, LRC3, ancho de hoja (AH), número de racimos (NRC).

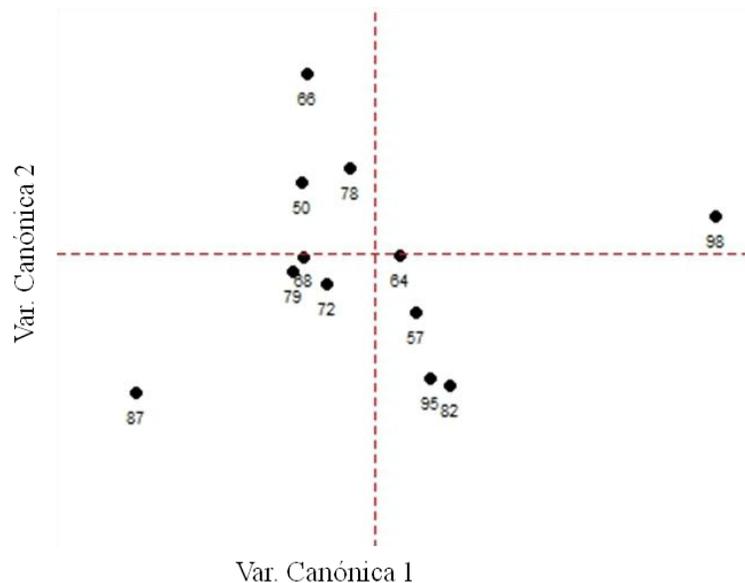


Gráfico No. 1. Representación gráfica de la Variable canónica 1 vs. Variable canónica 2. (●) Ubicación de la población en el grafico. Numero Identificación de la población.

Las variables canónicas 1 y 2 acumulan el 58% de la variación explicada por las variables. Las poblaciones se diferencian en el espacio a través de las variables canónicas 1 y 2. Se observan poblaciones que no son diferenciadas o se diferencian poco las cuales aparecen formando grupos, como por ejemplo las poblaciones 68, 72 y 79 (Gráfico No. 1). Mientras que otras poblaciones son discriminadas por alguna de estas dos variables. Como ejemplo las poblaciones 87 y 98 presentan valores extremos para la variable canónica 1. Mientras que la variable canónica 2 muestra valores extremos en su distribución para las poblaciones 66, 82 y 87.

##### 5. Estructura de la diversidad morfológica ( $Q_{ST}$ )

Se observa una gran variabilidad para los valores de  $Q_{ST}$ , con un rango de 0,16 a 0,62 (Cuadro No.7). Las variables ancho de espiguilla, número de racimos, ancho de hoja, largo de espiguilla, fecha de floración 5, fecha de floración 10, largo del cuarto racimo y la DIFPROM que presentaron los menores valores de  $Q_{ST}$  observados dentro de una rango entre 0,16 y 0,25. Mientras que las variables largo del primer racimo, LR:NRC, LRC1:NRC, SIMETRIA y largo de raquis presentaron los mayores valores de  $Q_{ST}$  observados, con un rango 0,49 a 0,62. Para los caracteres de interés agronómico el  $Q_{ST}$  se encuentra entre 0,16 para el ancho de la espiguilla y 0,36 para el largo de hoja.

Para los caracteres medidos en órganos reproductivos y sus relaciones el rango de valores de  $Q_{ST}$  se encuentra entre 0,2 y 0,62. Las variables el número de racimos, largo del cuarto racimo y la DIFPROM presentaron el menor  $Q_{ST}$  dentro de las variables medidas en la panoja con un  $Q_{ST}$  entre 0,2 y 0,25. Mientras el largo del racimo 1, LR:NRC y LRC1:NRC representan las variables medidas y relaciones de la panoja que muestran un  $Q_{ST}$  más altos (entre 0,57 y 0,62).

## 6. Comparación entre $Q_{ST}$ y $F_{ST}$

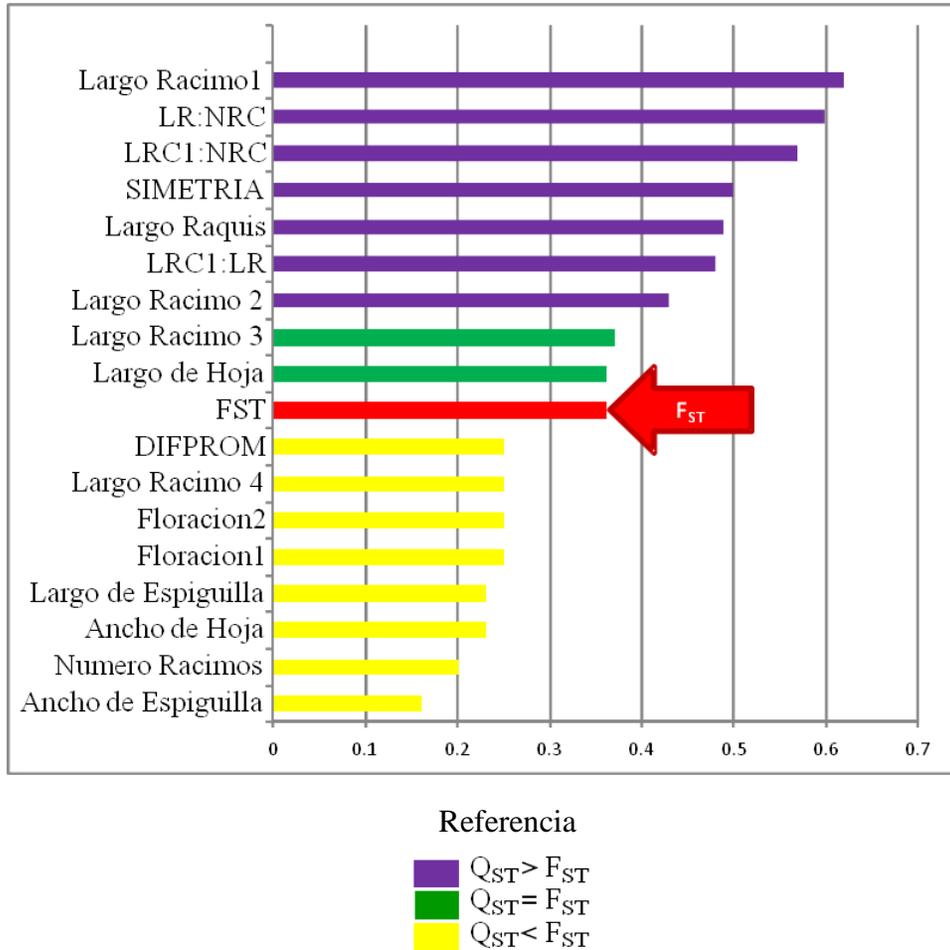


Gráfico No. 2. Comparación de valores de  $Q_{ST}$  para las variables analizadas clasificadas según su relación con el  $F_{ST}$

Dentro del grupo de variables analizadas 8 variables muestran signos de encontrarse bajo selección convergente ( $Q_{ST} < F_{ST}$ : ancho de hoja, largo de espiguilla, ancho de espiguilla, fecha de floración 5, fecha de floración 10, número de racimos, largo del cuarto racimo, DIFPROM). Mientras que 2 variables muestran una distribución de la varianza igual a los marcadores neutros y por tanto se pueden considerar neutrales ( $Q_{ST} = F_{ST}$ : Largo de hoja, largo del tercer racimo). Las 7 variables restantes muestran signos de encontrarse bajo los efectos de selección divergente ( $Q_{ST} > F_{ST}$ : Largo de raquis, largo del primer racimo, largo del segundo racimo, LR:NRC, LRC1:NRC, LRC1:LR, SIMETRIA).

## V. DISCUSIÓN

### A. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

La heterocigosis observada ( $H_O=0,00-0,05$ ) y esperada ( $H_e=0,27-0,59$ ) y riqueza alélica ( $A=2,0-3,8$ ) por locus concuerdan con lo encontrado en trabajos anteriores utilizando microsatélites para especies altamente autóгамas ( $H_O=0,0,-0,25$ ;  $H_e=0,0-6,46$ ) (Baek et al. 2003, Brondani et al. 2005, Le Corre 2005, Gutiérrez 2008, Siol et al. 2008, Matesanz et al. 2014). La distribución geográfica de los valores de heterocigosis esperada, alelos promedio por locus y los resultados de STRUCTURE sugiere un patrón en el cual a medida que se acercan al borde norte del rango geográfico las poblaciones presentan reducciones en  $A$  (2.0 Norte vs 3.8 Sur) y  $H_e$  (0.27 Norte vs 0.52 Sur). El análisis de STRUCTURE muestra a su vez que las poblaciones periféricas ubicadas al norte resultan menos diversas en su origen genético. Este patrón puede producirse como consecuencia de la expansión reciente en los bordes del área de distribución de una especie, o producto de procesos de extinción y recolonización (Eckert et al. 2008, Excoffier et al. 2009). La reciente colonización del ambiente por un grupo reducido de individuos ocasiona deriva genética causando una diferenciación de las poblaciones periféricas con respecto a las poblaciones originales a la vez que se produce una reducción en la diversidad genética. y un aumento de la probabilidad de fijación de alelos raros (Excoffier et al., 2009).

