

Tesis Doctoral

Estudios citogenéticos, bioquímicos y sistemáticos en algunas especies americanas del género *Bromus* (gramineae)

Naranjo, Carlos Alberto

1985

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the Master's and Doctoral Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Naranjo, Carlos Alberto. (1985). Estudios citogenéticos, bioquímicos y sistemáticos en algunas especies americanas del género *Bromus* (gramineae). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n1878_Naranjo

Cita tipo Chicago:

Naranjo, Carlos Alberto. "Estudios citogenéticos, bioquímicos y sistemáticos en algunas especies americanas del género *Bromus* (gramineae)". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1985.

http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n1878_Naranjo

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESTUDIOS CITOGENETICOS, BIOQUIMICOS Y SISTEMATICOS
EN ALGUNAS ESPECIES AMERICANAS DEL GENERO BROMUS (GRAMINEAE)

por CARLOS A. NARANJO

- 1878 -

ef. 2

Director: Prof. Dr. JUAN H. HUNZIKER

Lugar de trabajo: Lab. de Genética, Depto. de Ciencias Biológicas

Tesis presentada para optar al título de Doctor en Ciencias Biológicas

1985

1878

A mi familia

A mis amigos

AGRADECIMIENTOS

Agradezco sinceramente a todos los que han ayudado, directa o indirectamente al desarrollo de este trabajo y en especial:

Al Director de esta tesis, mi maestro, Prof. Dr. Juan H. Hunziker, por sus enseñanzas ejemplares, sus valiosos aportes, sugerencias y lectura del trabajo.

Al Ing. Agr. Carlos Itria por haber sugerido el tema.

A los Ing. Agr. Guillermo Covas y Guillermo F. Covas por el legado de materiales, valiosas y críticas sugerencias.

Al Dr. Otto T. Solbrig por las facilidades ofrecidas en el Gray Herbarium de la Universidad de Harvard (EEUU), donde fueron realizados parte de los estudios citogenéticos y cromatográficos.

Al Dr. G.L. Stebbins por las valiosas críticas y sugerencias que me hiciera durante su visita en 1979.

Al Dr. Gonzalo Gimenez Martín, Director del Centro de Biología Celular del Consejo Sup. de Inv. Cient., Madrid, España, donde se realizaron las mediciones del contenido de ADN.

A mi esposa, la Dra Lidia Poggio por su paciente, desinteresada y valiosa colaboración.

Al Centro de Tecnología y Ciencias de Sistemas, Universidad de Buenos Aires, donde fue desarrollado el programa de estudios de taxonomía numérica.

A la Universidad de Buenos Aires y a la Subsecretaría de Ciencia y Tecnología por apoyos económicos recibidos.

Por último deseo agradecer al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por su continuo apoyo como miembro de la Carrera del Investigador y como Becario Externo de Perfeccionamiento.

CONTENIDO

| | Página |
|--|--------|
| RESUMEN | 1 |
| <u>CAPITULO 1. INTRODUCCION GENERAL</u> | 5 |
| <u>CAPITULO 2. MATERIALES Y METODOS</u> | 8 |
| 2.1. MATERIALES | 8 |
| 2.2. HIBRIDACION Y POLIPLOIDIA ARTIFICIAL | 9 |
| 2.2.1. Obtención de híbridos | 9 |
| 2.2.3. Obtención de poliploides | 12 |
| 2.3. CITOGENETICA | 13 |
| 2.3.1. Obtención de preparados para estudios meióticos y mitóticos | 13 |
| 2.3.2. Medición del contenido de ADN, área y volumen nuclear | 13 |
| 2.3.3. Medición del porcentaje de viabilidad de polen y de ferti- lidad | 15 |
| 2.4. CROMATOGRAFIA DE COMPUESTOS FENOLICOS EN HOJAS | 16 |
| 2.4.1. Recolección del material para cromatografía | 16 |

| | Página |
|---|--------|
| 2.4.2. Obtención de los extractos | 16 |
| 2.4.3. Corridas cromatográficas | 17 |
| 2.4.4. Determinación de las características cromatográficas | 17 |
| 2.5. ELECTROFORESIS DE PROTEINAS SEMINALES | 19 |
| 2.6. METODOS NUMERICOS | 19 |

CAPITULO 3. CONSIDERACIONES SOBRE NOMENCLATURA, MORFOLOGIA
Y SISTEMAS REPRODUCTIVOS

| | |
|---|----|
| 3.1. EL GENERO <u>BROMUS</u> L | 25 |
| 3.1.1. Nomenclatura | 25 |
| 3.1.2. Clave para los subgéneros | 28 |
| 3.2. ESPECIES DE <u>BROMUS</u> ESTUDIADAS EN ESTE TRABAJO | 30 |
| 3.2.1. Nomenclatura | 30 |
| 3.2.2. Características morfológicas | 35 |
| A. Caracteres considerados | 35 |
| B. Estudio de taxonomía numérica | 36 |
| C. Clave para la determinación de las especies | 53 |
| 3.2.3. Distribución geográfica | 54 |
| 3.3. SISTEMAS REPRODUCTIVOS | 56 |
| 3.3.1. Introducción | 56 |
| 3.3.2. Prueba de autocompatibilidad | 62 |
| 3.3.3. Períodos y tipos de floración..... | 64 |

CAPITULO 4. HIBRIDACION INTERESPECIFICA Y LAS BARRERAS DE AISLAMIENTO

| | | |
|------|---|----|
| 4.1. | INTRODUCCION | 70 |
| 4.2. | ENUMERACION DE LOS CRUZAMIENTOS REALIZADOS E HIBRIDOS OBTENIDOS | 75 |
| 4.3. | MORFOLOGIA DE LOS HIBRIDOS | 77 |
| 4.4. | VIABILIDAD DEL POLEN Y FERTILIDAD DE HIBRIDOS Y SUS PROGENITORES | 85 |
| 4.5. | ANALISIS DE LOS MECANISMOS DE AISLAMIENTO Y ESTIMACION DE LA CRUZABILIDAD | 89 |

CAPITULO 5. CITOGENETICA

| | | |
|--------|---|-----|
| 5.1. | INTRODUCCION | 95 |
| 5.2. | COMPORTAMIENTO MEIOTICO EN PROGENITORES, HIBRIDOS Y POLIPLOIDES | 102 |
| 5.2.1. | F_1 <u>B. catharticus</u> x <u>B. brevis</u> y su alododecaploide | 102 |
| 5.2.2. | F_1 <u>B. bonariensis</u> x <u>B. catharticus</u> | 113 |
| 5.2.3. | F_1 <u>B. parodii</u> x <u>B. catharticus</u> y su recíproco | 121 |
| 5.2.4. | F_1 <u>B. brevis</u> x <u>B. bonariensis</u> y su recíproco | 126 |
| 5.2.5. | F_1 <u>B. parodii</u> x <u>B. brevis</u> | 131 |
| 5.3. | CONTENIDO DE ADN, AREA Y VOLUMEN CELULAR | 135 |

CAPITULO 6. ELECTROFORESIS DE PROTEINAS SEMINALES Y CROMATOGRAFIA
DE COMPUESTOS FENOLICOS EN HOJAS

| | | |
|--------|---|-----|
| 6.1. | INTRODUCCION | 143 |
| 6.2. | ELECTROFORESIS DE PROTEINAS SEMINALES | 150 |
| 6.2.1. | Características electroforéticas y relaciones fenéticas en tre las especies de <u>Bromus</u> estudiadas | 150 |
| 6.2.2. | Adición de proteínas en híbridos F ₁ y alopoliploides arti- ficiales en <u>Bromus</u> | 159 |
| 6.2.3. | Perfiles electroforéticos en especies diploides (subgénero Festucoides) y octoploides (subgénero Ceratochloa) | 163 |
| 6.3. | CROMATOGRAFIA DE COMPUESTOS FENOLICOS EN HOJAS | 168 |
| 6.3.1. | Cromatografía y relaciones fenéticas entre las cuatro espe- cies de <u>Bromus</u> del subgénero Ceratochloa | 168 |
| 6.3.2. | Cromatografía en algunos híbridos y poliploides de <u>Bromus</u> . A. <u>B. catharticus</u> x <u>B. brevis</u> , en las generaciones F ₁ , F ₂ y F ₃ | 179 |
| | B. <u>B. catharticus</u> - <u>B. brevis</u> , en las generaciones C ₁ y C ₂ .. | 183 |
| 6.3.3. | Cromatografía en <u>B. uruguayensis</u> y <u>B. brachyantera</u> (subgé- nero Festucoides) y las relaciones fenéticas entre ellas y con las especies del subgénero Ceratochloa | 189 |
| 6.3.4. | Estimación del grado de adición de los flavonoides..... | 195 |
| 6.4. | RELACIONES ENTRE LAS CUATRO ESPECIES DEL SUBGENERO CERATO- CHLOA EN BASE A CARACTERES ELECTROFORETICOS Y CROMATOGRÁFI- COS | 197 |

| | Página |
|--|--------|
| <u>CAPITULO 7. DISCUSION GENERAL</u> | 206 |
| <u>BIBLIOGRAFIA</u> | 220 |
| APENDICE = Origen de los materiales estudiados | 240 |

RESUMEN

Se han realizado estudios morfológicos, citogenéticos y quimiotaxonómicos sobre cuatro especies hexaploides ($2n = 42$) de Bromus del subgénero Ceratochloa (B. catharticus, B. brevis, B. parodii y B. bonariensis). Mediante técnicas de taxonomía numérica se analizaron los caracteres exomorfológicos, electroforéticos (proteínas seminales) y cromatográficos (compuestos fenólicos en hojas).

Se han obtenido y estudiado cinco de los seis posibles híbridos artificiales interespecíficos (B. bonariensis x B. catharticus, B. catharticus x B. brevis, B. parodii x B. catharticus, B. parodii x B. brevis y B. bonariensis x B. brevis). La meiosis de las especies fue regular con formación de 21 bivalentes cerrados. Los híbridos presentaron, en general, meiosis muy regular pero con disminución significativa de bivalentes cerrados y de quiasmas respecto a sus progenitores. Los híbridos en que participa B. catharticus presentaron mayor irregularidad meiótica y la fertilidad en ellos fue muy baja (0 al 5%). Las irregularidades meióticas observadas no explicarían la alta esterilidad en estos híbridos. Los híbridos B. parodii x B. brevis y B. bonariensis x B. brevis fueron más fértiles (40% y 47%, respectivamente). La cruzabilidad entre las especies está correlacionada con la fertilidad de sus híbridos

y varió de 0 al 11%.

Además, se pudo obtener y estudiar el alododecaploide artificial B. catharticus - B. brevis ($2n = 84$).

En base a resultados citogenéticos, de fertilidad de los híbridos y de la cruzabilidad se puede inferir que las especies de los pares B. brevis-B. bonariensis y B. parodii - B. brevis, serían las más afines reproductivamente. B. catharticus estaría muy aislada, ya que todos los híbridos en que está involucrada muestran baja fertilidad y cruzabilidad. El aislamiento reproductivo entre B. bonariensis y B. parodii sería de prefertilización o debido a inviabilidad de la cigota. Entre las otras especies sería postfertilización, incompletamente desarrollado entre la mayoría de ellas. La esterilidad de los híbridos sería cromosómica segregacional (heterocigosis para translocaciones e inversiones) siendo en la mayoría críptica. En algunos casos podría existir, además, esterilidad génica. La formación de hasta 7 IV (y 28 II, por apareamiento preferencial) en el alododecaploide indicaría que las especies progenitoras poseerían alta homología en uno de sus genomios básicos y serían aloploidos. En consecuencia se asigna a las especies progenitoras las siguientes fórmulas genómicas: B. catharticus ($AA B_1B_1 C_1C_1$) y B. brevis ($AA B_1^1B_1^1 C_1^1C_1^1$).

Al estudiar el contenido de ADN y volumen nuclear de cuatro especies de Bromus subgénero Ceratochloa se determinó que ellas diferían significativamente y se encontró alta correlación entre contenido de ADN y volumen nuclear. El contenido 2C de ADN en ellas es: B. bonariensis (14,55 pg), B. parodii (13,48 pg), B. brevis (12,87 pg) y B. catharticus (11,66 pg).

Los resultados de estudios exomorfológicos y quimiosistemáticos apoya

rían las relaciones obtenidas con los estudios citogenéticos, de fertilidad de los híbridos y del contenido de ADN. En especial indicarían que B. catharticus es la especie más diferenciada y evolucionada.

Cromatográficamente B. uruguayensis y B. brachyanthera (subgénero Festucoïdes) forman un grupo fenético separado del de las especies del subgénero Ceratochloa. Además estas dos especies muestran menor similitud cromatográfica que el par B. bonariensis - B. brevis. Considerando que B. uruguayensis y B. brachyanthera se encuentran bastante diferenciadas bioquímicamente y por el aislamiento reproductivo que existe (no se pudo obtener el híbrido) se recomienda mantenerlas como especies diferentes a pesar de la gran similitud morfológica entre ellas.

Se ha estudiado la adición de proteínas y de compuestos fenólicos en híbridos y poliploides. La adición de proteínas fue total mientras que en compuestos fenólicos hubo supresión y aparición de compuestos nuevos en los híbridos. Dentro de este estudio pudo verse que la electroforesis de las proteínas seminales apoya la hipótesis del origen de las especies octoploides del subgénero Ceratochloa.

Finalmente, los resultados indican que Bromus bonariensis sería la especie más primitiva, siendo perenne, estrictamente chasmógama, con mayor contenido de ADN y con distribución geográfica y ecológica más restringida. B. catharticus, por el contrario, sería la especie más evolucionada poseyendo características derivadas como ciclo de vida corto (anual o bianual), alto porcentaje de cleistogamia, el más bajo contenido de ADN y con distribución geográfica muy amplia. Además B. catharticus es la especie reproductivamente más aislada.

En una posición intermedia a las especies mencionadas se encuentran B. parodii y B. brevis. Esta última, por su alta cruzabilidad con las otras tres especies podría servir como especie "puente" que permitiría la transferencia artificial de genes de las tres especies a B. catharticus.

1 INTRODUCCION GENERAL

"In my opinion, the climax of flowering-plant evolution is represented by the grasses, which, in addition, are the most useful to man of all families".

G.L. Stebbins (1974)

El género Bromus (Gramineae) está representado por alrededor de 300 especies del Nuevo y Viejo Mundo. En América existen cinco secciones, de la cual Ceratochloa es la que posee distribución mas amplia y mayor número de especies. Hay especies hexaploides en Sudamérica, octoploides en Sud y Norteamérica y dodecaploides en Norteamérica. Existen varios estudios citogenéticos en las especies octoploides y dodecaploides (Stebbins, 1947a, 1949, 1981; Stebbins y Tobgy, 1944; Stebbins et al., 1944; Stebbins y Walters, 1949). En cambio son pocos los estudios que se ha realizado en las especies del complejo hexaploide Sudamericano relacionado con B. catharticus. Algunos estudios realizados por Stebbins (1949 a) y por Hall (1955) indicaron que dos híbridos entre especies hexaploides (B. catharticus, B. brevis) poseían meiosis regular y resultaron altamente estériles.

Dada la importancia que tienen las especies de este complejo por ser en su mayoría muy buenas forrajeras se decidió realizar un estudio de sistemática experimental con el propósito de establecer las relaciones filogenéticas entre estos taxones. La etapa inicial para encarar un estudio de esta naturaleza con-

sistió, necesariamente, en obtener todos los híbridos artificiales interespecíficos posibles para estudiar con ellos la cruzabilidad entre las especies por medio del estudio de todos los factores que determinan el intercambio génico potencial y en especial la fertilidad. Para ello se inició un plan de recolección de semillas de las diferentes especies y el cultivo de las mismas en el jardín experimental. Se planeó un estudio citogenético que incluye el comportamiento meiótico de las especies, en los híbridos artificiales y en los posibles alopoliploides sintéticos.

Los estudios quimiosistemáticos han demostrado ser excelentes auxiliares de los trabajos morfológicos, taxonómicos y citogenéticos en el establecimiento de relaciones filogenéticas. La aplicación de técnicas cromatográficas de compuestos fenólicos en hojas, desde los trabajos iniciales de Alston y Turner (1962, 1963) y los electroforéticos de proteínas seminales desde los de Hall (1959) han probado ser muy valiosos en estudios sistemáticos y evolutivos.

El empleo de técnicas de taxonomía numérica ha resultado de gran utilidad para la evaluación de un cúmulo elevado de datos, sean éstos de caracteres morfológicos o moleculares (Sokal y Sneath, 1965; Sneath y Sokal, 1973; Crisci y Armengol, 1983). La utilización de éstas técnicas en estudios quimiosistemáticos ha resultado un medio eficiente para evaluar similitudes y diferencias entre los taxones involucrados.

Con el objetivo de obtener la mayor diversidad de datos que puedan aportar información para el establecimiento de relaciones evolutivas entre las especies del complejo hexaploide que incluye a B. catharticus se encaró un plan de estudios multidisciplinarios y con tal fin se realizaron estudios exomorfológicos, citogenéticos, incluyendo medición del contenido de ADN nuclear, y moleculares sobre especies e híbridos artificiales. Con la ayuda de la taxonomía numérica se realizó el análisis y evaluación de los resultados.

El uso simultáneo de estos diferentes métodos han permitido llegar a ciertas conclusiones referentes a posibles tendencias evolutivas dentro de las especies hexaploides Sudamericanas del subgénero *Ceratochloa* y han hecho posible establecer cuales serían las especies presuntamente mas primitivas y las mas evolucionadas.

C A P I T U L O 2

MATERIALES Y METODOS

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. MATERIALES

La lista de los materiales señalando los números de herbario, de cultivo y el origen, se consignan en el Apéndice I. Los ejemplares de herbario se encuentran en el herbario de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Buenos Aires (BAFC) y un duplicado será depositado en el herbario del Instituto de Botánica Darwinion (SI). La mayoría de los materiales estudiados, incluyendo los híbridos y poliploides artificiales, fueron cultivados en el jardín experimental del Laboratorio de Genética, Departamento de Ciencias Biológicas, F.C.E.N., U.B.A.

2.2. HIBRIDACION Y POLIPLOIDIA ARTIFICIAL

2.2.1. Obtención de híbridos

Para la obtención de los híbridos se siguió el método usado por Stebbins y Tobgy (1944) con algunas modificaciones que se detallan a continuación:

a) Se seleccionó una panoja del progenitor femenino, con floración chas

mógama, en las cuales las anteras se encontraran amarillas pero no exertas, aproximadamente dos días antes que ocurra la antesis. En Bromus hay suficiente diferencia de tiempo entre la antesis de las espiguillas superiores e inferiores de la panoja. Todas las flores abiertas se cortaron antes de comenzar a castrar.

b) Se castraron las espiguillas de la siguiente manera: se sacaron con una pinza todos los antecios excepto los dos inferiores (se dejaron tres antecios si el material florífero fue escaso). Luego se apartó cuidadosamente la lemma de la palea con una pinza y se sacaron las anteras tomándolas por el ápice. Se castraron 20 a 40 espiguillas. Se sacaron de la inflorescencia todas las espiguillas no castradas.

c) Se colocó una estaca de bambú en la tierra lo más cerca posible a la planta, tratando de que la estaca fuera más alta que la inflorescencia emasculada. Se ató suavemente la caña florífera al bambú en dos o tres lugares, usando hilo de algodón.

d) Se seleccionó una panoja del progenitor masculino, con floración chasmógama, y se cortó la caña florífera lo más bajo posible. Se cortó de nuevo, a la altura del próximo nudo, bajo el agua en un tubo de vidrio de aproximadamente 25 mm de diámetro y 150 mm de largo.

e) Se colocó el tubo con la inflorescencia masculina al lado de la estaca que sostiene la caña castrada. Se ató el tubo a la estaca, de manera que la inflorescencia masculina quedara ligeramente más alta.

f) Se incluyeron ambas inflorescencias en una bolsa de tela avión de 15 x 40 cm y se ató ésta a la estaca, en la parte superior e inferior.

g) Se revisó el experimento todos los días hasta que los estigmas del progenitor polínico hubieran emergido y marchitado. Si la inflorescencia masculina se hallaba marchita, se la reemplazó con una nueva de la misma planta.

h) Después que todos los estigmas receptores se habían marchitado, se retiró el tubo e inflorescencia masculina, pero se mantuvo la inflorescencia castrada atada a la estaca, manteniéndola embolsada.

i) Dos semanas a partir de la fecha de polinización, se revisó el experimento para comprobar si se habían formado semillas. Cuando presentes, se cosecharon dos semanas más tarde.

En estas especies de Bromus existe, en general, doble tipo de floración, chasmogamia y cleistogamia (Ragonese y Marcó, 1941). La primera floración es chasmógama con anteras grandes (3 a 10 mm de longitud) y la segunda cleistógama con anteras chicas (0,4 a 0,8 mm de longitud). Durante la floración cleistógama las plantas no pueden usarse como progenitores femeninos por la imposibilidad de extraer las anteras (emascular) sin dañar el órgano femenino, pues las anteras son sentadas. Durante dicha floración cleistógama tampoco pueden usarse eficientemente como progenitores masculinos, por la escasa producción de polen y porque las flores permanecen cerradas. Los cruzamientos donde intervenía B. catharticus, ofrecieron mucha dificultad porque es la primera especie en florecer y cuando lo hacían las otras especies, B. catharticus ya había concluído su floración chasmógama. Para salvar esta dificultad se recurrió a la técnica de conservación de polen por desecación y en frío (Darlington y La Cour, 1976). En condiciones normales, desde el momento de maduración de polen (antesis) éste conserva su poder de germinación por tan solo 12 a 24 hs. Desecándolo a temperatura ambiente en ampolla, cerrándolo al

vacío y conservándolo a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, dicho poder germinativo se puede prolongar por más de 30 días. De esta forma se pudo salvar la dificultad de no coincidencia de las floraciones chasmógamas. En los casos en que fue necesario la conservación de polen, la fecundación artificial se realizó en el laboratorio para evitar presencia de polen extraño en el ambiente, colocando el polen sobre los estigmas receptivos con ayuda de un pincel pequeño de pelos suaves.

2.2.2. Obtención de poliploides

Las plantas fueron tratadas con una solución de colchicina al 2 ‰. Se realizó el tratamiento en plantas que habían concluido su floración, aproximadamente en el mes de abril o principio de mayo, el procedimiento usado es el siguiente:

a) Se desmonta la planta de la maceta y se lava el sistema radicular con agua corriente, tratando de mantener lo más íntacto posible el sistema radicular.

b) Se introduce el sistema radicular en un frasco de vidrio color caramelo de boca ancha de 1 lt., conteniendo solución de colchicina al 2 ‰. Se sostiene la mata, al cuello de frasco, con trozos de gomapluma o algodón. El tratamiento se realiza durante una noche (10 a 14 horas) a aproximadamente $20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

c) Terminado el tratamiento, se lava el sistema radicular con abundante agua corriente por 2 a 3 horas. Esto evita que la planta siga absorbiendo colchicina por más tiempo, lo que provocaría la muerte de la planta.

d) Se divide la mata en tantos macollos como sea posible y se plantan éstos en macetas individuales. Finalmente se estudian todas las plantas que

sobreviven, determinando, al florecer, si el tratamiento fue eficiente.

2.3. CITOGENETICA

2.3.1. Obtención de preparados para estudios mitóticos y meióticos

Las observaciones de cromosomas somáticos se realizaron en ápices de raíces provenientes de semillas o de plantas en macetas. Se realizó un pre-tratamiento a temperatura ambiente (18 a 20 °C) con solución 0,02 M de 8-hidroxiquinoleína durante 3 a 5 horas. La fijación se hizo en alcohol absoluto: ácido acético 3:1. Luego se hidrolizó con HCl 1 N a 60 °C durante 10 minutos. La tinción se hizo usando orceína acética al 2%.

Las observaciones citológicas en meiosis se realizaron en flores fijadas en líquido de Newcomer modificado (Hunziker, 1966a). Antes del aplasto de las anteras y la coloración, se dejó ablandar las espiguillas en alcohol 70%. La tinción se realizó con hematoxilina acética al 2% y citrato férrico al 1% como mordiente (Sáez, 1960; Núñez, 1968). Se usó carmín acético al 1% como colorante meiótico sólo con el propósito de observar los cuerpos nucleares (Walters, 1963).

Los preparados se sellaron con cemento sintético o con parafina y luego se hicieron permanentes por el método de congelamiento (Conger y Fairchild, 1953) y montaje en euparal o sandeural.

2.3.2. Medición de contenido de ADN, área y volumen nuclear

Tinción de Feulgen y Citofotometría: Apices de raíces de cada una de las muestras de Bromus, junto con ápices de raíces de Allium cepa c.v. "Ailsa

Craig" como testigo, fueron fijadas en alcohol absoluto-ácido acético en proporción 3:1 por más de 24 horas. Durante toda la técnica el testigo acompañó a cada una de las muestras. Luego de un lavado en agua destilada (10 minutos), fueron hidrolizadas en HCl 5N a 20 °C por 40 minutos (Fox, 1969). Al construir la curva de hidrólisis, se obtuvo una meseta de máxima coloración entre 35-50 minutos para Bromus y entre 30-40 minutos para A. cepa. Por ello fue seleccionado 40 minutos como óptimo para ambos materiales. Luego de la hidrólisis, se hicieron tres lavados en agua destilada (10 minutos c/u), seguidamente, fueron teñidos en Feulgen por 1 hora y a continuación se hicieron tres lavados en agua sulfurosa (10 minutos c/u). El reactivo de Feulgen fue preparado a temperatura ambiente según la técnica de Lillie (1951). Finalmente fueron lavados en agua destilada. La porción teñida de los ápices fue macerada sobre un portaobjeto estandar de 0,8/1,0 mm, en una gota de ácido acético 45% y cubierta con un cubreobjetos n° 1 1/2, se secó el exceso de ácido acético absorbiendo por los bordes con papel de filtro; no se hizo aplastamiento. Los preparados fueron hechos permanente por el método de congelamiento y montados en euparal, como los preparados mitóticos, según la técnica antes descrita. Las lecturas fueron hechas en un microdensitómetro scanning Vicker M85, dentro de los dos o tres días de hechos los preparados. El testigo fue usado para corregir las posibles variaciones en la intensidad de la tinción debidas a variaciones en la técnica, variaciones de mediciones en el aparato en diferentes días y para convertir las unidades arbitrarias en cantidades absolutas de ADN expresadas en picogramos (pg.); considerando el valor $2C = 33,55$ pg. para A. cepa (McLeish y Sunderland, 1961; Bennett y Smith, 1976).

De cada especie se estudiaron dos procedencias diferentes y de estas últimas tres o cuatro individuos (réplicas). De cada réplica se hicieron dos

preparados con el testigo en cada uno de ellos; sólo se midió el mejor de ellos. En cada preparado se leyeron 20 núcleos en telofase tardía (2C) del material de Bromus y de Allium, midiéndose además 5 núcleos en profase (4C) para control de los valores 2C. Cada núcleo se midió tres veces obteniéndose la media. Esta media y la del testigo correspondiente fueron usadas para obtener el valor de ADN en picogramos por núcleo medido.

Se realizó un análisis de varianza del contenido nuclear de ADN con el propósito de estimar las diferencias entre individuos, procedencias y especies diferentes. Además, se realizaron comparaciones entre medias por medio de los contrastes de Scheffé (1959).

Medición del área y volumen nuclear: Por cada medida de ADN, el microdensitómetro Vicker da una medida del área nuclear en unidades arbitrarias. Por lo tanto de cada núcleo se tomaron tres medidas de área y se calculó la media. Considerando al núcleo como una esfera y al área medida (A_n) como la del círculo que la genera, se calculó el volumen nuclear aplicando la fórmula $V_n = 4/3 \pi (A_n/\pi)^{3/2}$. Esta consideración, en el cálculo del volumen, provocaría una sobreestimación del valor real. Debido a que las mediciones se hacen en unidades arbitrarias y que el supuesto error es proporcional al valor del área, dicho error no afecta la comparación de los volúmenes relativos entre las especies.

2.3.3. Medición del porcentaje de viabilidad del polen y de fertilidad

La viabilidad del polen fue determinada en anteras maduras de flores frescas o de ejemplares de herbario, tiñéndolos con una mezcla 1:1 de glicerina y carmín propiónico al 1%. La determinación se hizo en base a por lo menos 500 granos de polen.

La fertilidad, expresada como % de flores fértiles, fue determinada por recuento de antecios con granos maduros en panojas maduras y la estimación se hizo en base a muestras de más de 500 antecios por planta.

2.4. CROMATOGRAFIA DE FLAVONOIDES EN HOJAS

2.4.1. Recolección del material para cromatografía

La recolección de hojas se realizó en plantas en cultivo. Se seleccionaron hojas maduras que no tuvieran síntomas de senectud, las que se recolectaron en forma individual y se secaron en estufa a 45 °C. En varios grupos de plantas se encontró variación estacional en la presencia de compuestos fenólicos en un mismo individuo (Naranjo et al., 1984). Los materiales de las especies estudiadas fueron coleccionados en la misma época, mientras que en algunos híbridos y poliploides artificiales se coleccionó materiales en épocas distintas. Esto último se tiene en cuenta al discutir los resultados pues aún no se han hecho estudios de variación estacional en Bromus.

2.4.2. Obtención de extractos

En general, se han seguido las técnicas cromatográficas desarrolladas por Mabry et al. (1970) y Markham (1982). Se molieron en molinillo 0,5 gr de hojas maduras secadas en estufa a 45 °C. Se extrajo en erlenmeyer de 50 ml con agitación periódica, y con 15 ml de Metanol:Agua (80:20), durante 3 horas a 18-20 °C. Luego se dejó sedimentar por 10-15 minutos. El sobrenadante se separó por medio de una pipeta Pasteur y se filtró en un balón de 30-50 ml. Seguidamente se concentró la muestra por evaporación, en evaporador rotativo al vacío, hasta sequedad total. Seguidamente se suspendió el extracto seco en

0,5 ml de agua destilada y se lavó con varias porciones de 2 ml de éter etílico hasta que la fase etérea no presentó fluorescencia al exponerla al UV. Con este último paso se pretendió eliminar las grasas y la clorofila.

2.4.3. Corridas cromatográficas

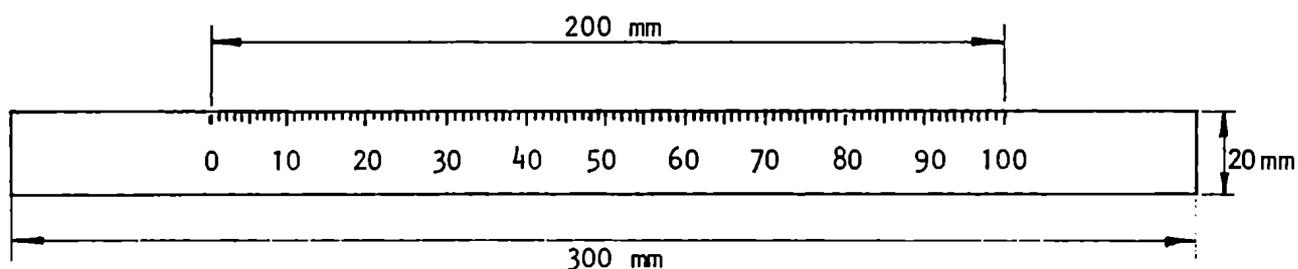
Se realizó cromatografía bidimensional descendente en papel. Se sembraron 50 a 100 μ g del extracto acuoso en papel Whatman N°3MM (46 cm x 46 cm). Las corridas se realizaron en cubas de madera con bandejas de acero inoxidable (Mabry et al., 1970). Las cubas se saturaron con el solvente respectivo, previamente a la corrida. La primera corrida se hizo en Terbutanol:Acido.Acético:Agua (TBA) en proporción de 3:1:1, hasta que el frente del solvente alcanzara 2,5 cm por debajo del borde del papel. Esta corrida duró aproximadamente 22 horas a 22-25 °C. La segunda corrida se realizó en Acido Acético:Agua (OHAc) en proporción 15:85, la cual duró aproximadamente 5 horas a 22-25 °C.

2.4.4. Determinación de las características cromatográficas de los compuestos

Los cromatogramas fueron analizados bajo luz ultravioleta (366 nm), marcando las manchas y determinando su color con exposición a vapores de amoníaco (NH_3) y sin ella. Luego se determinó el R_f característico de cada mancha en el primer y en el segundo solvente. Se hicieron varias corridas por individuo para probar la repetibilidad de los resultados. Además, fueron sembrados extractos de dos especies en proporción 1:1, cuando fue necesario verificar la similitud de algunas de las manchas cromatográficas.

Determinación del Rf: La movilidad cromatográfica de cada uno de los compuestos en cada uno de los dos solventes, se mide por su valor de Rf y es teóricamente, un caracter reproducible. El Rf se define como la distancia recorrida por el compuesto (desde el origen) dividido por la distancia recorrida por el frente del solvente (desde el origen). Para su determinación es, por lo tanto, necesario realizar ambas mediciones y luego su cociente.

Durante los trabajos de cromatografía realizados el autor de esta tesis ha ideado un nuevo método práctico de medición directa del Rf. Este consiste en usar una cinta de goma latex de aproximadamente 0,5 a 1 mm de espesor, 20 mm de ancho y 300 mm de largo. Sobre ella se construye una escala de 0 a 100, como se indica en la siguiente figura.



El modo de uso es muy simple. Se hace coincidir el 0 de la escala con la línea de origen y estirando la cinta desde el otro extremo, se hace coincidir el 100 con el frente del solvente. Con la cinta en esa posición, se lee el valor en que cae el centro de la mancha. Este último valor es el Rf del compuesto. Este valor de Rf, así obtenido, no posee mayor error que el que posee el obtenido por medio de las dos mediciones y su cociente. Este método ha sido puesto en práctica, además, en estudios cromatográficos realizados en Prosopis (Enus Zeiger y Naranjo, 1983; Naranjo et al., 1984) y en Vicia (Ferra

ri et al., 1981, en preparación).

2.5. ELECTROFORESIS DE PROTEINAS SEMINALES

Todos los pasos en la preparación de las proteínas deshidratadas para las corridas electroforéticas fueron hechas a 4 °C a partir de polvo obtenido moliendo en mortero de cuarzo 0,15 gr de semillas maduras (15-25 semillas) de cada material. Las proteínas fueron extraídas tres veces (1 hora cada una) usando 1 cc. de ácido acético 1/100 M cada vez. Luego de cada extracción se centrifugó a 10.300 g por 15 minutos y el sobrenadante fue liofilizado.

Los geles de poliacrilamida fueron preparados con Cyanagum al 7%, para un gel de 24 x 7 x 0,6 cm se utilizó 8,75 gr de Cyanagum en 125 cc de agua destilada más 0,083 cc de NNN'N tetrametilendiamina TMED y 0,83 cc de persulfato de amonio al 10% como catalizador. Posteriormente el gel fue equilibrado con buffer lactato de aluminio (0,05 M pH 3,1) al cual se agregó urea (3 M). Para la corrida fue usado un equipo de electroforesis horizontal de 12 pulgadas (E.C. Apparatus Corp. EC 401) provisto de circulación de agua fría a 5-6 °C. Como electrolito fue usado el buffer lactato de aluminio (0,05 M). Para el resto de la técnica fue seguido el procedimiento descrito por Hunziker (1969). La similitud de velocidad de migración de varias bandas proteicas de diferentes especies fueron confirmadas comparándolas corriendo una mezcla (50% + 50%) de las especies.

