

Niveles de ploidía de algunas especies de *Paspalum*, Poaceae de Paraguay

Chaparro, C.¹ ; Escobar, L. M.² ; Schneider, J. S.² ; Eckers, F.² ; Perichon, M. C.² ; Daviña, J. R.² ; Honfi, A. I.^{2*} 

¹Universidad Nacional de Asunción. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Laboratorio de Recursos Vegetales. Campus Universitario, San Lorenzo, Paraguay

²Programa de Estudios Florísticos y Genética Vegetal – Laboratorio de Citogenética Vegetal, Instituto de Biología Subtropical – Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología - Universidad Nacional de Misiones, (IBS-CONICET-UNaM), nodo Posadas, Misiones, Argentina

*autor por correspondencia: ahonfi@gmail.com

Niveles de ploidía de algunas especies de *Paspalum*, Poaceae de Paraguay. El género *Paspalum* reúne más de 330 especies nativas americanas, que son de gran interés por su calidad forrajera y el amplio rango de adaptabilidad ecológica que presentan. Paraguay dispone de escasa información sobre citología de procedencias nativas de especies del género. A fin de contribuir con la caracterización de plantas nativas de Paraguay, se ha determinado el nivel de ploidía con técnicas citogenéticas y citometría de flujo de 24 individuos de 13 accesiones pertenecientes a ocho especies de *Paspalum*. Se realizaron colectas en los departamentos Canindeyú, Central, Cordillera, Paraguari y Pte. Hayes. El 96% de las especies estudiadas presentó nivel de ploidía tetraploide. Las accesiones de *P. alnum* ($2n = 4x = 24$), *P. ionanthum*, *P. malacophyllum*, *P. notatum* var. *notatum*, *P. nicorae* y *P. plicatulum* fueron todas tetraploides ($2n = 4x = 40$), en cambio se encontró ploidía pentaploide en *P. arundinellum* ($2n = 5x = 50$) y diploide en *P. simplex* ($2n = 2x = 20$).

Palabras claves: Poliploidía, citometría de flujo, mitosis, recursos genéticos vegetales

Ploidy levels of some *Paspalum*, Poaceae species from Paraguay. The genus *Paspalum* comprises more than 330 native American species, which are of great interest due to their forage quality and the wide range of ecological adaptability. Paraguay has little information on the cytology of native species of the genus. In order to contribute to the characterization of native plants from Paraguay, the ploidy level of 24 individuals from 13 accessions belonging to eight *Paspalum* species has been determined using cytogenetic techniques and flow cytometry. The botanical collections were made in the Canindeyú, Central, Cordillera, Paraguari, and Pte. Hayes departments. Most (96%) of the studied species were tetraploid. The accessions of *P. alnum* ($2n = 4x = 24$), *P. ionanthum*, *P. malacophyllum*, *P. notatum* var. *notatum*, *P. nicorae* and *P. plicatulum* were tetraploids ($2n = 4x = 40$), whereas *P. arundinellum* was pentaploid ($2n = 5x = 50$) and *P. simplex* was diploid ($2n = 2x = 20$).

Keywords: Polyploidy, mitosis, flow cytometry, plant genetic resources

INTRODUCCIÓN

El género *Paspalum* L. pertenece a la tribu Paspaleae de la subfamilia Panicoideae de las gramíneas y dentro de la familia es uno de los géneros con mayor número de especies, con alrededor de 330 entidades (Zuloaga y Morrone, 2005; Morrone et al., 2012). La distribución geográfica del género es amplia en regiones tropicales y templadas de América, con pocas especies en áreas extra-americanas (Zuloaga y Morrone, 2005). Existen 80 especies y 3 variedades de *Paspalum* registradas en la Flora de Paraguay (Zuloaga et al., 2014) que habitan en una variada gama de ambientes, como sabanas, bordes de selva, praderas e incluso bañados y áreas de cerrado (Honfi com. pers.) donde forma parte de pastizales diversos.

En *Paspalum* se conocen los números cromosómicos de casi la mitad de las especies (Honfi, 2003; Honfi et al., 2021), es muy común la poliploidía y el 75,6% de las especies estudiadas son poliploides (Honfi et al., 2021). El número básico en especies de *Paspalum* es generalmente $x = 10$ y presenta pocas excepciones, como por ejemplo $x = 6$, en el grupo informal Alma y en *P. schesslii* Bonasora & G.H. Rua del subgénero Ceresia (Honfi, 2003; Bonasora et al. 2015; Honfi et al. 2021). En la actualidad, se han examinado los sistemas genéticos de alrededor del 20% de las especies (Ortiz et al., 2013; Honfi et al., 2021) y es común encontrar diversos citotipos coexistiendo dentro de una misma especie sin distinciones exomorfológicas entre ellos (Honfi et al., 2021).

Existen especies monoploides que exhiben un único nivel de ploidía y multiploides cuando comprenden una serie poliploide intraespecífica, y en ambos casos la poliploidía está presente. Los niveles de ploidía en *Paspalum* varían desde diploides ($2n = 2x = 20$) hasta hexadecaploides ($2n = 16x = 160$) (Quarin, 1992; Ortiz et al., 2013; Honfi et al., 2021). Los diploides poseen reproducción sexual en cambio los poliploides son en

su gran mayoría apomícticos (Quarin, 1992). La apomixis es el modo de reproducción asexual mediante semillas que tienen origen exclusivamente materno (Nogler, 1984).

La mayoría de los sistemas genéticos en especies de *Paspalum* comprenden más de un nivel de ploidía que son indistinguibles morfológicamente en la naturaleza. Un caso típico es el sistema genético que comprende diploides sexuales alógamos por auto-esterilidad y contrapartes conespecíficas poliploides apomícticos pseudógamos auto-compatibles (Quarin, 1992; Hojsgaard et al., 2009; Ortiz et al., 2013; Honfi et al., 2021). Especies que exhiben este sistema genético son *P. notatum* Flügge; *P. compressifolium* Swallen, *P. plicatum* Michx., *P. alnum* Mez, entre otras, que son especies de gran interés como forrajeras nativas (Vogt, 2011; Ortiz et al., 2013) en la producción ganadera sudamericana. La conservación de germoplasma y los planes de mejoramiento genético en *Paspalum* requieren como condición previa a su implementación, la caracterización del nivel de ploidía de las accesiones de cada especie, porque la diversidad reproductiva y de ploidía es condicionante del diseño de cruza-mientos y de muestreo de germoplasma.