#### 1. Estructura de la variabilidad molecular ( $F_{ST}$ )

El valor de  $F_{ST}$  para las poblaciones analizadas fue de 0,36, el cual se encuentra dentro del rango de valores reportados con microsatélites para especies autóгамas (0,23–0,6) (Kuittinen et al. 1997, Baek 2003, Le Corre 2005, Wang et al. 2006, Gutiérrez 2008, Arraouadi et al. 2009). Este valor de  $F_{ST}$  indica un cierto grado de subdivisión poblacional y por lo tanto estructura en la distribución de la variabilidad genética entre las poblaciones. Cuando se trata de especies autóгамas esto se puede atribuir a que la autofecundación tiende a aumentar los niveles de diferenciación entre las poblaciones como resultado de la reducción en el  $N_e$  y aumento de la deriva génica (Duminil et al., 2009).

## B. VARIABILIDAD MORFOLÓGICA

### 1. Variabilidad entre líneas

#### a. Heredabilidades

*Paspalum dilatatum* spp. *flavescens* es altamente homocigota (Speranza, 2009) por lo tanto además del componente aditivo, la variabilidad genética observada incluirá también las interacciones entre loci, no así las interacciones de dominancia intralocus. Con nuestro diseño no es posible determinar la heredabilidad en sentido estricto de la característica, aunque por definición sabemos que esta será siempre menor a la heredabilidad en sentido amplio. Los efectos de la epistasis no pueden ser estimados en este caso por lo que su efecto sobre la heredabilidad es desconocido. Como la especie es un alopoliploide probablemente los efectos de epistasis pueden ser aún más importantes debido a interacciones inter genómicas (Abel et al., 2005).

La heredabilidad de las variables analizadas fue de media a alta y se encuentran dentro del rango de heredabilidades reportadas por Rodríguez (2010) para una colección de varios biotipos de la misma especie. Sin embargo, para el conjunto de caracteres en general Rodríguez (2010) capta un rango de heredabilidades mayor que el que nosotros encontramos. Esto posiblemente se deba a que Rodríguez (2010) utilizó en su análisis varias especies y clones muy diversos. En ese ensayo puede haberse captado una mayor variabilidad debido a que para algunas características, la variabilidad observada está explicada por diferencias entre especies y biotipos y no dentro de éstas. En particular en nuestro caso las heredabilidades más bajas se registraron en las variables, largo y ancho de espiguilla, mientras que Rodríguez (2010) encontró valores altos para la heredabilidad en sentido amplio para las dimensiones de la espiguilla.

### 2. Estadístico F

En el trabajo precedente, Rodríguez (2010) clasificó las variables según su nivel de significancia lo que se relaciona con el cociente F. Las variables que presentan un F mayor tienen una varianza dentro de línea menor que entre líneas, por lo tanto la F de la variable para identificar diferencias entre grupos es mayor. El F observado para las diferentes variables presenta un rango amplio de valores presentando variaciones de hasta cuatro órdenes de magnitud (2,38-9,51).

#### a. Análisis y propuesta de descriptores

##### Fecha de floración

Las variables floración 10 (FLOR10, días a la emergencia de 10 panojas) y floración 5 (FLOR5, días a la emergencia de la 5 panoja) difieren en la cantidad de panojas que es necesario contar para determinar la fecha de floración. Estas dos variables se encuentran altamente correlacionadas (0,9) y sus  $H^2$  son levemente diferentes (0,65-0,6 respectivamente). Sin embargo la variable FLOR5 posee un F mayor que la variable FLOR10. Considerando que se necesita una menor cantidad de tiempo para determinar la fecha de floración a partir de la variable FLOR5, registrar sólo esta variable resulta mucho más eficiente y ventajoso. A pesar de esto la capacidad para la identificación de líneas de las fechas de floración es relativamente baja. Ya que se trata de una característica agrónomicamente relevante y es deseable contar con una caracterización adecuada de los materiales para fecha de floración sería necesario estudiar más en detalle la dinámica de la emergencia de las panojas en este tipo de especies.

##### Largo y ancho de hoja

Los caracteres largo de hoja (LH) y ancho de hoja (AH) no se encuentran correlacionados a ninguna de las otras variables y presentan una baja correlación entre sí. También muestran una alta heredabilidad y de las mejores precisiones en la discriminación entre líneas. Ambas características presentan variabilidad en la colección, y dentro de ésta es posible seleccionar entre líneas para ambas características ya que una alta proporción de esta variación se explica por efectos genéticos. Cumplen entonces con el requisito de poseer capacidad para diferenciar y ser heredables, por lo que consideramos que pueden ser utilizados como buenos descriptores dentro de esta especie. Existe también la posibilidad de realizar selección sobre estas características, tomando individuos promisorios para ser evaluados en el futuro

##### Largo y ancho de espiguilla

Las variables largo de espiguilla (LE) y ancho de espiguilla (AE) no presentan correlación con el resto de las variables ni entre sí. Los valores de heredabilidad y F en la discriminación para LE y AE fueron los más bajos estimados en este experimento. Basados en estos datos no es recomendable la utilización de estas variables en la identificación de líneas y consiguiente evaluación de germoplasma dentro de la especie en particular. Señalando que dentro de la especie se sugiere que no existe un nivel importante de variabilidad para el tamaño de semillas. Sin embargo dada la importancia de la característica por su relación con la instalación del cultivo, se sugiere ampliar la

exploración de germoplasma específicamente dirigida a las dimensiones de la espiguilla e identificar líneas con comportamientos extremos.

#### Medidas y relaciones en la panoja

La utilidad como descriptores de las variables medidas sobre la panoja y sus relaciones depende de seleccionar aquellas variables con el mejor compromiso entre heredabilidad, F y correlación. Las variables forman una estructura compleja de correlaciones (entre 0,89 y 0,4).

El largo de raquis (LR) se encuentra fuertemente correlacionado con las características medidas en la panoja y los cocientes entre los mismos (entre 0,89 y 0,62). Para el LR el 64% de la variación observada se encuentra explicada por efectos genéticos y la capacidad de discriminar entre líneas (5,54) es media-baja en comparación al resto de las variables. El LR no se destaca como una variable para ser utilizada en la caracterización de germoplasma de manera directa. Si bien es utilizada para determinar la variable LR:NRC, con la cual presenta valores de correlación altos (0,70). LR:NRC muestran una heredabilidad superior a LR y NRC (0,78 vs 0,64 y 0,64), mientras sucede lo mismo con el F (8,04 vs 5,63 y 5,83). Esta variable mejora la capacidad informativa de las variables utilizadas en su cálculo y mostrar una dimensión distinta de la diversidad.

La variable número de racimos (NRC) se encuentra correlacionada con las variables, LRC1:NRC y LRC1:LR (-0,71 y -0,62 respectivamente). Su heredabilidad (0,64) y F (4,26) cuales se presentan como intermedias en el rango de valores encontrado. La LRC1:NRC presenta heredabilidad y F mayores a NRC (0,78 y 5,64), corrigiendo los valores de NRC o mostrando otra dimensión en la variabilidad de la especie. El NRC puede ser utilizado directamente o como apoyo y en conjunto utilizado con la variable LRC1:NRC.

El largo de primer racimo (LRC1) presenta una alta correlación con el largo del racimo 2 (LRC2; 0,8), largo de racimo 3 (LRC3; 0,71), largo de racimo 4 (LRC4; 0,63), y los cocientes entre éstos y otras medidas de la panoja (LR:NRC; 0,77, LRC1:NRC; 0,8, SIMETRIA; 0,72). La variabilidad observada en la variable LRC1 se explica en un 76% por efectos genéticos. El F (5,83) de la variable se puede clasificar como media con respecto al resto de las variables analizadas. Ésta a su vez presenta la heredabilidad y F más altos dentro de las variables “largo de racimos” (LRC2; LRC3; LRC4;). Considerando esto, si medimos un solo racimo se obtiene información útil y se reduce el trabajo de medida. Por tanto el LRC1 será el único largo de racimo propuesto para ser medido en la panoja.