2.6. METODOS NUMERICOS

Para el procesamiento de datos con los métodos de la taxonomía numérica, se usó el programa NT-SYS desarrollado por Rohlf et al. (1982), en una com

putadora IBM 370 del Centro de Tecnología y Ciencia de Sistemas de la Universidad de Buenos Aires. Detalles de los métodos usados pueden encontrarse en Sokal y Sneath (1963), Sneath y Sokal (1973) y en Crisci y López Armengol (1983).

Se denomina unidad taxonómica operacional (OTU's) a la unidad taxonómica empleada. Esta puede variar (individuo, población, especie, género, etc.) y en nuestro caso se usa el nivel específico, considerando a cada una de las especies como una OTU's.

Los métodos de taxonomía numérica consisten en general de:

a) Determinación de las similitudes entre los OTU's, por medio del uso de diferentes coeficientes. La similitud se calcula a partir de una matriz básica de datos (MBD) compuesta por x OTU's e y caracteres.

b) A partir de los coeficientes calculados se construye una segunda matriz de similitud OTU x OTU.

c) Obtención de fenogramas a partir de la matriz de correlación con la aplicación de diferentes métodos de agrupamiento ("Clustering").

d) Se mide el grado de distorsión entre los valores de similitud del fenograma obtenido y los de la matriz original de similitud. Para ello se construye una nueva matriz de similitud, denominada cofenética, a partir del fenograma y luego se calcula un coeficiente de correlación del momento-producto entre la matriz original y la cofenética. Este coeficiente se denomina "coeficiente de correlación cofenético" (r); generalmente se ha encontrado que varían entre 0,6 y 0,95, y se ha podido demostrar empíricamente que valores superiores a 0,8 indican escasa distorsión entre ambas matrices (Sokal y Rohlf, 1962; Sneath y Sokal, 1973).

Coeficientes de similitud usados: La similitud entre dos OTU's se estima, por medio de los mencionados coeficientes. Estos coeficientes cuantifican las semejanzas entre los distintos OTU's de la MBD. Se los pueden clasificar en tres grupos: 1) coeficientes de asociación, 2) coeficientes de correlación y 3) coeficientes de distancia (Sokal y Sneath, 1963). En este trabajo se usan coeficientes de tipo 1 y 3.

Coeficientes de asociación: En estos coeficientes se tienen en cuenta: a = estados del carácter presentes en ambos OTU's; b = estados del carácter presentes en el primer OTU's y no en el segundo; c = estados del carácter presente en el segundo pero no en el primero y d = estados del carácter ausente en ambos OTU's.

a) Jaccard

$$S_j = \frac{a}{a + b + c}$$

En este coeficiente no se consideran las ausencias en ambos OTU's (d) como medida de similitud. Este coeficiente varía entre 0 y 1, siendo 1 el máximo de similitud conseguido.

b) "Simple Matching Coefficient" (SMC)

Es equivalente al de Jaccard, pero incluye los estados negativos.

$$SMC = \frac{a + d}{a + b + c + d}$$

Varía de 0 a 1, siendo 1 el máximo de similitud.

Coeficientes de Distancia

a) "Manhattan Distance" (D)

$$D = \sum_{i=1}^n \left[(X_{ij} - X_{ik}) \right]$$

b) "Taxonomic Distance" (TD)

$$TD = \sum_{i=1}^n \left[(X_{ij} - X_{ik})^2 \right]^{1/2}$$

En D y TD X_{ij} = valor del carácter i en la OTU j.

X_{ik} = valor del carácter i en la OTU k

n = número de caracteres.

Análisis de agrupamientos ("clustering"): En este trabajo se utilizan varios métodos para efectuar el agrupamiento:

a) Ligamiento promedio ("average linkage")

UPGMA ("unweighted pair group method using arithmetic averages")

WPGMA ("weighted pair group method using arithmetic averages")

b) Ligamiento simple ("Single linkage")

c) Ligamiento completo ("Complete linkage")

Congruencia taxonómica: La congruencia taxonómica es el grado de correspondencia entre diferentes clasificaciones de un mismo conjunto de organismos. Dos clasificaciones de un mismo conjunto de organismos son perfectamente congruentes si postulan los mismos grupos (Mickeych, 1978; Crisci y López Armengol, 1983; Crisci, 1984).

Se aplicaron diferentes métodos numéricos de clasificación que surgieron de la combinación de cada uno de los coeficientes con cada uno de los métodos de agrupamiento. Ninguno de estos métodos tiene más validez que otro (Sneath y Sokal, 1973), por lo que es conveniente la utilización de varios de ellos para minimizar los defectos del método y luego comparar los resultados viendo el grado de congruencia. Dichas congruencias valorizan las conclusio-

nes dado que son relativamente independientes de los métodos usados.

El estudio de la congruencia se encaró de manera experimental. Se realizaron variaciones que consistieron en:

a) variaciones de la metodología de clasificación, usando la misma fuente de caracteres.

b) variación de la fuente de caracteres (morfológicos, electroforéticos, cromatográficos, etc.).

La evaluación de la congruencia taxonómica se realizó por medio del cálculo del coeficiente de correlación (Sneath y Sokal, 1973) al comparar clasificaciones numéricas y mediante la comparación visual de los resultados en clasificación numérica o no numérica.

Análisis de componentes principales: Además de los métodos de agrupamiento mencionados, se pueden usar métodos de ordenación que permiten generar estructuras taxonómicas. Uno de los métodos de ordenación más difundidos es el análisis de componentes principales. Los fundamentos del mismo y la forma de aplicación están amplia y claramente discutidos por Sneath y Sokal (1973) y por Crisci y López Armengol (1983).

C A P I T U L O 3

CONSIDERACIONES SOBRE NOMENCLATURA, MORFOLOGIA
Y SISTEMAS REPRODUCTIVOS

3, CONSIDERACIONES SOBRE NOMENCLATURA, MORFOLOGIA Y SISTEMAS REPRODUCTIVOS

3.1. EL GENERO BROMUS L.

3.1.1. Nomenclatura

El género Bromus pertenece a la Familia Gramineae (Poaceae), Subfamilia Festucoideae, Tribu Festuceae. Con alrededor de 300 especies tiene su mayor distribución en Europa pero está representado en Asia, Africa y Norte-Centro y Sudamérica. El más reciente y cuidadoso tratamiento taxonómico y nomenclatorial del género Bromus es el realizado por Smith (1970). En la Tabla 3.1. se indican los nombres válidos de los distintos grupos de especies según si son tratados como géneros, subgéneros o secciones, de acuerdo a Smith (ibid.).

Smith (1970) reconoce sólo los seis primeros grupos (Tabla 3.1.), pues Smith (1969) incluye la única especie del grupo Boissiera en la Sect. Bromus bajo el nombre de Bromus pumilia (Trin.) Smith.

Smith (1970) comenta que no es muy grande el conocimiento de las afinidades de los seis taxones infragenéricos que reconoce, y que tales afinidades apoyan la idea de que ellos deben ser considerados como Secciones de

Tabla 3.1. Los siete grupos de especies de Bromus L. según Smith (1970) y Stebbins (1981)

| GENEROS | SUBGENEROS | SECCIONES |
|--|---|--|
| 1) <u>Bromus</u> L. | Bromus L. subg. <u>Bromus</u> | Bromus L. Secc. <u>Bromus</u> |
| 2) <u>Anisantha</u> C. Kock | subg. <u>Stenobromus</u> (Griseb.) Hackel | Secc. <u>Genea</u> Dumortier |
| 3) <u>Zerna</u> Panzer | subg. <u>Festucoides</u> (Coss. y Dur.) Hackel | Secc. <u>Pnigna</u> Dumortier |
| 4) <u>Ceratochloa</u> Beauv. | subg. <u>Ceratochloa</u> (Beauv.) Hackel | Secc. <u>Ceratochloa</u> (Beauv.) Griseb. |
| 5) <u>Nevskiiella</u> Kreczetovich y Vredensky. | subg. <u>Nevskiiella</u> Krecz. y Vreden | Secc. <u>Nevskiiella</u> (Krecz. y Vreden.) Tournay |
| 6) <u>Trisetobromus</u> Nevski | subg. <u>Neobromus</u> Shear | Secc. <u>Neobromus</u> (Shear) Hitcch. |
| 7) <u>Boissiera</u> Hochst. Steud. | subg. <u>Boissiera</u> (Hochst.) ex. Steud.) Stebbins | |

Bromus s.l. hasta que se puedan acumular más datos.

Stebbins (1981) reconoce los seis grupos de Smith (1970) pero los eleva a la categoría de subgéneros debido a que los cromosomas de algunas especies provienen de diferentes subgéneros y se ha probado que son casi no homólogos (lo que será discutido en el capítulo de citogenética). Además, Stebbins (1981) reconoce como subgénero a Boissiera (Tabla 3.1.).

Siguiendo la nomenclatura de Smith, por lo tanto, Stebbins (ibid.) reconoce siete subgéneros: Bromus subg. Bromus, subg. Stenobromus, subg. Festucoides, Subg. Ceratochloa, subg. Nevskiella, subg. Neobromus y subg. Boissiera. Los subgéneros Ceratochloa y Neobromus son nativos de Norte, Centro y Sudamérica; el subgénero Festucoides posee especies nativas en Norte, Centro y Sudamérica, pero tiene también muchos representantes nativos en Eurasia, África y Madagascar; el resto de los subgéneros poseen representantes nativos en Europa Occidental, Centro y Sudoeste de Asia, Irán y Afghanistan (Smith, 1970).

El subgénero Neobromus posee sólo una especie (B. trinii E.Desv.) nativa de las costas del Pacífico en Norte, Centro y Sudamérica.

El subgénero Ceratochloa posee alrededor de 16 especies. Hitchcock y Chase (1950) reconocen ocho especies en el complejo B. carinatus en Norteamérica: B. auleutensis Trin., B. arizonicus (Shear) Stebbins, B. breviaristatum Buckl., B. carinatus Hook. y Arn., B. marginatus Nees., B. maritimus (Piper) Hitchc., B. polyanthus Schibn. y B. sitchensis Trin. En Méjico y Centroamérica están presentes dos de ellas: B. carinatus y B. arizonicus (Soderstrom y Beaman, 1968). Este subgénero estaría representado en Sudamérica por siete especies (Stebbins, 1981): B. bonariensis Parodi et Cámara, B. brevis Nees, B. catharticus Vahl (citada por Stebbins como B. wildenowii Kunth.),

B. coloratus Steud., B. parodii Covas et Itria, B. stamineus E. Desv. y B. valdivianus Phil. Según Cámara Hernández (1978) a las especies mencionadas habría que agregar B. mango Desvaux., B. foukii Phil. y B. tunicatus Phil.

El subgénero Festucoides posee unas 32 especies en América (Cámara Hernández, 1970, 1978; Burkart, 1969; Longhi, 1977; Rosengurtt et al., 1970; Soderstrom y Beaman, 1968; Hitchcock y Chase, 1951; Pinto Escobar, 1981; Planchuelo, 1983). Para Norteamérica se han citado 17 especies y para Méjico y Centroamérica 10 especies. Para Sudamérica han sido citadas nueve especies: B. araucanus Phil., B. auleticus Trin. ex Nees, B. brachyanthera Doell., B. flexuosa Planch., B. lanatus H.B.K., B. pellitus Hack., B. pitensis H.B.K., B. uruguayensis Arech. y B. setifolius Presl.

3.1.2. Clave para los Subgéneros

En la Tabla 3.2. se presenta una clave para la determinación de los Subgéneros. En dicha clave se indican los caracteres morfológicos principales en los que se basa la separación de estos siete grupos. Para la confección de la clave se han tenido en cuenta los criterios y estudios de varios autores (Parodi, 1947; Hitchcock y Chase, 1951; Soderstrom y Beaman, 1968; Burkart, 1969; Cámara Hernández, 1970, 1978; Smith, 1970; Covas, 1981).

Tabla 3.2. Clave para la determinación de Subgéneros en Bromus

- A. Espiguillas con neta compresión en sentido lateral de glumas y lemmas que son carenadas o aquilladas. Plantas anuales o perennes. Norte, Centro y Sudamérica.
(6x, 8x, 12x) subg. Ceratochloa
- AA. Espiguillas redondeadas o algo comprimidas, lemmas nunca comprimidas ni carenadas.
- B. Plantas perennes; Gluma inferior 1-3-nervada, superior 3-5-nervada. Norte, Centro y Sudamérica y Europa.
(2x, 4x, 6x) subg. Festucoides
- BB. Plantas anuales.
- C. Espiguillas con pocas flores, pequeñas, menores de 10 mm de long., redondeadas cuando jóvenes, luego algo comprimidas; glumas angostas, la inferior 1-nervada, la superior 3-nervada. Europa.
(2x) subg. Nevskiella
- CC. Espiguillas con muchas flores, mayores de 10 mm de longitud; glumas anchas, la inferior 1-5-nervada, la superior 3-9-nervada.
- D. Arista recta o bifurcada, a veces pequeñas, no espiralizada, no articulada; los dientes de la lemma a veces delgados pero no aristados.
- E. Lemmas anchas, redondeadas, no acuminadas, sus dientes generalmente menores que 1 mm de longitud.
- F. Espiguillas levemente comprimidas; raquilla del 1er. antecio siempre menor que la 1/2 de la longitud de la lemma; lemma inferior 3-5-nervada, la superior 7-9-nervada. Aristas no aplanadas y rectas. Europa.
(2x, 4x, 8x) subg. Bromus
- FF. Espiguilla redonda; raquilla del 1er antecio de longitud mayor que la 1/2 de la longitud de la lemma; lemma inferior 5-nervada, la superior 5-9-nervada; aristas aplanadas y recurvas a la madurez. Europa.
(2x) subg. Boissiera
- EE. Lemmas angostas, gradualmente acuminadas, bífidas, los dientes de 2 a 5 mm de largo. Aristas usualmente mayores de 1,5 cm de largo. Europa.
(2x, 4x, 6x, 8x) subg. Stenobromus
- DD. Arista articulada, fuertemente espiralada en la parte inferior; dientes de la lemma aristados. Norte, Centro y Sudamérica.
(6x) subg. Neobromus

3.2. ESPECIES DE BROMUS ESTUDIADAS EN ESTE TRABAJO

3.2.1. Nomenclatura

A. Subgénero Ceratochloa (Beauv.) Hackel

Se tratan aquí algunos problemas nomenclatoriales y de sinonimias que han existido en relación a las cuatro especies sudamericanas que se estudian en este trabajo.

- 1) B. catharticus Vahl. (= B. unioloides H.B.K.) N.v.: "cebadilla criolla", "cebadilla australiana" o "cebadilla" en Sudamérica, "rescue grass" en EEUU y "praire grass" en Nueva Zelandia.

La conocida forrajera cebadilla criolla comienza a tener una historia nomenclatorial confusa cuando Hitchcock (1934) rehabilita para esta especie el binomio Bromus catharticus Vahl (Symb. Bot. 2:22. 1791) y pasa a la sinonimia el nombre B. unioloides H.B.K. (Nov. Gen. Sp. 1:151.1816). Parodi (1956) y Hubbard (1956) sugieren no aceptar la rehabilitación de B. catharticus Vahl, hecha por Hitchcock (ibid) y los argumentos son:

1. Que B. catharticus Vahl es una especie problemática de la que no existe el ejemplar tipo indiscutible que garantice la autenticidad de la especie.
2. Que la figura de Feuillée citada por Vahl para ilustrar la especie es una mezcla de dos plantas diferentes, ninguna de las cuales corresponde con la gramínea que se ha dado en llamar B. catharticus.
3. Que la especie que crece en Buenos Aires, coleccionada por Commerson, no es purgante como lo expresa el nombre específico aplicado por Vahl

y que copió el nombre prelinneo que le dió Feuillée.

En virtud de estas razones consideraron conveniente, para evitar ulteriores confusiones, declarar dudosa la especie descrita por Vahl (B. catharticus) y restablecer para la planta común en la Argentina el nombre de Bromus unioloides H.B.K.

Raven (1957) usa el nombre B. catharticus Vahl para la especie en cuestión, lo cual indica que no había podido enterarse de los trabajos de Parodi (1956) y Hubbard (1956). Tres años más tarde, Raven (1960) escribe un trabajo titulado "The correct name for rescue grass" (El nombre correcto para el pasto salvador). Este último nombre vulgar es con el cual se conoce en los Estados Unidos a B. catharticus (B. unioloides) como pasto forrajero introducido. P. Raven, en conocimiento de los trabajos de Parodi (1956) y de Hubbard (1956) y basándose en una observación que le hiciera Lloyd Shinnars sobre el trabajo de Hubbard, dice:

1. "Estoy de acuerdo con las conclusiones de este último, pero noté algunas discrepancias en la descripción original de B. unioloides. H.B.K. por lo cual decidí examinar el ejemplar tipo de la especie".
2. "Un examen de ese material confirmó mi suposición de que el tipo pertenecía a la misma especie que ha sido llamada Bromus haenkeanus (Presl.) Kunth, y no al más familiar pasto salvador ('rescue grass')".
3. "Como es mostrado en la sinonimia parcial, el primer nombre válido para el pasto salvador es B. willdenowii Kunth, basado en Festuca unioloides Willd".
4. "Un examen de un fragmento del tipo de esta especie, ha mostrado que es verdaderamente el familiar pasto salvador. Esta fue

sustancialmente la posición alcanzada por Chase (Contr. U.S. Nat. Herb. 24:183.1925), pero que fue pasada por alto por los trabajos posteriores".

5. "La especie andina debe ser conocida como B. unioloides H.B.K., mientras que el ampliamente diseminado y común pasto salvador está apropiadamente referido como B. willdenowii Kunth".

Por lo tanto, Raven (ibid) propone:

- a) llamar B. unioloides H.B.K. al conocido B. brevis Nees.
- b) llamar B. willdenowii Kunth a la cebadilla criolla o "rescue grass".

Por último, como comenta Covas (1981), la nomenclatura botánica de la cebadilla criolla ha sido aclarada, al parecer definitivamente, por Pinto-Escobar (1976, 1981) quien encontró en el Museo de París dos ejemplares de Bromus coleccionados por Dombé en Lima, Perú, que presumiblemente han sido los ejemplares sobre los que Vahl describió B. catharticus, nombre que tiene prioridad sobre B. unioloides H.B.K. y B. wildenowii Kunth. Respecto a la observación de Parodi (1956), quien señaló que la cebadilla criolla no es purgante, como lo consigna Vahl al describir la especie ("Gramen bromoides catharticum vulgo guilno"), lo que contribuía a dudar de la especie de Vahl, Cobas (ibid) señala que en repetidas oportunidades ha recogido la información de que la cebadilla criolla es buscada por los canes para purgarse; además señala que uno de los nombres vulgares que dan en Colombia a este pasto es "paja de perro", tal vez esté relacionado con la cualidad que se menciona. Para los rumiantes la cebadilla no parece tener el mismo efecto, ya que los bovinos y ovinos la consumen sin ninguna consecuencia (Covas, ibid).

Pinto-Escobar (1976, 1981) suministra la siguiente lista de sinónimos para B. catharticus Vahl (Symb. Bot. 2:22.1791):

Festuca unioloides Willd. Hort. erol. 3:tab.3. 1803.

Ceratochloa unioloides (Willd). Beauv. Agrost, 75.164; Expl. Pl.11, Tab. 15, Fig. 7.1812.

Bromus unioloides H.B.K. Nov. Gen. & Sp. 1:151.1816.

Bromus unioloides (Willd.) Raspail, Ann. Sci. Nat. 5:439.1825.

Bromus willdenowii Kunth. Revis. Gram. 1:134.1829.

Bromus strictus Broung. Voy. Aut. Monde 2(2):45.1831.

Visto lo que antecede, comparto la opinión vertida por Covas (1981) que el problema de la nomenclatura de la cebadilla criolla debe considerarse totalmente aclarado. Lamentablemente esta opinión no es compartida por Stebbins (1981) quien insiste en usar para esta especie el nombre B. willdenowii propuesto por Raven (1960). Con ello Stebbins (ibid) parece no reconocer el estudio y criterio de Pinto Escobar (1976, 1981), pues aunque no lo menciona, no lo debe desconocer debido a que Pinto Escobar es participante con Stebbins del mismo Simposio sobre Bromus donde publican cada uno un criterio diferente sobre la nomenclatura de esta especie (Pinto Escobar, 1981; Stebbins, 1981).

2) B. brevis Nees. ssp. brevis N.v.: "cebadilla pampeana"

Esta especie fue descrita por Nees (En Steudel, Syn. Plant. Gram.: 326.1855). No existen problemas nomenclatoriales excepto por el uso por parte de algunos autores del nombre B. haenkeanus (Presl.) Kunth (Enum.Pl., 1:416, 1833). Este último nombre es un sinónimo de B. catharticus Vahl, como lo señala Cámara-Hernández (1970).

Covas (1981) ha descripto para esta especie la subespecie festucaroides Covas et Millot. Esta subespecie difiere de la típica en que sus glumas, lemmas y cariopse no están comprimidos en sentido lateral. La compresión lateral mencionada es el carácter fundamental del Subgénero Ceratochloa. Pero dado que se encuentra toda una gama de variación que va desde las características de B. brevis ssp. brevis hasta las de B. brevis ssp. festucarioides, este hecho ha inducido al citado autor a considerar a esta última como una subespecie, mas bien que una especie diferente de B. brevis.

3) B. bonariensis Parodi et Cámara-Hernández. N.v.: "cebadilla serrana".

Especie descripta por Parodi y Cámara-Hernández (Parodi, 1962) en base al ejemplar L.R. Parodi N° 10329 (9/XI/32) proveniente de las Sierras de Curru-Malal, Prov. Buenos Aires. Los autores la mencionan como común en grietas húmedas de los cerros. Se trataba de una especie endémica de las sierras de La Ventana. Posteriormente, fue hallada en las Sierras de Lihuel-Calel, Prov. de La Pampa por P. Steibel, J. Cámara-Hernández y C.A. Naranjo.

4) B. parodii Covas et Itria. N.v.: "cebadilla intermedia"

Especie descripta por Covas e Itria (1968) en base a ejemplares de La Pampa, Anguil (cultivada de granos coleccionados en El Carancho, Depto. Ultra cán). Covas (1981) señala que esta especie ha sido hallada en suelos húmedos de la provincia fitogeográfica del Espinal y a orillas del arroyo de las sierras de Lihuel Calel, y agrega que es probable que se encuentre en otras áreas de nuestro país donde puede haber pasado inadvertida por su similitud con B. catharticus.

B. Subgénero Festucoides (Coss. & Dur.) Hackel

De este subgénero se mencionan aquí B. uruguayensis y B. brachyanthera por ser dos especies que se estudian cromosómica y cromatográficamente en este trabajo. El problema de nomenclatura se limita al diferente nivel taxonómico que distintos autores dan a estas dos entidades.

B. brachyanthera Doell (en Martius, Flora Brasil., 2(3):110.1878) y B. uruguayensis Arechavaleta (Las Gramin. Urug.:433, lám.64.1897) han sido mantenidas como especies distintas por Burkart (1969), pero consideradas como subespecies por Rosengurtt et al. (1970) y consideradas como variedades por Cámara-Hernández (1970) y Longhi (1977).

3.2.2. Características morfológicas

A. Caracteres considerados

Se ha realizado un estudio morfológico en las cuatro especies del subgénero Ceratochloa (B. catharticus, B. brevis, B. bonariensis y B. parodii). Para cada especie se han estudiado principalmente los mismos individuos que han sido usados como progenitores de los híbridos artificiales, en estudios citogenéticos, electroforéticos y cromatográficos. Los caracteres han sido obtenidos del estudio de 44 ejemplares de herbario: B. catharticus (14), B. brevis (12), B. bonariensis (8) y B. parodii (10). Los ejemplares estudiados representan de dos a cinco localidades diferentes para cada una de las especies.

En la Figura 3.1. A se muestra el aspecto general de cada una de las especies e interesa con ella mostrar las diferencias que presentan en cuanto a las inflorescencias secundarias (panojas). Corresponde aclarar que con la finalidad de poder mostrar en dicha figura todas las panojas de la planta, en el caso de B. catharticus y B. brevis las mismas fueron unidas por un anillo metálico o atándolas con hilo de algodón. Esto último alteró un poco el aspecto general de las inflorescencias de dichas especies, que se presentan naturalmente más expandidas radialmente.

En la Figura 3.1. B se muestra una inflorescencia primaria (espiguilla) de cada una de las especies citadas.

En la Tabla 3.3. se presenta la lista de los 18 caracteres considerados en este estudio. Los caracteres 1, 2 y 18 no han sido tomados en todos los ejemplares estudiados en cada una de las especies. El carácter 1 (perennidad) es un carácter difícil de determinar en ejemplares de herbario, pero ha sido determinado en materiales en cultivo y es un carácter constante para cada especie. El carácter 2 (tipo de floración, chasmogamia-cleistogamia) al igual que el carácter 1 se determinó en materiales cultivados y se verificó en los ejemplares de herbario analizados. El carácter 3 (Peso de la semilla) se lo determinó en aquellos ejemplares que estaban con frutos o en materiales de cultivo de la misma procedencia. Los restantes caracteres se los registró en todos los ejemplares de herbario estudiados.

B. Estudio de taxonomía numérica

Con el propósito de realizar una evaluación de las observaciones morfológicas se realizó con estos caracteres un estudio aplicando técnicas de

Fig. 3.1.: A = Aspecto general de las cuatro especies de Bromus subgénero Ceratochloa estudiadas (B. catharticus, B. brevis, B. bonariensis y B. parodii). Para referencia del aumento de esta foto, el diámetro de la maceta es de 22 cm.

B = espiguillas de las mismas cuatro especies.



B.cath.

B.brev.

B.bona.

B.paro.

A



B.cath.

B.brev.

B.bona.

B.paro.

B

Fig. 3.1

Tabla 3.3 Caracteres morfológicos considerados para cada OTU

| N° | Carácter y forma de tabulación |
|----|--|
| 1 | - Perenne (0), cortamente perenne (1), cortamente perenne o anual (2), <u>a</u> nual o bienal (3). |
| 2 | - Floración exclusivamente chasmógama (0), chasmogamia y cleistogamia alternada (1), exclusivamente cleistógama o alternada (2). |
| 3 | - Prefoliación plegada (0), plegada-convoluta (1), convoluta (2). |
| 4 | - Número de nudos del raquis principal de la panoja. |
| 5 | - Número total de espiguillas. |
| 6 | - Longitud del primer internodio basal del raquis principal (mm). |
| 7 | - Longitud del primer internodio basal de la ramificación del 2°nudo <u>ba</u> sal del raquis principal (mm). |
| 8 | - Número de ramificaciones en el 2° nudo basal del raquis principal de la panoja. |
| 9 | - Longitud de la espiguilla (mm). |
| 10 | - Ancho de la espiguilla (mm). |
| 11 | - Número de flores de la espiguilla (medido en la primera espiguilla <u>ba</u> sal de ramificación del segundo nudo basal del raquis principal). |
| 12 | - Longitud de la raquilla del 1er antecio (mm). |
| 13 | - Longitud de la gluma (mm). |
| 14 | - Ancho de la gluma (mm). |
| 15 | - Longitud de la lemma del 1er. antecio (mm). |
| 16 | - Ancho de la lemma del 1er. antecio (mm) |
| 17 | - Longitud de la arista de la lemma del 1er. antecio (mm). |
| 18 | - Peso de la semilla (mg). |

taxonomía numérica.

Los datos consistieron en los 18 caracteres registrados para cada una de las cuatro especies (OTU's). Los caracteres se han tabulado como se indica en la Tabla 3.3., usándose la media para los caracteres cuantitativos y registrándose la moda en los de variación discontinua cuando fue posible.

Los datos se presentan en la matriz básica de la Tabla 3.4., construída con los 18 caracteres y los 4 OTU's. Estos datos fueron analizados por dos métodos de agrupamiento y uno de ordenación.

Métodos de agrupamiento: La distorsión de cada método fue cuantificada en cada uno de los dos métodos empleados (Figura 3.2.). En ambos se utilizó el método de agrupamiento UPGMA mientras que se usó el coeficiente de distancia "Manhattan" en uno de ellos y Distancia Taxonómica en el otro. En la Figura 3.2. se muestran los fenogramas obtenidos. Ambos fenogramas sugieren las mismas relaciones fenéticas, siendo el par de especies B. brevis - B. parodii las más relacionadas y B. catharticus la especie más aislada. Es evidente, por simple comparación visual que los dos métodos aplicados produjeron resultados altamente congruentes.

Análisis de componentes principales (ACP): En base a la matriz básica de datos de la Tabla 3.4. se obtuvo una matriz de correlación de 18 caracteres x 18 caracteres y en base a ella se obtuvieron los Eigen-valor, porcentaje de traza y acumulación de porcentajes que figuran en la Tabla 3.5. Como puede observarse en esta última tabla el 100% de la variación de todos los caracteres está acumulada en los tres primeros componentes. La contribución de cada uno de los caracteres a cada uno de los tres componentes está indicada en la Tabla 3.6. Al analizar la Tabla 3.6. se ve que los seis caracteres

Tabla 3.4. Matriz Básica de Datos (MBD) para caracteres morfológicos

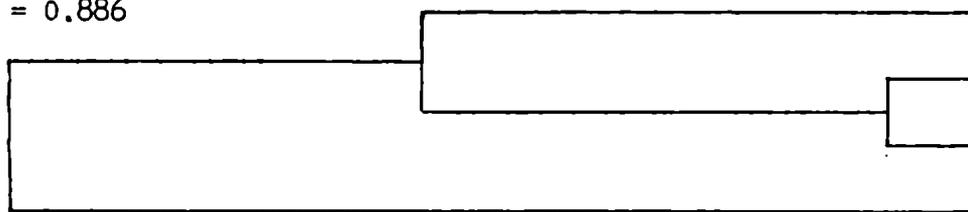
| Especies (OTU's) | Caracteres | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------------|------------|---|---|------|-------|-------|-------|------|-------|------|------|------|-------|------|-------|------|------|------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 |
| <i>B. catharticus</i> | 3 | 3 | 2 | 8,23 | 22,77 | 48 | 29,44 | 2,36 | 29,05 | 6,70 | 6,40 | 2,28 | 9,42 | 2,86 | 14,32 | 5,32 | 0,74 | 7,19 |
| <i>B. parodii</i> | 0 | 2 | 1 | 8,75 | 20,75 | 34,25 | 18,25 | 2,75 | 28,5 | 5,42 | 6,83 | 1,96 | 11,4 | 2,5 | 14,04 | 4,20 | 2,18 | 4,63 |
| <i>B. brevis</i> | 2 | 0 | 1 | 8,48 | 27 | 38,92 | 18 | 3,55 | 23,88 | 4,82 | 8,06 | 1,38 | 7,58 | 2,74 | 10,56 | 4,24 | 0,36 | 5,53 |
| <i>B. bonariensis</i> | 0 | 0 | 0 | 6 | 10,6 | 42,5 | 21 | 2 | 38,08 | 4,83 | 8,66 | 1,87 | 10,75 | 2,39 | 14,72 | 4,14 | 4,37 | 6,83 |

Fig. 3.2. Fenogramas obtenidos en base a 18 caracteres morfológicos. Coeficientes usados: T = Manhattan, TD = Distancia Taxonómica. Los dos fenogramas se obtuvieron por el método de agrupamiento UPGMA.

T / UPGMA

1.356 1.296 1.236 1.176 1.116 1.056 0.996 0.936

r = 0.886

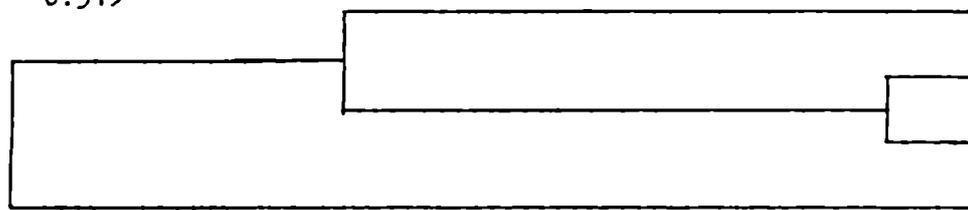


| OTU's | Nivel |
|----------------|-------|
| <u>B.bona.</u> | 0.160 |
| <u>B.brev.</u> | 0.946 |
| <u>B.paro.</u> | 1.337 |
| <u>B.cath.</u> | |

TD / UPGMA

1.530 1.470 1.410 1.350 1.290 1.230 1.170 1.110

r = 0.919



| OTU's | Nivel |
|----------------|-------|
| <u>B.bona.</u> | 1.370 |
| <u>B.brev.</u> | 1.121 |
| <u>B.paro.</u> | 1.513 |
| <u>B.cath.</u> | |

Fig. 3.2

Tabla 3.5 Valores del Eigen-Valor, porcentaje de traza y acumulación de porcentaje para cada uno de los tres componentes principales

| Componente | Eigen-Valor | Porcentaje de traza | Acumulación de porcentaje |
|------------|-------------|---------------------|---------------------------|
| 1° | 8,539 | 47,44 | 47,44 |
| 2° | 6,669 | 37,06 | 84,50 |
| 3° | 2,791 | 15,50 | 100 |

Tabla 3.6 Contribución de cada uno de los 18 caracteres a los tres componentes principales

| Carácter | Componentes | | |
|----------|-------------|--------|--------|
| | 1° | 2° | 3° |
| 1 | 0,899 | -0,027 | -0,437 |
| 2 | 0,717 | 0,472 | 0,514 |
| 3 | 0,986 | 0,063 | 0,156 |
| 4 | 0,686 | -0,523 | 0,507 |
| 5 | 0,756 | -0,652 | 0,067 |
| 6 | 0,450 | 0,638 | -0,625 |
| 7 | 0,644 | 0,728 | -0,237 |
| 8 | 0,287 | -0,958 | -0,005 |
| 9 | -0,653 | 0,742 | -0,151 |
| 10 | 0,812 | 0,555 | 0,182 |
| 11 | -0,784 | -0,233 | -0,575 |
| 12 | 0,347 | 0,876 | 0,335 |
| 13 | -0,469 | 0,584 | 0,662 |
| 14 | 0,954 | -0,140 | -0,264 |
| 15 | -0,197 | 0,925 | 0,324 |
| 16 | 0,854 | 0,503 | -0,133 |
| 17 | -0,866 | 0,498 | 0,041 |
| 18 | 0,190 | 0,701 | -0,688 |

que más contribuyen al primer componente son:

- 1 - Perennidad
- 3 - Tipo de prefoliación
- 5 - Número total de espiguillas
- 10 - Ancho de la espiguilla
- 14 - Ancho de la gluma
- 16 - Ancho de la lemma.