Entre los antecedentes de estudios cromosómicos en procedencias de *Paspalum* de Paraguay, se registran diploides y poliploides (Honfi et al., 1990; Daviña et al., 2001; Pozzobon et al., 2008, 2013; Molero et al., 2006; Hojsgaard et al., 2009; Rivarola Sena et al., 2016; Reutemann et al., 2020; 2022). Parte de los antecedentes existentes sobre cromosomas de *Paspalum* de procedencias de Paraguay, se han reunido tiempo atrás en la base de datos CROMOPAR (Daviña et al., 2001; Molero et al., 2006). Aun así, la información disponible es aún insuficiente y fragmentaria.

En base a lo expuesto, este trabajo tiene como objetivo determinar el nivel de ploidía de algunas especies de *Paspalum* de Paraguay mediante el recuento citogenético de números cromosómicos y análisis de citometría de flujo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material estudiado

El material estudiado fue colectado en los departamentos Canindeyú, Central, Cordillera, Paraguari y Presidente Hayes de Paraguay (Tabla 1). Los ejemplares de herbario fueron depositados en los siguientes herbarios: Herbario de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad Nacional de Asunción (FACEN), Herbario de la Universidad Nacional de Misiones (MNES), Herbario Gaspar Xuárez (BAA). Se tomaron muestras de ejemplares vivos que fueron trasplantados en macetas. Todos los ejemplares colectados fueron georreferenciados (Tabla 1). Las especies fueron identificadas taxonómicamente de acuerdo a Zuloaga et al. (2014).

Mitosis

Los estudios cromosómicos se realizaron en el laboratorio de Citogenética Vegetal del Instituto de Biología Subtropical (IBS, UNaM- CONICET), Posadas, Misiones, Argentina dentro del marco del convenio de cooperación científica FACEN - UNA y PEFyGV FCEQyN- UNaM. Se realizaron preparados mitóticos a partir de ápices de raicillas obtenidos a partir de plantas cultivadas en macetas. Las raicillas fueron pretratadas con solución saturada de 1-bromonafaleno por 3 h. Luego fueron fijadas en etanol absoluto-ácido acético glacial en proporción 3:1 a temperatura ambiente por una noche y conservadas a 4°C hasta su utilización. Las raicillas fueron hidrolizadas con HCl 1N durante 10 minutos a 60°C y se colorearon con fucsina básica (Reactivo de Schiff). El meristema coloreado fue macerado en orceína acética 2%. Los preparados fueron sellados con solución de goma y las preparaciones cromosómicas fueron observadas con un microscopio Leica DMS provisto con cámara de video C 350 FX.

Determinación del nivel de ploidía por citometría de flujo

Los individuos con número cromosómico determinado mediante conteos cromosómicos clásicos fueron usados como estándar de referencia internos en mediciones del contenido relativo de ADN en tejidos foliares por citometría de flujo. Se utilizó un citómetro de flujo marca Partec Modelo CyFlow Ploidy Analyzer (IBS – CONICET- UNaM). Para ello se aplicó el protocolo de Siena et al. (2008). Para ello, una muestra de tejido foliar fresco (0,5 cm²) de cada planta se colocó en cajas de Petri junto a una muestra de tamaño similar de la planta usada como patrón (con ploidía conocida por recuento cromosómico). Se utilizó 0,5 ml de Tris-MgCl₂ Otto I *buffer* de extracción y 1,5 ml de Otto II *buffer* de tinción 4μg/ml DAPI (0,6-diamino-2-fenilindol) para la coloración de los núcleos celulares. El nivel de ploidía se determinó comparando los histogramas de fluorescencia del estándar de referencia y la muestra, analizando al menos 3000 núcleos y tres repeticiones/muestra. El análisis de los histogramas se realizó con el programa FloMax 2.4 de Sysmex-Partec.

Análisis de bases de datos citogenéticas

Se registraron las publicaciones existentes con información cromosómica de especies de *Paspalum* con procedencias estudiadas de Paraguay. Para ello, se consultaron las siguientes bases de datos cromosómicas: TROPICOS, CROMOPAR, *Chromosome Counts Database (CCDB)*, *CHROBASE - Chromosome numbers for the Italian flora (CHROBASE)*, *Botanical Society of the British Isles (BSBI) Cytology database (British Isles cytology)*, *Chromosome number database of Polish plants (Poland Database)*, *Chilean Plants Cytogenetic Database (Chilean Cytogenetic Database)*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los pastizales naturales de Paraguay contienen especies de *Paspalum* que contribuyen a su alto valor biológico como reservorio de biodiversidad y como fuente alimenticia para el ganado. En este trabajo se analizaron citogenéticamente ocho especies, 13 accesiones y 24 individuos de *Paspalum* procedentes de Paraguay (Tabla 1).

Tres niveles de ploidía han sido identificados y el 96% de los individuos presentaron citotipo tetraploide. El 4% restante es diploide o pentaploide. La tetraploidía es la condición más común dentro del género (Quarin, 1992) y también, es el citotipo más extendido en la naturaleza (Honfi et al., 1990; 2021). Es común encontrar diversos citotipos en una misma especie de *Paspalum* y generalmente sin distinciones exomorfológicas entre ellos (Honfi et al., 2021). Las especies estudiadas en este trabajo pertenecen a diferentes grupos informales, Alma, Plicatula, Quadrifaria, Malacophylla y Notata (Zuloaga y Morrone, 2005).