La variable DIFPROM no muestra una correlación alta con ninguna de las variables analizadas, excepto con la variable SIMETRIA (-0,67). Sin embargo presenta una su escasa capacidad de explicar diferencias genéticas (44%) y la baja F en la discriminación entre líneas (2,38). La utilización de esta variable implica además contar

con las medidas de las longitudes de cuatro racimos de cada panoja. En el conjunto esta variable no presenta una gran utilidad.

En base a lo discutido anteriormente para las variables medidas sobre la panoja y sus relaciones analizadas, se propone reducir el número de medidas a realizar sobre la panoja a 3 medidas y sus cocientes. Las variables LR, NRC, LRC1 y los cocientes entre las mismas LR:NRC y LRC1:NRC. Este grupo de variables y cocientes presenta el mejor compromiso entre heredabilidad F y correlación dentro de las variables medidas en la panoja presentando el mejor compromiso informativo.

### 3. Variabilidad entre poblaciones

#### a. Análisis discriminante

Las variables seleccionadas para integrar el modelo multivariado que mejor diferencia entre las poblaciones, incorpora en primer término los caracteres con mayor heredabilidad y F en la discriminación (LR:NRC, LRC1:NRC, LH, AH, LRC2, LRC1). Las variables canónicas 1 y 2 se conforman a partir de los caracteres que más información aportan en el modelo STEPWISE (LR:NRC, LRAC1:NRC, LH, AH, LRC2, LRC1). Los modelos también utilizan caracteres con menor heredabilidad y F ya que la capacidad informativa se ve aumentada por su baja correlación con las demás variables (SIMETRIA, AE). A pesar de esto la proporción de la variabilidad captada es baja en comparación a la variabilidad captada con la utilización de los caracteres con mejor heredabilidad y F.

Las primeras cuatro variables incorporadas en el modelo son LR:NRC, LRC1:NRC, LH y AH. Estas variables son las que poseen mayor capacidad de clasificación a nivel de líneas. Las variables que menos aportan a la diferenciación entre las poblaciones son por ejemplo FLOR10, LE y SIMETRIA. Estos resultados muestran que con unas pocas variables es posible diferenciar accesiones por lo que en trabajos de caracterización futuros eligiendo unos pocos descriptores a medir se puede lograr un buen nivel de F en la identificación poblaciones con características diferentes. Se propone utilizar LH, AH, NRAC, LR, LRC1 y LR:NRC y LRC1:NRC que se calculan a partir de las primeras.

Las poblaciones difieren en la composición en cuanto a frecuencia, número y parentesco entre líneas dentro de una población. Entonces las variables que mejor discriminen las líneas que integran una población mejor discriminarán entre las poblaciones. Poblaciones con una mayor covarianza interna serán diferenciadas de las poblaciones con una menor covarianza o lo que es lo mismo formadas por líneas muy diferentes. Poblaciones con una covarianza interna menor serán más difíciles de diferenciar entre sí. Esto sucede como consecuencia de que su varianza entre poblaciones será menor a su varianza dentro de poblaciones. Con las variables agregadas se pueden observar varios aspectos de la planta en general y cuáles son las diferencias en

conformación para las mismas. Por ejemplo se puede ver plantas con distinto largo de hoja y distinta forma en la panoja. Además de caracterizar las poblaciones y sus líneas constituyentes, es importante conocer cómo se distribuye la varianza genética entre y dentro de las poblaciones bajo estudio para poder comprender los patrones de diferenciación observados entre las poblaciones, esto se hizo en este trabajo a través del estimador  $Q_{ST}$ .

b. Estructura poblacional de las variables morfológicas ( $Q_{ST}$ )

El rango de valores de  $Q_{ST}$  para las variables analizadas es amplio (0,16–0,62) y se encuentra dentro del rango de valores encontrado en diversas especies de plantas (0,01–0,94), incluyendo los valores reportados para diferentes características en especies autóгамas (0,045 a 0,89) (Bonnin et al. 1996, Kuittinen et al. 1997, Gutiérrez 2008, Arrauadi et al. 2009). Los valores de  $Q_{ST}$  presentan una gran variación en el comportamiento de las distintas variables coincidiendo otros estudios anteriores (Spitze 1993, Podolsky y Holtsford 1995, Steinger et al. 2002, Palo et al. 2003). Es necesario analizar las implicancias de los resultados para cada tipo de carácter estudiado y su relación con la utilización del germoplasma y la dinámica poblacional de la especie.

c. Comparación entre estructura poblacional para caracteres morfológicos vs moleculares ( $Q_{ST}$ -  $F_{ST}$ )

Los caracteres cuantitativos medidos pueden ser clasificados como caracteres morfológicos o como caracteres de historia de vida, ambos tipos de carácter pueden diferir en la respuesta a la selección natural (Merilä y Sheldon, 1999). Generalmente los caracteres asociados a la reproducción y fisiología (historia de vida) se encuentran bajo presión de selección estabilizadora o una selección débil mostrando valores de  $Q_{ST} = F_{ST}$  (De Kort et al., 2012). Por otro lado, los caracteres fenológicos o asociados a la producción de biomasa tienden a presentar valores de  $Q_{ST} > F_{ST}$  (De Kort et al., 2012). La diferencia fundamental en este comportamiento depende de la cantidad de genes involucrados, la complejidad de la herencia y la epistasis (De Kort et al., 2012). Otro factor que podría afectar la estructura de la diversidad morfológica es el ciclo de vida; en especies perennes es posible encontrar una mayor estructuración en caracteres morfológicos y fenológicos, que lo que es común encontrar en especies anuales (De Kort et al., 2012). Sin embargo, en un meta-análisis incluyendo todos los estudios al momento de la publicación (plantas, animales vertebrados e invertebrados) no se encontraron diferencias entre el comportamiento de caracteres morfológicos y caracteres de historia de vida (Leinonen et al., 2008). En particular, Munguía-Rosas (2011) encuentra que la fecha de floración podría estar fuertemente afectada por la selección en algunos tipos de plantas, y la intensidad de la presión de selección estaría afectada por factores ambientales en particular la latitud.

Las variables LR, LRC1, FLOR10 y FLOR5, LE, AE, LRC2, LRC3, LRC4 se pueden sugerir como caracteres que afectan la historia de vida de la especie. Estas

características son medidas sobre los órganos reproductivos y pueden tener una relación directa el éxito reproductivo de la especie. Las variables FLOR10 y FLOR5, LE, AE, LRC3 y LRC4 presentan valores de  $Q_{ST} \leq F_{ST}$  lo que coincide con lo sugerido en la literatura para características asociadas a la historia de vida (De Kort et al., 2012). En el caso de la fecha de floración, el rango de variación encontrado (15 días entre extremos) es bajo. Esta falta de diferenciación entre las poblaciones podría ser el producto de la selección convergente, dado que no existe una gran diferenciación ambiental ni variación latitudinal en la reducida distribución geográfica de la especie en el sur de Uruguay. Para las variables LE y AE, el resultado observado puede deberse a la poca variabilidad para la característica evidenciada por una baja  $H^2$  y un bajo F.

Las dimensiones de la panoja, por otra parte (LR, LRC1, LRC2) presentan valores de  $Q_{ST} > F_{ST}$  a pesar de que se trata de características relacionadas con la historia de vida ya que afectan el número de propágulos producidos por la planta. Trabajos anteriores han reportado casos similares para caracteres asociados al éxito reproductivo con  $Q_{ST} > F_{ST}$  (Chun et al., 2011). Esta discrepancia probablemente se deba a que la respuesta de cada carácter a la selección depende de la especie, la historia de vida propia de la especie, número de genes, estructura y complejidad génica que determinan la característica (Merilä y Sheldon 1999, Leinonen et al. 2008, De Kort et al. 2012).

El carácter largo de hoja (LH) presenta un valor de  $Q_{ST} = F_{ST}$  aunque se trata de una característica de tipo morfológico por lo que podría esperarse un grado mayor de diferenciación (De Kort et al., 2012). Esta característica tiene alta heredabilidad y diferencias altamente significativas entre las líneas, indicando que la característica presenta variabilidad genética. A pesar de ello no se observa evidencia de selección natural en las condiciones donde se desarrolla la planta, para el carácter LH. El ancho de hoja presenta sin embargo valores de  $Q_{ST} < F_{ST}$  lo que sugiere la posible selección a favor de un mismo fenotipo para ancho de hoja en la meta población.