Los seis caracteres que más contribuyen al segundo componente son:

- 6 - Longitud del primer internodio basal del raquis principal
- 7 - Longitud del primer internodio basal de la ramificación del 2° nudo basal del raquis principal
- 9 - Longitud de la espiguilla
- 12 - Longitud de la raquilla del 1er. antecio
- 15 - Longitud de la lemma
- 18 - Peso de la semilla

Por último, los seis caracteres que más contribuyen al tercer componente son:

- 2 - Tipo de floración
- 4 - Número de nudos del raquis principal de la panoja
- 10 - Ancho de la espiguilla
- 12 - Longitud de la raquilla del 1er. antecio
- 13 - Longitud de la gluma
- 15 - Longitud de la lemma

En la Tabla 3.7. se dan los valores de la posición de cada OTU's

Tabla 3.7 Valor de la posición de cada OTU's en cada uno de los tres componentes principales

| Componente | OTU'S | | | |
|------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | <u>B. bona.</u> | <u>B. brev.</u> | <u>B. paro.</u> | <u>B. cath.</u> |
| 1° | -0,822 | 0,132 | -0,151 | 0,841 |
| 2° | 0,420 | -0,809 | -0,126 | 0,515 |
| 3° | -0,233 | -0,263 | 0,579 | -0,082 |

(especie) en cada uno de los tres componentes. La representación gráfica que permite visualizar las estructuras taxonómicas que este método genera, se pueden hacer en dos o en tres dimensiones. Las representaciones gráficas bidimensionales surgen de la combinación de a dos de los tres componentes. En la Figura 3.3. A y B se muestran dos de las representaciones bidimensionales. La representación gráfica tridimensional se basa en la combinación de los tres componentes y se muestra en la Figura 3.4.

Con este método (ACP) las relaciones entre OTU's se establecen por su proximidad en el espacio delimitado por los componentes; cuanto más próximos se encuentran, más relacionados están. Al analizar los dos gráficos bidimensionales (Figura 3.3.) y el tridimensional (Figura 3.4.) puede verse que las cuatro especies están todas suficientemente separadas lo que no permite establecer pares con neta afinidad. No obstante, en las Figuras 3.3. A y 3.4. puede verse que las especies más aisladas son B. bonariensis y B. catharticus, en especial esta última.

•
Fig. 3.3. Gráficos bidimensionales con la proyección de las OTU's en los tres componentes (I, II y III), tomados de a dos.
A = componentes I y II, donde está representada el 84,50% de la variación total (I = 47,44%; II = 37,06%).
B = componentes I y III, donde está representada el 62,94% de la variación total (I = 47,44%; III = 15,50%).

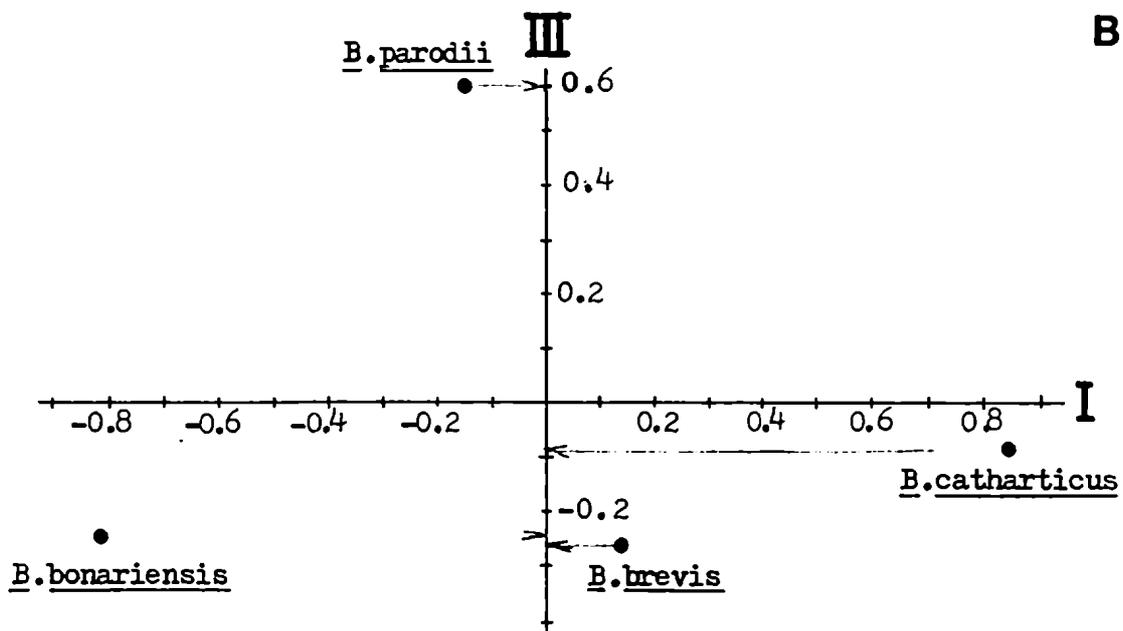
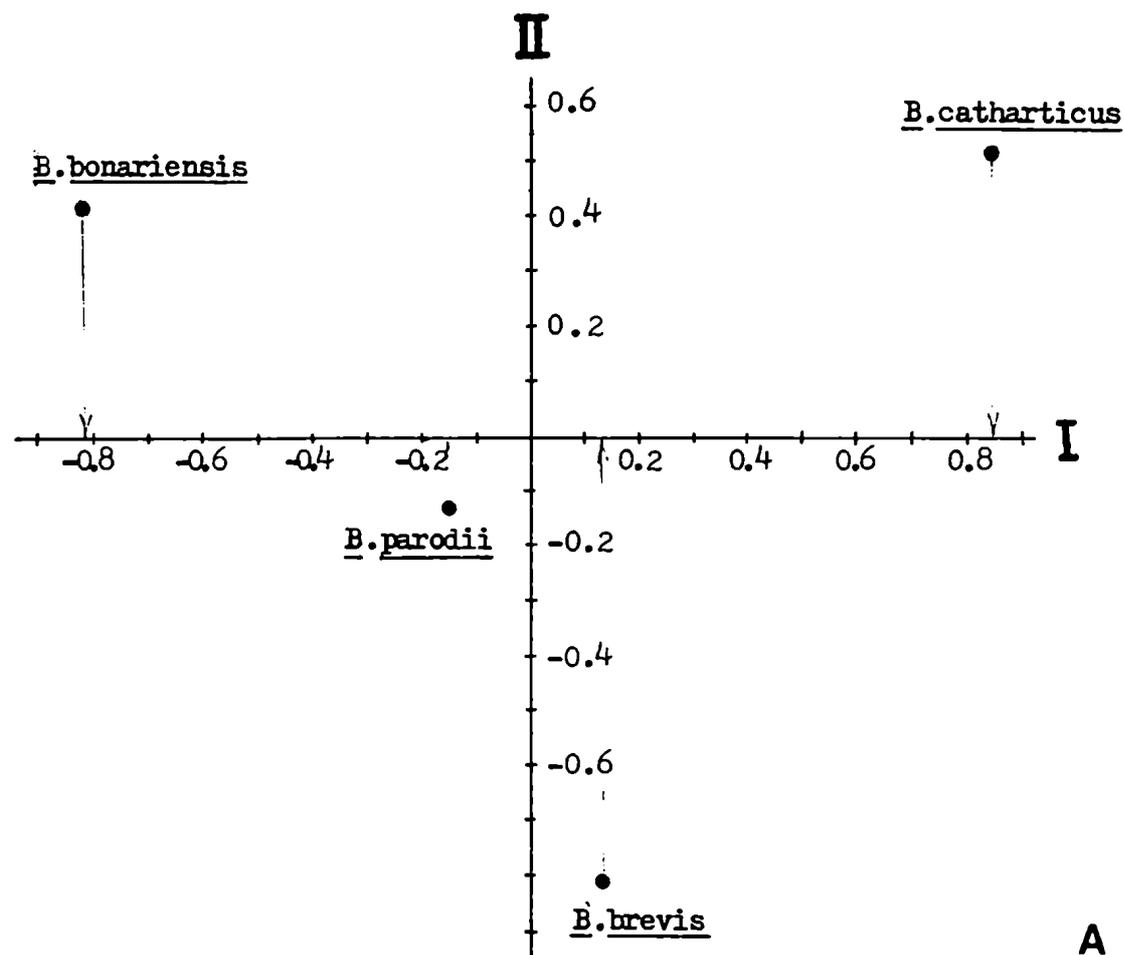


Fig. 3.3

Fig.3.4 Análisis de los componentes principales de las cuatro especies de Bromus consideradas.

Gráfico tridimensional con la proyección de las OTU en los tres componentes (I, II y III). Esta representación expresa el 100% de la variación. (I = 47,44%; II = 37,06% y III = 15,50%)

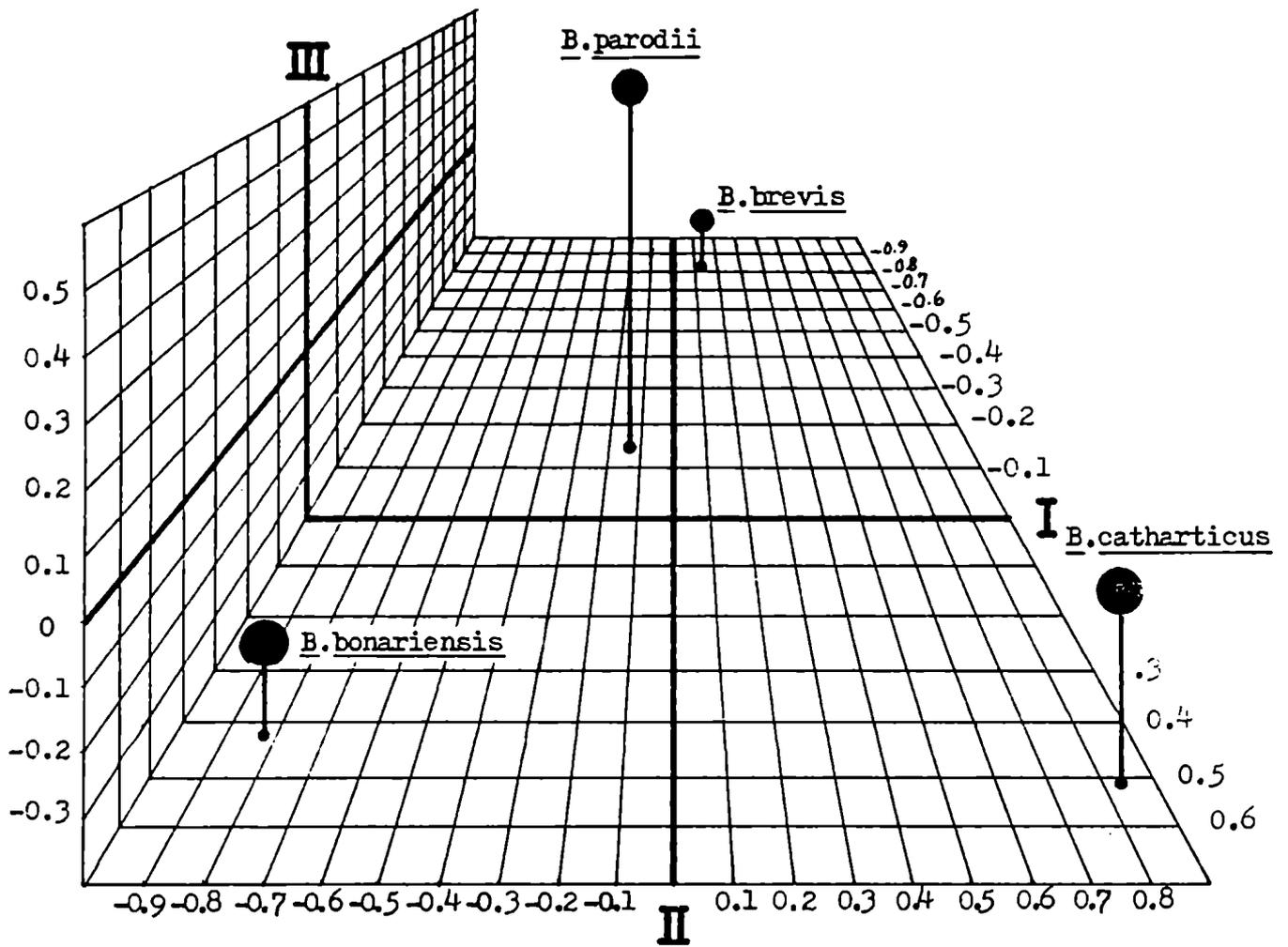


Fig. 3.4

C. Clave para la determinación de las especies

La siguiente clave ha sido elaborada en base a la propuesta por Covas (1981) con algunas modificaciones sugeridas por las observaciones realizadas en el presente trabajo.

A. Prefoliación convoluta. Anual o bienal. Floración chasmógama-cleistógama, predominantemente cleistógama.

B. catharticus

AA. Prefoliación plegada o plegada con los bordes de la lámina involutos.

B. Artejo de la raquilla menor de 1,5 mm de longitud. Lemma con arista generalmente menor de 0,5 mm de longitud.

B. brevis ssp. brevis

BB. Artejo de la raquilla mayor de 1,5 mm de longitud. Lemma con arista generalmente mayor de 0,5 mm de longitud.

C. Láminas foliares plegadas, con bordes involutos (plegada-convoluta). Panojas con ramificaciones erguidas. Chasmógama-cleistógama.

B. parodii

CC. Láminas foliares plegadas. Panojas piramidales con ramificaciones horizontales. Flores chasmógamas.

B. bonariensis

3.2.3. DISTRIBUCION GEOGRAFICA

En la sección 3.1.1. (p. 25) se menciona y señala la distribución del género Bromus, que es cosmopolita. El subgénero Ceratochloa (página 27) es americano y está constituido por alrededor de 16 especies, 8 del complejo octoploide de B. carinatus en Norteamérica, Méjico y Centro América, y 8 especies del complejo hexaploide "B. catharticus" en Sudamérica.

A continuación se discute la distribución geográfica de las cuatro especies hexaploides aquí estudiadas. Los comentarios que se realizan no constituyen el producto de un estudio profundo del problema, se basan sólo en algunas observaciones propias y observaciones realizadas por otros autores (Parodi, 1949; Soderstrom y Beaman, 1968; Burkart, 1969; Cámara Hernández, 1970; Rosengurtt et al., 1970; Longhi, 1977; Covas, 1981; Pinto Escobar, 1981).

B. bonariensis : Originalmente esta especie fue descripta como endémica de las sierras de Curru-Malal, Prov. de Buenos Aires (ver página 34). Posteriormente, fue hallada en las sierras de Lihuel-Calel, Prov. de La Pampa y recientemente parece habérsela hallado en las sierras de Tandil (Hunziker, J.H., comunicación personal). Esta especie tendría distribución restringida a las sierras de las Provincias de Buenos Aires y La Pampa. En las sierras se la encuentra en grietas húmedas conviviendo con helechos. Estaría aislada ecológicamente de las otras especies.

B. parodii: Se conoce aún poco sobre su distribución geográfica por ser una especie recientemente descripta (Covas y Itria, 1968). La descripción se realizó en base a materiales de El Carancho, Depto Ultracán, Provincia de La Pampa. Los autores de la especie y Covas (1981) comentan que ha sido hallada en suelos húmedos de la provincia fitogeográfica del Espinal y a orillas del arroyo de las sierras de Lihuel-Calel, Prov. de La Pampa y agregan que se encuentra en otras

áreas de nuestro país donde puede haber pasado inadvertida por su similitud con B.catharticus.

B.brevis: Es una especie de amplia distribución en las provincias fitogeográficas Pampeana, del Espinal y del Monte en la República Argentina, extendiéndose hacia el sur hasta Santa Cruz, hacia el este de la Provincia de Buenos Aires, hacia el oeste en la Prov. San Juan y hacia el norte hasta Jujuy. También ha sido citada para el noroeste de Sudamérica y Centroamérica en la provincia fitogeográfica Pacífica. Tendría por lo tanto una distribución disyunta. B.brevis aunque en general puede encontrársela aislada en las zonas más secas de las provincias fitogeográficas mencionadas, es simpátrica con B.catharticus en las zonas algo más húmedas.

B.catharticus: Sin lugar a duda es la especie de mayor distribución de las aquí consideradas. En relación a B.brevis, es menos tolerante a la sequía y está limitada hacia el sur a las zonas húmedas de la provincia fitogeográfica del Monte. En cambio hacia el este se extiende hasta Uruguay y el Sur de Brasil en la provincia fitogeográfica Pampeana. Hacia el oeste se la ha citado para el centro y norte de Chile en las provincias fitogeográficas de las Yungas y Subantártica. Hacia el norte se extiende hasta el noroeste de Sudamérica y Centroamérica. Su distribución parece continua desde la República Argentina hacia el norte a través de la provincia fitogeográfica del Desierto en Perú.

3.3. SISTEMAS REPRODUCTIVOS

3.3.1. Introducción

Las plantas superiores proveen un buen material para el estudio de la evolución de los sistemas genéticos que afectan el sistema reproductivo en las poblaciones (especialmente el porcentaje de fecundación cruzada), porque frecuentemente existen diferentes sistemas en especies relacionadas de un mismo género (Stebbins, 1957). En las gramíneas existe una gran diversidad de sistemas de reproducción sexual que van desde la autogamia hasta distintos tipos de alogamia (Connor, 1979). Según Stebbins (ibid) un buen ejemplo para estos estudios es el género Bromus. Algunas especies del viejo mundo como B. erectus Huds. y B. inermis Leyss. son autoincompatibles y equipadas para la fecundación cruzada con anteras largas exertas y largos estigmas plumosos. Otras, particularmente las perennes del nuevo mundo como B. grandis (Shear) Hitchc., B. laevipes Shear, B. purgans L. y B. anomalus Rupr. ex Fourn. tienen anteras largas o medianas, las cuales son usualmente exertas, pero estas especies son autocompatibles y pueden autofecundarse. Un tercer grupo de especies representadas por unas pocas perennes (B. ciliatus L.) y por las anuales de los Subgéneros Bromus y Stenobromus, son regularmente autopolinizadas debido a sus anteras pequeñas las cuales son raramente exertas; la alogamia es en estas especies un evento raro como lo señala Jain (1975) al calcular un 4% de alogamia para B. mollis L. Finalmente hay un grupo de especies del nuevo mundo, también autocompatibles, pertenecientes al Subgénero Ceratochloa que alternativamente producen flores con chasmogamia (CH) con anteras largas exertas y estigmas largos adaptadas para polinización cruzada y flores con cleistogamia (CL) con anteras cortas en las que la autofecundación

es obligada (Hackel , 1906; Hauman, 1917; Ragonese y Marcó, 1941; Harlan, 1945 a).

Hackel (1906) fue quien describió por primera vez la CL en B. catharticus, con anteras pequeñas de 0,5-0,7 mm y lodículas de 0,5 mm. La mayoría de los ejemplares, observados por este autor, eran CL y unos pocos CH con anteras largas hasta 3,5 mm y lodículas de 1 mm. Hackel, clasificó a esta especie como dimórfica con dos tipos de plantas diferentes: CH y CL y Stuckert (1906) cita por primera vez para Argentina las dos formas de Hackel: B. uniolooides H.B.K. f. typica cleistogama Hackel y B. uniolooides H.B.K. f. chasmogama Hackel . Fue Hauman (1917) quien observó que en setiembre la floración era CH y en octubre era CL puntualizando que no se trata de una especie dimorfa sino que son plantas CL facultativas.

En B. carinatus, Harlan (1945 a) describió la existencia de CH y CL en una misma planta y sugirió que la especie es CL facultativa. Señaló, además, que las condiciones ambientales óptimas para la floración inducían CH y las adversas CL, que ambos tipos de flores pueden aparecer en una misma panaja y que morfológicamente las flores CL difieren de las CH en que tienen reducción en el tamaño de las anteras, estigmas y lodículas.

Ragonese y Marcó (1941) describieron detalladamente para B. catharticus un sistema reproductivo semejante al de B. carinatus y señalaron que la primera floración es CH mientras las subsiguientes son CL. Posteriormente (Ragonese y Marcó, 1943) muestran que el fotoperíodo sería el factor ambiental determinante de uno u otro tipo de floración; fotoperíodo corto (10-12 horas) en la primera floración induce CH. Estos mismos autores señalaron que la prolongación artificial del fotoperíodo es capaz de adelantar en dos

semanas la floración e inducir la producción de CL en agosto. Pero la reducción artificial del fotoperíodo no fue suficiente para inducir la producción de CH en las segundas floraciones.

Langer y Wilson (1965) señalan que en B. catharticus, además del foto período corto es necesario una alta humedad en el suelo para producir CH. Ragonese y Marcó (1941) y Langer y Wilson (ibid) coinciden en que el tamaño de las anteras, filamento y lodículas son más cortas en la floración CL de B. catharticus.

La primera floración en B. catharticus puede ser directamente CL omitiéndose la floración CH, sin un fotoperíodo largo que la induzca, contrariamente a lo señalado por Ragonese y Marcó (1943). Esto fue observado por Pérez López (1975) quien obtuvo CL en primera floración sin ningún tratamiento fotoperiódico con sólo atrasar la fecha de siembra hasta los primeros días de junio. En poblaciones naturales y en cultivo, es muy frecuente que la primera floración sea CL, como será mostrado en la sección 3.3.3. del presente trabajo.

Respecto al tipo de floración y sistema reproductivo de las otras tres especies del Subgénero *Ceratochloa* (B. brevis, B. parodii y B. bonariensis) no se han realizado estudios detallados, aunque existen algunas referencias que se mencionan a continuación.

Covas e Itria (1968) en la descripción original de B. parodii señalan que la especie posee "Anteras hasta de 0,9 mm de long."; los autores no indicaron si la floración es CL o CH, aunque por el tamaño pequeño de las anteras probablemente la especie fue descrita en base a ejemplares CL. Posteriormente Covas (1981) señala que la floración es alternadamente CH y CL con

anteras largas y cortas respectivamente.

En B. brevis el único que ha hecho observaciones críticas sobre el tipo de floración fue Covas (1981), quien menciona para B. brevis ssp. brevis "La floración es alternadamente chasmógama o cleistógama; en el primer caso produce anteras largas exsertas, en tanto que en el segundo las mismas son cortas y quedan incluidas entre las glumelas". Para B. brevis ssp. festucaroides, Covas (ibid) señala: "En esta subespecie se observa alternancia de chasmogamia y cleistogamia".

Para B. bonariensis, Parodi (1962) en la descripción original de la especie menciona "Androceo de 3 estambres con anteras de 3 a 7 mm de largo", sin señalar que el largo de las anteras correspondería a floración CH.

En relación a la estructura reproductiva en poblaciones naturales de especies del Subgénero Ceratochloa se pueden citar los trabajos de Harlan (1945 b) en B. carinatus y los de Pérez López (1975), Cladera (1979) y Cladera y Pahlen (1984) en B. catharticus.

Harlan (ibid) presenta una hipótesis acerca de la estructura reproductiva de B. carinatus, explicando, en base a la condición de CL facultativa, la existencia de enjambres de razas locales. La autogamia (CL) es la regla y en una población local se presenta alta homocigosis, sin embargo híbridos interpoblacionales con alta heterocigosis ocurren ocasionalmente en panojas CH. Por autofecundación posterior, esta heterocigosis es reducida y en pocas generaciones uno o muchos recombinantes de los caracteres originales pueden establecerse como razas nuevas y uniformes restringidas en su variabilidad genética.

Pérez López (1975) analizó la variación para 17 caracteres morfológicos,

algunos con alta heredabilidad, en plántulas y plantas adultas en tres poblaciones de B. catharticus, concluyendo que la variabilidad en las progenies provenientes de floración CL es tan alta como la que se presenta en la progenie de individuos con floración CH.

Cladera (1979) y Cladera y Pahlen (1984) al estudiar la variación de esterases en las mismas poblaciones de B. catharticus estudiadas por Pérez López (ibid) encontraron que esta especie resulta predominantemente autofecundada. Vieron dos patrones, uno rápido (Est-R) y uno lento (Est-L); en la progenie de semillas colectadas en primavera (CH) los dos patrones aparecen en igual frecuencia y no hallaron patrones heterocigotas. Estos resultados no coincidirían con los obtenidos por Pérez López (1975) para caracteres morfológicos. Los autores no discuten estas diferencias, aunque Cladera (1979) aclara que los estudios de las esterases se hicieron después de un ciclo de autofecundación, lo cual redujo a la mitad el número de posibles heterocigotas.

Otros aspectos importantes sobre el sistema reproductivo de estas plantas pueden ser presentados al discutir las siguientes preguntas:

- a) ¿De qué forma puede ser estimado el grado de alogamia?
- b) ¿Es la cleistogamia (CL) y en cierta forma la autogamia en general una condición derivada?
- c) ¿Desde un punto de vista genético, qué significado evolutivo tiene la CL?

a) En relación a la forma de estimar el grado de alogamia, Cruden (1977) señala que la relación entre el número de granos de polen/óvulos (P/o's) en

plantas, incluyendo las gramíneas, refleja el sistema reproductivo y ellas pueden ser divididas en cinco clases que van de xenógamas con $P/o's = 5860$ a cleistógamas con $P/o's = 5$. Como las flores de gramíneas poseen un solo óvulo, el número y longitud de las anteras es un buen estimador de la relación $P/o's$ y refleja la variación en el sistema reproductivo (Cruden, 1977). Apoya esta última idea el que Campbell (1982) haya encontrado una gran correlación entre longitud de las anteras y el porcentaje medio de CH en nueve especies de Andropogon. Por otro lado en especies en que hay alternancia de CH y CL, es importante, para estimar el grado de alogamia, hacer una estimación previa del porcentaje de CH en cada ciclo de floración. Este último aspecto ha sido tenido en cuenta por Wilken (1982) al calcular el balance entre CH y CL en Callonia grandiflora (Polemoniaceae).

b) Stebbins (1957) argumenta, con ayuda de numerosos ejemplos, incluido el género Bromus, que la autogamia es una condición derivada. Sus argumentos están basados en estudios comparativos de morfología, distribución geográfica, sistema genético y la naturaleza de cambios mutacionales.

c) Campbell et al (1983) comentan críticamente, en base al aporte de numerosos autores, que la autofecundación y la autogamia son importantes en la limitación del flujo génico entre poblaciones, la preservación de combinaciones génicas que confieren alta adaptación a determinados ambientes, la fructificación de plantas aisladas como producto de dispersión a distancia y bajo condiciones adversas de polinización y reducción o eliminación del costo de la sexualidad a través del mantenimiento de una ventaja adaptativa sobre la asexualidad. Estos autores señalan, además, que la CL (autofecundación obligada en flores cerradas) intensifica las ventajas potenciales de la autogamia.

Campbell (1982) encontró, en un estudio sobre CL - CH en once especies de Andropogon, que los taxones con la mayor frecuencia de flores CL son también los más exitosos colonizadores de ambientes modificados. A conclusión semejante llega Cruden (1977) al analizar la adaptación de otras plantas autógamas. Campbell et al. (1983) señalan que alrededor del 60% de las especies de gramíneas con CL son colonizadores de ambientes modificados.

3.3.2. Pruebas de autocompatibilidad

Mientras se realizaron los cruzamientos interespecíficos, se hicieron algunas pruebas para confirmar la supuesta autocompatibilidad durante la floración chasmógama (CH) en cada una de las especies. Se utilizaron bolsas de tela de avión, iguales a las descritas para hibridación, con las cuales se cubrieron las panojas aproximadamente una semana antes de la antesis y hasta que los frutos se hubieran producido.

Los resultados de algunas de las pruebas se muestran en la Tabla 3.9., donde puede verse que todas las especies del Subgénero *Ceratochloa* son autocompatibles. La producción de semillas fue semejante a la de los testigos, a los que se mantuvo con una polinización abierta. En general se notó una aparente y pequeña disminución de producción de semillas en las plantas sometidas a la prueba. Esta disminución puede deberse a las perturbaciones producidas por el embolsado de la panoja, que, al alterar las condiciones naturales de polinización, pudo disminuir la producción de semillas. B. brachyanthera y B. uruguayensis, que pertenecen al Subgénero *Festucoides* y florecen siempre con flores chasmógama (CH), mostraron ser autocompatibles con elevados porcentajes de producción de semillas.

Tabla 3.9. Prueba de autocompatibilidad en especies de Bromus.

| Especie | N° de Cultivo ¹ | Autopolinización | | Polinización abierta | | Mes y año |
|-------------------------|----------------------------|--------------------------------|-------------------------|----------------------|-------------------------|-----------|
| | | Tipo de floración ² | % de semillas obtenidas | Tipo de floración | % de semillas obtenidas | |
| <u>B. catharticus</u> | 129/3 | CH | 83,2 | | | IX/71 |
| | 129/1,4,5,8 | | -- | CH | 97 | IX/71 |
| | 129/4 | CL | 95,7 | | -- | XI/71 |
| <u>B. brevis</u> | 125/6 | CH | 91,2 | -- | -- | IX/71 |
| | 125/3,4 | | -- | CH | 89 | IX/71 |
| <u>B. bonariensis</u> | 98/2 | CH | 90,4 | -- | -- | X/76 |
| | 98/1,2,3,4 | -- | -- | CH | 91 | X/76 |
| <u>B. parodii</u> | 634/2 | CH | 88,5 | -- | -- | XI/76 |
| | 634/1,2,3,4 | -- | -- | CH | 94,8 | XI/76 |
| <u>B. brachyanthera</u> | 620 /3 | CH | 87,2 | -- | -- | XI/76 |
| | 620 /1,2,3,4 | -- | -- | CH | 92 | XI/76 |
| <u>B. uruguayensis</u> | 638/1 | CH | 91,3 | -- | -- | XI/76 |
| | 638/1,2,3 | -- | -- | CH | 93,7 | XI/76 |

1: Además del N° de cultivo se indican los números de individualización de las plantas usadas

2: CH = chasmogamia , CL = cleistogamia.

En la Tabla 3.9. se muestra además los resultados de una prueba hecha en B. catharticus (Cult.129/4) en diciembre, cuando la floración es cleistógama (CL). La producción de semillas fue elevada, lo que indica la eficiencia de la autofecundación durante CL.

3.3.3. Períodos y tipos de floración

Durante los años 1971 y 1980, en que se mantuvieron cultivadas las especies en el jardín experimental, se ha acumulado suficiente información como para hacer un análisis sobre sus períodos y tipo de floración. Con motivo de la realización de cruzamientos artificiales y fijaciones de flores para estudios meióticos se puso gran atención en la búsqueda de la producción de floración CH, única útil para los fines mencionados por el gran tamaño de las anteras. En la Figura 3.5. se muestran los períodos y tipo de floración (CH-CL) . Es importante aclarar que los registros realizados para la confección de los períodos de la Figura 3.5. se han hecho en plantas con anteras maduras con lo cual podría considerarse que los períodos de floración se inician entre 2 y 3 semanas antes para cada especie. No obstante esto último, se insiste en fijar el inicio de floración en el momento de maduración de anteras (antesis) pues es en el cual se inicia la fecundación en cada una de las especies.

En tres de las especies (B. catharticus, B. brevis y B. parodii) hay alternancia de floración CH - CL (Figura 3.5.). Dichas floraciones se producen en las mismas plantas. Sólo en B. catharticus puede ocurrir que las plantas inicien su floración directamente en forma de CL , sin producción de CH en la primera floración; la frecuencia en que ocurre este último fenómeno se rá discutida en el punto 3.3.4. de este Capítulo. B. brevis y B. parodii, en cambio, siempre inician la floración en forma de CH (Figura 3.5.). En

Fig. 3.5. Períodos y tipos de floración en las cuatro especies estudiadas de Bromus, Subgénero Ceratochloa. Resultados de observaciones realizadas en material cultivado en un jardín experimental uniforme. La floración chasmógama (CH) y cleistógama (CL) se señalan con línea llena y de trazo respectivamente.

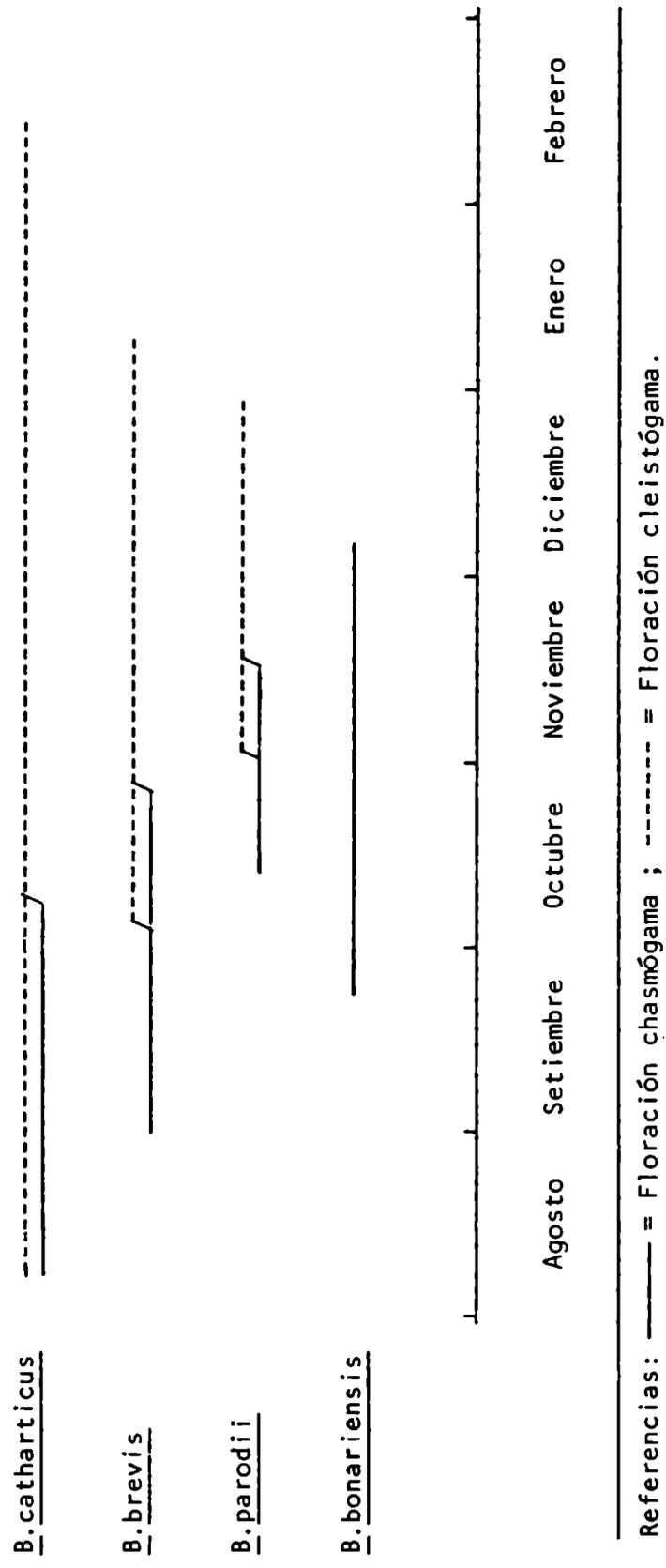


Fig. 3.5

B. catharticus, B. brevis y B. parodii, al finalizar el período de floración CH, se han observado inflorescencias con ambos tipos de flores (CH y CL), incluso entre flores de la misma espiguilla. Por último, B. bonariensis siempre produce flores CH, no habiéndose encontrado nunca indicios de floración CL.

Los límites propuestos en la Figura 3.5. para los períodos de floración son bastantes precisos en lo que se refiere a las floraciones CH, siendo excepcionales los casos en que los transgreden. En cambio son menos precisos los límites de floración CL, pues, por ejemplo en B. catharticus se han registrado, en determinados años, algunos individuos en poblaciones naturales con floración CL en marzo, abril y mayo, como también a fin de julio y principio de agosto.

En B. uruguayensis y B. brachyanthera (Subg. Festucoides) las floraciones son exclusivamente CH y al menos coinciden en los meses de octubre y noviembre en materiales cultivados. No se han registrado con precisión los límites de floración de estas dos especies.