La condición tetraploide en especies con número básico de cromosomas $x = 10$ es de $2n = 4x =$

40 y en especies como *P. alnum* con número básico $x = 6$, es de $2n = 4x = 24$ cromosomas (Tabla 1). El grupo informal Alma de *Paspalum* es monoespecífico, y está constituido por *P. alnum*, especie que se distribuye en Argentina, Paraguay y Brasil y que posee 2 niveles de ploidía, diploide y tetraploide (Honfi et al., 1990; Hojsgaard et al., 2009; Zuloaga et al., 2014). Hasta el momento, solamente han sido registrados individuos tetraploides de *P. alnum* de Paraguay.

En el grupo Plicatula se reúnen especies morfológicamente relacionadas con *P. plicatulum* Michx., la cual es una especie típica de los campos de y sabanas de América (Zuloaga y Morrone, 2005). *Paspalum leptum* Schult. (= *P. nicorae* Parodi) es una especie forrajera nativa del grupo que se distribuye en Argentina, Brasil, Paraguay y Uruguay (Zuloaga y Morrone, 2005) y es considerada como indicadora de campos de valor nutritivo considerable, que toleran alta carga animal y donde los animales engordan satisfactoriamente (Barreto, 1956). Las procedencias de los departamentos Central y Paraguari resultaron tetraploides (Tabla 1, Fig. 1A) un citotipo común en esta especie.

TABLA 1. Síntesis de número cromosómico (2n) y nivel de ploidía (x) de especies de *Paspalum*

| Especie | 2n | x | Legajo | Procedencia |
|----------------------------|----|----|----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>P. alnum</i> Chase | 24 | 4x | H2535 #1 | Py. Dpto. Cordillera, ruta de Tobatí a Arroyos y Esteros. S25°03'48" WO57°11'22.4", 62 msnm (MNES) |
| | 24 | 4x | H2535 #2 | Py. Dpto. Cordillera, ruta de Tobatí a Arroyos y Esteros. S25°03'48" WO57°11'22.4", 62 msnm, (MNES) |
| | 24 | 4x | Rua 1145 | Py. Dto. Presidente Hayes. Ruta 9 Transchaco (BAA, FACEN). |
| <i>P. arundinellum</i> Mez | 50 | 5x | Rua 54 | Py. Dpto. Canindeyú |
| <i>P. ionanthum</i> Chase | 40 | 4x | H2529 #2 | Py. Dpto. Central. Ypacaraí, sobre Ruta 2 S25°22'56.9" WO57°15'30.5", 76 msnm (MNES) |
| | 40 | 4x | H2529 #3 | |
| | 40 | 4x | H2529 #4 | |
| | 40 | 4x | H2529 #5 | |
| | 40 | 4x | H2532#1 | Py. Dpto. Cordillera, ruta de Tobatí a Arroyos y Esteros. S25°08'16.1" WO57° 06' 20.7", 71 msnm (MNES) |
| | 40 | 4x | H2532 #2 | |
| | 40 | 4x | H2532 #3 | |

TABLA 1. Continuación

| | | | | |
|----------------------------------------------|----|----|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | 40 | 4x | H2538 #1 | Py. Dpto. Paraguari. S25°38'03.5" WO57°09'17.7", 109 msnm (MNES) |
| | 40 | 4x | H2538 #2 | |
| | 40 | 4x | H2538 #3 | |
| | 40 | 4x | H2538 #4 | |
| | 40 | 4x | H2538 #5 | |
| <i>P. lepton</i> Schult. | 40 | 4x | H2540 #B | Py. Dpto. Paraguari, Villa Florida, (MNES) |
| | 40 | 4x | H2530 #1 | Py. Dpto. Central. Ruta de Caacupé a Tobatí. S25°18'04.5" WO57°05'39.5", 109msnm (MNES) |
| | 40 | 4x | H2530 #2 | |
| <i>P. malacophyllum</i> Trin. | 40 | 4x | Rua 298 | Py. Parque Nacional Cerro Corá (BAA, FACEN) |
| <i>P. notatum</i> Flügge var. <i>notatum</i> | 40 | 4x | H2528 | Py. Dpto. Central, Ruta 2, 18 km antes de Caacupé S27°24'15.3" WO57°17'44.3" (FACEN, MNES) |
| <i>P. plicatum</i> Michx. | 40 | 4x | H2539 | Py. Dpto. Paraguari. S25°38'03.4" WO 57°09'17.7", 109 msnm (MNES) |
| | 40 | 4x | H2536#1 | Py. Dto. Cordillera, entre Tobatí a Arroyos y Esteros. S25°03'48" WO 57°11'22.4, 62 msnm" (MNES) |
| | 40 | 4x | H2536#2 | |
| <i>P. simplex</i> Morong ex Britton | 20 | 2x | H2537 #2 | Py. Dpto. Presidente Hayes, Puerto Falcón, (MNES) |
| | 20 | 2x | H2537 #3 | |

Coleccionista: H: Honfi A.I.

En los pastizales de Paraguay, *P. plicatum* es una especie muy frecuente y constituye un componente muy productivo. Bajo este epíteto, se reúnen citotipos diploides auto-estériles de reproducción sexual (Honfi et al., 1990; Ortiz et al., 2013) y tetraploides apomíticos auto-compatibles y pseudógamos (Burson y Bennett, 1971). Morfológicamente es muy variable, polimórfica y con gran tolerancia ecológica (Honfi, com. pers.). Todas las accesiones estudiadas fueron tetraploides con $2n=4x=40$ cromosomas (Fig. 1B, 1C, 1D, Tabla 1). Las accesiones conocidas exhiben invariablemente tetraploidía en materiales de Argentina, Brasil y Paraguay (Burson & Bennett, 1970; Pozzobon et al., 2000; Hojsgaard et al., 2009; Novo et al., 2019). Excepcionalmente se han encontrado diploides en el norte de Argentina (Honfi et al. 1990).