Una posible explicación para estos resultados es que el ancho de lamina afecta la proporción de lamina respecto al nervio medio, la cual no es afectada por el largo de hoja debido a que una unidad más de largo implica una unidad más de nervio medio. Esta relación podría afectar la eficiencia en el uso del agua o la eficiencia fotosintética de la planta. Considerando que estamos tratando con una especie estival, bajo los mismos supuestos climáticos considerados para la fecha de floración y considerando que se trata de un carácter morfológico. La fecha de floración podría estar bajo selección convergente en la región de estudio, mientras el largo de hoja se mantiene neutral.

Los valores de  $Q_{ST}$  pueden presentar sesgos debido a diversos factores tales como incorrecta toma de datos, efectos maternos, número de poblaciones y efectos aditivos (O'Hara y Merilä 2005, Goudet y Büchi 2006, López-Fanjul 2007, Pujol et al. 2008). Los efectos de dominancia y epistasis pueden sesgar los valores de  $Q_{ST}$  aumentando o reduciendo su valor según las frecuencias y relación entre los alelos

(Goudet y Büchi 2006, López-Fanjul et al. 2007, Pujol et al. 2008). En nuestro caso la especie es autógama y el efecto de la dominancia es despreciable debido a la condición de homocigosis predominante (Goudet y Büchi, 2006). La epistasis puede afectar nuestras estimaciones de  $Q_{ST}$ , ya que en completa homocigosis aún pueden ocurrir interacciones epistáticas entre loci. Se sugiere que el efecto de la epistasis afecta el valor del  $Q_{ST}$  es reduciendo su magnitud (Whitlock, 1999). En cuanto a la precisión de nuestras mediciones para detectar diferencias morfológicas entre poblaciones no se espera que hayan afectado en gran medida las estimaciones dado que estos datos se obtuvieron en un ensayo de campo diseñado para tal fin, con un adecuado número de repeticiones y submuestreo acorde a la búsqueda y los resultados muestran un nivel de adecuado. Los efectos maternos son propuestos por (Chun et al., 2011) como posible factor en el desvío de las estimaciones en los valores de  $Q_{ST}$ . En nuestro caso los efectos maternos fueron controlados al cultivar en conjunto las plantas cabeza de línea por una generación en invernáculo. El número de poblaciones utilizadas en la estimación del  $Q_{ST}$  puede afectar la precisión del mismo, en nuestro caso se utilizaron 12 poblaciones que es el mínimo recomendado para lograr una estimación confiable (Goudet y Büchi, 2006). De todas estas posibles fuentes de error probablemente la epistasis haya tenido la mayor incidencia, debido a que no es posible controlar sus efectos con nuestro diseño experimental y no se conoce el modo de herencia de estas características.

Los resultados para la relación  $Q_{ST} - F_{ST}$  son heterogéneos sugiriendo que las estrategias para la exploración del germoplasma deben adaptarse a los resultados. Para caracteres posiblemente neutrales la variación observada en una determinada zona geográfica no responde a la selección, sino que se debe al equilibrio entre migración, mutación y deriva. Es de esperar que exista una mayor probabilidad de fijación de alelos raros en los bordes del área de distribución de la especie como consecuencia del efecto de la deriva (Excoffier y Ray, 2008). Mientras que las variables que muestran valores de  $Q_{ST} > F_{ST}$  podrían encontrarse bajo los efectos de la selección divergente (Merilä y Crnokrak 2001, McKay y Latta 2002, Palo et al. 2003). Aquellos caracteres que muestran valores de  $Q_{ST} < F_{ST}$  podrían encontrarse bajo selección convergente o estabilizadora (Edmands y Harrison, 2003). Estos caracteres entonces las poblaciones mostrarán poco diferenciadas entre sí. Para la exploración del germoplasma se deben de tomar en cuenta ambos aspectos de la diversidad (morfológica y molecular) de manera que ambos estén representados en la colección (McKay y Latta, 2002). En el conjunto de caracteres analizados se encontraron todas las situaciones posibles al mismo tiempo en la colección. Entonces se deberá combinar la información considerando prioridades y los objetivos del programa.

## VI. CONCLUSIONES

La variación no se encuentra repartida en el área de distribución al azar, se distribuye siguiendo un patrón en el que la diversidad genética sufre una reducción al acercarse al borde Norte del área de distribución. Este patrón puede deberse tanto a una expansión reciente de la población y a los efectos de un proceso repetido de extinción y recolonización.

La metapoblación presenta variabilidad para las características morfológicas analizadas y la variación entre las poblaciones muestra una distribución similar a la encontrada para caracteres moleculares. Fue posible determinar un grupo de caracteres que permiten diferenciar las líneas, así como también entre las poblaciones. Se sugiere un conjunto de variables para ser utilizadas como descriptores que consideran desde más de un punto de vista la estructura de la planta. La variación registrada entre las líneas permite suponer que es posible realizar selección dentro de la variación existente en la colección.

La mayoría de las variables presenta una estructura que sugiere el efecto de la selección divergente. Sin embargo, la comparación entre la distribución de la variabilidad para caracteres morfológicos y moleculares sugiere que en este caso algunas variables podrían interactuar con la selección natural de formas en diferentes a lo que se ha reportado en la literatura.

## VII. RESUMEN

Dentro de las gramíneas estivales nativas se ha trabajado ampliamente con los biotipos apomícticos del grupo Dilatata del género *Paspalum*. La apomixis limita la capacidad de mejoramiento de estos biotipos y generalmente se asocia a una baja producción de semillas y susceptibilidad a *Claviceps*. *Paspalum dilatatum* ssp. *flavescens* es un biotipo tetraploide, sexual y autógeno, que presenta buena producción de semilla y resistencia a *Claviceps*. A pesar de esto su variabilidad genética, estructuración geográfica y potencial agronómico no han sido estudiados en profundidad. En esta se caracterizó la variabilidad genética y morfológica de una colección de este biotipo representativa de su área de distribución en Uruguay. Específicamente se analizó la distribución de la variabilidad molecular a través de la riqueza alélica (A) y la heterocigosis esperada ( $H_e$ ). Se estimó la proporción de la variabilidad total debida a varianza entre poblaciones para caracteres cuantitativos ( $Q_{ST}$ ) y marcadores moleculares neutros ( $F_{ST}$ ). Se estimó la heredabilidad en sentido amplio ( $H^2$ ) y F de las variables morfológicas. Se tomaron 12 poblaciones y 8 a 12 líneas puras por población. Estas líneas se caracterizaron para 6 loci de microsatélites y 17 caracteres morfológicos en un diseño de bloques generalizados desbalanceados en dos localidades. Se obtuvo valores de  $H^2$  para las variables morfológicas entre 0,40 y 0,78. Se encontraron diferencias entre las poblaciones y entre líneas. Se obtuvo un  $F_{ST}$  de 0,37 y los valores de  $Q_{ST}$  para diferentes características variaron entre 0,2 y 0,62. La variación molecular se distribuye siguiendo un patrón en el que la diversidad genética sufre una reducción al acercarse al borde norte del área de distribución. Este patrón puede deberse tanto a una expansión reciente de la población y a los efectos de un proceso repetido de extinción y recolonización. La variación morfológica entre las poblaciones muestra una distribución similar a la encontrada para caracteres moleculares. Se sugiere un conjunto de variables para ser utilizadas como descriptores para la especie que representan los diferentes órganos de la planta. La el nivel de variación registrada entre las líneas permite suponer que es posible realizar selección dentro de esta colección. La comparación entre los valores de  $Q_{ST}$  y  $F_{ST}$  sugiere que la mayoría de las variables presenta una estructura que podría explicarse por el efecto de la selección divergente. Sin embargo, algunas variables podrían estar interactuando con la selección natural de formas diferentes a lo que se ha reportado en la literatura.

Palabras clave: *Paspalum*; Diversidad; Caracterización; Germoplasma.