3.3.4. Porcentaje de chasmogamia - cleistogamia en especies de Bromus

Como ya fue mencionado en la sección anterior B. brevis y B. parodii se produce alternancia de CH - CL pero la primera floración es siempre CH. En B. catharticus también existe alternancia de floraciones CH - CL pero en la primera floración puede fallar la CH, floreciendo directamente en forma CL. Con el propósito de cuantificar este último fenómeno se realizó un censo en 10 poblaciones de B. catharticus en el que se registró el porcentaje de plantas con floración CH y CL. En la Tabla 3.9. se presentan los resultados del análisis de un total de 293 plantas con un 8,89% de CH.

Tabla 3.9 Porcentaje de Cleistogamia - Chasmogamia en 10 poblaciones de B.catharticus, en la primera floración (Septiembre, 1984). Poblaciones 1 a 8 = Buenos Aires; poblaciones 9 y 10 = Ciudad de Corrientes.

| Población | Floración chasmógama % | Floración cleistógama % | Número de plantas analizadas |
|-----------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------------|
| 1 | 0 | 100 | 32 |
| 2 | 4 | 96 | 25 |
| 3 | 16 | 84 | 25 |
| 4 | 10 | 90 | 20 |
| 5 | 13,6 | 86,4 | 44 |
| 6 | 18 | 82 | 50 |
| 7 | 0 | 100 | 28 |
| 8 | 9,5 | 90,5 | 21 |
| 9 | 0 | 100 | 20 |
| 10 | 17,8 | 82,2 | 28 |
| Total | 8,89 | 91,11 | 293 |

CAPITULO 4

HIBRIDACION Y LAS BARRERAS DE AISLAMIENTO

4, HIBRIDACION Y LAS BARRERAS DE AISLAMIENTO

4.1. INTRODUCCION

Las especies están bien adaptadas al ambiente donde viven y la mayoría de los genotipos de sus individuos ocupan cimas adaptativas (Dobzhansky, 1970). La hibridación interespecífica y el gran intercambio y recombinación génica que produce, cuando los híbridos no son totalmente estériles, pueden romper las combinaciones génicas que confieren valor adaptativo a las especies. Estos hechos determinan un desperdicio gamético que disminuye el potencial reproductivo de las especies poco aisladas (Hunziker, 1978).

Las especies alopátricas, por habitar regiones no superpuestas, permanecen aisladas por sus diferentes distribuciones geográficas. En cambio, las especies simpátricas evitan la rotura de su integridad genética provocada por la hibridación interespecífica, mediante las barreras de aislamiento.

El grado de aislamiento no es necesariamente una función de la divergencia genética o la distancia taxonómica, aunque se encuentra una correlación positiva en la mayoría de los casos (Levin, 1978). El interés en el conocimiento de los mecanismos de aislamiento fue estimulado considerablemente cuando se intentó organizar sistemas de poblaciones dentro de grupos

taxonómicos, basándose en el concepto biológico de especie propuesto por Mayr (1963). Según Mayr (1963) las especies son grupos de poblaciones naturales que pueden reproducirse entre ellas y que están aisladas reproductivamente de otros grupos similares. Si la especie y especiación biológica son descritas en términos de aislamiento, entonces es esencial clasificar los mecanismos y estudiar su efectividad.

Los mecanismos de aislamiento en plantas han sido clasificados de varias maneras (Stebbins, 1950, 1958; Grant, 1963, 1981; Dobzhansky, 1970; Solbrig, 1968; Hunziker, 1978; Levin, 1978 y otros). Estos sistemas reconocen esencialmente las mismas clases de barreras y las agrupan en externas (prefertilización) e internas (postfertilización). Se presenta en la Tabla 4.1. el sistema de clasificación propuesto por Solbrig (1968), que es uno de los pocos que incluye el modo de reproducción como mecanismo de aislamiento como "4. Inbreeding and asexual reproduction" (4. autogamia y reproducción asexual; Tabla 4.1.). Este mecanismo es también incluido y ampliamente discutido por Levin (1978).

Con el término cruzabilidad, diferentes autores han expresado la factibilidad y éxito de un determinado cruzamiento interespecífico. Así Halloran (1981), entre otros, estima la cruzabilidad en base al porcentaje de semillas producidas en un determinado cruzamiento. Otros autores como Khush y Stebbins (1961), la estiman con el porcentaje de semillas híbridas que dan individuos que llegan a la edad reproductiva y, según estos autores, dicho porcentaje depende de 3 componentes: a) porcentaje de semillas híbridas obtenidas en relación al número de flores polinizadas; b) el poder germinativo de las semillas híbridas y c) porcentaje de híbridos que llegaron a la edad reproductiva.

Tabla 4.1. Mecanismos de aislamiento en plantas según Solbrig (1968)

| | | |
|-------------------|--|---|
| Prefertilización | Reducción del contacto | 1. Separación geográfica 2. Separación ecológica |
| | Reducción de la frecuencia de cruzamientos | 3. Incompatibilidad del polen (aislamiento gamético) 4. Autogamia y reproducción asexual 5. Polinizadores específicos (aislamiento etológico) 6. Diferentes períodos de floración (aislamiento alocrónico) |
| Postfertilización | Reducción de la formación de la cigota (<u>precigótico</u>) | 7. Aislamiento genético 8. Esterilidad de los híbridos |
| | Reducción del flujo génico a través de los híbridos (<u>poscigótico</u>) | 9. Debilidad de los híbridos o degeneración de su progenie 10. Falta de establecimiento de los híbridos (Aislamiento ambiental) |

Si con la cruzabilidad se pretende estimar la probabilidad real o potencial de flujo génico entre las especies, debería incluirse en su estimación la fertilidad de los híbridos. Es importante tener en cuenta esta última etapa, pues puede ocurrir, como en los híbridos naturales Hordeum jubatum x H. parodii (Hunziker et al, 1975) y Prosopis nigra x P. affinis (Naranjo et al , 1984), que aunque son muy frecuentes son total o altamente estériles, respectivamente. Según los criterios seguidos por Halloran (1981) y Khush y Stebbins (1961) entre las especies mencionadas existiría una muy alta cruzabilidad pero la baja o nula fertilidad de la F_1 limita el proceso de hibridación a dicha generación evitando la formación de generaciones híbridas posteriores. En estos casos la barrera de aislamiento está muy desarrollada en la esterilidad del híbrido F_1 .

En el presente trabajo se usará el término de cruzabilidad en un sentido amplio, incluyendo en su estimación 4 componentes:

- A) Porcentaje de flores que produjeron semillas híbridas.
- B) Porcentaje de germinación de las semillas híbridas.
- C) Porcentaje de híbridos que llegan a la edad reproductiva.
- D) Fertilidad del híbrido, expresada en porcentaje de semillas formadas.

Estos componentes representan diferentes etapas del proceso de hibridación y flujo génico en las cuales se pueden manifestar distintas barreras de aislamiento entre las especies.

Cuando no se conocen o no se han encontrado híbridos naturales, el medio que permite estudiar la cruzabilidad es intentar obtenerlos artificialmente.

Muchas veces, para obtener los híbridos artificiales, es necesario salvar barreras de aislamiento de prefertilización tales como : diferencias en el pe-
ríodo de floración (aislamiento temporal) o diferencias en el modo de repro-
ducción (cleistogamia - chasmogamia). En estos casos, en el momento de determi-
nar las relaciones entre las especies por medio de la cruzabilidad, deberán
considerarse también las posibles barreras de aislamiento de prefertilización,
que estarán disminuyendo la cruzabilidad real pero no la potencial.

Los estudios de cruzabilidad entre especies del género Bromus tienen
implicancias evolutivas y prácticas. La facilidad de hibridarse y formar hí-
bridos viables y no totalmente estériles son los requisitos para la intro-
gresión entre especies en la naturaleza, y la transferencia sistemática de
genes en el mejoramiento realizado por el hombre.

La obtención de los híbridos artificiales es importante porque permi-
te hacer sobre ellos, además, otros estudios. Entre los más importantes pue-
den citarse:

a) Estudio del comportamiento meiótico de los cromosomas en el híbrido, lo que permite una estimación del grado de homología de los genomios de los progenitores.

b) Obtención de aloploidos por tratamiento con colchicina.

c) Estudio de la herencia de caracteres morfológicos, fisiológicos y bioquímicos.

d) Iniciar planes de mejora a través de retrocruzadas controladas y selección, en plantas con interés agronómico.

Los únicos antecedentes de híbridos naturales, entre las especies de

Bromus, es la existencia de presuntos híbridos B. catharticus x B. brevis citados por Itria (1958) para la provincia de La Pampa y por la Dra. A. M. Planchuelo (comunicación personal) para ciertas regiones del Centro de Argentina.

En este capítulo, además de describir las características morfológicas de los híbridos y poliploides artificiales, se estudiarán los mecanismos de aislamiento que determinan la cruzabilidad real y potencial de las especies en la naturaleza.

4.2. ENUMERACION DE LOS CRUZAMIENTOS REALIZADOS E HIBRIDOS OBTENIDOS

En la Tabla 4.2. se detalla la mayoría de los cruzamientos realizados durante las primaveras de los años 1971 al 1980. Los mismos fueron hechos en el jardín experimental del Laboratorio de Genética, F.C.E.N., Bs.As.

El éxito de los distintos cruzamientos fue diferente (Tabla 4.2.). Algunas hibridaciones aparentan ser difíciles o imposibles de obtener como B. parodii x B. bonariensis, B. uruguayensis x B. catharticus y B. uruguayensis x B. brachyanthera (Tabla 4.2.). El cruzamiento B. parodii x B. bonariensis o su recíproco fueron repetidos ocho veces (C18, C35, C38 al C43) con un total de 153 flores castradas y no se obtuvo ninguna semilla híbrida.

Durante el segundo año de vida del híbrido F₁ C9 B. bonariensis x B. catharticus, al tener una primera floración chasmógama, se lo pudo retrocruzar (usándolo como madre) con B. bonariensis (Cult. 98), no obteniéndose ninguna semilla en más de 250 flores supuestamente polinizadas. Este cruzamiento se realizó con el mismo método que los restantes, aunque, en este caso no se castró al híbrido C9 por tener polen altamente inviable, como se verá más

Tabla 4.2. Cruzamientos artificiales realizados

| Cruza- miento N° | Progenitores | | Fecha | N° de antecios castrados | N° de semillas obtenidas | N° de plantas F ₁ obtenidas |
|------------------------|------------------|--------------------|-------|--------------------------------|--------------------------------|---|
| | Femenino | Masculino | | | | |
| 1 | B.cath. (129/5) | x B.brev. (125/4) | IX/71 | 23 | 0 | - |
| 2 | B.cath. (129/1) | x B.brev. (125/8) | IX/71 | 18 | 1 | 1 |
| 3 | B.brev. (125/11) | x B.cath. (129/1) | IX/71 | 25 | 0 | - |
| 4 | B.brev. (125/10) | x B.cath. (129/2) | IX/71 | 20 | 0 | - |
| 5 | B.bona. (98/3) | x B.cath. (641) | X/76 | 13 | 1 | 0 |
| 6 | B.bona. (98/3) | x B.cath. (642) | X/76 | 7 | 0 | - |
| 7 | B.bona. (98/5) | x B.cath. (639) | X/76 | 10 | 0 | - |
| 8 | B.bona. (98/5) | x B.cath. (640)* | X/76 | 19 | 0 | - |
| 9 | B.bona. (98/2) | x B.cath. (643)* | X/76 | 15 | 5 | 1 |
| 10 | B.bona. (98/4) | x B.cath. (644) | X/76 | 26 | 0 | - |
| 11 | B.cath. (642) | x B.bona. (98/5) | X/76 | 22 | 0 | - |
| 12 | B.cath. (639) | x B.bona. (98/3) | X/76 | 18 | 0 | - |
| 13 | B.paro. (634/7) | x B.cath. (644)* | XI/76 | 17 | 1 | 0 |
| 14 | B.paro. (634/1) | x B.cath. (645)* | XI/76 | 25 | 4 | 0 |
| 15 | B.paro. (634/3) | x B.cath. (646)* | XI/76 | 17 | 0 | - |
| 16 | B.paro. (634/2) | x B.cath. (646)* | XI/76 | 18 | 1 | 0 |
| 17 | B.paro. (634/4) | x B.cath. (646)* | XI/76 | 22 | 2 | 0 |
| 18 | B.paro. (634/7) | x B.bona. (98/7) | XI/76 | 14 | 0 | - |
| 19 | B.paro. (634/2) | x B.brev. (636/7) | XI/76 | 23 | 0 | - |
| 20 | B.paro. (634/3) | x B.brev. (636/1) | XI/76 | 19 | 0 | - |
| 21 | B.urug. (638/1) | x B.cath. (644) | X/76 | 12 | 0 | - |
| 22 | B.urug. (638/1) | x B.cath. (645) | X/76 | 16 | 0 | - |
| 23 | B.urug. (638/2) | x B.cath. (645) | X/76 | 15 | 0 | - |
| 24 | B.brac. (620/3) | x B.urug. (638/3) | XI/76 | 19 | 0 | - |
| 25 | B.brac. (620/4) | x B.urug. (638/1) | XI/76 | 11 | 0 | - |
| 26 | B.urug. (638/7) | x B.brac. (620/1) | XI/77 | 21 | 0 | - |
| 27 | B.brac. (620/3) | x B.urug. (638/2) | XI/77 | 17 | 0 | - |
| 28 | B.brev. (842/3) | x B.bona. (98/5) | X/78 | 19 | 2 | 2 |
| 29 | B.brev. (842/3) | x B.bona. (98/2) | X/78 | 24 | 7 | 7 |
| 30 | B.bona. (98/5) | x B.brev. (842/4) | X/78 | 20 | 2 | 1 |
| 31 | B.bona. (98/5) | x B.brev. (842/2) | X/78 | 25 | 1 | 1 |
| 32 | B.paro. (841/3) | x B.brev. (842/3) | XI/78 | 25 | 14 | 14 |
| 33 | B.paro. (840/4) | x B.brev. (842/2) | XI/78 | 28 | 11 | 11 |
| 34 | B.paro. (635/5) | x B.brev. (842/2) | XI/78 | 24 | 3 | 3 |
| 35 | B.paro. (840/3) | x B.bona. (98/4) | XI/78 | 18 | 0 | - |
| 36 | B.paro. (841/4) | x B.cath. (908/1)* | X/79 | 20 | 1 | 1 |
| 37 | B.cath. (908/3) | x B.paro. (841/4) | X/79 | 35 | 5 | 4 |
| 38 | B.paro. (840/4) | x B.bona. (98/2) | XI/79 | 22 | 0 | - |
| 39 | B.bona. (98/5) | x B.paro. (840/3) | XI/79 | 14 | 0 | - |
| 40 | B.bona. (98/5) | x B.paro. (840/3) | XI/79 | 36 | 0 | - |
| 41 | B.paro. (840/5) | x B.bona. (851) | XI/80 | 8 | 0 | - |
| 42 | B.paro. (840/6) | x B.bona. (851) | XI/80 | 21 | 0 | - |
| 43 | B.bona. (852) | x B.paro. (840/4) | XI/80 | 20 | 0 | - |

* = se utilizó polen conservado por desecación y frío.

adelante en este capítulo. Este experimento permite inferir que dicho híbrido C9 sería también ginoestéril.

Fueron dos los híbridos F_1 que se trataron con colchicina, para obtener sus aloploidos: el C2 B. catharticus x B. brevis y el C9 B. bonariensis x B. catharticus. Del híbrido C2 se obtuvo el alododecaploide B. catharticus - B. brevis (Cult. 144), mientras que el tratamiento del híbrido C9 falló no obteniéndose la esperada duplicación cromosómica.

4.3. MORFOLOGIA DE LOS HIBRIDOS

En los híbridos la mayoría de los caracteres morfológicos cuantitativos fueron intermedios respecto a los de los progenitores. Sin embargo, con respecto a varios caracteres los híbridos mostraron un fenómeno de vigor híbrido seguramente a causa de heterosis. En general los híbridos presentaron exuberancia y transgreden los límites de las líneas progenitoras, para el tamaño de la panoja, número de espiguillas por panoja, número de flores por espiguilla, etc. En la Figura 4.1 A se muestra el aspecto general del híbrido B. bonariensis x B. catharticus (Cruzamiento N°9); este ha sido uno de los híbridos más vigorosos con panojas de más de 1,5 m de alto. Sus espiguillas son más grandes que las de los progenitores, por el mayor tamaño de las flores (Figura 4.1 B). En este híbrido el número de flores por espiguillas llega a 14, siendo el máximo en sus padres 10 y 8 respectivamente.

En las Figuras 4.2 A y B se muestran los híbridos B. catharticus x B. brevis (C2) y B. parodii x B. brevis (C33) respectivamente. Estos híbridos al igual que los restantes, mostraron gran vigor.

En las Figuras 4.3 A y B. se muestran los híbridos B.bonariensis x B. brevis (C30), su recíproco (C28) y B.catharticus x B.parodii (C37), su recíproco (C36), respectivamente. Es interesante destacar que el híbrido B.bonariensis x B.brevis (C30) fue menos vigoroso que su recíproco (Fig. 4.3 A). Este híbrido (C30) es el único que mostró disminuido su vigor, probablemente por influencia del citoplasma materno (B.bonariensis). Como será discutido mas adelante los dos híbridos mencionados (C30 y C28) no presentaron diferencias en su fertilidad ni en el comportamiento meiótico de los cromosomas.

Fig. 4.1. A = Aspecto general del híbrido B.bonariensis x B.cathar-
ticus (C9) y de sus progenitores; el diámetro de las mace-
tas es de 22 cm. B = Aspecto de las espiguillas de] mismo
híbrido y de sus progenitores, en tamaño natural.



B. bonar.

B. bonar. x
B. cath. (C9)

B. cath.

A



B. bonar.

B. bonar. x
B. cath. (C9)

B. cath.

B

Fig. 4.1.

Fig. 4.2 A = Aspecto general del híbrido B.catharticus x B.brevis (C2) y de sus progenitores. B = Aspecto general del híbrido B.parodii x B.brevis (C33) y de sus progenitores. A y B con igual aumento, el diámetro de las macetas es de 22 cm.



B. cath.

B. cath. x
B. brev. (C2)

B. brev.

A



B. parod.

B. parod. x
B. brev. (C33)

B. brev.

B

Fig. 4.2

Fig. 4.3. A = Aspecto general del híbrido B.bonariensis x B.brevis (C30), de su recíproco B.brevis x B.bonariensis (C28) y el de sus progenitores. B = Aspecto general del híbrido B.catharticus x B.parodii (C37), de su recíproco B.parodii x B.catharticus (C36) y el de sus progenitores. A y B con igual aumento, el diámetro de las macetas es de 22 cm.



B. bonar.

B. bonar. x

B. brev. x

B. brev.

B. brev. (C30)

B. bonar. (C28)

A



B. cath.

B. cath. x

B. parod. x

B. parod.

B. parod. (C37)

B. cath. (C36)

B

Fig. 4.3.

4.4. VIABILIDAD DEL POLEN Y FERTILIDAD DE HÍBRIDOS Y SUS PROGENITORES

Durante el primer año de floración a cada uno de los híbridos se los cubrió con una carpa de tela de avión blanca, durante la floración, para evitar contaminación con polen extraño; de esta forma, las semillas cosechadas en ellos constituyeron una F_2 por autofecundación. Se supone que todos los híbridos son autocompatibles, porque la mayoría produjo semillas y porque todas las especies progenitoras lo son (ver capítulo 3,). Igual procedimiento se empleó para obtener la fertilidad del alododecaploide B. catharticus-B. brevis en su primera generación C_1 (Cult. 144).

En la Tabla 4.3. se consigna el porcentaje de viabilidad de polen y la fertilidad expresada como el porcentaje de flores con semillas maduras, de las especies progenitoras y en la primera generación de cada uno de los híbridos obtenidos.

En las especies progenitoras se midió la viabilidad de polen y la fertilidad, durante sus floraciones chasmógamas. En estas especies la viabilidad de polen varió de 76 al 93,3% y la fertilidad entre el 86 y el 97% (Tabla 4.3.).

El híbrido F_1 C9 B. bonariensis x B. catharticus en su primer año floreció en forma cleistógama. La viabilidad del polen en este híbrido fue de sólo el 2,4% y la fertilidad del 0% (Tabla 4.3.). En la Figura 4.4. A y B se muestra el aspecto que presentan los granos de polen, teñidos con mezcla glicerina-carmín propiónico (1:1), en este híbrido y en uno de sus progenitores.

En el híbrido F_1 C2 B. catharticus x B. brevis, tuvo una viabilidad de polen de 7,9% y una fertilidad de 2,8%. En la F_2 de este híbrido, la viabilidad de polen varió entre el 25 al 33%. El alododecaploide B. catharticus-

Tabla 4.3. Viabilidad de polen y fertilidad en semillas de los híbridos y sus progenitores

| Especies o híbrido | Nº Cult. o híbrido | 2n | % de viabilidad de polen | % de flores con semillas maduras |
|---|--------------------------|----|--------------------------------|--|
| <u>B. catharticus</u> | 129 | 42 | 86,2 | 97 |
| | 643 | 42 | 92 | 90 |
| | 908 | 42 | 93,3 | 98 |
| <u>B. brevis</u> | 125 | 42 | 79,2 | 89 |
| | 842 | 42 | 82,4 | 86 |
| <u>B. bonariensis</u> | 98/2 | 42 | 76 | 91 |
| | 98/3 | 42 | 80,5 | 93 |
| <u>B. parodii</u> | 841/4 | 42 | 92 | 93 |
| <u>B. bonariensis</u> x <u>B. catharticus</u> | C9 | 42 | 2,4 | 0 |
| <u>B. catharticus</u> x <u>B. brevis</u> | C2 | 42 | 7,9 | 2,8 |
| <u>B. catharticus</u> - <u>B. brevis</u> | 144 | 84 | 35,5 | 17,5 |
| <u>B. brevis</u> x <u>B. bonariensis</u> | C29 | 42 | 48 | 39 |
| <u>B. bonariensis</u> x <u>B. brevis</u> | C30 | 42 | 51 | 42 |
| <u>B. parodii</u> x <u>B. brevis</u> | C32 | 42 | 50 | 46,8 |
| <u>B. parodii</u> x <u>B. catharticus</u> | C36 | 42 | 6 | 3,48 |
| <u>B. catharticus</u> x <u>B. parodii</u> | C37/2 | 42 | 6,8 | 4,81 |

Fig. 4.4. A - C = Granos de polen teñidos con mezcla 1:1 de glicerina y carmín propiónico al 1%.

A = B.catharticus (Cult.643).

B = F₁ B.bonariensis x B.catharticus (C9).

A y B = Con igual aumento.

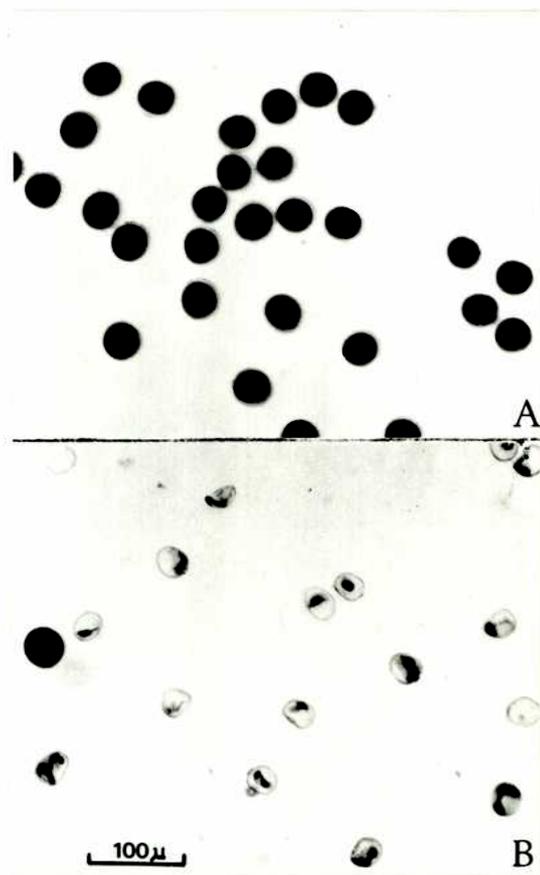


Fig. 4.4.

B. brevis en su primera generación C_1 (Cult. 144), tuvo una viabilidad de polen del 35,5% y una fertilidad del 17,5% (Tabla 4.3.). En la generación C_2 se notó un relativo aumento de la fertilidad, variando en las cuatro plantas estudiadas (Cult. 145/1 al 4) desde 28 al 58%.

4.5. ANALISIS DE LOS MECANISMOS DE AISLAMIENTO Y ESTIMACION DE LA CRUZABILIDAD

Al estudiar los mecanismos de aislamiento (ver clasificación en p. 72) entre las especies, corresponde analizar, en primer lugar, la existencia de mecanismo de prefertilización. En relación a los mecanismos que reducen el contacto (separación geográfica o ecológica) de las cuatro especies del subgénero *Ceratochloa* (B. catharticus, B. brevis, B. bonariensis y B. parodii) aquí estudiadas, B. bonariensis es la única que se puede considerar relativamente aislada ecológicamente. Como fue mencionado en el capítulo 3 (pags. 34 y 54), *B. bonariensis* se encuentra sólo en un ambiente particular en las Sierras de La Ventana y de Lihuel-Calel. B. catharticus, B. brevis y B. parodii, aunque poseen preferencias ecológicas distintas, se las ha encontrado creciendo juntas, de a dos, en varias regiones de nuestro país. Existen campos en el sur de la provincia de Santa Fé donde crecen juntas las tres especies (Rabasa, S.L., comunicación personal).

En cuanto a los mecanismos que reducen la frecuencia de cruzamiento entre las cuatro especies mencionadas, pueden citarse: a) distintos modos de floración (autogamia) y b) diferentes períodos de floración. En la Figura 3.5 (p.66), se mostraron las diferencias entre las especies respecto a estas características. Tres de las especies producen flores chasmógamas sólo al

principio de sus floraciones. Si se considera sólo el período de floración chasmógama, durante el cual es posible que ocurra fecundación cruzada, puede verse que estos períodos son distintos y la barrera de aislamiento temporal real se ve incrementada. Esto último es de mayor relevancia si se tiene en cuenta que a veces puede no existir floración chasmógama en B. catharticus. Por lo considerado, esta última especie es la que se encuentra más aislada temporalmente de las otras y, en especial, con B. parodii ya que los períodos de floración chasmógama de estas dos especies prácticamente no se superponen (Figura 3.5.).

Los períodos de floración han sido observados en cultivos realizados en un jardín uniforme, los cuales coinciden con algunas observaciones realizadas en el campo ; sin embargo, es probable que los períodos señalados en la Figura 3.5. se vean modificados en ciertos ambientes.

Las barreras de prefertilización existentes se han salvado al realizar los cruzamientos artificiales. Al cultivar a todas las especies en un jardín uniforme, se salvan las barreras ecológicas y geográficas. Las barreras temporales también pudieron ser salvadas, por ejemplo, al tratar de obtener el híbrido B. parodii x B. catharticus. Existía el inconveniente que B. catharticus florece, en general, más precozmente y sólo la primera floración suele ser chasmógama, no pudiendo ser esta especie usada para cruzamientos durante la floración cleistógama. Para salvar esta barrera, tuvo que conservarse polen desecado y frío de B. catharticus, el cual se usó con éxito al obtener el híbrido C36 B. parodii x B. catharticus (Tabla 4.2.). Además pudo también obtenerse el híbrido recíproco C37, al encontrarse una planta de B. catharticus excepcional con floración chasmógama tardía. Otros cruzamientos donde se usó también polen conservado de B. catharticus fueron los C8, C9, C13, C14, C15,

C16 y C17 (Tabla 4.2.).

El análisis de los mecanismos de postfertilización se lo hace basándose en los resultados de los cruzamientos realizados y las características de los híbridos obtenidos. En la Tabla 4.4., se indica los valores obtenidos en las 4 etapas o componentes (A, B, C y D) de la cruzabilidad en cada uno de los cruzamientos.

En la primera etapa (A), el porcentaje de flores que produjeron semillas híbridas se ve que es igual al 0% en tres cruzamientos (B. parodii x B. bonariensis, B. uruguayensis x B. catharticus y B. uruguayensis x B. brachyanthera). Esto determina, para estos cruzamientos, que la cruzabilidad sea 0%. La causa determinante de que en estos cruzamientos no se obtengan semillas, podría ser algún mecanismo que impida la formación de la cigota (aislamiento precigótico) o que una vez formada exista algún tipo de interacción génica que impida su desarrollo. En los otros cruzamientos la barrera en la etapa A está desarrollada pero es incompleta obteniéndose valores entre 1,2 y 23,4%.

En la etapa B (porcentaje de germinación de las semillas híbridas), son 2 los cruzamientos que tienen valores que son muy bajos en relación a los valores obtenidos en los progenitores, que varían del 95 al 100%. Estos cruzamientos son B. parodii x B. catharticus y B. bonariensis x B. catharticus con 35,7 y 16,7% respectivamente (Tabla 4.4.). Esto nos mide los fenómenos de interacción de los diferentes genomas en la F_1 , que provocarían cierta inviabilidad o disminución del poder germinativo. Es importante señalar que siempre, con la germinación de las semillas híbridas, se hizo germinar semillas de los progenitores que, cosechadas en la misma época que las

Tabla 4.4 Análisis de los resultados de los cruzamientos artificiales y cálculo de la cruzabilidad

| Cruzamiento ¹ | N° de cruzam. realizados | N° total de flores castradas | N° de semillas producidas | % de | | N° de semillas germinadas | % de | | Fertilidad % | cruza-bilidad |
|--------------------------|--------------------------|------------------------------|---------------------------|------------------------------------|-------------------------|---------------------------|------------------------------|------|--------------|---------------|
| | | | | flores que produjeron semillas (A) | semillas germinadas (B) | | híbridos en edad reprod. (C) | (D) | | |
| B.paro. x B.brev. | 5 | 119 | 28 | 23,5 | 100 | 28 | 100 | 46.8 | 11 | |
| B.bona. x B.brev. | 4 | 88 | 12 | 13,6 | 91,7 | 11 | 100 | 40.5 | 5.05 | |
| B.paro. x B.cath. | 7 | 154 | 14 | 9,1 | 35,7 | 5 | 100 | 4.15 | 0.13 | |
| B.bona. x B.cath. | 8 | 130 | 6 | 4,6 | 16,7 | 1 | 100 | 0 | 0 | |
| B.cath. x B.brev. | 4 | 86 | 1 | 1,2 | 100 | 1 | 100 | 2.8 | 0.03 | |
| B.paro. x B.bona. | 8 | 153 | 0 | 0 | --- | --- | --- | 0 | 0 | |
| B.urug. x B.cath. | 3 | 43 | 0 | 0 | | | | 0 | 0 | |
| B.urug. x B.brac. | 4 | 68 | 0 | 0 | | | | 0 | 0 | |

1 = Los resultados corresponden al cruzamiento y a su recíproco, en los casos en que fue realizado este último.

híbridas y en las mismas condiciones de germinación, lo hicieron en un porcentaje mayor del 95%.

En la etapa C (porcentaje de híbridos que llegan a la edad reproductiva) todos los cruzamientos, cuyas semillas híbridas germinaron, presentaron $C = 100\%$ (Tabla 4.4.).

En los 5 primeros cruzamientos (Tabla 4.4.) la fertilidad de los híbridos, expresada en porcentaje de semillas maduras formadas (etapa D) tuvieron valores que variaron de 0 a 46,8%, los cuales presentan diferencias importantes respecto a los progenitores que variaron entre 86 y 97% para esta característica.

C A P I T U L O 5

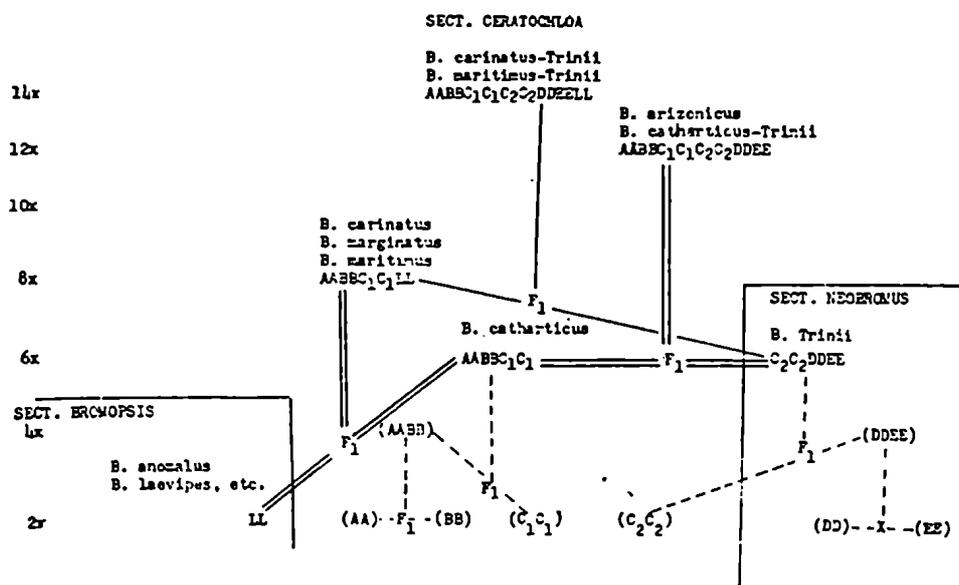
C I T O G E N E T I C A

5, CITOGENETICA

5.1. INTRODUCCION

El género Bromus, como la mayoría de los géneros de la Subfamilia Festucoideae, posee un número básico $x = 7$ y está constituido por series poliploides en la mayoría de sus subgéneros (Stebbins, 1981). En el subgénero americano Ceratochloa hay especies hexaploides, octoploides y dodecaploides. No existirían actualmente especies diploides y tetraploides. Actualmente los hexaploides se encuentran en Sudamérica, los octoploides en Sud y Norteamérica y los dodecaploides en Norteamérica. Stebbins y colaboradores han realizado una serie de trabajos sobre citogenética experimental en especies de este subgénero (Stebbins, 1947 a, 1949; Stebbins y Love, 1941; Stebbins y Tobgy, 1944; Stebbins et al., 1944; Stebbins y Walters, 1949; Hall, 1955; Walters, 1957). Encontraron que los niveles hexaploides y octoploides estaban formados por complejos de especies. En cada uno de ellos obtuvieron híbridos entre diferentes taxones y observaron que si bien mostraron meiosis regular eran altamente estériles. Los trabajos realizados por el grupo mencionado tuvieron como objetivo principal el establecer el origen y naturaleza de las especies octoploides norteamericanas del complejo B. carinatus y, consecuentemente, esclarecer la compleja sistemática del grupo. En el siguiente diagrama se

resumen los resultados más importantes.



Este diagrama que ha sido tomado de Stebbins y Walters (1949), muestra las relaciones filogenéticas de especies americanas del subgénero *Ceratochloa* con especies de los subgéneros *Festucoides* (como *Bromopsis*) y *Neobromus*. Las dobles líneas muestran los orígenes que fueron demostrados experimentalmente, las líneas simples el origen de dos aneuploides artificiales y las líneas punteadas el origen de especies tetraploides extinguidas y la participación de ellas en el origen de los hexaploides actuales.

Stebbins y Tobgy (1944) demostraron que en los octoploides del complejo *B. carinatus* estaban presentes los tres genomios (A B C) de *B. catharticus*. Esto lo pudieron deducir por el estudio del híbrido *B. catharticus* x *B. carinatus*, donde los cromosomas de *B. catharticus* se aparean con 21 cromosomas de *B. carinatus* y forman 21 bivalentes, quedando 7 univalentes grandes (L).