La especie de referencia del grupo Notata es *P. notatum*, la cual posee dos variedades, *P. notatum* var. *saurae* y *P. notatum* var. *notatum*,

que difieren en el nivel de ploidía, diploide y tetraploide, respectivamente (Zuloaga y Morrone, 2005). El material estudiado es tetraploide (Fig. 2A, Tabla 1) y este resultado concuerda con numerosos recuentos previos realizados en esta especie (Hojsgaard et al., 2009; Reutemann et al., 2019, y referencias). El análisis de todas las procedencias de Paraguay indica que las poblaciones son uniformemente tetraploides. Por primera vez, se analiza con citometría de flujo el nivel de ploidía de plantas de *P. notatum* del departamento Central. La presencia de un único pico en el histograma (Fig. 2A) indica que el material de referencia usado ($2n=40$) y el material estudiado, presentan el mismo nivel de ploidía tetraploide.

Paspalum ionanthum Chase (= *P. guaraniticum* Parodi) es una especie muy difundida en los campos de los departamentos de Cordillera, Central, Paraguari y por primera vez se reporta para el departamento Presidente Hayes. Se trata de una especie que también forma parte del gru-

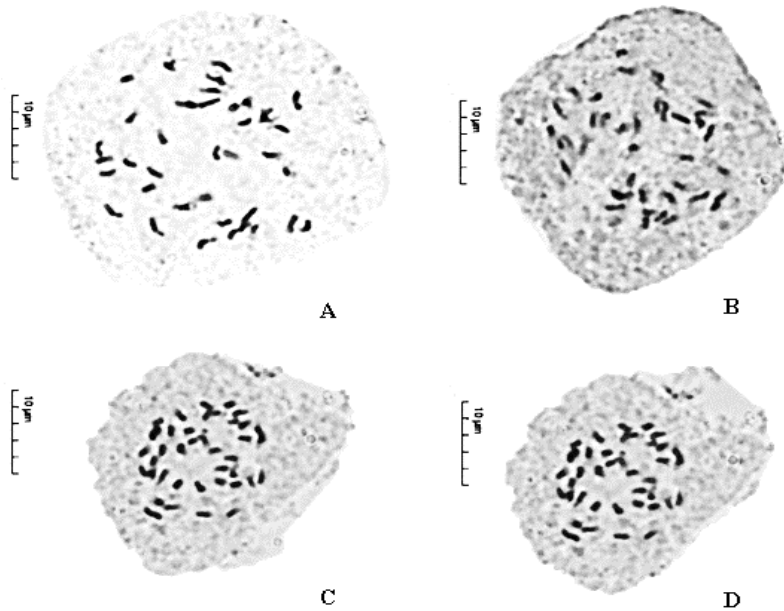


Figura 1. Números cromosómicos de especies de *Paspalum*, grupo Plicatula. A) *Paspalum leptum*, $2n = 4x = 40$ (H2530 #1). B) *P. plicatum*, $2n = 4x = 40$ (H2536#1). C) *P. plicatum*, $2n = 4x = 40$ (H2536#2). D) *P. plicatum*, $2n = 4x = 40$ (H2538). Escala: $10 \mu\text{m}$

po taxonómico informal Notata (Chase, 1929), que reúne a todas las especies morfológicamente similares a *P. notatum*. Se trata de una especie perenne y cespitosa, la cual produce un forraje apetecido por el ganado y es medianamente productivo (Rosengurt et al., 1970; Morrone y Zuloaga, 2005). Se la encuentra generalmente ocupando áreas húmedas de terrenos bajos y arenosos, distribuida a través del sureste del Paraguay, suroeste de Brasil, noreste de Argentina y noroeste de Uruguay (Quarin y Norrmann, 1987). En esta especie se han registrado citotipos tetraploides ($2n = 4x = 40$) sexuales autoestériles (Burson y Bennett, 1970; Quarin, 1977; Quarin y Norrmann, 1987; Martínez et al., 1999; Hojsgaard et al., 2009), un citotipo tetraploide apomítico (Bashaw et al., 1970) que posiblemente pertenezca a otra especie de *Paspalum* (Quarin, com. pers.) y octoploides ($2n = 8x = 80$) de reproducción apomítica (Burson y Bennett, 1970).

En *Paspalum* se han descrito varios sistemas genéticos y *P. ionanthum* forma parte del grupo de especies poliploides sexuales autoestériles,

con contrapartes poliploides superiores de reproducción apomítica (Ortiz et al., 2013). La distribución geográfica natural de los citotipos de esta especie en Paraguay, es conocida apenas a partir de las investigaciones realizadas en algunas plantas individuales. La presencia del citotipo octoploide fue documentada en la región noroeste del Uruguay por Burson & Bennett (1970) y luego no se han encontrado nuevos registros octoploides para esta especie. En Argentina, se han registrado exclusivamente individuos y poblaciones tetraploides en la provincia de Corrientes, Argentina (Quarin & Norrmann, 1987; Martínez et al., 1999; Schedler, 2019; Schedler et al. 2023). El modo de reproducción fue determinado en la especie, a través del análisis de los sacos embrionarios, estableciendo que la misma se reproduce principalmente por la vía sexual, pero que posee capacidad para la reproducción apomítica, debido a la presencia simultánea de sacos embrionarios meióticos y apospóricos (Burson & Bennett, 1970; Martínez et al., 1999; Schedler et al. 2023). Además, el citotipo octoploide también es

apomítico facultativo (Galdeano et al., 2016). Todas las procedencias de Paraguay resultaron tetraploides con $2n=4x=40$ cromosomas (Tabla 1, Fig. 2B). Los resultados indican que *P. ionanthum* en Paraguay es una especie nativa con un único nivel de ploidía tetraploide y que es frecuente en los campos naturales pastoreados. En *Paspalum* son poco comunes los tetraploides que se reproducen sexualmente, y por tal razón, *P. ionanthum* constituye un recurso genético valioso para la conservación y el mejoramiento genético de pastos forrajeros.