## VIII. SUMMARY

Among native war-season grasses, the apomictic biotypes of the Dilatata group of *Paspalum* have been intensively studied. Apomixis limits the possibilities to breed these biotypes and it is generally associated to low seed production and susceptibility to *Claviceps*. The selfing tetraploid sexual biotypes, *P. dilatatum* ssp. *flavescens*, shows good seed production and is less susceptible to *Claviceps*. In spite of this, its genetic variability, geographic structure and agronomic potential have not been sufficiently studied. In this work we analyzed the morphological and genetic variability of a collection of this biotype representing its distribution area in Uruguay. Specifically we analyzed the distribution of molecular genetic variability by means of allele richness (A), and expected heterozygosity ( $H_e$ ). We estimated the proportion of the genetic variability due to the variance among populations ( $Q_{ST}$ ) and neutral molecular markers ( $F_{ST}$ ). We also estimated the broad sense heritability ( $H^2$ ) and precision for the discrimination among lines for morphological variables. We analyzed 12 populations and eight to twelve lines per population. These lines were characterized for six microsatellite loci and seventeen morphological characters in an unbalanced generalized block design in two locations. Values between 0.40 and 0.78 were obtained for  $H^2$  and differences were found among lines and populations. The  $F_{ST}$  value was 0.37 and  $Q_{ST}$  values for the different variables ranged between 0.20 and 0.62. Molecular variability followed a pattern in which diversity decreases as populations reach the northern limit of the distribution. This pattern suggests either a recent expansion of the population or repeated extinction-colonization cycles. Morphological variability among populations shows a similar distribution. A set of variables that can potentially be used as descriptors for the species is suggested which takes into account different organs of the plant. The amount of variability observed among lines suggests that selection can be practiced on this collection. The comparison between the observed values of  $Q_{ST}$  and  $F_{ST}$  suggests that most of the variables shows a structure that may be explained by the effect of diverging selection; however, some of these variables may be interacting with selection in ways different from those previously reported in the literature.

Keywords: *Paspalum*; Diversity; Characterization; Germplasm.

## IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Abadie, T.; Berretta, A. 2001. Caracterización y evaluación de recursos fitogenéticos. In: Berretta, A.; Rivas, M. eds. Estrategia en recursos fitogenéticos para los países del Cono Sur. Montevideo, PROCISUR-ICCA. pp. 89-97 (Documentos).
2. Abel, S.; Möllers, C.; Becker, H. C. 2005. Development of synthetic *Brassica napus* lines for the analysis of “fixed heterosis” in allopolyploid plants. *Euphytica*. 146(1-2): 157–163.
3. Abràmoff, M. D.; Magalhães, P. J.; Ram, S. J. 2004. Image processing with ImageJ. *Biophotonics International*. 11(7): 36–42
4. Adkins, S.; Bellairs, S.; Loch, D. 2002. Seed dormancy mechanisms in warm season grass species. *Euphytica*. 126: 13–20.
5. Akashi, R.; Adachi, T. 1992. Somatic embryogenes and plant generation from cultured immature inflorescences of apomictic dallisgrass (*Paspalum dilatatum* Poir.). *Plant Science*. 82: 213–218.
6. Alonso, S.; Monterubbianesi, M. 2006. Phenotypic variability in leaf length, width and area and their relationships in clones of two subspecies of *Paspalum dilatatum* during summer and autumn. *New Zealand Journal of Agricultural Research*. 49: 25–33.
7. \_\_\_\_\_.; \_\_\_\_\_. 2003. Efecto de la subespecie y la estación de crecimiento sobre el crecimiento foliar de *Paspalum dilatatum*. Poir. (en línea). Balcarce, Unidad Integrada (Universidad de Mar del Plata, Facultad de Ciencias Agrarias/INTA, Balcarce). pp 141–142. Consultado 14 dic. 2014. Disponible en <http://repiica.iica.int/docs/B0515E/B0515E.PDF>
8. Arraouadi, S.; Badri, M.; Jaleel, C. A.; Djébali, N.; Ilahi, H.; Huguet, T.; Aouani, M. E. 2009. Analysis of genetic variation in natural populations of *Medicago truncatula* of southern Tunisian ecological areas, using morphological traits and SSR markers. *Tropical Plant Biology*. 2(3-4): 122–132.
9. Baek, H. J.; Beharav, A.; Nevo, E. 2003. Ecological-genomic diversity of microsatellites in wild barley, *Hordeum spontaneum*, populations in Jordan. *Theoretical and Applied Genetics*. 106(3): 397–410.

10. Barcaccia, G.; Albertini, E. 2013. Apomixis in plant reproduction; a novel perspective on an old dilemma. *Plant Reproduction*. 26(3): 159–79.
11. Baréa, K.; Scheffer-Basso, S. 2007. Management of *Paspalum dilatatum* Poir. biotype Virasoro. 1. Production, chemical composition and persistence. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 36(4): 992–999.
12. Bashaw, E. C.; Hoff, B. 1962. Effects of irradiation on apomictic common dallisgrass. *Crop Science*. 2: 501–504.
13. \_\_\_\_\_; Hanna, W. 1990. Apomixis in grasses. In: Geoffrey, P. ed. *Reproductive versatility in the grasses*. Cambridge, Cambridge University Press. pp. 100-130.
14. Bennett, H.; Bashaw, E. C. 1966. Interspecific hybridization with *Paspalum* spp. *Crop Science*. 6(1): 52–54.
15. Beretta, E. J. 1991. Producción de pasturas naturales en el basalto. A- Producción mensual y estacional del forraje de cuatro comunidades nativas sobre suelos de basalto. In: Carámbula, M.; Vaz Martins, D.; Indarte, E. eds. *Pasturas y producción animal en áreas de ganadería extensiva*. Montevideo, Uruguay, INIA. pp. 12-18 (Serie Técnica no.13).
16. Biodiversity International. 2007. Guidelines for the development of crop descriptor lists. *Biodiversity Technical Bulletin*. Series 13: 72.
17. Bonnin, I.; Prospero, J.; Olivieri, I. 1996. Genetic markers and quantitative genetic variation in *Medicago truncatula* (*Leguminosae*); a comparative analysis of population structure. *Genetics*. 143: 1795–1805.
18. Boutin-Garnache, I.; Raposo, M.; Raymond, R.; Deschepper, C. 2001. M13-Tailed primers improve the readability and usability of microsatellite analyses performed with two different allele-sizing methods. *Biotechniques*. 31: 24–26.
19. Brondani, R. P. V.; Zucchi, M. I.; Brondani, C.; Nakano Rangel, P. H.; De Oliveira Borba, T. C.; Rangel, P. N.; Magalhães, M. R.; Vencovsky, R. 2005. Genetic structure of wild rice *Oryza glumaepatula* populations in three Brazilian biomes using microsatellite markers. *Genetica*. 125(2-3): 115–123.

20. Burson, B.; Lee, H.; Bennett, H. 1973. Genome relations between tetraploid *Paspalum dilatatum* and four diploid *Paspalum* species. *Crop Science*. 13(6): 739–743.
21. \_\_\_\_\_.; Correa, J.; Potts, H. C. 1978. Anatomical study of seed shattering in bahiagrass and dallisgrass. *Crop Science*. 18: 122–125.
22. \_\_\_\_\_.; Quarín, C.1982. Cytology of *Paspalum virgatum* and its relationship with *P. intermedium* and *P. jurgensii*. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*. 24: 219–226.
23. \_\_\_\_\_.1991. Genome relationships between tetraploid and hexaploid biotypes of dallisgrass, *Paspalum dilatatum*. *Botanical Gazette*. 152(2): 219–223.
24. \_\_\_\_\_. 1992. Cytology and reproductive behavior of hybrids between *Paspalum urvillei* and two hexaploid *P. dilatatum* biotypes. *Botanical Gazette*. 35: 1002–1006.
25. \_\_\_\_\_.; Tischler, C. 1993. Regeneration and somaclonal variation in apomictic *Paspalum dilatatum* Poir. *Euphytica*. 67: 71–78.
26. Burton, G. W.; Jackson, J. E. 1962. Radiation breeding of apomictic prostrate dallisgrass, *Paspalum dilatatum* var.*pauciciliatum*. *Crop Science*. 2: 495-497.
27. \_\_\_\_\_.; Hanna, W. 1992. Using apomictic tetraploids to make a self-incompatible diploid Pensacola bahiagrass clone set seed. *Journal of Heredity*. 83(4): 305-306.
28. CABI (Commonwealth Agricultural Bureau International, GB). 2014. Invasive species compendium *Paspalum urvillei*. (en línea). Boston, MA. s.p. Consultado 12 nov. 2014. Disponible en <http://www.cabi.org/isc/datasheet/109621>
29. Camadro, E. L. 2012. Relevance of the genetic structure of natural populations, and sampling and classification approaches for conservation and use of wild crop relatives; potato as an example. *Botany*. 90(11): 1065–1072.
30. Campbell, B. D.; Mitchell, N. D.; Field, T. R. O. 1999. Climate profiles of temperate C<sub>3</sub> and subtropical C<sub>4</sub> species in New Zealand pastures. *New Zealand Journal of Agricultural*. 42(3): 37–41.