Además observaron que B. carinatus forma 28 bivalentes (21 bivalentes medianos y 7 bivalentes grandes). En este trabajo los autores postularon la hipótesis de que los 14 cromosomas grandes (LL) de B. carinatus podrían provenir de una especie diploide del subgénero Bromopsis. Stebbins (1947) al poder estudiar el híbrido pentaploide ($2n = 35$) B. marginatus x B. laevipes, el que forma 7 bivalentes grandes (LL) y 21 univalentes medianos (ABC) probó indirectamente la hipótesis antes mencionada. Con estos estudios quedaba establecido que los octoploides norteamericanos con fórmula genómica AA BB CC LL se originaron por alopoliploidía entre hexaploides (AABBCC) sudamericanos del subgénero Ceratochloa y diploides (LL) del subgénero Bromopsis (actualmente subgénero Festucoides).

Stebbins et al., (1944) al estudiar el número cromosómico de los diferentes taxones del complejo B. carinatus, que suponían debían ser todas octoploides ($2n = 56$) por los estudios previos (Stebbins y Love, 1941), encontraron que B. carinatus var. arizonicus Shear. era dodecaploide con $2n = 84$. En este mismo trabajo estudiaron el híbrido B. carinatus x B. arizonicus y señalaron que: a) B. arizonicus es una nueva especie, que posee $2n = 84$ mientras B. carinatus tiene $2n = 56$. b) La meiosis del híbrido forma regularmente un máximo de 7 trivalentes (+ 14 bivalentes medianos + 14 univalentes medianos + 7 univalentes grandes). Los 7 cromosomas grandes (L) de B. carinatus no tenían homólogos en B. arizonicus, los 14 univalentes medianos provenían de B. arizonicus y los 14 bivalentes medianos mostraban la existencia de dos genomas al menos homólogos (C_1 y C_2) entre ambas especies. c) Las evidencias citogenéticas demuestran la diferenciación entre B. carinatus y B. arizonicus. Además, propusieron las fórmulas genómicas: B. carinatus = AA BB C_1C_1 LL, B. arizonicus = AA BB C_1C_1 C_2C_2 DD EE. Los genomas A, B y C son originarios

de B. catharticus y es posible que B. arizonicus los posea en forma modificada. d) B. arizonicus se habría originado por hibridación y poliploidía entre B. catharticus (o una especie relacionada) y una especie $2n = 42$ con cromosomas medianos no pertenecientes al subgénero *Ceratochloa*.

El estudio de un nuevo aloploidio entre B. catharticus y la especie hexaploide B. trinii (única especie del subgénero *Neobromus*), realizado por Stebbins (1949) parece haber aclarado el origen de B. arizonicus. La morfología externa del alododecaploide ($2n = 84$) B. catharticus - B. trinii ofreció una fuerte confirmación de la hipótesis propuesta por Stebbins *et al* (1944). Este alododecaploide tiene el mismo número cromosómico que B. arizonicus y difiere de esta última en algunos caracteres morfológicos. Estas diferencias morfológicas serían las mismas que distinguen a B. catharticus de B. brevis (citada como B. hankeanus). Esta, según Stebbins (1949), es una buena razón para proponer que B. arizonicus se originó por aloploidía a partir del híbrido entre B. brevis y B. trinii.

Stebbins (1947 a) menciona que existe una especie octoploide ($2n = 56$), del subgénero *Ceratochloa*, en Sudamérica y dicha especie es B. pitensis. Stebbins (*ibid*) luego del estudio del híbrido B. pitensis x B. marginatus sugiere que B. pitensis tiene un origen semejante al de los octoploides Norteamericanos. B. pitensis pertenecería al subgénero *Festucoides* y no a *Ceratochloa* según Pinto Escobar (1976) y Planchuelo (1983).

En la Tabla 5.1. se consignan los recuentos cromosómicos previos en las especies de *Bromus* estudiadas en el presente trabajo. Sobre algunas de ellas se han hecho estudios de la morfología cromosómica (Schulz-Schaeffer, 1960; Schulz-Schaeffer y Markarian, 1957; Schifino y Winge, 1983).

Tabla 5.1. Recuentos y estudios cromosómicos previos.

| Espece | n | 2n | Autor |
|--|----|----|--|
| <u>B.catharticus</u> Vahl | | 42 | Stebbins & Tobgy, 1944. Hall, 1955. Schulz-Schaeffer, 1960. Schulz-Schaeffer & Markarian, 1957. |
| como <u>B.unioloides</u> H.B.K. | 21 | 42 | Bowden & Senn, 1962. |
| | 21 | 42 | Fernandes & Queiros, 1969. |
| | 21 | 42 | Mehra & Sharma, 1975. |
| | | 42 | Naranjo, 1976, 1978. |
| | | 42 | Schifino & Winge, 1983. |
| <u>B.brevis</u> Nees ssp. <u>brevis</u> | | 42 | Covas & Schnack, 1946. |
| | | 42 | Covas, 1981. |
| | 21 | 42 | Naranjo, 1976, 1978. |
| como <u>B.haenkeanus</u> (Presl.) Kunth | | 42 | Schifino & Winge, 1983 |
| | | 42 | Schulz-Schaeffer, 1960. |
| | | | Schulz-Schaeffer & Markarian, 1957. Hall, 1955. |
| <u>B.brevis</u> Nees ssp. <u>festucarioides</u> Covas et Millot | | 42 | Covas, 1981. |
| <u>B.parodii</u> Covas et Itria | | 42 | Covas & Itria, 1968 |
| | 21 | 42 | Naranjo, 1982. |
| | | 42 | Schifino & Winge, 1983. |
| <u>B.bonariensis</u> Parodi et Cám.Hern. | 21 | 42 | Naranjo, 1979. |
| | | 42 | Schifino & Winge, 1983. |
| <u>B.brachyanthera</u> Doell | 21 | | Quarin, 1977. |
| <u>B.uruguayensis</u> Arech. | | 42 | Myers, 1947. |
| como <u>B.brachyanthera</u> var. <u>uruguayensis</u> | | 42 | Schifino & Winge, 1983. |

B. catharticus y B. brevis poseen un cariotipo formado por cromosomas con centrómero mediano (m) o submediano (sm) y todos de tamaño semejante. Schulz-Schaeffer y Markarian (1957) describen cuatro pares de cromosomas con satélite (SAT) en B. catharticus y cuatro pares en B. brevis, y señalan que ellas difieren en tres de dichos pares SAT. Schulz-Schaeffer (1960) establece las relaciones de estas dos especies con otras del género Bromus en base a las diferencias en los cromosomas SAT. Schifino y Winge (1983) describen un cariotipo semejante para B. catharticus, pero encuentran un solo par de cromosomas SAT, y la presencia de 2 cromosomas B en algunos de los individuos estudiados. Esta última observación indica que existe cierta variación en los cromosomas SAT en B. catharticus, o por lo menos en la manifestación de los mismos. Por otro lado, la gran simetría y uniformidad del cariotipo de estas especies, en cuanto a la posición del centrómero (cromosomas m en su mayoría) y de tamaño semejante, hace difícil poder detectar las pequeñas diferencias que pudieran existir.

Stebbins (1949) y Hall (1955) han estudiado dos individuos presumiblemente híbridos B. catharticus x B. brevis (como B. catharticus x B. haenkeanus) obtenido a partir de individuos de poblaciones adventicias de estas especies introducidas en California. Estos individuos F_1 mostraron un apareamiento perfecto con formación de 21 bivalentes en las 20 a 25 células en metafase I estudiadas en cada individuo y encontraron sólo un 3% de anafases I con rezagados; no obstante los híbridos fueron altamente estériles. Naranjo (1978) en un estudio de un nuevo híbrido (B. catharticus x B. brevis) entre individuos de poblaciones naturales, con la finalidad de estudiar un mayor número de células en meiosis, encontró una serie de irregularidades meióticas que pueden justificar, en gran parte, la esterilidad del híbrido.

Desde hace más de diez años, se han intensificado los estudios del contenido de ADN nuclear por ser éste un carácter importante para ponderar las diferencias entre genomios. Existen fuertes evidencias de variación del contenido de ADN nuclear entre especies relacionadas con igual número de cromosomas e incluso con alta semejanza de sus cariotipos (Furuta, 1975; Narayan y Rees, 1977; Seal y Rees, 1982; Naranjo y Poggio, 1983; De Azkue y Martínez, 1984). Varios autores han encontrado que existe una asociación positiva entre contenido de ADN y volumen nuclear (Baetcke et al., 1967; Edwards y Endrizzi, 1975). Sin embargo especies que difieren en el contenido de ADN pueden tener volumen nuclear semejante si difieren significativamente en el contenido de heterocromatina. Esto se debe a que en la heterocromatina el porcentaje de ADN es mayor que en la eucromatina. Un ejemplo de este último caso es el encontrado en el género Bulnesia (Poggio et al., 1984; Poggio y Hunziker, enviado para publicar). En Bromus se han hecho algunos estudios sobre el contenido de ADN en algunas especies hexaploides mostrando diferencias que serían significativas (Bennett y Smith, 1976; Bennett et al., 1982; Schifino y Winge, 1983).

Con el propósito de establecer las diferencias citológicas entre los genomios de las cuatro especies del subg. Ceratochloa (B. catharticus, B. brevis, B. parodii y B. bonariensis), se estudian en este capítulo:

- a) El comportamiento meiótico de los cromosomas en las especies e híbridos.
- b) El volumen y el contenido de ADN nuclear en las cuatro especies.

5.2. COMPORTAMIENTO MEIOTICO EN PROGENITORES, HIBRIDOS Y POLIPLOIDES

5.2.1. F₁ B. catharticus x B. brevis (C2) y su alododecaploide (Cult. 144)

A) Híbrido artificial F₁ (C2)

Los resultados del estudio del comportamiento cromosómico en diacinesis y metafase I de los progenitores y del híbrido F₁ están detallados en la Tabla 5.2. En las Figuras 5.1. y 5.2. se ilustran los estados meióticos de las especies y del híbrido. Estos resultados fueron comunicados y discutidos por Naranjo (1976). Las especies progenitoras tienen meiosis regular formando 21 bivalentes (11) cerrados con frecuencia de quiasmas por célula muy similar, no siendo significativa sus diferencias (Figuras 5.1. A y B). El resto de los estados meióticos son totalmente regulares en ambas especies.

El híbrido F₁ difiere de las especies progenitoras en una serie de eventos del comportamiento meiótico de sus cromosomas. Aunque aparecen diacinesis y metafases I con 21 bivalentes, la mayoría de ellas presentaron de 2 a 6 univalentes (Tabla 5.2., Figuras 5.1. C-H). La diferencia entre el híbrido y B. brevis es, por ejemplo, significativa con respecto a bivalentes cerrados ($t = 25,06$; $p < 0,001$) y de quiasmas por células ($t = 12,58$; $p < 0,001$). En prometafase - metafase I se presentó un cuadrivalente o un trivalente en el 5% de las células (Tabla 5.2., Figuras 5.1. E y F). En la mayoría de las metafases o prometafases que mostraron bivalentes abiertos, se detectó que uno de ellos es heteromorfo para la posición del centrómero (Figuras 5.1. D y E). En metafase I los univalentes se ubican fuera de la placa ecuatorial y en general con repartición desbalanceada (Figuras 5.1. G y H). En un 4,5% de

las metafases I se forman husos multipolares y varias placas ecuatoriales. En la Figura 5.1. I se muestra una metafase I con dos placas y un huso tripolar; el alto contraste de la fotomicrografía no permite visualizar las fibras del huso, que pudieron ser observadas al microscopio. En la anafase I el 15% de las células tuvieron un puente, 36% presentaron 1-3 rezagados (Figura 5.2.A), 49% fueron normales (total de células estudiadas = 95). En telofase I el 38% de las células presentaron 1-4 micronúcleos (Figura 5.2. B). En anafase-telofase II, el 33% tuvieron 1-8 rezagados, 12% 1-3 puentes dineocéntricos¹ (Figura 5.2. C y D), 55% fueron normales (total de células estudiadas = 52). De un total de 135 tetradas (telofase II) 37% tuvieron 1-5 micronúcleos, el resto aparentaron ser normales.

¹ = Los puentes dineocéntricos se originan por la activación de neocentrómeros terminales o subterminales. Han sido observados anteriormente en B. carinatus y B. trinii x B. carinatus (Walters, 1957) y en otros híbridos de Hordeum, Agropyron y Phalaris (Hunziker y Maumús, 1964).

Tabla 5.2 Comportamiento meiótico en los híbridos B.catharticus x B.brevis y en sus progenitores.

| Especies e híbridos | Número de cultivo y herbario | 2n | Asociaciones cromosómicas en diacinesis o metafase I. Media \pm E.S. y rango | | | | | | | Número de células estudiadas |
|---|------------------------------|----|--|---------------------------|------------------------------|---------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | | | IV | III | II | I | II cerrados | Nº de quiasmas por célula | | |
| <u>B.catharticus</u> Kunth. | Cult. 129 C.A.N. 198 | 42 | | | 21 | | | 20.91 ± 0.21 19-21 | 41.87 ± 0.19 39-43 | 55 |
| <u>B.brevis</u> Nees | Cult. 125 C.A.N. 176 | 42 | | | 21 | | | 20.92 ± 0.02 20-21 | 41.92 ± 0.04 41-43 | 181 |
| <u>B.catharticus</u> x <u>B.brevis</u> (F ₁) | C2 C.A.N. 387 | 42 | 0.02 ± 0.02 0-1 | 0.02 ± 0.02 0-1 | 20.57 ± 0.10 18-21 | 0.67 ± 0.18 0-6 | 18.73 ± 0.14 16-21 | 39.36 ± 0.20 35-42 | 81 | |
| <u>B.catharticus</u> - <u>B.brevis</u> (C ₁) | Cult. 144 C.A.N. 408 | 84 | 5.63 ± 0.24 4-7 | | 30.75 ± 0.48 28-34 | | no registrado | no registrado | 23 | |

Fig. 5.1. A = B. catharticus (Cult. 129), diacinesis con 21 bivalentes cerrados.

B = B. brevis (Cult. 125), diacinesis con 21 bivalentes cerrados.

C-1 = Híbrido F₁ B. catharticus x B. brevis (C2).

C = Diacinesis con 21 bivalentes (3 abiertos).

D = Prometafase I con 20 bivalentes + 2 univalentes; 2 bivalentes abiertos, uno de ellos es heteromorfo y se lo señala con una flecha.

E = Prometafase I con 19 bivalentes + 1 cuadrivalente, la flecha señala un bivalente heteromorfo.

F = Prometafase I con 18 bivalentes + 1 trivalente + 3 univalentes.

G = Metafase I que muestra 6 univalentes , el resto son bivalentes.

H = Metafase I que muestra 4 univalentes, el resto son bivalentes.

I = Metafase I con huso tripolar y doble placa ecuatorial (21 bivalentes)

A-H con igual aumento, indicado en C.



Fig. 5.1.

Fig. 5.2. A - D = Híbrido F₁ B.catharticus x B.brevis (C2).

A = Anafase I con un puente y dos univalentes rezagados.

B = Telofase I con dos micronúcleos.

C = Anafase II con varios rezagados y varios puentes dineocéntricos incipientes debido a la acción de los neocentrómeros.

D = Telofase II con un puente dineocéntrico y un rezagado.

Todas con igual aumento.

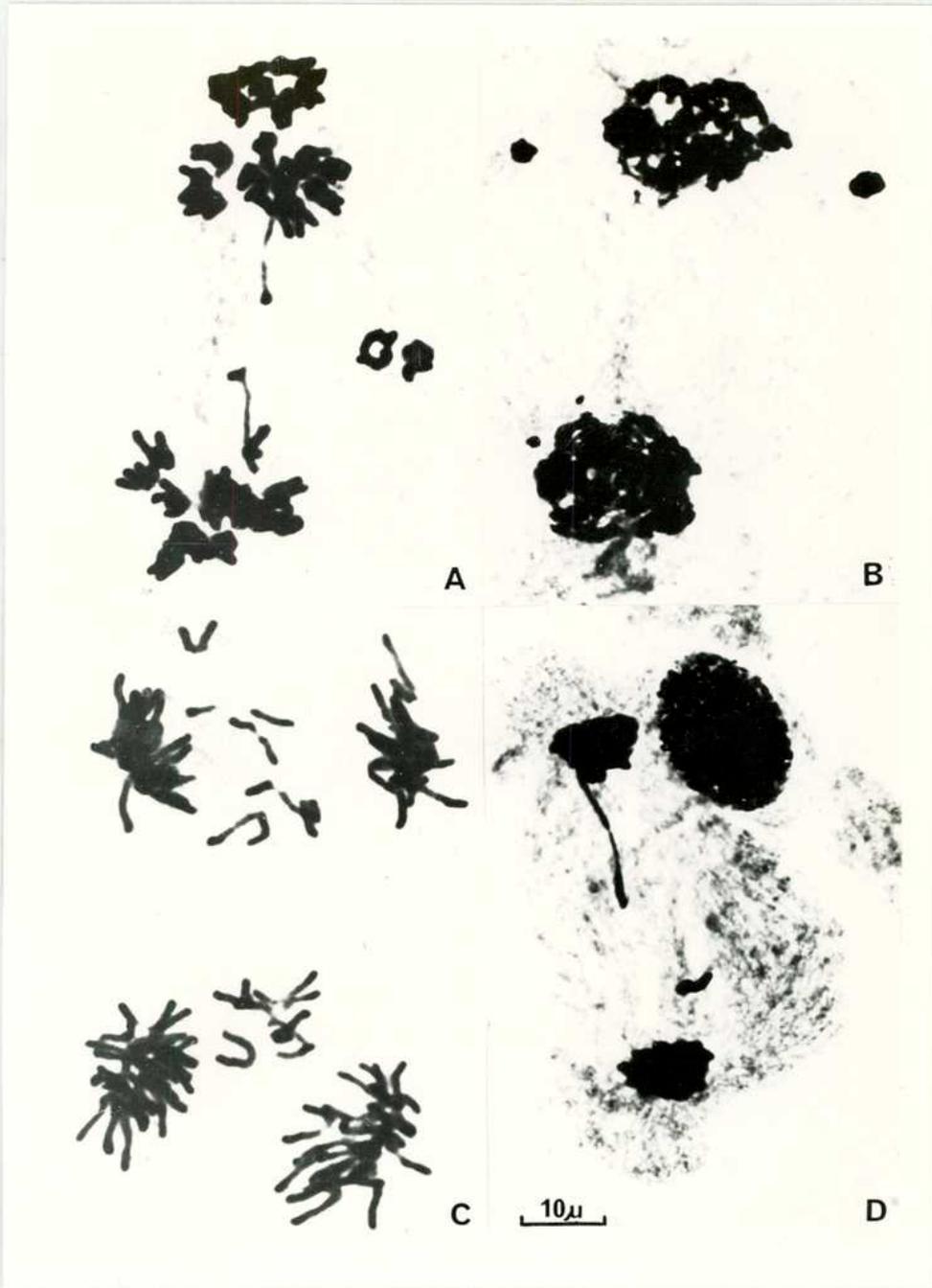


Fig. 5.2.

B) Alododecaploide artificial *B. catharticus* - *B. brevis* (Cult. 144)

Las configuraciones meióticas en diacinesis - prometafase I se indican en la Tabla 5.2. y se ilustra con dos diacinesis tardías en las Figuras 5.4. C y D. En las 23 diacinesis - prometafases I estudiadas se observó variación de 4 a 7 cuadrivalentes ($\bar{X} = 5,63 \pm 0,24$) siendo el resto bivalentes, la mayoría cerrados. En metafase I, si bien no fue posible estudiar en detalle las configuraciones cromosómicas sobre la placa, se vió que el 31% fueron normales y el 71% presentaron 1 a 5 univalentes fuera de la placa (41 células estudiadas). Estos univalentes se habrían originado por desinapsis o terminalización precoz de los quiasmas. En el 83% de dichas metafases I se observó 1 cuerpo nuclear (NB) en uno de los polos. En 17 telofases I estudiadas, 6 fueron normales (35%) y en 11 se vieron 1 a 2 micronúcleos (75%). De 52 tétradas 32 fueron normales (61%) mientras que 20 presentaron de 1 a 5 micronúcleos (38%).

Con referencia a los cromosomas somáticos de este alododecaploide, se realizaron las siguientes observaciones (Figuras 5.4. A y B): Su cariotipo está compuesto por 84 cromosomas m o sm. Se pudieron identificar dos tipos de cromosomas con satélites (dos pares de cada uno) que son mostrados en detalle en la Figura 5.4. B. Ambos tipos son cromosomas m, uno de ellos posee la constricción secundaria proximal en el brazo corto, dando origen a un satélite lineal; el otro posee una constricción secundaria subterminal en el brazo largo con microsátélite terminal. En las seis metafases mitóticas donde se pudieron estudiar los 84 cromosomas, se observó un máximo de 4 cromosomas con satélite de cada uno de los dos tipos, o sea se observó un máximo de 8 cromosomas con satélites.

Fig. 5.4. A - C = Alododecaploide artificial B. catharticus -
B. brevis (Cult. 144).

A = Metafase mitótica en ápice de raíz, con $2n = 84$.

B = Detalle de los dos tipos de cromosomas con satélites
(señalados con flechas).

C y D = Diacinesis con 25 bivalentes + 6 hexavalentes,
las flechas señalan los cuadrivalentes.

C y D con igual aumento.

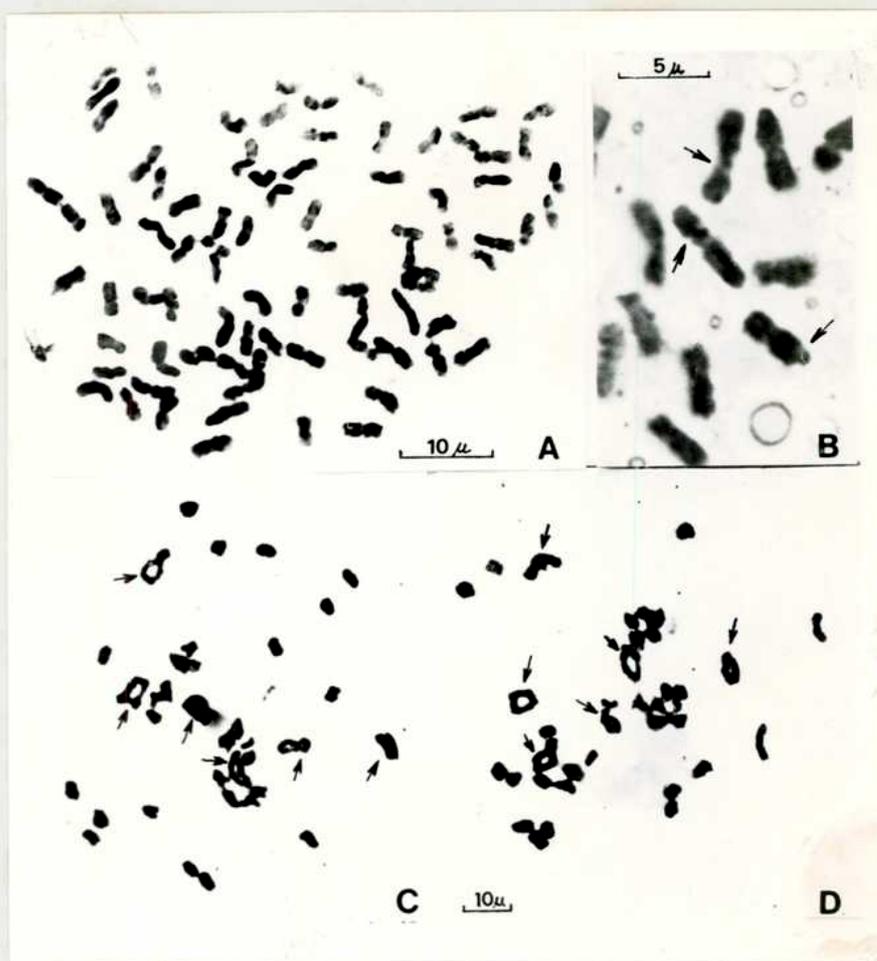


Fig. 5.4.

5.2.2. F₁ B. bonariensis x B. catharticus (C9)

Parte de los resultados citológicos se resumen en la Tabla 5.3. y en las Figuras 5.5. y 5.6. se muestra el comportamiento meiótico de las especies progenitoras y del híbrido. Estos resultados fueron publicados previamente (Naranjo, 1979). Al comparar el comportamiento meiótico de la línea de B. catharticus (Cult. 643) usada en la obtención de este híbrido (Tabla 5.3.), con la línea (Cult. 129) usada para obtener el híbrido C2 (B. catharticus x B. brevis, Tabla 5.2.), se vió que no existen diferencias significativas entre ellas para frecuencias de bivalentes cerrados ($t = 0,87$; $p > 0,2$) y frecuencia de quiasmas por célula ($t = 0,68$; $p > 0,4$). La meiosis de los progenitores del presente híbrido fue totalmente regular y no presentaron diferencias significativas en el comportamiento meiótico entre ellas (Figura 5.5. A a D).

El híbrido B. bonariensis x B. catharticus presentó meiosis bastante regular aunque mostró varias diferencias en su comportamiento en relación a sus progenitores. La F₁ mostró en diacinesis - metafase I 21 bivalentes (Figura 5.5. E.) en la mayoría de las células, aunque aparecieron de 2 a 4 univalentes en alrededor del 10% de las células (Figura 5.5. F). Al comparar este híbrido con sus progenitores, presentó diferencias significativas respecto a la frecuencia de bivalentes cerrados y a la frecuencia de quiasmas por célula; comparando con B. catharticus para bivalentes cerrados $t = 16,01$; $p < 0,001$ y para quiasmas $t = 7,9$; $p < 0,001$.

Se estudiaron 50 células en Anafase I del híbrido, de las cuales 49 presentaron una segregación aparentemente normal (21-21, Figuras 5.6. A y C) y en sólo una de ellas (2%) se observó una segregación anormal 20-22

(Figura 5.6. B). En tres de dichas Anafases I (6%) se observó un puente dicéntrico (Figuras 5.6. A, C y D). En Telofase I y II en el 4-5% de las células se encontraron 1 a 3 micronúcleos (Figuras 5.6. E y F).

Tabla 5.3. Comportamiento meiótico en el híbrido B. bonariensis x B. catharticus y

en sus progenitores.

| Especies e híbrido | Número de cultivo y herbario | 2n | Asociaciones cromosómicas en diacinesis o metafase I. Media ± E.S. y rango | | | | Número de células estudiadas |
|--|------------------------------------|----|---|----------------------|-------------------------|------------------------------------|---------------------------------|
| | | | II | I | II cerrados | Nº de quiasmas por célula | |
| <u>B. catharticus</u> Kunth. | Cult. 643 CAN. 114 | 42 | 21 | | 20.80 ±0.05 18-21 | 41.50 ±0.07 39-45 | 20 |
| <u>B. bonariensis</u> Parodi et Cámara | Cult. 98/2 CAN. 599 | 42 | 21 | | 20.99 ±0.01 20-21 | 42.02 ±0.04 41-43 | 100 |
| <u>B. bonariensis</u> x <u>B. catharticus</u> | C9 CAN. 1205 | 42 | 20.89 ±0.08 19-21 | 0.21 ±0.05 0-4 | 18.73 ±0.11 14-21 | 39.84 ±0.12 34-43 | 143 |

Fig. 5.5. A - B = B. bonariensis (Cult. 98/2), diacinesis.

A = 21 bivalentes (19 cerrados).

B = 21 bivalentes (20 cerrados).

C - D = B. catharticus (Cult. 643), metafases I.

C = 21 bivalentes (20 cerrados).

D = 21 bivalentes (18 cerrados).

E - F = F₁ B. bonariensis x B. catharticus (C9), metafases I.

E = 21 bivalentes (20 cerrados)

F = 20 bivalentes + 2 univalentes (18 bivalentes cerrados), las flechas señalan los univalentes.

Todas con igual aumento.

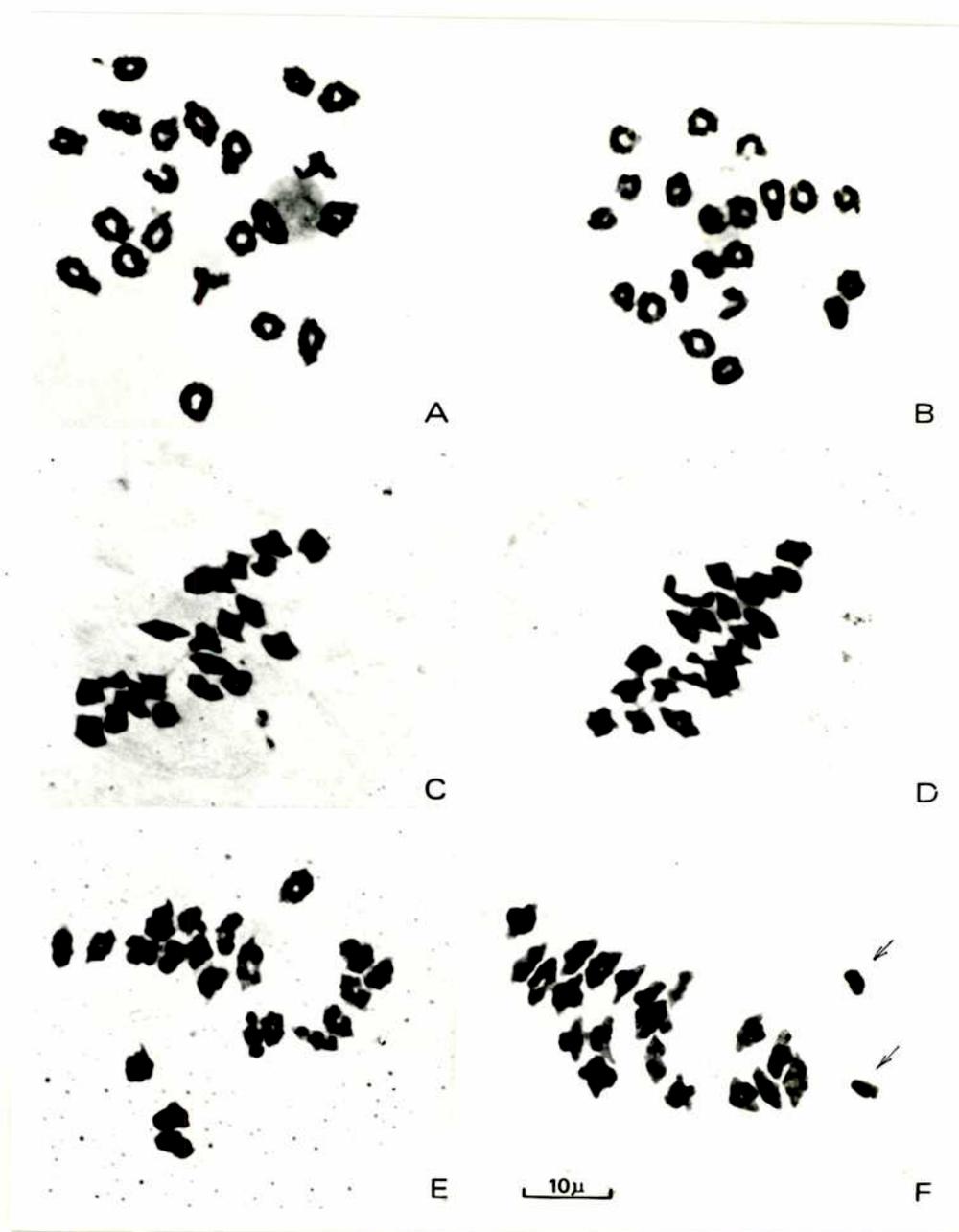


Fig. 5.5.

Fig. 5.6. A - F = F₁ B.bonariensis x B.catharticus (C9).

A - D = Anafase I.

A y C con segregación normal 21 - 21.

B = con segregación 20 - 22, la flecha señala un cromosoma fuera de huso.

A, B y C = con presunto puente dicéntrico.

E = Telofase I con 3 micronúcleos.

F = Tetrada (telofase II) con 2 micronúcleos.

Todas con igual aumento.

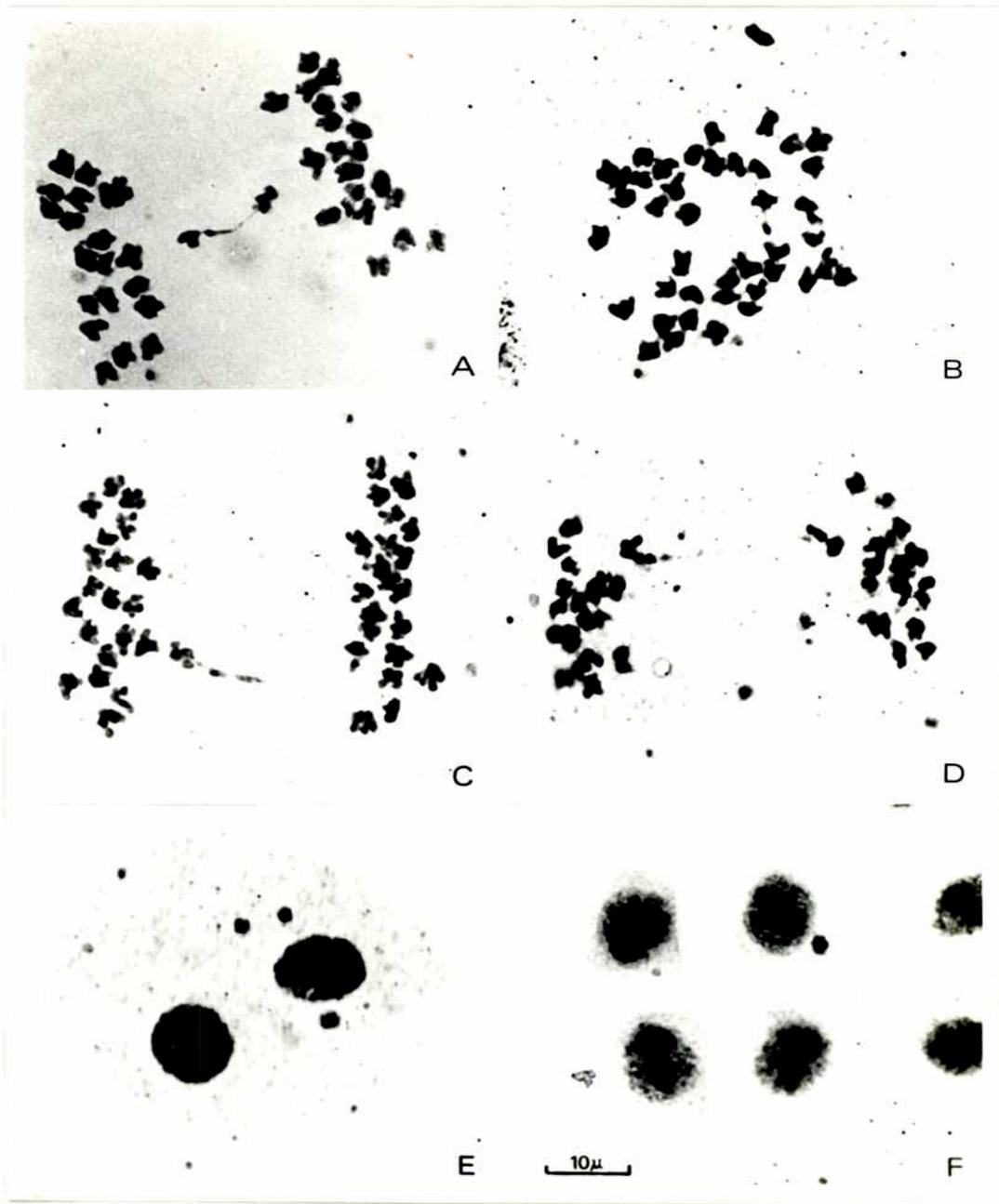


Fig. 5.6.