El subgénero *Anachyris* Chase de *Paspalum* reúne a seis especies, tres de ellas se encuentran en Paraguay, por ejemplo, *P. malacophyllum* Trin. (Zuloaga et al., 2014). La ploidía en *P. malacophyllum* procedente de Paraguay determinada por citometría de flujo indica que se trata de tetraploides (Tabla 1, Fig. 2C) y coincide con recuentos previos realizados en poblaciones de Argentina, Brasil, Bolivia y Paraguay (Hojsgaard et al., 2009; Zilli et al., 2014). Los diploides de esta especie se encuentran solamente en el sur de Brasil en cambio los tetraploides ocupan el resto de la distribución geográfica de la especie (Zilli et al., 2014).

En la actualidad, *P. leptum* Oliveira & Valls es el nombre de *P. nicorae* Parodi, luego de pasar a sinonimia a ésta última (Oliveira y Valls, 2008; Novo et al., 2019), aunque no hay acuerdo en esta denominación. Se trata de una especie del grupo *Plicatula* nativa de Sudamérica, natural del E de Paraguay, S de Brasil, NE de Argentina y de Uruguay, que fue introducida a Norteamérica (Novo et al., 2019). Las procedencias de los departamentos Central y Paraguairí, resultaron tetraploides cuando fueron analizadas por citometría de flujo (Fig. 2D). Hasta el momento, todas las accesiones estudiadas de esta especie, provenientes de Argentina, Paraguay y Brasil son tetraploides invariablemente, y de reproducción apomítica con cierta sexualidad residual (Hojsgaard et al., 2009; Novo et al., 2019).

La procedencia de Canindeyú de *P. arundinellum* Mez (Tabla 1, Fig. 2E) resultó pentaploide ($2n=5x=50$) y este hallazgo coincide con los registros cromosómicos previos de accesiones de Paraguay y Argentina de esta especie (Honfi et al., 1990; Hojsgaard et al., 2009). En *P. arundinellum* se han encontrado también raros individuos de condición tetraploide procedentes de Argentina (Formosa) y de Paraguay, pero la condición más común en la naturaleza son los pentaploides (Honfi, 2003). En Paraguay, los tetraploides de *P. arundinellum* fueron encontrados en los departamentos de Caaguazú (Hojsgaard et al., 2009) y de Concepción (Rivarola Sena et al., 2016).

Paspalum simplex Morong ex Britton, es una especie multiploide que comprende citotipos $2x$, $3x$, $4x$, $6x$ típica del Gran Chaco (Urbani et al., 2002; Zilli et al., 2014). La accesión estudiada resultó diploide (Tabla 1, Fig. 2F) y el nivel de ploidía coincide con recuentos previos realizados en esta especie (Urbani et al., 2002; Zilli et al., 2014). En Paraguay, se han encontrado tres citotipos, los diploides se encuentran en el sur, los hexaploides se encuentran al norte, en cambio los tetraploides se distribuyen en el norte, centro y sur (Urbani et al., 2002; Hojsgaard et al., 2009; Zilli et al., 2014; Rivarola et al., 2016).