31. Caponio, I.; Quarín, C. 1987. El sistema genético de *Paspalum simplex* y de un híbrido interespecífico con *P. dilatatum*. *Kurtziana*, 19: 35-45.
32. \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_. 1990. Intra- and interspecific hybridization between dallisgrass and vaseygrass. *Crop Science*. 30(2): 362–364.
33. Carámbula, M. 1991. Aspectos relevantes para la producción forrajera. Montevideo, INIA. 46 p. (Serie Técnica no.19).
34. \_\_\_\_\_. 2002. Pasturas y forrajes, potenciales y alternativas para producir forraje. Montevideo, Hemisferio. Sur. t.1, 357 p.
35. Carman, J. 1997. Asynchronous expression of duplicate genes in angiosperms may cause apomixis, bispory, tetraspory, and polyembryony. *Biological Journal of the Linnean Society*. 61(1): 51–94.
36. Carrillo, A. Q. 2010. Apomixis y su importancia en la selección y mejoramiento de gramíneas forrajeras tropicales; revisión. *Técnica Pecuaria en México*. 48(1): 25–42.
37. Chun, Y.; Corre, V. L.; Bretagnolle, F. 2011. Adaptive divergence for a fitness-related trait among invasive *Ambrosia artemisiifolia* populations in France. *Molecular Ecology*. 20: 1378–1388.
38. Collins, G.; Symons, R. 1992. Extraction of nuclear DNA from grape vine leaves by a modified procedure. *Plant Molecular Biology*. 10: 233–235.
39. Crnokrak, P.; Merilä, J. 2002. Genetic population divergence, markers and traits. *Trends in Ecology and Evolution*. 17(11): 501–502.
40. Cuña, M.; Muguruza, M.; Rocha, F. 2012. Determinación del desarrollo fenológico de la panoja, curva de caída y calidad de semilla en *Paspalum dilatatum* cv. Chirú y *Paspalum dilatatum* ssp. (en línea). Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 91 p. Consultado 06 oct. 2014. Disponible en <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=tesis.xis:method=post;formato=2;cantidad=1;epresion=mfn=003929>
41. Da Costa, I.; Scheffer-Basso, S. M. 2003a A caracterização morfofisiológica e agrônômica de *Paspalum dilatatum* Poir . biótipo virasoro e *Festuca arundinacea* Scherb. 1. desenvolvimineto morfológico. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 32(5): 1054–1060.

42. \_\_\_\_\_.; \_\_\_\_\_.; 2003b. A caracterização morfofisiológica e agrônômica de *Paspalum dilatatum* Poir. biótipo virasoro e *Festuca arundinacea* Schreb. 2. disponibilidade de forragem e. Revista Brasileira de Zootecnia. 32(5): 1061–1067.
43. Dall’Agnol, M.; Gomes, K. 1987. Avaliação inicial da produção de matéria seca de espécies do gênero *Paspalum*. In: Encontro Internacional sobre Melhoramento Genético de *Paspalum* (1987, Nova Odessa). Anais. Nova Odessa, São Paulo. BR, Instituto de Zootecnia. cap. 1, pp. 15–21.
44. Davies, L.; Cohen, D. 1992. Phenotypic variation in somaclones of *Paspalum dilatatum* and their seedling offspring. Canadian Journal of Plant Science. 72(3): 773–784.
45. De Kort, H.; Vandepitte, K.; Honnay, O. 2012. A meta-analysis of the effects of plant traits and geographical scale on the magnitude of adaptive differentiation as measured by the difference between  $Q_{ST}$  and  $F_{ST}$ . Evolutionary Ecology. 27(6): 1081–1097.
46. De Patta Pillar, V.; Muller, C.; De Souza, S.; Ávila Jacques, A. V. 2009. Campos Sulinos-conservação e uso sustentável da biodiversidade. (em línea). Brasília, DF, Ministerio Medio Ambiente. 403 p. Consultado 2 abr. 2014. Disponible en <http://ecoqua.ecologia.ufrgs.br/arquivos/Livros/CamposSulinos.pdf>
47. Díaz, S.; Cabido, M. 2001. Vive la difference; plant functional diversity matters to ecosystem processes. Trends in Ecology and Evolution. 16(11): 646–655.
48. Doyle, J. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin. 19: 11–15.
49. Duminil, J.; Hardy, O. J.; Petit, R. J. 2009. Plant traits correlated with generation time directly affect inbreeding depression and mating system and indirectly genetic structure. BMC Evolutionary Biology. 9: 177.
50. Eckert, C. G.; Samis, K. E.; Loughheed, S. C. 2008. Genetic variation across species’ geographical ranges; the central-marginal hypothesis and beyond. Molecular Ecology. 17(5): 1170–1188.
51. Edmands, S.; Harrison, J. S. J. 2003. Molecular and quantitative trait variation within and among populations of the intertidal copepod *Tigriopus Californicus*. Evolution. 57(10): 2277–2285.

52. Evanno, G.; Regnaut, S.; Goudet, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE; a simulation study. *Molecular Ecology*. 14(8): 2611–2620.
53. Excoffier, L.; Smouse, P. E.; Quattro, J. M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes; application. *Genetics*. 131: 479–491.
54. \_\_\_\_\_; Ray, N. 2008. Surfing during population expansions promotes genetic revolutions and structuration. *Trends in Ecology and Evolution*. 23(7): 347–351.
55. \_\_\_\_\_; Foll, M.; Petit, R. J. 2009. Genetic consequences of range expansions. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 40(1): 481–501.
56. Franco, T. L.; Hidalgo, R. 2003. Análisis estadístico de datos de caracterización morfológica de recursos fitogenéticos. Cali, Colombia, IPGRI. 89 p. (Boletín técnico no. 8).
57. García, J. 1995. Gramilla y praderas. Montevideo, INIA. 15 p. (Serie Técnica no. 67).
58. García, M.; Arturi, M. J. A. 2001. Potencial de mejora en caracteres cuantitativos de *Paspalum dilatatum* Poir. en poblaciones del noreste bonaerense. *Revista de la Facultad de Agronomía (La Plata)*. 104(2): 105–111.
59. Gepts, P. 2004. Crop domestication as a long-term selection experiment. *Plant Breeding Reviews*. 24(1): 1–44.
60. Glison, N.; Viega, L.; Cornaglia, P.; Gutiérrez, L.; Speranza, P. 2015 Variability in germination behaviour of *Paspalum dilatatum* Poir. seeds is genotype dependent. (en línea). *Grass and Forage Science*. 70 (1): 144-153. Consultado 12 nov. 2014. Disponible en <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/gfs.12119/abstract>.
61. Goudet, J.; Büchi, L. 2006. The effects of dominance, regular inbreeding and sampling design on  $Q_{(ST)}$ , an estimator of population differentiation for quantitative traits. *Genetics*. 172(2): 1337–1347.
62. Gutiérrez, L. 2008. Genetic diversity in cultivated and wild *Hordeum* species. PhD. dissertation. Ames, Iowa. Iowa State University. 121 p.