5.2.3. F₁ B. parodii x B. catharticus (C36) y B. catharticus x B. parodii (C37/2)

Los resultados del comportamiento cromosómico en diacinesis - metafase I de los progenitores e híbridos se detalla en la Tabla 5.4. En la Figura 5.7. se ilustra el comportamiento de los cromosomas meióticos en estos híbridos.

La línea de B. catharticus (Cult. 908), progenitora de estos híbridos, presenta una meiosis totalmente regular, con formación de 21 bivalentes y tiene comportamiento para bivalentes cerrados y quiasmas muy semejante al de las otras dos líneas de B. catharticus estudiadas (Cult. 129 y 643; Tablas 5.2. y 5.3.). Por lo tanto las tres líneas de B. catharticus estudiadas tienen comportamiento meiótico semejante. El otro progenitor, B. parodii (Cult. 841/4), forma siempre 21 bivalentes y tiene una frecuencia de bivalentes cerrados y de quiasmas muy semejante a B. catharticus (Tabla 5.4.), siendo el resto de su meiosis totalmente regular.

Los híbridos B. parodii x B. catharticus (C36) y su recíproco B. catharticus x B. parodii (C37/2) mostraron una meiosis muy regular, formando en la mayoría de las células 21 bivalentes (Tabla 5.4., Figuras 5.7. B y C). En sólo dos células (de 83 estudiadas) B. parodii x B. catharticus (C36) presentó 1 cuadrivalente + 19 bivalentes (Figura 5.7. A). Ambos híbridos presentaron muy pocas células con 20 bivalentes + 2 univalentes (Figura 5.7. D; Tabla 5.4.). En relación a la frecuencia de bivalentes cerrados y de quiasmas, los híbridos no mostraron diferencias significativas entre ellos (bivalentes cerrados, $t = 0,83$, $p < 0,2$; quiasmas $t = 0,71$, $p < 0,4$). Al comparar estos híbridos con sus progenitores, respecto a estos parámetros, se observó

que no son significativas las diferencias, aunque los híbridos presentan un poco de mayor variación (Tabla 5.4.).

En anafase-telofase I de los híbridos, se vió con baja frecuencia la producción de 1 puente dicéntrico con un fragmento acéntrico (Figuras 5.7. G y H). También se observó en algunas anafase I rezagados dividiéndose ecuacionalmente (Figura 5.7. F.). En B. parodii x B. catharticus, de un total de 44 anafases I estudiadas, sólo una presentó 1 puente y 1 fragmento; y en un total de 83 telofases I en sólo dos se vió 1 puente + 1 fragmento. En este híbrido, por lo tanto, sólo el 2,36% de las anafases-telofase I manifiestan 1 puente + 1 fragmento . En el híbrido B. catharticus x B. parodii sólo se observó 1 puente + 1 fragmento (Figura 5.7. H) en el 2,74% de las 73 anafases-telofases I estudiadas.

Tabla 5.4. Comportamiento meiótico en el híbrido B. parodii x B. catharticus, en su recíproco y en sus progenitores.

| Especies e híbridos | Número de cultivo y herbario | 2n | Asociaciones cromosómicas en diacinesis o metafase I. Media \pm E.S. y rango | | | | | Número de células estudiadas |
|---|------------------------------|----|--|------------------------------|---------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | | | IV | III | I | II cerrados | Nº de quiasmas por célula | |
| <u>B. parodii</u> Covas et Itria | Cult. 841/4 CAN 1216 | 42 | | 21 | | 20.94 ± 0.03 20-21 | 41.96 ± 0.05 41-43 | 96 |
| <u>B. catharticus</u> Kunth | Cult. 908 CAN 1116 | 42 | | 21 | | 20.89 ± 0.04 19-21 | 41.84 ± 0.11 39-44 | 56 |
| <u>B. parodii</u> x <u>B. catharticus</u> | C36 CAN 1210 | 42 | 0.02 ± 0.02 0-1 | 20.91 ± 0.05 19-21 | 0.27 ± 0.04 0-2 | 20.15 ± 0.13 19-21 | 41.55 ± 0.23 39-43 | 83 |
| <u>B. catharticus</u> x <u>B. parodii</u> | C37/2 CAN 1211 | 42 | | 20.87 ± 0.11 20-21 | 0.31 ± 0.05 0-2 | 20.19 ± 0.18 19-21 | 41.48 ± 0.29 38-43 | 75 |

Fig. 5.7. A - H = F₁ B. parodii x B. catharticus (C36).

A = Diacinesis con 19 bivalentes + 1 cuadrivalente.

B = Diacinesis con 21 bivalentes cerrados y 43 quiasmas.

C = Metafase I con 21 bivalentes cerrados y 42 quiasmas.

D = Metafase I donde son visibles dos univalentes.

E = Anafase I con un puente dicéntrico. No se observó fragmento.

F = Anafase I con dos rezagados; producto de división ecuacional de un univalente.

G = Anafase I con un puente dicéntrico y un fragmento acéntrico.

H = F₁ B. catharticus x B. parodii (C37/2), telofase I con un puente dicéntrico (aparentemente ya cortado) y un fragmento acéntrico.

Todas con igual aumento.

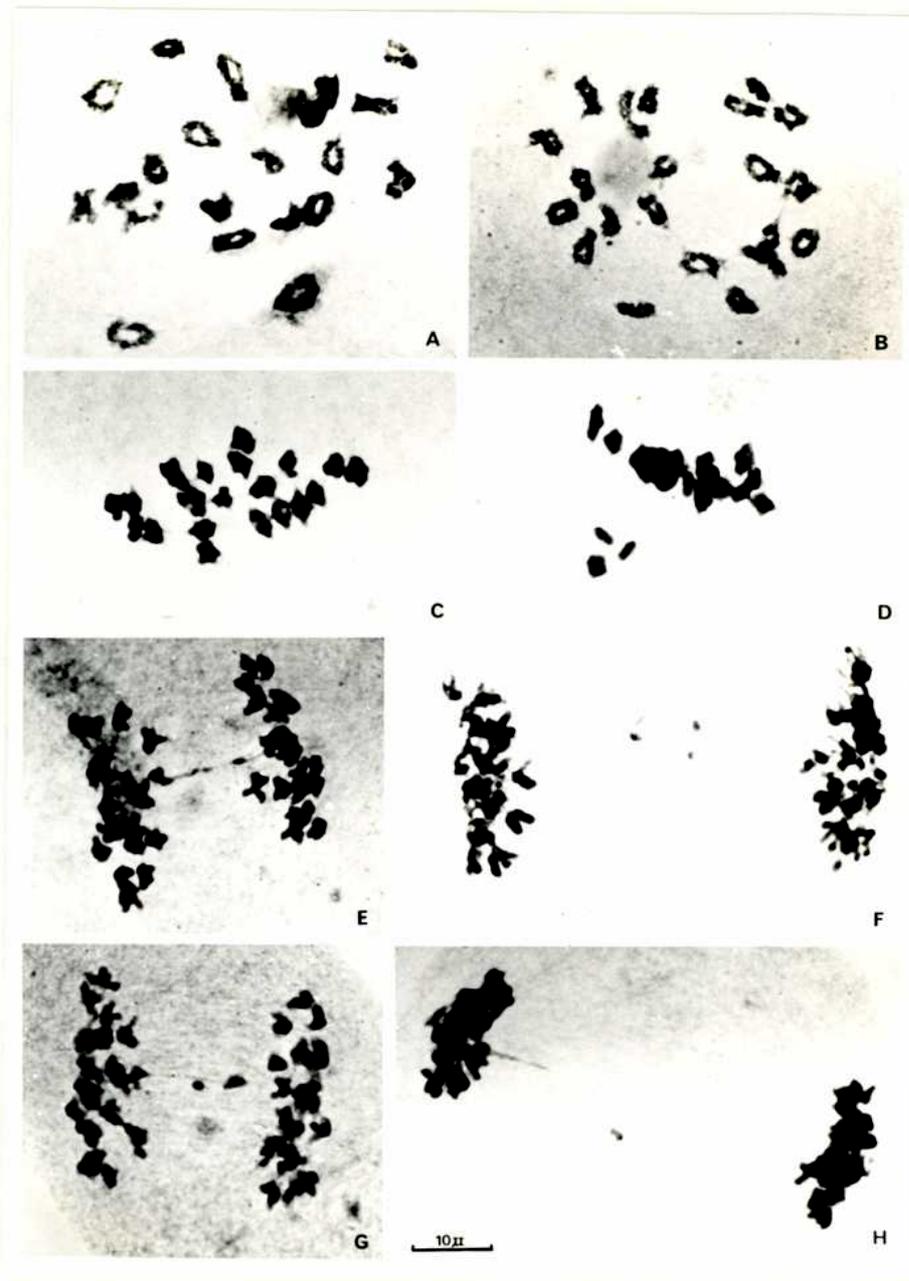


Fig. 5.7.

5.2.4. F₁ B. brevis x B. bonariensis (C29) y B. bonariensis x B. brevis (C30)

El comportamiento cromosómico en diacinesis-metafase I de los híbridos y progenitores se detalla en la Tabla 5.5. y se ilustra en la Figura 5.8.

El origen del progenitor B. bonariensis (Cult. 98/3) usado en los presentes híbridos, es el mismo que en el híbrido B. bonariensis x B. catharticus (Tabla 5.3.). En este caso se usó otro individuo (Cult. 98/3) cuyo comportamiento meiótico es regular formando 21 bivalentes (Tabla 5.5.) y no difiere significativamente para frecuencia de bivalentes cerrados y quiasmas del otro individuo estudiado (Cult. 98/1, Tabla 5.3.). B. brevis (Cult. 842, Tabla 5.5., Figura 5.8. A) posee meiosis regular y su comportamiento meiótico es muy semejante al de otro origen de esta especie (Cult. 125, Tabla 5.2., Figura 5.1. B).

Los híbridos (C29 y C30) poseen meiosis bastante regular formando 21 bivalentes en el 96,5% de las diacinesis -metafases I (Tabla 5.5.; Figura 5.8. C) y 20 bivalentes + 2 univalentes en el 3,5% (Figura 5.8. D). Estos híbridos no presentaron, entre sí, diferencias significativas para frecuencias de bivalentes, bivalentes cerrados y quiasmas por célula ($t = 0,68, 0,87$ y $0,10$ respectivamente, p siempre $> 0,4$). Al comparar estos híbridos con sus progenitores sólo se encontró que es significativa la diferencia entre ellos y cualquiera de sus progenitores respecto a la frecuencia de bivalentes cerrados ($t = 2,41, p < 0,02$).

En el híbrido (C29) de las 65 células estudiadas en anafase I, el 12% presentaron 1 a 2 rezagados y el resto fueron aparentemente normales (Figura 5.8. E). En Telofase I, este híbrido, presentó 1 a 2 rezagados en

el 8,6% de las 129 células estudiadas (Figuras 5.8. F y G) siendo el resto aparentemente normales. En Telofase II el 98% presentaron de 1 a 4 rezagados (Figura 5.8. H), el resto de las 138 células estudiadas fueron aparentemente normales.

Tabla 5.5. Comportamiento meiótico en el híbrido B.brevis x B.bonariensis,
en su recíproco y en sus progenitores.

| Especies e híbridos | Número de cultivo y herbario | 2n | Asociaciones cromosómicas en diacinesis o metafase I. Media \pm E.S. y rango | | | | Número de Células estudiadas |
|---|------------------------------------|----|---|---------------------------|------------------------------|------------------------------------|---------------------------------|
| | | | II | I | II cerrados | Nº de quiasmas por célula | |
| <u>B. bonariensis</u> | Cult. 98/3 CAN 965 | 42 | 21 | | 20.93 ± 0.02 20-21 | 41.98 ± 0.05 41-43 | 86 |
| <u>B. brevis</u> | Cult. 842 CAN 1211 | 42 | 21 | | 20.94 ± 0.02 20-21 | 41.87 ± 0.03 41-43 | 122 |
| <u>B. brevis</u> x <u>B. bonariensis</u> | C29 CAN 1120 | 42 | 20.97 ± 0.01 20-21 | 0.07 ± 0.02 0-2 | 19.97 ± 0.06 18-21 | 41.30 ± 0.16 39-43 | 205 |
| <u>B. bonariensis</u> x <u>B. brevis</u> | C30 CAN 1121 | 42 | 20.98 ± 0.01 20-21 | 0.06 ± 0.02 0-2 | 19.88 ± 0.05 19-21 | 41.34 ± 0.11 39-43 | 95 |

Fig. 5.8. A = B. brevis (Cult. 842), diacinesis con 21 bivalentes cerrados y 43 quiasmas.

B = B. bonariensis (Cult. 98/3), diacinesis con 21 bivalentes cerrados y 42 quiasmas.

C - H = F₁ B. brevis x B. bonariensis (C29).

C = Diacinesis con 21 bivalentes (18 cerrados) y 39 quiasmas.

D = Prometafase I con 20 bivalentes + 2 univalentes.

E = Anafase I aparentemente normal.

F - G = Telofases I

F = Con 4 rezagados, resultantes de división ecuacional de 2 univalentes.

G = Con 2 rezagados, producto de división ecuacional de 1 univalente.

H = Telofase II con 4 micronúcleos.

Todas con igual aumento.



Fig. 5.8.

5.2.5. F₁ B. parodii x B. brevis (C32)

En la Tabla 5.6. se muestra el comportamiento meiótico en diacinesis-metafase I del híbrido y en la Figura 5.9. se ilustran algunas de las irregularidades de su meiosis.

El comportamiento meiótico de los progenitores es regular (B. parodii, cult. 841; B. brevis, cult. 842) y ya fue descrito en las Tablas 5.4. y 5.5. Los mismos no presentaron diferencias significativas para bivalentes cerrados ($t = 0,13$, $p > 0,5$) y para quiasmas por célula ($t = 0,79$, $p > 0,2$).

Este híbrido presenta una meiosis relativamente regular formándose en diacinesis - metafase I, 21 bivalentes en el 88,9% de las células estudiadas, presentando 20 bivalentes + 2 univalentes ó 19 bivalentes + 4 univalentes en sólo el 11,4% (Tabla 5.6., Figuras 5.9. A-C). Comparando esta F₁ con cualquiera de sus progenitores, presentó disminución significativa en la frecuencia de bivalentes cerrados ($t = 2,39$, $p < 0,02$) y en la frecuencia de quiasmas ($t = 4,93$, $p < 0,001$). En Anafase I de 61 células analizadas, 54 fueron aparentemente normales (88,52%), 6 (6,56% presentaron 1 a 3 rezagados y 3 (4,92%) presentaron 1 puente sin fragmento visible (Figura 5.9. D). En Telofase I, de 64 células analizadas, 57 fueron aparentemente normales (89,07%) y 7 (10,94%) presentaron de 1 a 5 micronúcleos. En los estados II también se observaron ciertas irregularidades meióticas. En Anafase - Telofase II de 84 analizadas el 12% presentó de 1 a 8 rezagados (Figura 5.9. E) y el resto fueron aparentemente normales. De 210 tetradas estudiadas el 9,87% presentaron de 1 a 5 micronúcleos (Figura 5.9. F).

Tabla 5.6. Comportamiento meiótico en el híbrido B. parodii x B. brevis y en uno de sus progenitores.

| Especie e híbrido | Número de cultivo y herbario | 2n | Asociaciones cromosómicas en Diacinesis | | | | Número de células estudiadas |
|---|------------------------------|----|---|---------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | | | o Metafase I. Media \pm E.S. y rango | | | | |
| | | | II | I | II cerrados | Nº de quiasmas por célula | |
| <u>B. parodii</u> | Cult. 841 CAN. 12M | 42 | 21 | | 20.94 ± 0.03 20-21 | 41.96 ± 0.05 41-43 | 96 |
| <u>B. parodii</u> x <u>B. brevis</u> | C32 CAN. 1117 | 42 | 20.88 ± 0.03 19-21 | 0.25 ± 0.06 0-4 | 19.65 ± 0.12 18-21 | 40.18 ± 0.28 38-42 | 154 |

Fig.5.9. A - F = F₁ B.parodii x B.brevis (C32/1).

A - C = Metafase I.

A y C = Con dos univalentes, el resto bivalentes.

B = Con cuatro univalentes, el resto bivalentes.

D = Anafase I con un puente dicéntrico sin fragmento acéntrico visible.

E = Telofase II con varios rezagados.

F = Tetrada con 4 micronúcleos.

Todas con igual aumento.

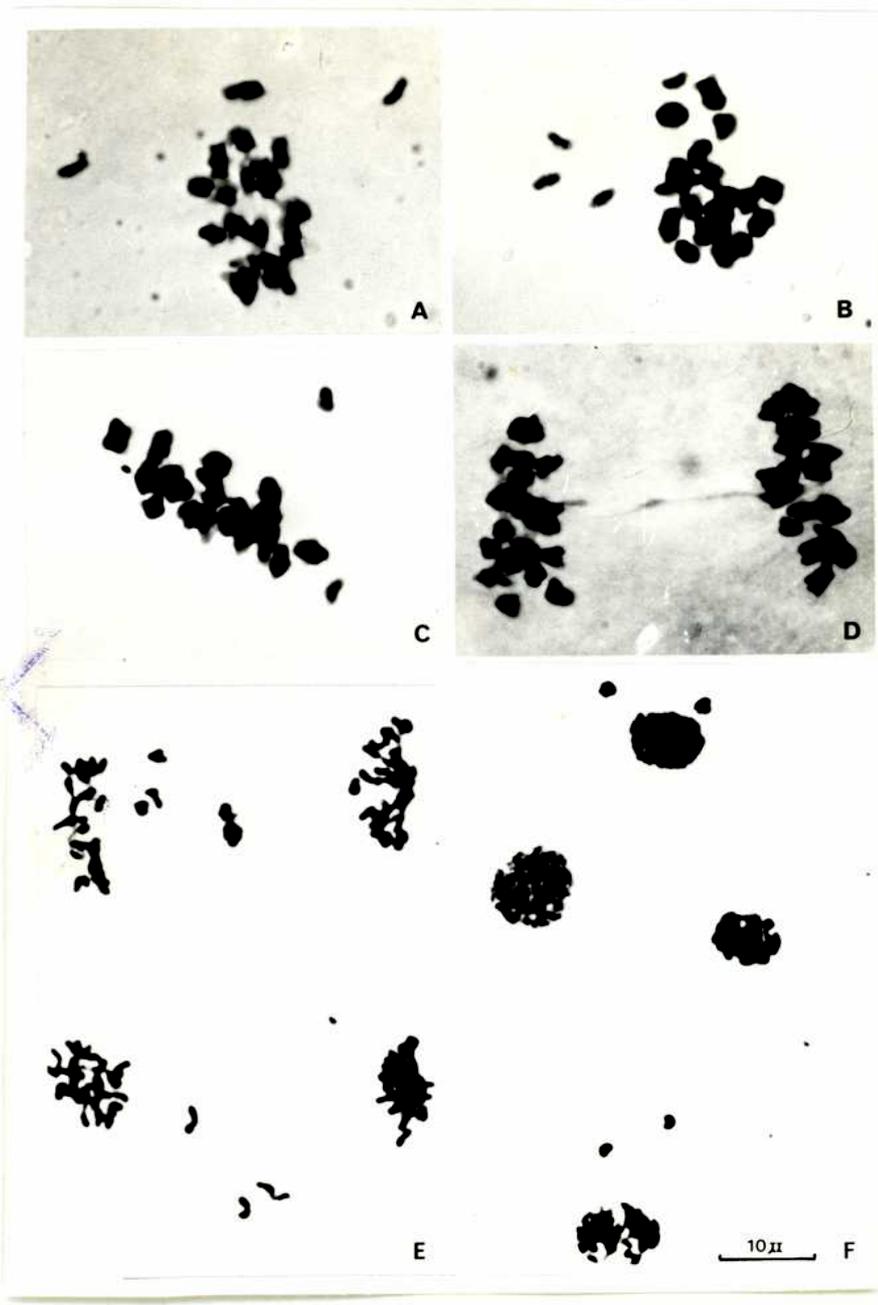


Fig.5.9.

5.3. CONTENIDO DE ADN, AREA Y VOLUMEN NUCLEAR

Se estudió la variación intra e interespecífica del contenido de ADN, área y volumen nuclear en las cuatro especies del subgénero Ceratochloa analizadas en este trabajo. Con tal fin se estudiaron tres o cuatro individuos de dos o más procedencias distintas de cada una de las especies. Al elegir las distintas procedencias de cada especie se trató de estudiar poblaciones que distaran no menos de 200 Km; así para B. catharticus se estudiaron poblaciones de Buenos Aires (Cult. 911) y de Entre Ríos, Gualeguaychú (CAN N° 572). De B. bonariensis se estudiaron las dos procedencias, hasta ahora conocidas, Sierra de La Ventana, Provincia de Buenos Aires (Cult. 98) y Sierras de Lihuel-Calel, Provincia de La Pampa (Cult. 015). De B. brevis, se estudió una población de Sierra de La Ventana, Provincia de Buenos Aires (CAN N° 709) y una de Anguil, Provincia de La Pampa (Cult. 845).

En la Tabla 5.7. a, se pueden ver los resultados obtenidos¹. Al realizar un análisis de varianza entre las réplicas (individuos) de cada una de las procedencias de las distintas especies, se encontró que no presentaban diferencias significativas, considerándose globalmente los datos para el cálculo de la media de cada una de las procedencias. Las diferencias entre las distintas procedencias de cada especie y entre especies, se estudiaron mediante ANOVA. En la Tabla 5.7. b se presentan los resultados de dicho análisis y se puede ver que no hay diferencias significativas entre las diferentes procedencias de una especie, siendo en cambio significativas las diferen

¹ = La parte experimental fue realizada en el Centro de Biología Celular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, España. Estos resultados fueron ya comunicados (Naranjo, 1984).

cias entre especies. En la Figura 5.10. se representan los histogramas de variación del contenido de ADN en cada una de las especies.

En la Tabla 5.7. a se presentan también las áreas y el volumen nuclear medio para cada una de las especies, siendo significativas las diferencias. No se encontró diferencias significativas entre las medias de área y volumen nuclear de distintos individuos de una especie. Como las mediciones fueron hechas en distintos preparados para cada uno de los individuos, lo anterior estaría indicando que la técnica no influyó variando el área y volumen, quizás debido a que los núcleos poseen suficiente elasticidad para no deformarse en forma irreversible por efecto del peso del cubreobjeto.

En la Figura 5.11. se representa la correlación entre el contenido de ADN y volumen nuclear, siendo el coeficiente de correlación $r = 0,965$.

Tabla 5.7. a) Contenido de ADN, área y volumen nuclear en varias especies de Bromus del subg. Ceratochloa.

| Especie | Origen (N° de herb. ó cult.) | ADN (2C en pg) | | | | $\bar{X} \pm E.S.$ | Área nuclear $\bar{X} \pm E.S.$ (u.a.) | Volumen nuclear $\bar{X} \pm E.S.$ (a.u.) |
|-----------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|------------|------------|------------|--------------------|---|--|
| | | Réplicas (plantas) $\bar{x} \pm E.S.$ | | | | | | |
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | | | |
| <u>B. catharticus</u> | 911 | 11.58±0.12 | 11.87±0.11 | 11.52±0.13 | --- | 11.66±0.07 | 9.54±0.20 | 22.17±0.89 |
| | 572 | 11.46±0.10 | 11.63±0.11 | 11.93±0.13 | --- | 11.67±0.07 | | |
| <u>B. brevis</u> | 709 | 12.94±0.08 | 12.86±0.12 | 12.71±0.10 | --- | 12.83±0.06 | 9.96±0.25 | 23.64±1.02 |
| | 845 | 13.02±0.15 | 12.87±0.14 | 12.83±0.16 | --- | 12.90±0.09 | | |
| <u>B. parodii</u> | 841 | 13.53±0.13 | 13.51±0.09 | 13.26±0.11 | 13.56±0.14 | 13.46±0.06 | 10.30±0.30 | 24.86±1.16 |
| | 104 | 13.54±0.14 | 13.45±0.14 | 13.53±0.19 | 13.51±0.12 | 13.50±0.07 | | |
| <u>B. bonariensis</u> | 015 | 14.47±0.11 | 14.43±0.09 | 14.45±0.13 | 14.42±0.08 | 14.44±0.06 | 11.27±0.35 | 28.46±1.48 |
| | 98 | 14.60±0.12 | 14.69±0.10 | 14.65±0.10 | --- | 14.66±0.06 | | |

b) Análisis de varianza del contenido de ADN entre orígenes de una especie y entre especies

| Fuente de variación | SC | GL | CM | F | P |
|-------------------------------|----------|-----|----------|----------|---------|
| Entre especies | 555.4301 | 3 | 185.1434 | 472.0336 | 0.00001 |
| Entre orígenes de una especie | 1.5689 | 4 | 0.3922 | 1.2118 | 0.305 |
| Error | 172.6516 | 532 | 0.3236 | | |
| Total | 729.6506 | 539 | | | |

Fig. 5.10 Histogramas de variación del contenido de ADN nuclear 2C expresado en pico_gramos. En cada especie se representan los 120 a 160 núcleos medidos. Las flechas señalan el valor medio de cada especie.

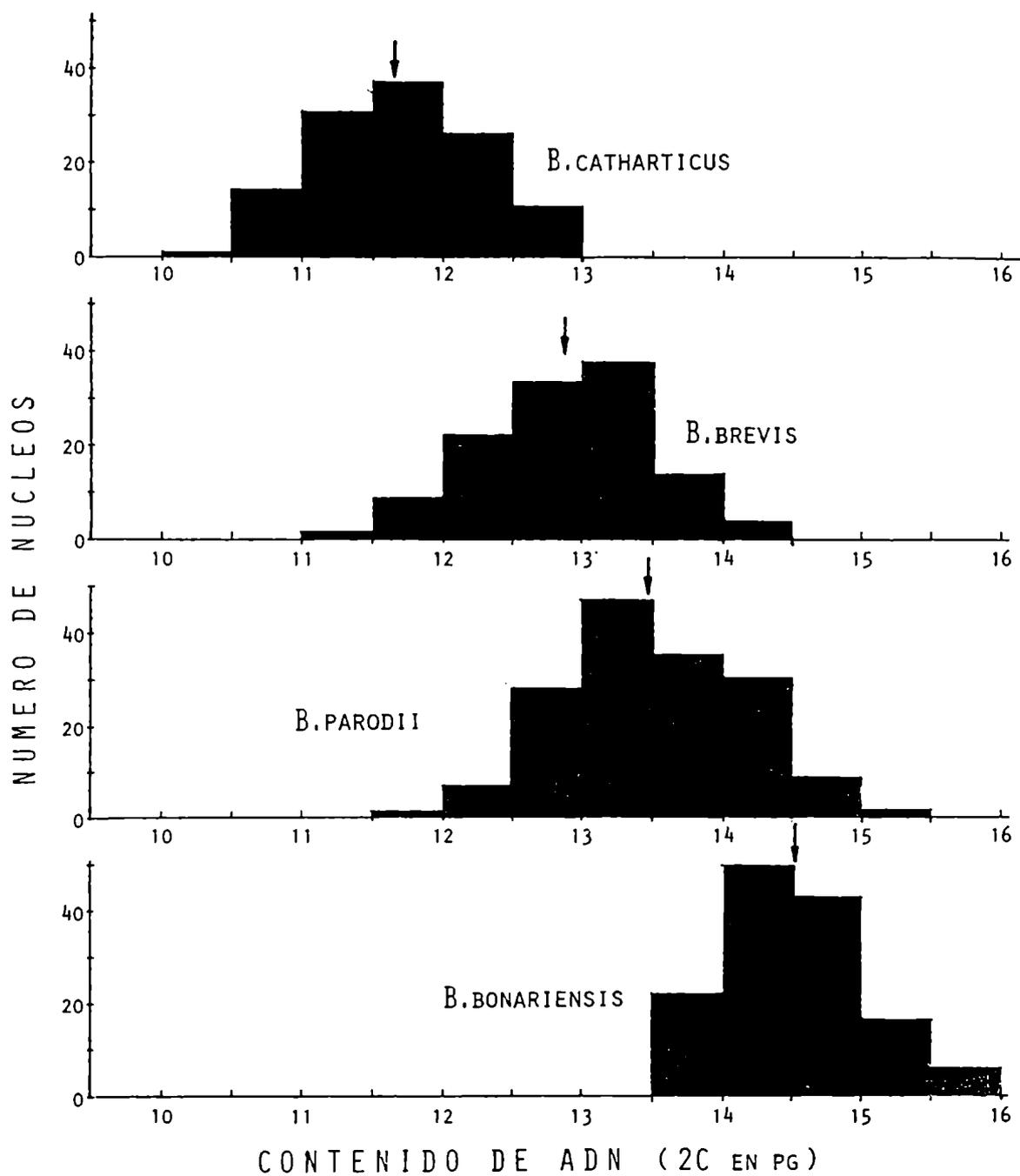


Fig. 5.10.

Fig. 5.11 Regresión entre el contenido de ADN y el volumen nuclear para cada una de las cuatro especies del subg. *Ceratochloa* estudiadas. Los puntos representan los valores medios de estos caracteres para cada una de las especies. La ecuación de regresión es $y = -3.47 + 2.15 x$ y el $r = 0.965$.

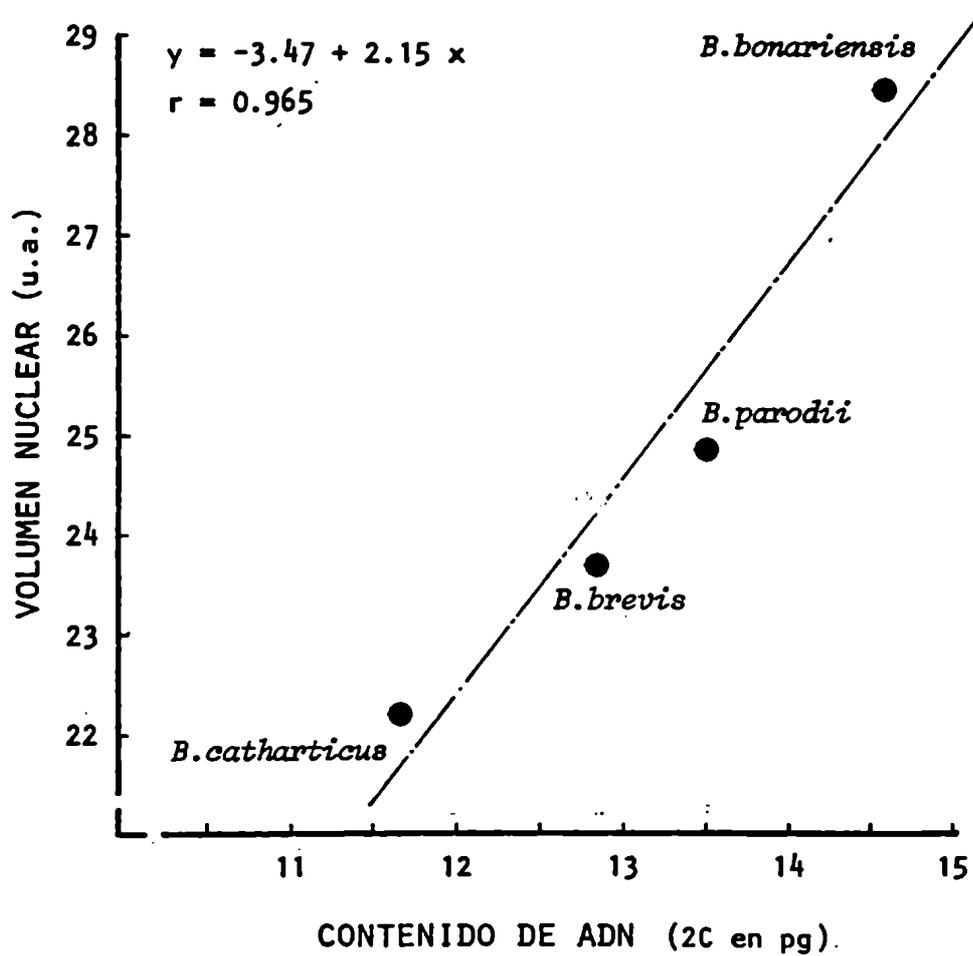


Fig. 5.11.

C A P I T U L O 6

ELECTROFORESIS DE PROTEINAS SEMINALES Y

CROMATOGRAFIA DE COMPUESTOS FENOLICOS

6. ELECTROFORESIS DE PROTEINAS SEMINALES Y CROMATOGRAFIA DE COMPUESTOS FENOLICOS

6.1. INTRODUCCION

En el establecimiento de las relaciones filogenéticas es muy importante analizar los fenotipos bioquímicos. Esto puede realizarse por medio de estudios de compuestos macro - micromoleculares. En vegetales ha sido muy utilizada la electroforesis de proteínas seminales totales e isoenzimas, y cromatografía de compuestos fenólicos.

La utilidad de los espectros electroforéticos de proteínas seminales en estudios taxonómicos y evolutivos ha sido analizada y destacada por Ladizinsky y Hymowitz (1979). Los autores analizan los aportes que se hicieron desde los trabajos pioneros de Hall (1959, 1964), Hall y Johnson (1963), Johnson y Hall (1965), Fox et al. (1964), Vaughan y Waite (1966) y Hunziker (1966, 1967) hasta la fecha de su revisión. En ese lapso, en alrededor de un centenar de trabajos se realizaron estudios electroforéticos de proteínas seminales en más de 45 géneros correspondientes a 13 familias. Estos estudios se intensificaron cuando Fox et al. (1964), y Johnson y Hall (1965) adoptaron, por su mayor resolución, el uso de geles de poliacrilamida propuesto por Raymond y Wang (1960) en reemplazo de los de almidón.

Una de las características más importantes de los perfiles electroforéticos de proteínas seminales es su alta estabilidad. Como lo señala Ladizinsky y Hymowitz (1979), ésto se ha probado particularmente entre plantas cultivadas en las cuales un gran número de plantas han podido ser analizadas. En plantas cultivadas muestras provenientes de diferentes áreas geográficas y adaptadas a diferentes zonas ecológicas poseen esencialmente los mismos perfiles electroforéticos (Johnson, 1972, 1975; Ladizinsky y Adler, 1975; y otros). Además, la composición de las proteínas seminales son altamente estables y es muy poco afectada por las condiciones ambientales o las fluctuaciones estacionales (Adriaanse et al., 1969; Gray et al., 1973); incluso la edad de las semillas maduras no parece afectar sus perfiles electroforéticos (Robinson y Megarrity, 1975). Se ha observado también que cambios intrínsecos como alteraciones cromosómicas estructurales o duplicación de los cromosomas tendrían nulo o bajo efecto sobre los perfiles proteicos específicos (Hunziker, 1967; Levin y Schall, 1970).