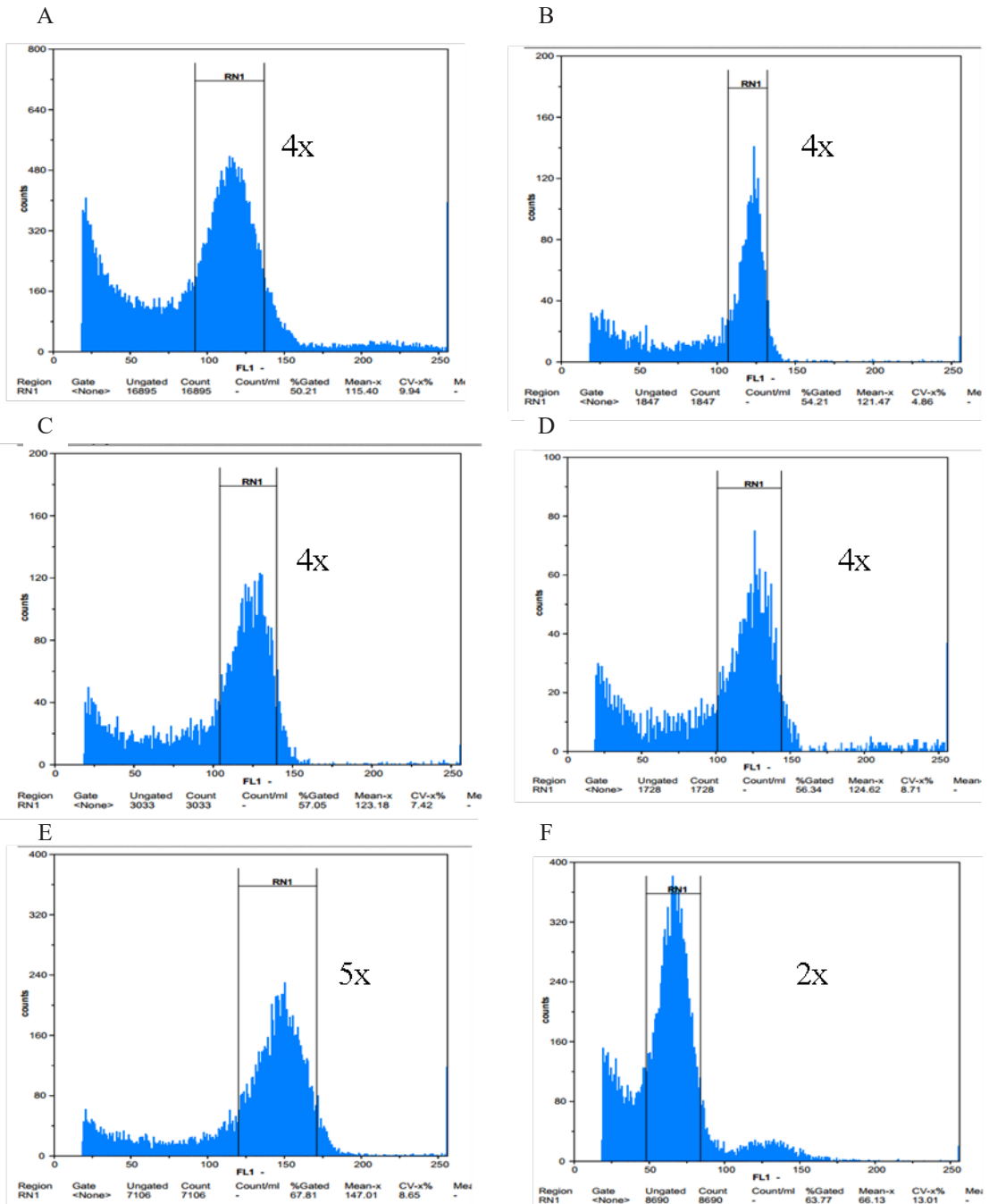


Figura 2. Histogramas de contenido relativo de ADN obtenidos en tejidos foliares por citometría de flujo de especies de *Paspalum*. A) *P. notatum* var. *notatum*, B) *P. ionanthum*, C) *P. malacophyllum*, D) *P. leptum*, E) *P. arundinellum*, F) *P. simplex*

Históricamente, se han realizado pocos estudios cromosómicos de *Paspalum* en procedencias de Paraguay. Honfi et al. (1990) realizaron conteos cromosómicos de unas pocas muestras provenientes de los departamentos de Boquerón y Presidente Hayes, ambas tetraploides, pertenecientes a *P. alnum* y *P. distichum* L., respectivamente. Norrmann et al. (1989) identificaron el número cromosómico y nivel de ploidía de seis especies de *Paspalum*, entre ellas una única procedencia de *P. intermedium* Munro ex Morong & Britton ($2n = 2x = 20$) de Pdte. Hayes. Pozzobon et al. (2008) realizaron revisiones de números cromosómicos para especies de *Paspalum* del cono sur de Sudamérica, incluyendo en su estudio a *P. limbatum* Henrard ($2n = 4x = 40$), *P. mandiocanum* Trin. var. *subaequiglume* Barreto ($2n = 5x = 50$) del departamento de Amambay, y a *P. conspersum* Schrad. ($2n = 6x = 60$) proveniente de Cordillera. Por su parte, Hojsgaard et al., (2009) han estudiado los cromosomas y niveles de ploidía de varias especies de *Paspalum* de Argentina, Bolivia, Brasil y Paraguay, y encuentran *P. alcalinum* Mez ($2n = 6x = 60$) y *P. simplex* (4x) en Pdte. Hayes; *P. arundinellum* ($2n = 4x = 40$) en Caaguazú; *P. glauscescens* Hack. ($2n = 4x = 40$), *P. malacophyllum* (4x) y *P. intermedium* ($2n = 2x = 20$) en Amambay; *P. inaequivalve* Raddi ($2n = 6x = 60$) en Paraguari; *P. ionanthum* (4x) y *P. leptum* (4x) en Cordillera, *P. juergensii* Hack. y *P. umbrosum* Trin. ($2n = 2x = 20$) en Itapúa; *P. orbiculatum* Poir. y *P. paucifolium* Sw. ($2n = 2x = 20$) en Paraguari. Sartor et al. (2011) realizaron estudios sobre niveles de ploidía y de comportamiento reproductivo en cinco especies de *Paspalum* y encontraron en el departamento Central procedencias hexaploides de *P. alcalinum* ($2n = 6x = 60$) y procedencias diploides, triploides y tetraploides de *P. denticulatum* Trin. Mas recientemente, Rivarola Sena et al. (2016) han realizado la caracterización cromosómica de especies de *Poaceas* del Monumento Natural Tres Cerros, Vallemí, del departamento de Concepción y determinaron el nivel de ploidía de diversas espe-

cies de *Paspalum*, registrando tetraploides de *P. arundinellum*, *P. compressifolium*, *P. notatum* y tetraploides y hexaploides de *P. simplex*. También Reutemann et al. (2019) encuentran tetraploides de *P. ionanthum* (4x) en el departamento de Cordillera y de *P. paucifolium* de Paraguari. Todos estos estudios, utilizaron las técnicas clásicas de recuentos cromosómicos. En este trabajo, por primera vez se combinan dos técnicas de análisis citogenético, particularmente, la determinación del número cromosómico clásico obtenido mediante preparaciones citológicas cromosómicas, junto con la determinación del nivel de ploidía por citometría de flujo. La aplicación conjunta de estas técnicas, resulta óptima para efectuar con celeridad el análisis de un gran volumen de plantas y obtener resultados con alta fidelidad.

CONCLUSIONES

Paspalum es un género americano altamente polimórfico, que comprende valiosos recursos forrajeros para una variada gama de rangos ecológicos. Sin embargo, solamente unas pocas especies se utilizan ampliamente como pastos forrajeros. La falta de diversidad intraespecífica de niveles de ploidía en las especies de *Paspalum* analizadas procedentes de Paraguay, se evidencia en todos los casos con la presencia de un único citotipo común a todas las accesiones. El nivel de ploidía predominante fue el tetraploide ($2n = 4x = 40$), en cambio se encontró en un solo caso, ploidía pentaploide ($2n = 5x = 50$) y en otro diploide ($2n = 2x = 20$). Los resultados encontrados en este trabajo, denotan que aún persiste el vacío de información cromosómica de especies de *Paspalum* procedentes de Paraguay. Además, se presenta por primera vez, la aplicación de la citometría de flujo para determinar el nivel de ploidía en plantas de Paraguay, y resulta una herramienta útil y eficiente para analizar grandes cantidades de material. La combinación de la información de cromosomas y niveles de ploidía con la distribución geográfica de las especies de *Paspalum*

son necesarias de estudiar en profundidad en un futuro próximo, para identificar las áreas geográficas prioritarias de conservación de germoplasma de interés.