63. Hamrick, J.; Godt, M. 1996. Effects of the life history traits on the genetic diversity in plant species. *Philosophical Transactions, Biological Sciences*. 351(1345): 1291–1298.
64. Harfouche, A.; Meilan, R.; Kirst, M.; Morgante, M.; Boerjan, W.; Sabatti, M.; Scarascia Mugnozza, G. 2012. Accelerating the domestication of forest trees in a changing world. *Trends in Plant Science*. 17(2): 64–72.
65. Harlan, J.R. 1992. *Crops and man*. 2<sup>nd</sup>. ed. Madison, WI, American Society of Agronomy. 284 p.
66. Henry, R. J. 2014. Genomics strategies for germplasm characterization and the development of climate resilient crops. *Frontiers in Plant Science*. 5: 68.
67. Hickenbick, M.; Flores, A. 1992. Mode of reproduction and seed production in *Paspalum dilatatum* Poir. Virasoro biotype–Dilatata Group (*Gramineae*). *Revista Brasileira de Genetica*. 15(1): 85–102.
68. Hintum Van, T. 1995. Hierarchical approaches to the analysis of genetic diversity in crop plants. In: Hodgkin, T.; Brown, A.; Van Hintum, T.; Morales, E. eds. *Core collections of plant genetic resources*. New York, John Wiley and Sons. pp. 23–34.
69. Höglund, J. 2009. *Evolutionary conservation genetics*. Oxford, Oxford University Press. 189 p.
70. Holland, J. B.; Nyquist, W. E.; Cervantes-Martínez, C. T. 1999. Estimating and interpreting heritability for plant breeding; an update. In: Janick, J. ed. *Plant breeding reviews*. Hoboken, New Jersey, Wiley and Sons. pp. 9-112 (Plant Breeding Reviews no. 22).
71. Holsinger, K. E.; Weir, B. S. 2009. Genetics in geographically structured populations; defining, estimating and interpreting  $F_{(ST)}$ . *Nature Reviews. Genetics*. 10(9): 639–650.
72. Jefferson, R. 1994. Apomixis; a social revolution for agriculture. *Biotechnology and Development Monitor*. no. 19: 14–16.
73. Johnson, R. A.; Wichern, D. W. 1998. *Applied multivariate statistical analyses*. 4<sup>th</sup> ed. Upper Saddle River, NJ, Prentice Hall. s.p.
74. Johnston, W. H. 1996. The place of C4 grasses in temperate pastures in Australia. *New Zealand Journal of Agricultural Research*. 39: 527–540.

75. Kuittinen, H.; Mattila, A.; Savolainen, O. 1997. Genetic variation at marker loci and in quantitative traits in natural populations of *Arabidopsis thaliana*. *Heredity*. 79 (2): 144–52.
76. Le Corre, V. 2005. Variation at two flowering time genes within and among populations of *Arabidopsis thaliana*; comparison with markers and traits. *Molecular Ecology*. 14(13): 4181–4192.
77. Leinonen, T.; O’Hara, R. B.; Cano, J. M.; Merilä, J. 2008. Comparative studies of quantitative trait and neutral marker divergence: a meta-analysis. *Journal of Evolutionary Biology*. 21(1): 1–17.
78. \_\_\_\_\_; McCairns, R. J. S.; O’Hara, R. B.; Merilä, J. 2013.  $Q_{(ST)}$ - $F_{(ST)}$  comparisons; evolutionary and ecological insights from genomic heterogeneity. *Nature Reviews. Genetics*. 14(3): 179–190.
79. Loch, D. S.; Ferguson, J. 1999. Tropical and subtropical forage seed production; an overview. In: Loch, D. S.; Ferguson, J. eds. Forage seed production. 2. Tropical and subtropical species. Wallingford, UK, CABI. pp. 1–40.
80. López-Fanjul, C.; Fernández, A.; Toro, M. 2007. The effect of dominance on the use of the  $Q_{ST}$ - $F_{ST}$  contrast to detect natural selection on quantitative traits. *Genetics*. 176 (1): 725–727.
81. Loveless, M.; Hamrick, J. 1984. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 15: 65–95.
82. McCormick, L. H.; Boschma, S. P.; Scott, J. F. 2009. Producer-identified constraints to widespread adoption of sown tropical grass pastures on the north-west slopes of New South. *Tropical Grasslands*. 43: 263–266.
83. McKay, J. K.; Latta, R. G. 2002. Adaptive population divergence; markers, QTL and traits. *Trends in Ecology and Evolution*. 17(6): 285–291.
84. Madia, M.; Schrauf, G. 1999. Prospección de enfermedades de pasto miel (*Paspalum dilatatum* Poir) detectadas en la región pampeana de la República Argentina. (en línea). *Boletín de Sanidad Vegetal y Plagas*. 25: 435–443. Consultado 3 abr. 2014. Disponible en [http://www.researchgate.net/publication/28161520\\_Prospeccion\\_de\\_enfermedades\\_de\\_Pasto\\_Miel\\_\(Paspalum\\_dilatatum\\_Poir\)detectadas\\_en\\_la\\_Regin\\_Pampeana\\_de\\_la\\_Republica\\_Argentina/file/9c96052192fbe16d21.pdf](http://www.researchgate.net/publication/28161520_Prospeccion_de_enfermedades_de_Pasto_Miel_(Paspalum_dilatatum_Poir)detectadas_en_la_Regin_Pampeana_de_la_Republica_Argentina/file/9c96052192fbe16d21.pdf)

85. Martino, D.; Methol, M.; Oleaga, A.; Pirelli, H. 2008. Cambios en el uso de la tierra. (en línea) In: PNUMA; CLAES. MVOTMA. DINAMA. GEOUruguay; informe del estado del ambiente. Montevideo, PNUMA. pp. 58-117. Consultado oct. 2014. Disponible en <http://www.ambiental.net/noticias/reportes/GeoUruguayCap02.pdf>.
86. Matesanz, S.; Theiss, K.; Holsinger, K.; Sultan, S. 2014. Genetic diversity and population structure in *Polygonum cespitosum*; insights to an ongoing plant invasion. *PloS one*. 9(4): s.p.
87. Merilä, J.; Sheldon, B. 1999. Genetic architecture of fitness and nonfitness traits; empirical patterns and development of ideas. *Heredity*. 83: 103–109.
88. \_\_\_\_\_; Crnokrak, P. 2001. Comparison of genetic differentiation at marker loci and quantitative traits. *Journal of Evolutionary Biology*. 14(1): 892–903.
89. Michelini, D. 2010. Caracterización morfogénica de *Paspalum dilatatum* Poir. (en línea). Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 107 p. Consultado 12 dic. 2014. Disponible en <http://biblioteca.fagro.edu.uy/iah/textostesis/2010/3666mic2.pdf>
90. Millot, J. 1969. Mejoramiento de gramíneas forrajeras. *Miscelánea CIAAB*. no. 7: 101-110.
91. Moraes-Fernandes, M.; Barreto, I. L.; Salzano, F. 1968. Cytogenetic, ecologic and morphologic studies in Brazilian forms of *Paspalum dilatatum*. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*. 10: 131–138.
92. Munguía-Rosas, M.; Ollerton, J.; Parra-Tabla, V.; De-Nova, J. A. 2011. Meta-analysis of phenotypic selection on flowering phenology suggests that early flowering plants are favoured. *Ecology Letters*. 14(5): 511–521.
93. Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist*. 106: 283–292.
94. \_\_\_\_\_. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 70(12): 3321–3323.
95. Nogler, G. 1984. Gametophytic apomixis. In: Johri, B. M. ed. *Embryology of angiosperms*. Berlin, Springer-Verlag. pp. 475 – 518.

96. Nordborg, M. 2000. Linkage disequilibrium, gene trees and selfing; an ancestral recombination graph with partial self-fertilization. *Genetics*. 154: 923–929.
97. O’Hara, R.; Merilä, J. 2005. Bias and precision in  $Q_{ST}$  estimates; problems and some solutions. *Genetics*. 171(3): 1331–1339.
98. Palo, J. U.; O’Hara, R. B.; Laugen, T.; Laurila, A.; Primmer, C. R.; Merila, J. 2003. Latitudinal divergence of common frog (*Rana temporaria*) life history traits by natural selection; evidence from a comparison of molecular and quantitative genetic data. *Molecular Ecology*. 12(7): 1963–1978.
99. Pearson, C.; Shah, S.; Shah, P. 1981. Effects of temperature on seed production, seed quality and growth of *Paspalum dilatatum*. *Journal of Applied Ecology*. 18(3): 897–905.
100. Pizarro, E. A. 2000. Potencial forrajero del género *Paspalum*. *Pasturas Tropicales*. 22(1): 31–46.
101. Podolsky, R. H.; Holtsford, T. P. 1995. Population structure of morphological traits in *Clarkia dudleyana* I. Comparacion of  $F_{ST}$  between allozymes and morphological traits. *Genetics Society of America*. 140: 733–744.
102. Pollak, E. 1987. On the theory of partially inbreeding finite populations. I. Partial selfing. *Genetics*. 117: 353–360.
103. Pritchard, J.; Stephens, M.; Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 155: 945–959.
104. Pujol, B.; Wilson, A. J.; Ross, R. I. C.; Pannell, J. R. 2008. Are  $Q_{(ST)}$ . $F_{(ST)}$  comparisons for natural populations meaningful? *Molecular Ecology*. 17(22): 4782–4785.
105. Quarín, C.; Caponio, I. 1995. Cytogenetics and reproduction of *Paspalum dasypleurum* and its hybrids with *P. urvillei* and *P. dilatatum* ssp. *flavescens*. *International Journal of Plant Sciences*. 156(2): 232–235.
106. Quintans, I. 2013. Determinación de la producción, estacionalidad y calidad de forraje en una colección de pasto miel (*Paspalum dilatatum* Poir.). (en línea). Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 124 p. Consultado 12 nov. 2014. Disponible en <http://biblioteca.fagro.edu.uy/iah/textostesis/2013/3893qui.pdf>