En diferentes grupos de plantas se ha visto que cada especie se caracteriza por un perfil electroforético determinado, con presencia de bandas propias, como ha sido observado en , por ejemplo, Triticum (Johnson, 1972), Cicer (Ladizinsky y Adler, 1975) y Bulnesia (Comas et al., 1979, 1984). En otros géneros como, por ejemplo, Pisum (Przybylska et al., 1977) y Prosopis (Burghardt y Palacios, 1984) que poseen especies que forman híbridos relativamente fértiles y presentan gran variación intraespecífica de los perfiles electroforéticos, las entidades se pueden caracterizar por las frecuencias relativas de las diferentes bandas de los perfiles.

Otra característica interesante de las proteínas seminales es que

existe alta adición en los híbridos anfibloides artificiales de las proteínas de los progenitores. Aunque es abundante la información acumulada sobre esta característica, no son muchas las familias y géneros donde se la ha estudiado. En varios géneros de gramíneas se ha visto adición total en anfibloides artificiales en Avena (Murray et al., 1970), Hordeum (Naranjo y Hunziker, 1971), Stipa-Oryzopsis (Hall y Johnson, 1963). En otros géneros de gramíneas se ha visto, por otro lado que la adición no es total apareciendo bandas nuevas y/o supresión de bandas de los progenitores como, por ejemplo, la aparición de 2 bandas nuevas en un anfibloide artificial en Aegilops (Waines y Johnson, 1971), la aparición de 1 a 2 bandas nuevas y 3 a 4 bandas suprimidas en tres anfibloides artificiales entre Elymus canadensis y tres especies de Agropyron (Naranjo y Hunziker, 1971). Además, se ha encontrado que mientras que el anfibloide Triticale hexaploide (trigo tetraploide x centeno diploide) presenta adición total (Hristova y Baeva, 1972), en el Triticale octoploide originado a partir de trigo hexaploide y centeno diploide se ven suprimidas algunas bandas parentales (Hall, 1959; Hristova y Baeva, 1972).

Este fenómeno de disminución de la adición cuando uno de los progenitores tiene mayor nivel de ploidía ha sido observado también en Solanum (Edmonds y Glidewell, 1977). En géneros de otras tres familias que se han estudiado se observó adición total como en Gossypium (Cherry et al., 1971), Galeopsis (Houts y Hillebrand, 1976) y Brassica (Vaughan y Waite, 1967).

La propiedad de adición de las proteínas seminales de los progenitores en híbridos y poliploides ha sido usada, con buenos resultados, como una herramienta auxiliar en el estudio del origen y la evolución de los mismos. Hunziker (1966, 1967) ha confirmado electroforéticamente la participación del

tetraploide Agropyron tilcarensis en el origen del complejo hexaploide A. scabriglume, hipótesis que fue previamente apoyada por estudios morfológicos y citogenéticos. En un interesante estudio Johnson (1972) confirmó electroforéticamente el origen de Aegilops cylindrica. Esta especie es un alotetraploide (CCDD) originado a partir de los diploides Ae. caudata (CC) y Ae. squarrosa (DD). Mientras el espectro del tetraploide es muy uniforme, existen algunas variaciones en los diploides; mediante la elección de apropiadas variantes de cada uno de los diploides fue posible sintetizar el espectro de Ae. cylindrica con una mezcla de dichos diploides. Johnson concluyó que Ae. cylindrica se originó en un área donde dichas variantes electroforéticas de Ae. caudata y Ae. squarrosa crecen, o al menos crecían, simpátricamente. Waines y Johnson (1975) proponen, con un estudio electroforético, que Ae. squarrosa es el mejor candidato como progenitor diploide de Ae. ovata.

Edmonds y Glidewell (1977) demostraron que el hexaploide Solanum nigrum se originó por aloploidia a partir del tetraploide S. villosum y el diploide S. americano.

La cromatografía de flavonoides ha demostrado constituir importante información para estudios taxonómicos y evolutivos pues en general una especie puede ser identificada por su patrón cromatográfico en diferentes grupos de plantas (Markham et al., 1970; Ballard y Cruden, 1978; Hunziker et al., 1978; Poggio, 1980; Palacios y Bravo, 1981; Hickenbick, 1983; Naranjo et al., 1984; y otros). Son pocos los casos en que se ha observado el mismo patrón cromatográfico en diferentes especies, como ocurre en trece especies de Thermopsis estudiadas por Dement y Mabry (1972) y en cinco de las quince especies de Helianthus (Series Corona-solis) estudiadas por Schilling y Mabry (1981).

Schilling (1983) encontró mayor variación interespecífica en otras siete especies de Helianthus (Series Angustifolii) observando, en éstas, compuestos específicos.

Harborne (1967) ha señalado que los flavonoides están considerados como los caracteres químicos más estables en plantas. La variación cualitativa en los patrones de flavonoides, según Harborne (ibid.) está muy limitada al nivel específico. Existen muy pocos ejemplos donde una gran variación morfológica intraespecífica es acompañada por una gran variación cromatográfica como ocurre en el género Galium (Puff, 1975) y en Clematis pitcheri (Dennis y Bierner, 1980). Dennis y Bierner (ibid.) al estudiar siete especies de Clematis encontraron que dos variedades de C. pitcheri presentan marcadas diferencias en sus patrones de flavonoides. En general se ha observado constancia en los patrones cromatográficos específicos en grupos que presentan notable variación morfológica como por ejemplo en Baptisia (Brehm y Alston, 1964), Prosopis (Bragg et al., 1978; Palacios y Bravo, 1981; Naranjo et al., 1984) y en Helianthus (Schilling y Mabry, 1981; Schilling, 1983). En la mayoría de los casos la situación típica es que los compuestos principales están uniformemente presentes y hay alguna variación en compuestos menores. Esta variación es la resultante de la heterocigosis existente en la mayoría de las poblaciones naturales, la cual variará dependiendo del sistema de reproducción (auto-alogamia) como lo han mostrado Fröst y Asker (1977) en estudios cromatográficos en Hordeum y Brunsberg (1965) en Lathyrus. Además, ciertos compuestos pueden estar presentes en cantidades bajas (trazas) en algunos individuos y pueden ser subestimados por el método de detección. La causa de la baja concentración de dichos compuestos puede ser debida a variación en genes reguladores o variación debida a efectos ambientales (Abrahanson y Solbrig, 1971;

Wooten, 1971).

Al considerar la variación intraespecífica es importante tener en cuenta la variación intraindividual debida a variación estacional. En diferentes grupos de plantas se ha demostrado la existencia de variación en el patrón cromatográfico de un individuo a lo largo de las estaciones, por ejemplo en Tiarella (Taylor, 1971), en Juniperus (Adams, 1972) y en Prosopis (Naranjo et al., 1984). Debido a que esta variación estacional puede llegar a involucrar hasta un 30% de los compuestos como en Prosopis (Naranjo, ibid.), los autores recomiendan, en los casos en que no se ha podido estudiar esta posible variación, comparar entidades cuyos materiales fueron recolectados en la misma época.

En la década del sesenta Alston, Turner y colaboradores llegaron a demostrar la gran utilidad del estudio de los patrones cromatográficos en el análisis de plantas pertenecientes a complejos naturales de origen híbrido en plantas (Alston y Turner, 1962, 1963; Alston y Hempel, 1964). En base a una serie de trabajos en el género Baptisia encontraron que el estudio de los patrones de flavonoides, sin necesidad de determinación molecular de los compuestos, constituían un método inequívoco en la identificación de varios híbridos interespecíficos en poblaciones naturales. Luego de que dichos autores propusieran dicha técnica, ésta empezó a ser aplicada a otros grupos de plantas permitiendo la identificación y estudio de un gran número de híbridos, por ejemplo en Asplenium (Smith y Levin, 1963), Viola (Stebbins et al., 1963), Zinnia (Torres y Levin, 1964), Tragopogon (Brehn y Ownbey, 1965), Phlox (Levin, 1966), Larrea (Hunziker et al., 1978), Prosopis (Naranjo et al., 1984); e innumerables otros casos.

El éxito de la aplicación del estudio de los patrones cromatográficos en el estudio y determinación del origen y naturaleza de los híbridos radica en el grado de adición en los mismos de los compuestos de los progenitores. Son varios los autores que han encontrado en general adición completa en híbridos naturales (Alston et al., 1965; Smith y Levin, 1963; Harborne, 1973; Ornduff et al., 1973; y otros). Pero existen casos en que se han encontrado compuestos nuevos en híbridos y poliploides derivados como en Phlox (Levy y Levin, 1971), Saccharum (Willians et al., 1974) y en Lasthenia (Ornduff et al., 1973).

6.2. ELECTROFORESIS DE PROTEINAS SEMINALES

El presente estudio ha tenido los siguientes objetivos:

a) Tratar de determinar el grado de diferenciación genética al nivel de proteínas seminales de las cuatro especies de Bromus (subg. Ceratochloa) estudiadas y establecer relaciones fenéticas en base a estos caracteres.

b) Por medio del estudio comparativo del espectro proteico de los híbridos y poliploides artificiales con el de sus progenitores, realizar un estudio del grado de aditividad de las proteínas seminales en las distintas generaciones híbridas estudiadas (F_1 y C_1).

6.2.1. Características electroforéticas y relaciones fenéticas entre las especies de Bromus estudiadas

A. Características electroforéticas

En la separación electroforética de la Figura 6.1. A, se muestran los patrones proteicos de las cuatro especies estudiadas del subg. Ceratochloa: B. catharticus (Cult. 129 y 103), B. parodii (Cult. 104), B. brevis (Cult. 125) y B. bonariensis (Cult. 98). En el esquema de la Figura 6.1.B, se numeran las bandas de dichos patrones. Este esquema está basado en la corrida de la Figura 6.1. A y en otras realizadas en estos materiales. Algunas bandas más lentas que la N° 1, no se las ha considerado por presentar intensidades muy bajas. Las diferencias de intensidad de algunas bandas entre especies, como se observa en la Figura 6.1. A, se debe a que en esa oportunidad se utilizaron igual cantidad de semillas por especie, siendo ellas de diferente tamaño. Posteriormente se utilizó 0,15 gramos de semillas maduras

Fig. 6.1. A = Patrones electroforéticos de B.catharticus, B.pardii, B.brevis y B.bonariensis. Cátodo hacia la derecha y el origen en el borde izquierdo. B = Representación esquemática de las bandas proteicas. Las bandas más lentas que la N°1 no fueron consideradas.

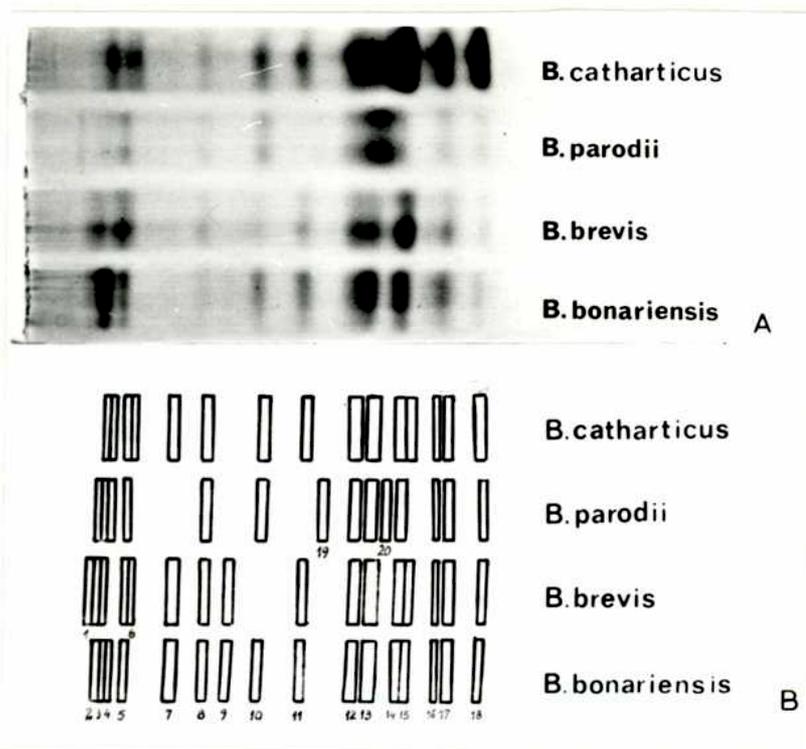


Fig. 6.1

(15-25 semillas) de cada uno de los taxones obteniéndose igual concentración de proteínas y mayor similitud en la densidad de las bandas homólogas entre las especies.

Al comparar estas cuatro especies se consideró un total de 20 bandas electroforéticas. En la Tabla 6.1. (MBD, Matriz Básica de Datos) se indican las bandas presentes en cada una de las especies. Al analizar la Figura 6.1. A y B, y la Tabla 6.1. puede verse que nueve bandas son comunes a las 4 especies (N°3, 5, 8, 12, 13, 14, 16, 17, 18), sólo tres bandas son propias de alguna de las especies (N° 1, 19, 20) y las nueve bandas restantes están compartidas por dos ó tres de las especies. La presencia de una banda en tres de las cuatro especies, hace que ésta sea marcadora (por ausencia) de la cuarta especie; así, la ausencia de la banda 2 es marcadora de B. catharticus, la de las bandas 4 y 10 de B. brevis y la de las bandas 7, 11 y 15 de B. parodii.

B. Relaciones fenéticas

Al aplicar las técnicas de taxonomía numérica a los resultados obtenidos en este estudio electroforético se obtiene una cuantificación de las relaciones entre las especies. Las relaciones que se obtienen son fenéticas (relación de fenotipos actuales) y son estructuras taxonómicas hipotéticas a las que no deben dársele, necesariamente, connotaciones filogenéticas.

En base a los 20 caracteres electroforéticos y las cuatro especies como OTU's (MBD, Tabla 6.1.), se aplicaron tres coeficientes de similitud: dos coeficientes de asociación "Jaccard" = S_j y "Simple Matching Coefficient" = SMC, y un coeficiente de distancia "Taxonomic Distance" = TD. Con estos

Tabla 6.1. Características electroforéticas. Matriz Básica de Datos (MBD), para proteínas de reserva. (0=ausente o no detectada;1=presente).

| Especies (OTU's) | Bandas electroforéticas | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------|-------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
| 1. <u>B.catharticus</u> | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 2. <u>B.bonariensis</u> | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 3. <u>B.brevis</u> | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 4. <u>B.parodii</u> | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |

coeficientes se obtuvieron las tres matrices de similitud (OTU x OTU) de la Tabla 6.2. Con estas matrices y la aplicación de UPGMA (= "Unweighted Pair Group Method using Arithmetic average") como método de agrupamiento de ligamiento completo, se obtuvieron los tres fenogramas de la Figura 6.2.

Los tres métodos han originado fenogramas muy semejantes, y han generado la misma relación fenética. B. bonariensis y B. brevis forman un primer grupo fenético de gran afinidad. B. catharticus se une a este primer grupo, mostrando mayor afinidad por él que por B. parodii que es la especie más aislada. Para evaluar la congruencia taxonómica, además de la comparación visual de los fenogramas, se calcularon los coeficientes de correlación r entre las tres matrices de similitud de la Tabla 6.2. Los valores fueron:

$$r = 0,992 \text{ para el par Sj/SMC}$$

$$r = 0,996 \text{ para el par Sj/TD}$$

$$r = 0,997 \text{ para el par SMC/TD}$$

El elevado valor de r obtenido en todos los casos indica una perfecta congruencia entre los resultados obtenidos por los tres métodos de clasificación usados.

En la sección 6.4. de este capítulo se analiza la concordancia (congruencia) con los resultados de los estudios cromatográficos.

Tabla 6.2. Matrices de similitud (OTU x OTU), considerando 20 caracteres electroforéticos. Coeficientes usados: Sj = Jaccard, SMC = "Simple Matching Coefficient" y TD = Distancia Taxonómica.

| | | 1. <u>B.cath.</u> | 2. <u>B.bona.</u> | 3. <u>B.brev.</u> | 4. <u>B.paro.</u> |
|----|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Sj | 1. <u>B.cath.</u> | 1.0 | | | |
| | 2. <u>B.bona.</u> | 0.765 | 1.0 | | |
| | 3. <u>B.brev.</u> | 0.667 | 0.778 | 1.0 | |
| | 4. <u>B.paro.</u> | 0.556 | 0.667 | 0.500 | 1.0 |

| | | 1. <u>B.cath.</u> | 2. <u>B.bona.</u> | 3. <u>B.brev.</u> | 4. <u>B.paro.</u> |
|-----|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| SMC | 1. <u>B.cath.</u> | 1.0 | | | |
| | 2. <u>B.bona.</u> | 0.800 | 1.0 | | |
| | 3. <u>B.brev.</u> | 0.700 | 0.800 | 1.0 | |
| | 4. <u>B.paro.</u> | 0.600 | 0.700 | 0.500 | 1.0 |

| | | 1. <u>B.cath.</u> | 2. <u>B.bona.</u> | 3. <u>B.brev.</u> | 4. <u>B.paro.</u> |
|----|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| TD | 1. <u>B.cath.</u> | 0.0 | | | |
| | 2. <u>B.bona.</u> | 0.447 | 0.0 | | |
| | 3. <u>B.brev.</u> | 0.548 | 0.447 | 0.0 | |
| | 4. <u>B.paro.</u> | 0.632 | 0.548 | 0.707 | 0.0 |

Fig. 6.2. Fenogramas obtenidos en base a 20 caracteres electroforéticos. Coeficientes usados: S_j = Jaccard, SMC = "Simple Matching Coefficient" y TD = Distancia Taxonómica. Los tres fenogramas se obtuvieron por el método de agrupamiento UPGMA. r = coeficiente de correlación cofenética.

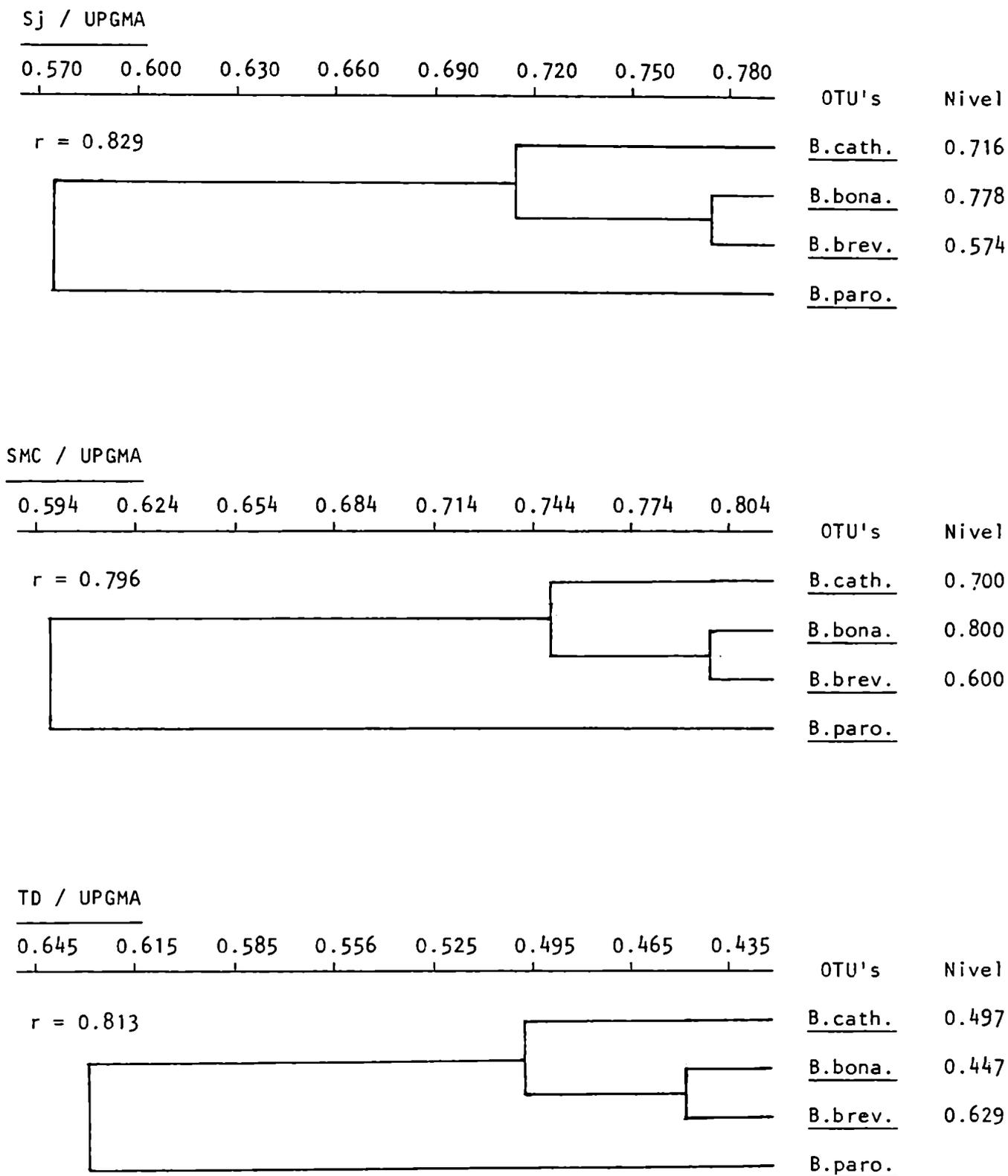


Fig. 6.2

6.2.2. Adición de proteínas en un híbrido F_1 y en su aloploiploide artificial de *Bromus*

En los estudios previos de cuantificación del grado de adición de las proteínas de reserva de los progenitores en los híbridos F_1 y en los aloploiploides derivados, se presentó la dificultad metodológica de no poder estudiar la aditividad en los híbridos F_1 por ser éstos, en general, totalmente estériles. En esos casos lo que se hizo es correr una mezcla de los extractos de las especies. En el presente estudio, se pudo salvar dicha dificultad por contar con un híbrido que no resultó totalmente estéril pudiendo comparar el patrón electroforético del híbrido F_1 con el de su aloploiploide derivado.

El híbrido en cuestión es el F_1 *B. catharticus* x *B. brevis* (híbrido C2, Tabla 4.2.) donde pudo estudiarse su patrón electroforético y compararlo con el del aloploiploide C_1 *B. catharticus-B. brevis* (Cult. 144) y con el de sus progenitores.

Como puede observarse en la corrida electroforética de la Figura 6.3. la adición en los espectros híbridos es completa. No se encontraron diferencias entre los espectros proteicos de la F_1 y el del aloploiploide, siendo a su vez dichos espectros iguales al obtenido a partir de una mezcla (50% + 50%) de extractos proteicos de los progenitores, lo cual se pudo ver en otras corridas electroforéticas.

Fig. 6.3. A = Patrones electroforéticos de B.catharticus, B.brevis, el híbrido F₁ (C2) y el anfiploide artificial (Cult. 144). El cátodo hacia la derecha y el origen en el borde izquierdo. B = Representación esquemática de las bandas proteicas. Las bandas más lentas que la N°1 no fueron consideradas.

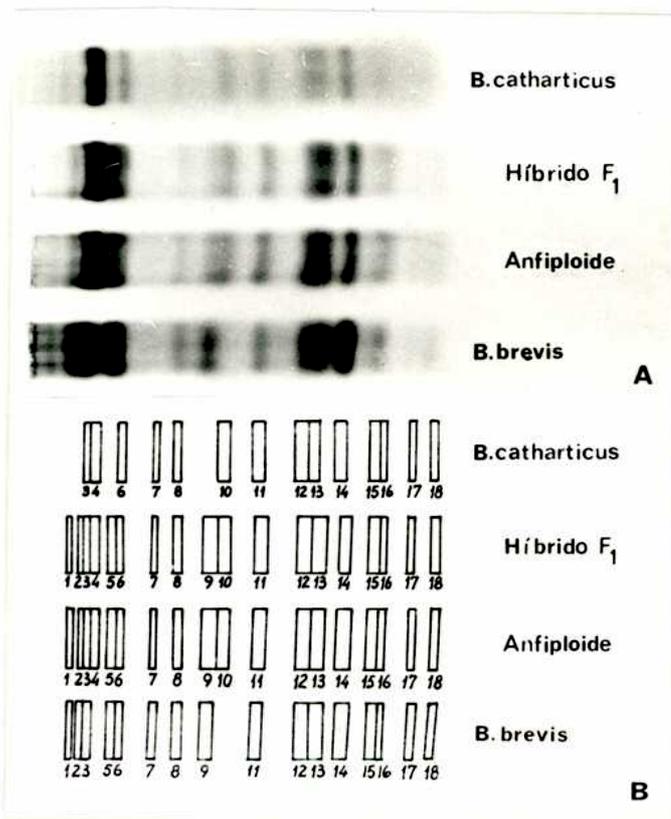


Fig. 6.3

6.2.3. Perfiles electroforéticos en especies diploides (subg. Festucoides) y octoploides (subg. Ceratochloa)

Se ha realizado un estudio preliminar de caracterización y variación proteica en especies diploides del subgénero Festucoides (B. laevipes, B. anomalus y B. ciliatus) y en especies del complejo octoploide del subgénero Ceratochloa (B. carinatus, B. marginatus y B. maritimus).

En la Figura 6.4. se muestra una de las corridas electroforéticas realizadas. Los diploides tienen un patrón que los caracteriza y consta de pocas bandas. Los octoploides poseen una mayor riqueza proteica. Tanto al nivel diploide como octoploide existe variación interespecífica (Figura 6.4.).

En la Figura 6.5. se comparan los perfiles electroforéticos de un hexaploide, un octoploide y un diploide. En ella puede observarse que los perfiles del hexaploide y octoploide son semejantes estando contenido en el octoploide el espectro proteico del hexaploide. Las bandas del diploide podrían también estar incluidas en el octoploide. Esto último no puede afirmarse, por ahora, ya que las pocas bandas de los diploides coinciden con zonas de mayor densidad proteica de los octoploides. Estas observaciones estarían apoyando el origen de los octoploides (subgénero Ceratochloa) como alopoliploides entre hexaploides (subgénero Ceratochloa) y diploides (subgénero Festucoides) postulado y probado citogenéticamente por Stebbins y Tobgy (1944).

Fig. 6.4. Perfiles electroforéticos de tres especies octoploides de Bromus subg. Ceratochloa (B. carinatus, B. marginatus y B. maritimus) y tres especies diploides del subg. Festucoides (B. laevipes, B. anomalus y B. ciliatus). El cátodo hacia la derecha y el origen en el extremo izquierdo.

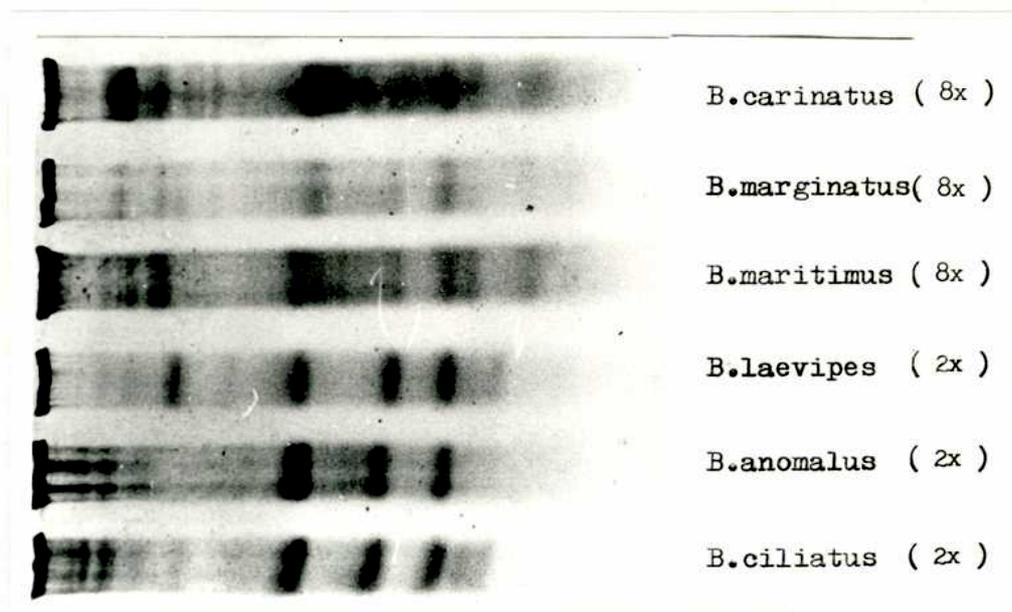


Fig. 6.4.

Fig. 6.5. Perfiles electroforéticos de una especie hexaploide del subgénero *Ceratochloa* (B. *brevis*), una octoploide del subgénero *Ceratochloa* (B. *maritimus*) y de una diploide, subgénero *Festucoides* (B. *anomalus*). El cátodo hacia la derecha y el origen en el borde izquierdo.

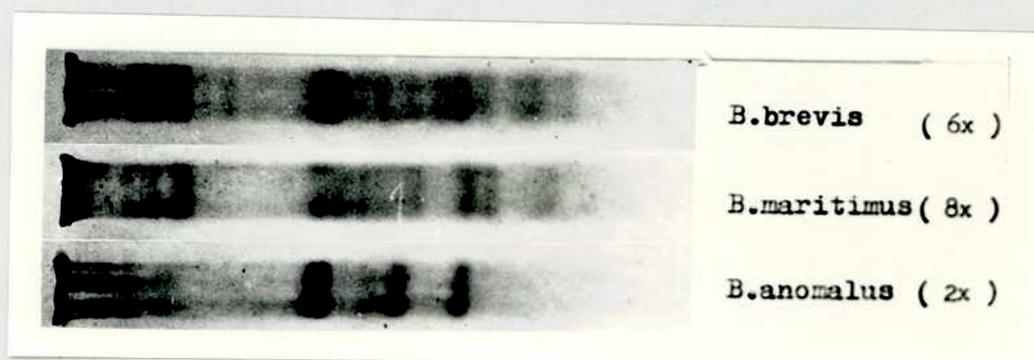


Fig. 6.5.

6.3. CROMATOGRAFIA DE FLAVONOIDES EN HOJAS

Los objetivos fijados al realizar este estudio fueron análogos a los de los estudios electroforéticos:

a) Establecer las relaciones fenéticas entre las cuatro especies de Bromus (subg. Ceratochloa), en base a las diferencias genéticas existentes en la determinación de los flavonoides en las hojas.

b) Establecer las relaciones fenéticas entre B. uruguayensis y B. brachyantera (subg. Festucoides) y de estas especies con las del subgénero Ceratochloa.

c) Análisis de patrones cromatográficos en generaciones parentales, híbridos y alopoliploides derivados, y cuantificación de la adición de los flavonoides en cada una de las generaciones híbridas.

6.3.1. Cromatografía y relaciones fenéticas entre cuatro especies de Bromus, subgénero Ceratochloa

A. Características cromatográficas

En el estudio de estas cuatro especies fueron consideradas treinta zonas cromatográficas (1 al 30, Tabla 6.3.). Los compuestos 31 al 42 que figuran en la Tabla 6.3. corresponden a las especies del subgénero Festucoides y el compuesto a a los híbridos. Desde un punto de vista práctico se considera cada zona cromatográfica (mancha) como un flavonoide aunque podría incluir más de un compuesto. En la Tabla 6.4. (MBD) se indican los compuestos presentes en cada una de las especies. Los compuestos considerados estuvieron

TABLA 6.3 Características cromatográficas de los compuestos. ----- = invisible;
 --- = no vira; am = amarillo; am-ve = amarillo verdoso; bla = blanco;
 c = celeste; pa = pardo; v = violeta.

| Compuesto | Rf (TBA) X | Rf (HOAc) X | Color (UV) | Color (UV+NH ₃) |
|-----------|---------------|----------------|---------------|--------------------------------|
| 1 | .776 | .055 | pa | pa-am |
| 2 | .414 | .190 | pa | am |
| 3 | .408 | .130 | pa | am |
| 4 | .445 | .323 | pa | --- |
| 5 | .349 | .324 | pa | |
| 6 | .210 | .265 | pa | |
| 7 | .513 | .130 | pa | |
| 8 | .337 | .653 | pa | |
| 9 | .118 | .359 | pa | |
| 10 | .180 | .429 | pa | |
| 11 | .386 | .594 | pa | |
| 12 | .006 | .592 | pa | |
| 13 | .468 | .193 | pa | |
| 14 | .631 | .178 | pa | |
| 15 | .658 | .265 | pa | |
| 16 | .411 | .647 | pa | |
| 17 | .525 | .199 | pa | |
| 18 | .597 | .136 | pa | |
| 19 | .645 | .163 | pa | |
| 20 | .565 | .232 | pa | |
| 21 | .105 | .195 | ----- | |
| 22 | .256 | .007 | bla | |
| 23 | .138 | .253 | pa | |
| 24 | .332 | .870 | v | |
| 25 | .375 | .265 | pa | |
| 26 | .319 | .694 | am | |
| 27 | .288 | .606 | pa | |
| 28 | .316 | .106 | am | |
| 29 | .004 | .835 | am | |
| 30 | .612 | .287 | pa | |
| 31 | .529 | .322 | pa | |
| 32 | .622 | .240 | pa | |
| 33 | .312 | .007 | am | |
| 34 | .320 | .523 | pa | |
| 35 | .005 | .764 | am | --- |
| 36 | .302 | .106 | ----- | am |
| 37 | .209 | .193 | ----- | am |
| 38 | .733 | .867 | pa | --- |
| 39 | .360 | .559 | ----- | am |
| 40 | .245 | .882 | am | --- |
| 41 | .217 | .853 | v | --- |
| 42 | .426 | .612 | c | --- |
| a | .185 | .525 | pa | am |

presentes en más del 80% de los individuos, siendo muy pocos los compuestos que presentaron frecuencia menor. En la Figura 6.6. se representan esquemáticamente los cromatogramas característicos de estas especies.

B. catharticus: Se estudiaron en total doce individuos, cinco provenientes de una población de Núñez, Buenos Aires (402/1, 402/2, 402/3, 402/4 y 402/5) y siete de Brazo Largo, Entre Ríos (198/1 al 7). No se encontró variación significativa intra e interpoblacional. El cromatograma característico está constituido por 11 compuestos (Figura 6.6.). Los compuestos 4, 5, 6 y 7 son propios, mientras los compuestos 2 y 17 son compartidos solamente con B. parodii y B. brevis respectivamente. B. catharticus no posee el compuesto 29 que es común a las otras tres especies.

B. bonariensis: Se estudiaron ocho individuos (Cult. N° 98/1 al 8). Contiene trece de los compuestos considerados (Figura 6.6.), de los cuales sólo el 27 es propio. Comparte exclusivamente con B. brevis seis de los compuestos (9, 10, 11, 13, 16 y 22).

B. brevis: Se analizaron diez individuos en total, seis provenientes de la Pampa (Cult. 118/2 al 8) y cuatro de Cardenal Cagliaro, Prov. de Buenos Aires (Cult. 125/1 al 4). No se encontró variación intrapoblacional y la variación interpoblacional fue muy baja y no involucra a los compuestos considerados. El cromatograma característico está formado por quince compuestos (Figura 6.6.), de los cuales son propios el 12, 14 y 15.

B. parodii: Se analizaron once individuos (Cult. 104/1 al 11). El cromatograma característico contiene catorce compuestos (Figura 6.5.). Los compuestos 18, 19, 20, 21, 23, 25, 28 y 30 son propios.

Del análisis anterior se deduce que del total de treinta compuestos

Fig. 6.6. Cromatogramas característicos de B.bonariensis, B.brevis, B.catharticus y B.parodii. Se muestran rayados los compuestos que son propios de cada una, al comparar estas cuatro especies. Los frentes de los solventes se señalan con línea de trazo.