AGRADECIMIENTOS

Al Programa de Estudios Florísticos y Genética Vegetal, Laboratorio de Citogenética Vegetal, FCEQyN, del Instituto de Biología Subtropical (IBS-CONICET-UNaM) Nodo Posadas de Misiones - Argentina, a los laboratorios de Botánica de la FACEN y FCQ de la Universidad Nacional de Asunción - Paraguay, y a los curadores de los herbarios consultados, por la atención, la ayuda y la oportunidad de utilizar los materiales y equipamientos necesarios para desarrollar este trabajo. Especial mención de agradecimiento a la Mgter. Claudia Diana Pereira Sushner por la colaboración brindada. Este trabajo ha sido financiado en parte por ANPCyT- [PICT 2016- 1637 de J.R.D y A.I.H; PICT RAICES 2017-4203 y PICT 2020-3783 de A.I.H.], y *Universidad Nacional de Misiones*, Argentina [PI 16Q1758]. L.E.M., J.S.S., F.E., M.C.P. y A.I.H. pertenecen al CONICET, Argentina; J.R.D. pertenece a UNaM, Misiones, Argentina. Los resultados de este trabajo se obtuvieron en parte durante el desarrollo de la tesis de Maestría de la FACEN-UNA, Paraguay de la Lic. Clarisse Chaparro.

APORTE DE LOS AUTORES

CCh desarrolló su tesis de Maestría en Ciencias Biológicas, Mención Biodiversidad y Sistemática. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Asunción (FACEN-UNA), Paraguay. JRD y AIH, fueron los directores y realizaron el diseño y conducción de la investigación y la defensa de la tesis. LME, y JSS hicieron igual contribución con CCh en trabajo de laboratorio (PEFyGV-IBS-CONICET-UNaM), obtención de resultados y en el análisis de los datos. EF y MCP participaron en obtención de datos

de citometría de flujo y su análisis. Todos los autores participaron en la redacción y revisaron la versión final del manuscrito.

CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores no tienen intereses contrapuestos para declarar que sean relevantes para el contenido de este artículo.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Barreto, I. L. (1956). Las especies afines a *Paspalum plicatulum* en Rio Grande del Sur (Brasil). *Revista Argentina de Agronomía* 23(2), 53-70.
- Bashaw E. C., Hovin A. W. & Holt E. C. (1970). Apomixis, its evolutionary significance and utilization in plant breeding. In: Norman M.J.T. Ed. *Proceed. 11th Intl. Grassl Congr.*, Queensland. University of Queensland Press, St. Lucia, 245-248.
- Bonasora M., Pozzobon M., Honfi A. I. & Rua G. (2015). *Paspalum schesslii* (Poaceae, Paspaleae), a new species from Mato Grosso (Brazil) with an unusual base chromosome number. *Plant Systematic & Evolution* 301, 2325–2339.
- Burson B. L. & Bennett H. W. (1970). Cytology, method of reproduction and fertility of *Brunswick grass*, *Paspalum nicorae* Parodi. *Crop Science* 10, 184-187.
- Burson B. L. & Bennett, H. W. (1971). Meiotic and reproductive behavior of some introduced *Paspalum* species. *Jour. of the Mississippi Academy of Science* 17, 5-8.
- Chase A. (1929). The North American species of *Paspalum*. *Contrib. US. Natl. Herb.* 28, 1310.
- Daviña J. R., Honfi A. I., D. F. De Diana, V. Fernández, I. Lirussi, A. Rovira & Molero, J. (2001). Chromosome studies on plants from Paraguay. *Phyton*, 215-224.
- Galdeano, F., Urbani, M. H., Sartor, M. E., Honfi, A. I., Espinoza, F. & Quarin, C. L. (2016).