107. R Development Core Team. 2011. R; a language and environment for statistical computing. (en línea). Vienna, Austria, R Foundation for Statistical Computing. s.p. Consultado 12 dic. 2014 Disponible en <http://www.rproject.org/>.
108. Ríos, A. 2001. Dinámica y control de *Cynodon dactylon* en sistemas mixtos de siembra directa y laboreo convencional. In: Díaz Rosselló, R. ed. Siembra directa en cono Sur. Montevideo, IICA/PROCISUR. pp. 201–224.
109. Rodríguez, O. 2010. Caracterización morfológica de clones recombinantes de *Paspalum Dilatatum* (Poir). (en línea). Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 81 p. Consultado 12 dic. 2014. Disponible en <http://biblioteca.fagro.edu.uy/iah/textostesis/2010/3637rod.pdf>
110. Rosengurtt, B.; Arrillaga, B. R.; Izaguirre, P. 1970. Gramíneas uruguayas. Montevideo, Uruguay, Universidad de la República. pp. 347-383.
111. Rowley, J. A.; Tunnicliffe, C. G.; Taylor, A. 1975. Freezing sensitivity of leaf tissue of C<sub>4</sub> grasses. Australian Journal of Plant Physiology. 2(2): 447–451.
112. 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.
113. Sánchez, J. 1981. Sobre“ *Paspalum urvillei*” Steudel. (en línea) Anales del Jardín Botánico de Madrid. 38(1): 307. Consultado 5 nov. 2014. Disponible en <http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2987626>
114. Santiñaque, F. 1979. Estudios sobre productividad y comportamiento de distintas mezclas forrajeras. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 86 p.
115. Sarkar, D. 2008. Lattice; multivariate data visualization with R. (en línea). Vienna, Austria, Springer. s.p. Consultado 12 dic. 2014. Disponible en <http://lmdvr.r-forge.r-project.org/>
116. SAS Institute. 2004. Base SAS 9.1 procedures guide. Cary, NC. v. 1-4, s.p.
117. Savidan, Y. 1987. O melhoramento genético do gênero *Paspalum*. In: Encontro Internacional sobre Melhoramento Genético de *Paspalum* (1987, Nova

- Odessa). Anais. Nova Odessa, São Paulo, BR, Instituto de Zootecnia. cap. 1, pp. 37–47.
- 118.\_\_\_\_\_.2000. Apomixis; genetics and breeding. In: Janick, J. ed. Plant breeding reviews. Hoboken, New Jersey, Wiley and Sons. pp. 13-86 (Plant Breeding Reviews no. 18).
- 119.Sawasato, J. T.; Agnol, M. D.; Priscila, D.; Junior, T.; Klafke, G. B. 2008. Utilização de microssatélites e RAPD na caracterização molecular de acessos de *Paspalum urvillei* Steudel. Revista Brasileira de Zootecnia. 37(8): 1366–1374.
- 120.Scheffer-Basso, S. M.; Rodrigues, G. L.; Bordignon, M. V. 2002. Caracterização morfofisiológica e anatômica de *Paspalum urvillei* (Steudel). Revista Brasileira de Zootecnia. 31(4): 1674–1679.
- 121.Schrauf, G.; Blanco, M. 2003. Ergot resistance in plants of *Paspalum dilatatum* incorporated by hybridisation with *Paspalum urvillei*. Tropical Grasslands. 37: 182–186.
- 122.Shapter, F. M.; Cross, M.; Ablett, G.; Malory, S.; Chivers, I. H.; King, G. J; Henry, R. J. 2013. High-throughput sequencing and mutagenesis to accelerate the domestication of *Microlaena stipoides* as a new food crop. PloS one. 8(12): s.p.
- 123.Siol, M.; Prosperi, J. M.; Bonnin, I.; Ronfort, J. 2008. How multilocus genotypic pattern helps to understand the history of selfing populations; a case study in *Medicago truncatula*. Heredity. 100(5): 517–525.
- 124.Skerman, P. J.; Riveros, F. 1992. Graminéas tropicales. Roma, FAO. 849 p. (Colección FAO no. 23).
- 125.Slatkin, M. 1993. Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations. Evolution. 47(1): 264–279.
- 126.\_\_\_\_\_. 1994. Gene flow and population structure. In: Real, L. A. ed. Ecological genetics. Princeton, Princeton University Press. pp. 3-17.
- 127.Souza-Chies, T.; Cavalli-Molina, S. 1995. Variability in seed production and germination in *Paspalum*; *Dilatata* group (*Gramineae*). Revista Brasileira de Biologia. 55(1): 127–139.

- 128.Speranza, P. 2005. Los desafíos de la exploración de los recursos genéticos en plantas apomícticas; lecciones del caso de *Paspalum dilatatum*. (en línea) Agrociencia (Montevideo). 9(1-2): 73–76. Consultado 06 oct. 2014. Disponible en <http://www.fagro.edu.uy/~agrociencia/index.php/directorio/article/view/280>.
- 129.\_\_\_\_\_.; Malosetti, M. 2007. Nuclear and cytoplasmic microsatellite markers for the species of the Dilatata group of *Paspalum* (Poaceae). Plant Genetic Resources. 5(01): 14.
- 130.\_\_\_\_\_. 2009. Evolutionary patterns in the Dilatata group (*Paspalum*, Poaceae). Plant Systematics and Evolution. 282(1-2): 43–56.
- 131.Spitze, K. 1993. Population structure in *Daphnia obtuse*; quantitative genetic and allozymic variation. Genetics. 135: 367–374.
- 132.Steinger, T.; Haldimann, P.; Leiss, K. A.; Muller-Scarer, H. 2002. Does natural selection promote population divergence? A comparative analysis of population structure using amplified fragment length polymorphism markers and quantitative traits. Molecular Ecology. 11: 2583–2590.
- 133.Tejera, M. D. 2014. Inclusión del género *Paspalum* en mezclas forrajeras; efectos sobre la disponibilidad de forraje, la resistencia a la invasión, y la estabilidad. Tesis Magister en Ciencias Agrarias. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 77 p.
- 134.Valls, S. F. M.; Pozzobon, M. 1987. Variação apresentada pelos principais grupos taxonômicos de *Paspalum* com interesse forrageiro no Brasil. In: Encontro Internacional sobre Melhoramiento Genético de Paspalum (1987, Nova Odessa). Anais. Nova Odessa, São Paulo, BR, Instituto de Zootecnia. pp. 15–21.
- 135.Van de Wouw, M.; Hanson, J.; Nokoe, S. 1999. Observation strategies for morphological characterisation of forages. Genetic Resources and Crop Evolution. 46: 63–71.
- 136.Vucetich, J.; Waite, T. 2003. Spatial patterns of demography and genetic processes across the species' range; null hypotheses for landscape conservation genetics. Conservation Genetics. 4: 639–645.

137. Walter, A.; Studer, B.; Kölliker, R. 2012. Advanced phenotyping offers opportunities for improved breeding of forage and turf species. *Annals of Botany*. 110(6): 1271–1279.
138. Wang, J. L.; Zhao, N. X.; Gai, Y. B.; Lin, F.; Ren, A. Z.; Ruan, W. B.; Chen, L. 2006. RAPD analysis of genetic diversity and population genetic structure of *Stipa krylovii* reshov. Inner Mongolia steppe. *Russian Journal of Genetics*. 42(5): 468–475.
139. Weir, B.; Cockerham, C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*. 38(6): 1358–1370.
140. Whitlock, M. 1999. Neutral additive genetic variance in a metapopulation. *Genetical Research*. 74: 215–221.
141. Wright, S. 1943. An analysis of local variability of flower color in *Linanthus Parryae*. *Genetics*. 28(2): 139–156.
142. \_\_\_\_\_. 1951. The genetic structure of populations. *Annual Eugenics*. 15: 323–354.
143. Zuloaga, F.; Morrone, O. 2005. Revisión de las especies de *Paspalum* para América del Sur austral (Argentina, Bolivia, sur del Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay). St. Louis, Missouri Botanical Garden. 297 p. (Monografía no. 102).