- Relative DNA content in diploid, polyploid, and multiploid species of *Paspalum* (Poaceae) with relation to reproductive mode and taxonomy. *Journal of Plant Research*, 129(4), 697-710.
- Hojsgaard, D., Honfi, A. I., Rua, G. & Davina, J. (2009). Chromosome numbers and ploidy levels of *Paspalum* species from subtropical South America (Poaceae). *Genetic Resources and Crop Evolution* 56(4), 533-545.
- Honfi, A. I. (2003). Citoembriología de poliploides impares en el género *Paspalum* L. (Panicoideae: Gramineae). Tesis Doctoral, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina, 1-203.
- Honfi, A. I., Quarin, C. L., y Valls, J. F. M. (1990). Estudios cariológicos en gramíneas sudamericanas. *Darwiniana* 30, 87-94.
- Honfi, A. I., Morrone, O. & Zuloaga, F. O. (2021). Chromosome numbers and ploidy levels of some Paniceae and Paspaleae species (Poaceae, Panicoideae). *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 106(1), 234-244.
- Martínez E.J., C. L. Quarin & M. D. Hayward. (1999). Genetic control of apospory in apomictic *Paspalum* species. *Cytologia* 64, 425-433.
- Molero, J., Daviña J. R., Honfi A. I., D. Franco & Rovira, A. (2006). Chromosome studies on plants from Paraguay II. *Candollea* 61(2), 373-392.
- Morrone, O., Aagesen, L., Scataglini, M. A., Sallariato, D. L., Denham, S. S., Chemisquy, M. A. & Zuloaga, F. O. (2012). Phylogeny of the Paniceae (Poaceae: Panicoideae): integrating plastid DNA sequences and morphology into a new classification. *Cladistics*, 28(4), 333-356.
- Nogler G. A. (1984). Gametophytic apomixis. In: B.M. Johri, editor. Embryology of Angiosperms. Springer-Verlag, Berlin. pp. 475-518.
- Norrmann, G. A., Quarin, C. L. & Burson, B. L. (1989). Cytogenetics and reproductive behavior of different chromosome races in six *Paspalum* species. *Journal of Heredity*, 80(1), 24-28.
- Novo, P. E., Galdeano, F., Espinoza, F. & Quarin, C. L. (2019). Cytogenetic relationships, polyploid origin and taxonomic issues in *Paspalum* species: inter-and intraspecific hybrids between a sexual synthetic autotetraploid and five wild apomictic tetraploid species. *Plant Biology*, 21(2), 267-277.
- Oliveira R. C. & Valls J. F. M. (2008). Novos sinónimos e ocorrências em *Paspalum* L. (Poaceae). *Hoehnea*, 35, 289-295.
- Ortiz, J. P. A., Quarin, C. L., Pessino, S. C., Acuña, C., Martínez, E. J., Espinoza, F. & Pupilli, F. (2013). Harnessing apomictic reproduction in grasses: what we have learned from *Paspalum*. *Annals of Botany*, 112 (5), 767-787.
- Pozzobon M. T., J. F. M. Valls & S. Dos Santos. (2000). Contagens cromossômicas em espécies brasileiras de *Paspalum* L. (Gramineae). *Acta Botanica Brasileira* 14 (2), 151-162.
- Pozzobon. M., Carvalho Machado, A. Vaio, J. F.M. Valls, Peñaloza, A. Santos, S. Côrtes, A. & Rua, G. H. (2008). Cytogenetic analyses in *Paspalum* L. reveal new diploid species and accessions. *Ciência Rural*, 38(5), 1292-1299.
- Pozzobon, M. T., Paganella, M. B., Santos, S. D. & Valls, J. F. M. (2013). Cytological and reproductive aspects in the Caespitosa group of *Paspalum*. *Ciência Rural*, 43, 2004-2010.
- Quarin C. L. (1977). Recuentos cromosómicos en gramíneas de Argentina subtropical. *Hickenia* 1, 73-78.
- Quarin C. L. & Norrmann G. A. (1987). Cytology and reproductive behavior of *Paspalum equitans*, *P. ionanthum*, and their hybrids with diploid and tetraploid cytotypes of *P. cromo-rhizon*. *Botanical Gazette* 148, 386-391.
- Quarin, C. L. (1992). The nature of apomixis and its origin in panicoid grasses. *Apomixis Newsletter* 5, 8-15.
- Reutemann A. V., Daviña J. R., Rua G. H. & Honfi A. I. (2019). Poaceae, *Paspalum* species. In: Marhold, K. (ed.), IAPT/IOPB chromosome

- data 31/11. *Taxon* 68(6), 1 – 7, E39 - E42.
- Reutemann A. V., D. H. Hojsgaard, E. J. Martínez, G. H. Rua, J. R. Daviña & Honfi A. I. (2020). Poaceae, *Paspalum* species chromosome data. In: Marhold & Kučera (eds), IAPT/IOPB chromosome data 33/12. *Taxon* 69(6), 1402, E41 - E44.
- Reutemann A. V., M. C. Perichon, F. Eckers, M. A. Sader, G. Paniagua, E. J. Martínez, J. R. Daviña, D. H. Hojsgaard & Honfi A. I. (2022). Chromosome numbers of *Paspalum* species. In: Marhold & Kucera (eds.) IAPT chromosome data 36/5, *Taxon* 71(5), E13 – E18.
- Rivarola Sena A., J. R. Daviña & A. I. Honfi. (2016). Poaceae. In: Marhold, K. (ed.), IAPT/IOPB chromosome data 23. *Taxon* 55: 1457, E11- E12.
- Rosengurt B., Arrillaga De Maffei B. y Izaguirre De Artucio P. (1970). Gramíneas uruguayas. Universidad de la República, Montevideo.
- Sartor, M. E., Quarin, C. L., Urbani, M. H. & Espinoza, F. (2011). Ploidy levels and reproductive behaviour in natural populations of five *Paspalum* species. *Plant Systematics and Evolution*, 293(1), 31-41.
- Schedler, M. (2019). *Diversidad genética en poblaciones naturales de especies poliploides sexuales del género Paspalum L. (Poaceae)*. [Doctorado en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales Universidad Nacional de Córdoba]
- Schedler, M.; Reutemann, A. V.; Hojsgaard, D. H.; Zilli, A. L.; Brugnoli, E. A.; Galdeano, F.; Acuña, C. A.; Honfi, A.I. & Martínez, E. J. (2023). Alternative evolutionary pathways in *Paspalum* involving allotetraploidy, sexuality, and varied mating systems. *Genes* 14, 1137.
- Siena, L. A., Sartor, M. E., Espinoza, F., Quarin, C. L. & Ortiz, J. P. A. (2008). Genetic and embryological evidences of apomixis at the diploid level in *Paspalum rufum* support recurrent auto-polyploidization in the species. *Sexual Plant Reproduction*, 21(3), 205-215.
- Urbani M. H., Quarin C. L., Espinoza F., Penteadó M. I. O. & Rodríguez I. F. (2002) Cytogeography a and reproduction of the *Paspalum simplex* polyploid complex. *Plant Systematics & Evolution* 236, 99–105.
- Vogt, C. (2011). Composición de la Flora Vascular del Chaco Boreal, Paraguay I. Pteridophyta y Monocotiledoneae. *Steviana* 3, 13-47.
- Zilli A. L., Hojsgaard D. H., Brugnoli E. A., Acuña C. A., Honfi A. I., Urbani M. H., Quarin C. L. & Martínez, E. J. (2014). Genetic Relationship Among *Paspalum* Species of The Subgenus Anachyris: Taxonomic and Evolutionary Implications. *Flora Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* 209, 604 - 612.
- Zuloaga F. O. y Morrone O. (2005). Revisión de las especies de *Paspalum* para América del Sur austral (Argentina, Bolivia, sur del Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay). *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden* 102, 1-297.
- Zuloaga, F. O., Morrone, O. y Pensiero, J. F. (2014). Gramineae VI. En: Ramella, L. y Perret, P. 2014. *Flora del Paraguay*. Paraguay. Editions des Conservatoire et Jardinbotaniques de la Ville de Genève.