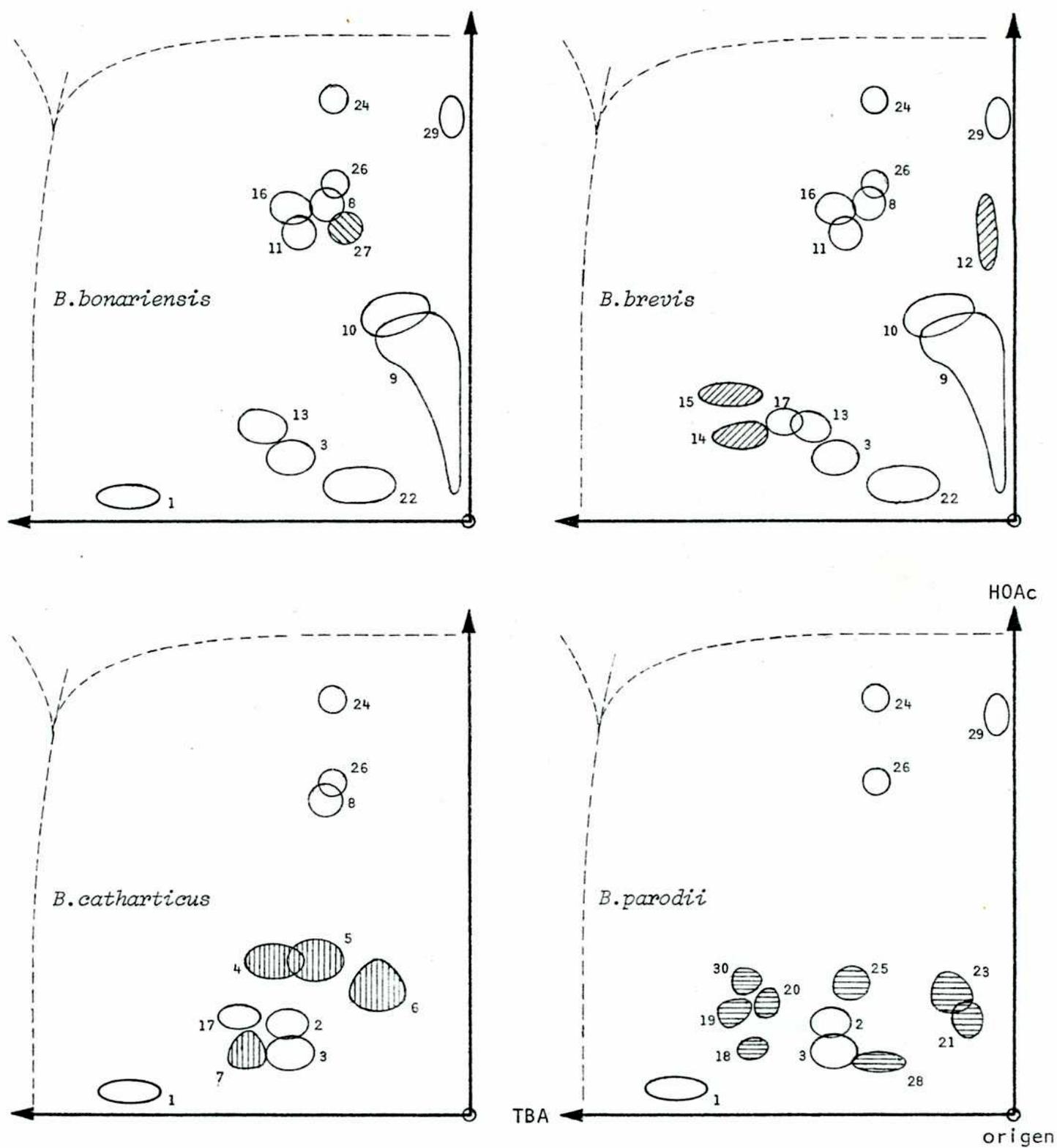


Fig. 6.6

considerados sólo tres (3, 24 y 26) son comunes a las cuatro especies. Por lo tanto, las diferencias entre ellas están basadas en los veintisiete restantes. De estos últimos once son compartidos y dieciseis son propios de algunas de las especies. Los compuestos propios son: B. catharticus = 4, 5, 6 y 7; B. bonariensis = 27; B. brevis = 12, 14 y 15; B. parodii = 18, 19, 20, 21, 23, 25, 28 y 30.

Cada una de las especies posee, por lo tanto, un cromatograma que la caracteriza. Estos son fácilmente identificables no sólo por los compuestos propios, sino también por las combinaciones entre los restantes.

B. Relaciones fenéticas

Como ya ha sido discutido (6.2.1.B) con la aplicación de técnicas numéricas se obtienen relaciones que deben ser interpretadas como la generación de hipótesis de estructuras taxonómicas puramente fenéticas, sin necesarias connotaciones filogenéticas.

Trabajando con los 30 caracteres cromatográficos (1 a 30) y las cuatro especies (1 a 4) como OTU's (MBD, Tabla 6.4.), se aplicaron tres coeficientes de similitud; dos coeficientes de distancia "Manhattan Coefficient" = D, "Taxonomic Distance" = TD y un coeficiente de asociación "Simple Matching Coefficient" = SMC. Con estos coeficientes se obtuvieron las tres matrices de similitud (OTU x OTU) de la Tabla 6.5. En base a estas matrices y con la aplicación de "unweighted pair group method using arithmetic averages" = UPGMA, como método de agrupamiento de ligamiento promedio, se obtuvo los tres fenogramas de la Figura 6.7. Los coeficientes de correlación cofenética (r), que son mayores de 0,912, nos indican que existe una muy baja distorsión en los

Tabla 6.5 Matrices de similitud (OTU x OTU), considerando 30 caracteres cromatográficos. Coeficientes usados: T = Manhattan; TD = Distancia Taxonómica; SMC = "Simple Matching Coefficient".

| | | 1. <u>B.cath.</u> | 2. <u>B.bona.</u> | 3. <u>B.brev.</u> | 4. <u>B.paro.</u> |
|---|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| T | 1. <u>B.cath.</u> | 0.0 | | | |
| | 2. <u>B.bona.</u> | 0.683 | 0.0 | | |
| | 3. <u>B.brev.</u> | 0.730 | 0.447 | 0.0 | |
| | 4. <u>B.paro.</u> | 0.707 | 0.753 | 0.837 | 0.0 |

| | | 1. <u>B.cath.</u> | 2. <u>B.bona.</u> | 3. <u>B.brev.</u> | 4. <u>B.paro.</u> |
|----|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| TD | 1. <u>B.cath.</u> | 0.0 | | | |
| | 2. <u>B.bona.</u> | 0.467 | 0.0 | | |
| | 3. <u>B.brev.</u> | 0.533 | 0.200 | 0.0 | |
| | 4. <u>B.paro.</u> | 0.500 | 0.567 | 0.700 | 0.0 |

| | | 1. <u>B.cath.</u> | 2. <u>B.bona.</u> | 3. <u>B.brev.</u> | 4. <u>B.paro.</u> |
|-----|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| SMC | 1. <u>B.cath.</u> | 1.0 | | | |
| | 2. <u>B.bona.</u> | 0.533 | 1.0 | | |
| | 3. <u>B.brev.</u> | 0.467 | 0.800 | 1.0 | |
| | 4. <u>B.paro.</u> | 0.500 | 0.433 | 0.300 | 1.0 |

Fig. 6.7. Fenogramas obtenidos en base a 30 caracteres cromatográficos. Coeficientes usados: T = Manhattan, TD = Distancia Taxonómica y SMC = "Simple Matching Coefficient". Los tres fenogramas se obtuvieron por el método de agrupamiento UPGMA. r = coeficiente de correlación cofenética.

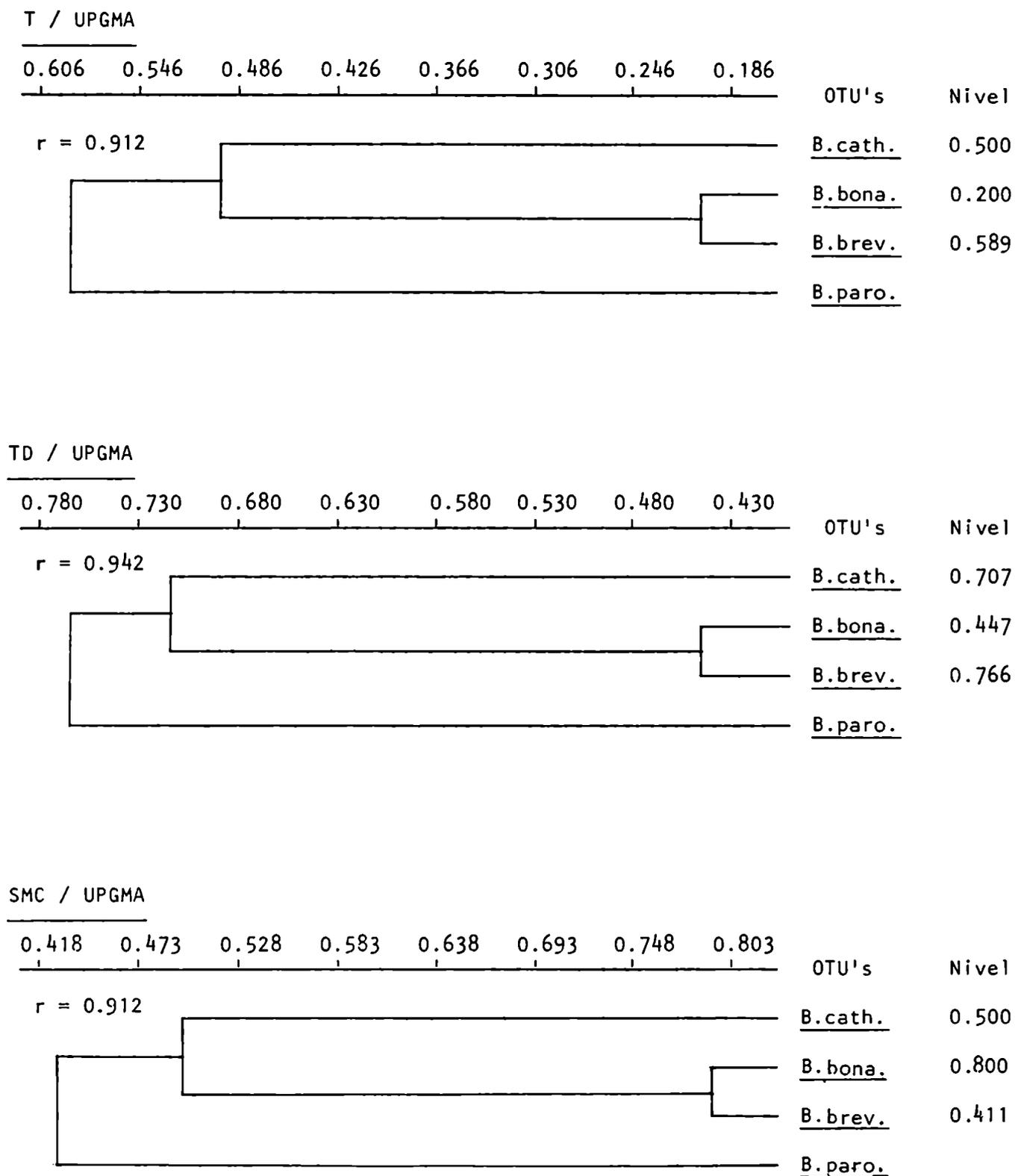


Fig. 6.7

métodos aplicados para obtener los fenogramas mencionados.

Al analizar los tres fenogramas se puede ver que se ha generado la misma relación fenética. Se forma un primer grupo fenético de gran afinidad entre B. bonariensis y B. brevis, luego se une a B. catharticus quedando B. parodii como la especie más aislada. La perfecta congruencia taxonómica obtenida con los tres métodos está indicada por los valores elevados de los coeficientes de correlación obtenidos al comparar de a dos las matrices de similitud de la Tabla 6.5. dichos valores son:

$$r = 0,995 \text{ para el par T/TD}$$

$$r = 0,994 \text{ para el par T/SMC}$$

$$r = 1 \quad \text{para el par TD/SMC}$$

En la sección 6.4. se analizará la concordancia de estos resultados con los datos electroforéticos.

6.3.2. Cromatografía en algunos híbridos y poliploides artificiales entre especies de Bromus, subgénero Ceratochloa

El primer objetivo de este estudio fue analizar la posible existencia de interacción de los genotipos de los progenitores y el grado de adición de los fenoles en los híbridos y aloploiploides artificiales.

El segundo objetivo fue obtener información general sobre las posibles diferencias del fenotipo fenólico a causa de la poliploidía.

Se consideraron un total de 30 zonas cromatográficas (compuestos 1 al 30, Tabla 6.3. y 6.4.) en forma similar a cuando fueron estudiadas las especies progenitoras.

A. Cromatografía del híbrido hexaploide B. catharticus x B. brevis en las generaciones F₁, F₂ y F₃

En la Figura 6.8. se esquematizan los cromatogramas correspondientes a las generaciones F₁, F₂ y F₃ de dicho híbrido.

En cada una de las generaciones se han realizado las siguientes observaciones:

F₁: Se estudió el único individuo híbrido obtenido (Cruzamiento N° 2 = C2). En la Figura 6.8. se esquematiza su cromatograma, que es híbrido pues presenta compuestos aportados por cada uno de los progenitores, aunque se ve la ausencia de los compuestos 1, 6 y 7 propios de B. catharticus y los compuestos 11, 12, 14 y 22 propios de B. brevis. Se observó un nuevo compuesto denominado a.

F₂: En los cuatro individuos estudiados de esta generación (148/1, 2,

Fig, 6.8. Cromatogramas de híbridos hexaploides B.catharticus x B.brevis en generaciones F_1 , F_2 y F_3 .

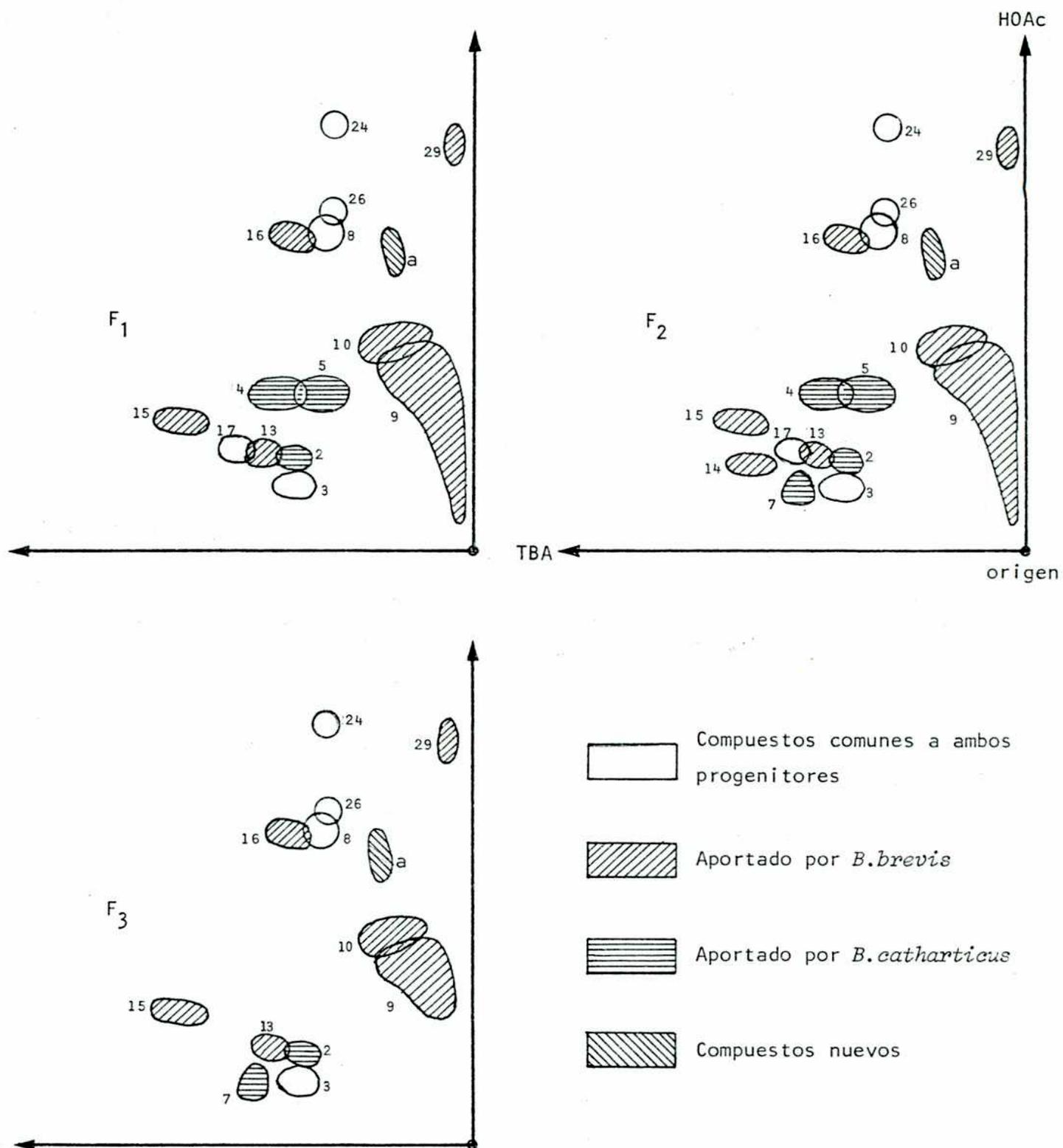


Fig. 6.8

3, 4) se encontró el mismo cromatograma, el que se muestra en la Figura 6.8. Al igual que en la F_1 presenta un cromatograma híbrido, pero se observó la ausencia de los compuestos 1 y 6 propios de B. catharticus y los compuestos 11, 12 y 22 propios de B. brevis. Se observó el nuevo compuesto a.

F_3 : Se estudiaron dos individuos (853/1 y 2) los que presentaron el mismo cromatograma (Figura 6.8.). Dicho cromatograma es híbrido en el cual se observó la ausencia de los compuestos 1, 4, 5 y 6 propios de B. catharticus y los compuestos 11, 12, 17 y 22 propios de B. brevis. La zona cromatográfica correspondiente al "compuesto 9" presenta una forma distinta, tiene menos cola en el desarrollo del 2° solvente; esto pudo verse en varias corridas de este material. Se observó la presencia del nuevo compuesto a.

En todos los individuos de este híbrido, en las distintas generaciones, se observó en general:

a) Los nueve compuestos (18, 19, 20, 21, 23, 25, 27, 28 y 30) que están ausentes en las dos especies progenitoras, están ausentes también en los híbridos.

b) Los cinco compuestos (3, 8, 17, 24 y 26) que tienen en común los progenitores, también están presentes en los híbridos en general; el compuesto 17 está ausente en la F_3 .

c) En todos los híbridos aparece un compuesto nuevo, de posible naturaleza híbrida, el cual hemos denominado a y sus características cromatográficas se dan en la Tabla 6.3.

d) Los compuestos 1, 6, 11, 12 y 22 están ausentes en todas las generaciones.

e) Los compuestos 7 y 14 no se detectaron en la F_1 y reaparecieron en las plantas F_2 que fueron estudiadas y/o en la F_3 .

B. Cromatografía del alododecaploide *B. catharticus* - *B. brevis*, en las generaciones C_1 y C_2

Los cromatogramas correspondientes a individuos de las generaciones C_1 y C_2 de dicho aloploiploide, se esquematizan en la Figura 6.9.

C_1 : Se estudiaron dos individuos (144/1 y 2) los que presentaron las mismas características cromatográficas (Figura 6.9.). El cromatograma es idéntico al del híbrido F_1 (132; Figura 6.9.), por lo cual valen las mismas consideraciones hechas sobre él.

C_2 : Se estudiaron dos individuos (145 y 146), los que mostraron diferencias particulares en sus cromatogramas (Figura 6.9.).

Individuo 145: Están ausentes los compuestos 1 y 6 propios de *B. catharticus* y los compuestos 11, 12 y 22 propios de *B. brevis*.

Individuo 146: están ausentes los compuestos 1, 4, 5 y 6 propios de *B. catharticus* y los compuestos 11, 12, 14 y 22 propios de *B. brevis*.

En estos cromatogramas se observan las mismas características generales que en los de las F_1 , F_2 y F_3 .

a) Están ausentes los nueve compuestos que están ausentes en los progenitores.

b) Están presentes los cinco compuestos comunes a ambos progenitores; el compuesto 17 no aparece en los individuos C_2 .

c) Aparecen en todos el nuevo compuesto a.

Fig. 6.9. Cromatogramas del alododecaploide B. catharticus-B. brevis
en las generaciones C_1 y C_2 .

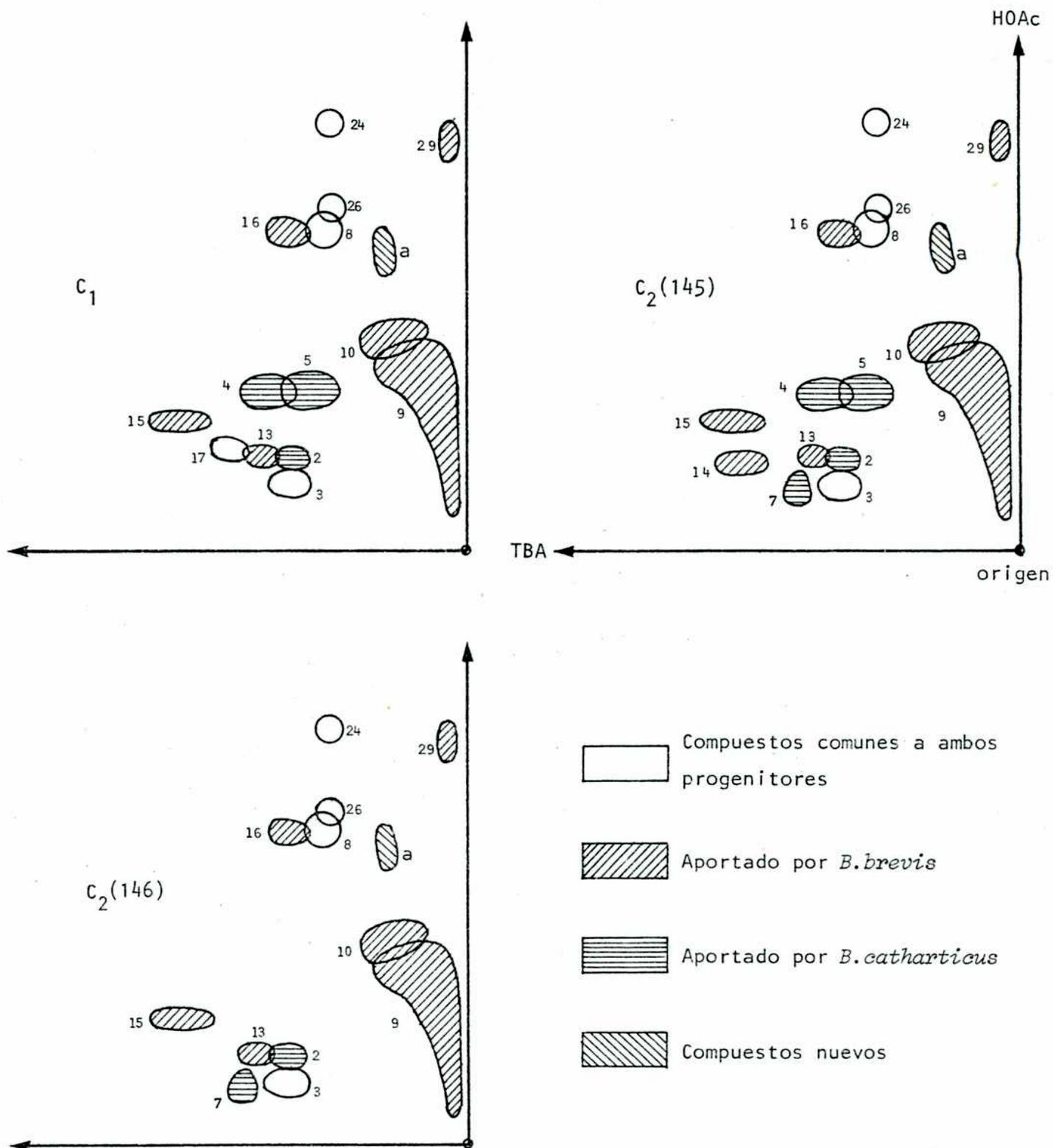


Fig. 6.9

d) Los compuestos 1, 6, 11, 12 y 22 están ausentes en las dos generaciones.

e) El compuesto 7 está ausente en C_1 y reaparece en C_2 , mientras que el compuesto 14 no reaparece en C_2 .

C. Cromatografía del híbrido F_1 hexaploide *B. bonariensis* x *B. catharticus* (C9)

Se estudió el único individuo obtenido y su cromatograma se representa en la Figura 6.10. Se observa que:

a) Están ausentes los once compuestos áusentes en ambos progenitores (Tabla 6.4.).

b) De los cinco compuestos que están presentes en ambos progenitores, están presentes cuatro (3, 8, 24 y 26) y está ausente uno de ellos (1).

c) No aparecieron compuestos nuevos.

d) Están ausentes los compuestos 11 y 22 propios de *B. bonariensis* y el compuesto 6 propio de *B. catharticus*; pero están presentes los restantes compuestos propios de cada uno de los progenitores.

Dado que todos los híbridos F_1 , F_2 y C_1 estudiados poseen reproducción predominantemente cleistogámica, se supone que la F_2 , F_3 y C_2 se han originado por autofecundación.

Fig. 6.10. Cromatograma del híbrido F₁ hexaploide B. bonariensis x
B. catharticus (C9).

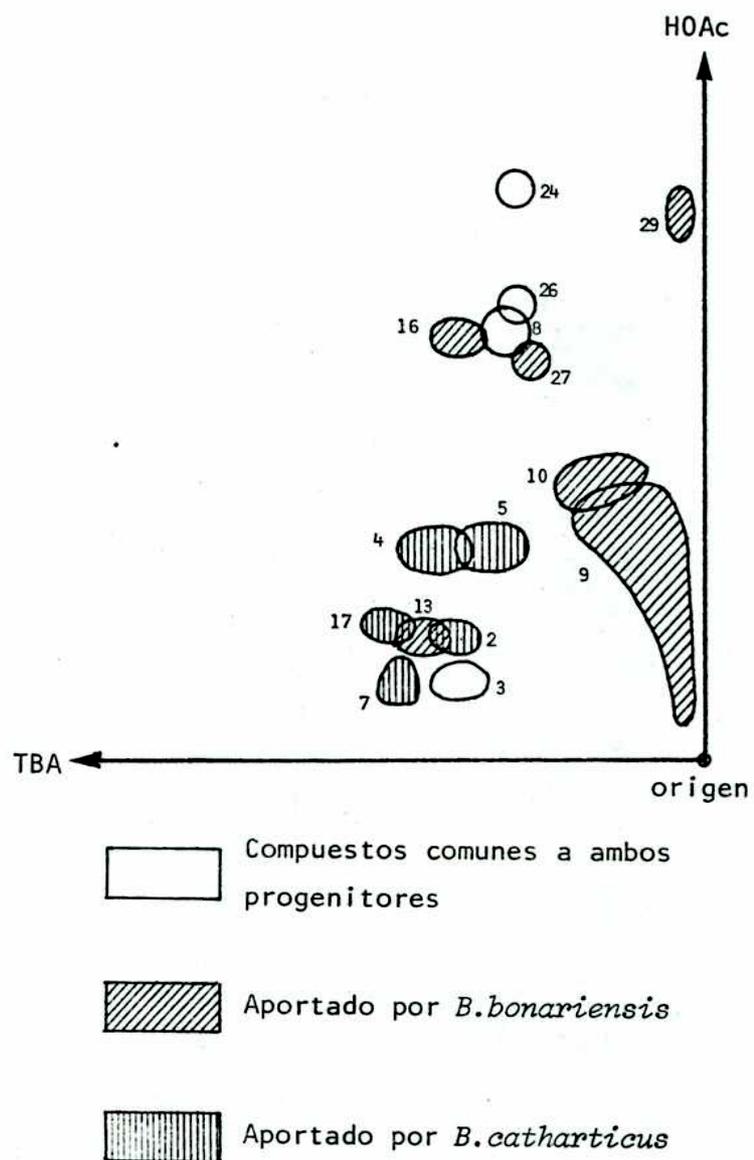


Fig. 6.10

6.3.3. Cromatografía en B. uruguayensis y B. brachyanthera (subgénero Festucoides) y las relaciones fenéticas entre estas dos especies y con las especies del subgénero Ceratochloa

A. Características cromatográficas

Fueron consideradas un total de cuarenta y dos zonas cromatográficas (compuestos) al estudiar estas dos especies (Tabla 6.3. y 6.4.). Veintitrés de dichos compuestos están ausentes en ambas especies (1, 4, 5, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 27, 28 y 30) y son los que están compartidos por las cuatro especies del subgénero Ceratochloa. Se ha considerado, por lo tanto, un total de diecinueve compuestos que estas dos especies comparten. En la Figura 6.11. se esquematizan los cromatogramas característicos de estas dos especies.

B. uruguayensis: Se estudiaron tres individuos (638/1-3). El cromatograma característico está formado por 14 compuestos (Figura 6.11.). Los compuestos 31 y 36 son propios, mientras los compuestos 37, 38, 39, 40 y 41 son comunes con B. brachyanthera. Siete compuestos (2, 3, 6, 8, 25, 26 y 29) son comunes a ambas especies y compartidos con las cuatro especies del subgénero Ceratochloa.

B. brachyanthera: Se estudiaron cuatro individuos (620/1-4). Su cromatograma característico estaba formado por 17 compuestos (Figura 6.11.). Los compuestos 32, 33, 34, 35 y 42 son propios.

Fig. 6.11. Cromatogramas característicos de B.uruguayensis y B.brachyanthera. Se muestran rayados los compuestos que son propios de cada una de estas dos especies el realizar su comparación.

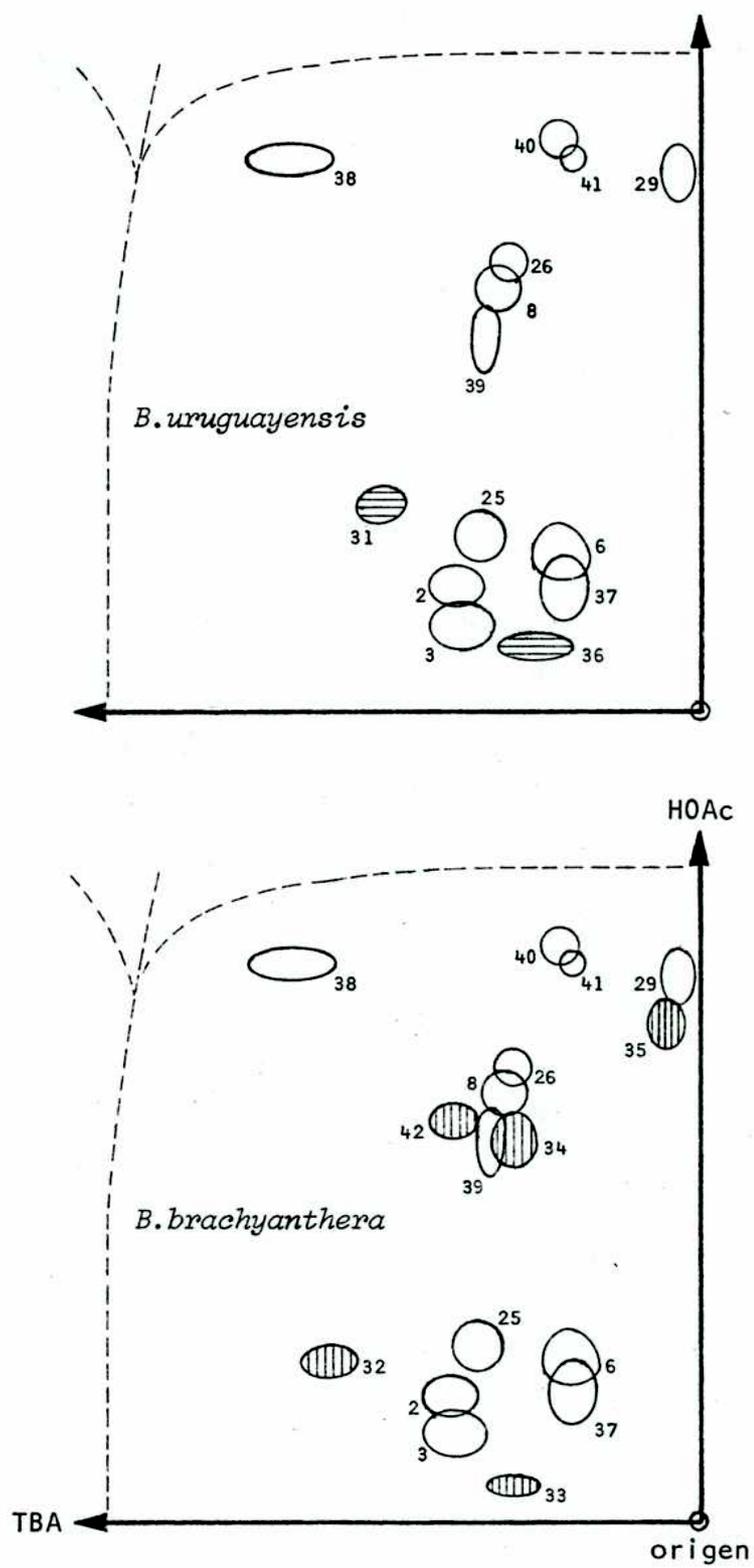


Fig. 6.11

B. Relaciones fenéticas

Considerando los 42 caracteres cromatográficos y las seis especies de Bromus (MBD, Tabla 6.4.), se aplicó el coeficiente de asociación SMC ("Simple Matching Coefficient"). Con este coeficiente se obtuvo la matriz de similitud (OTU x OTU) de la Tabla 6.6. En base a esta matriz y con la aplicación del método de agrupamiento UPGMA, se obtuvo el fenograma de la Figura 6.12.

En el fenograma obtenido se puede ver que las relaciones fenéticas entre las especies del subgénero Ceratochloa (B. catharticus, B. bonariensis, B. brevis y B. parodii) es muy semejante a la obtenida al considerar a estas cuatro especies (OTU's) y 30 caracteres cromatográficos (Figura 6.7.). En relación a B. uruguayensis y B. brachyanthera, forman un grupo fenético independiente (Figura 6.12.).

Este fenograma (Figura 6.12.) nos muestra, con sus relaciones fenéticas que:

a) Las especies del subgénero Ceratochloa forman un grupo separado del de las especies estudiadas del subgénero Festucoides.

b) B. uruguayensis y B. brachyanthera aunque están muy relacionadas, muestran menor similitud cromatográfica que el par B. bonariensis - B. brevis.

Tabla 6.6. Matriz de similitud (OTU x OTU), considerando 42 caracteres cromatográficos. Coeficiente: SMC = "Simple Matching Coefficient".

| | 1. <u>B.cath.</u> | 2. <u>B.bona.</u> | 3. <u>B.brev.</u> | 4. <u>B.paro.</u> | 5. <u>B.urug.</u> | 6. <u>B.brach.</u> |
|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
| 1. <u>B.cath.</u> | 1 | | | | | |
| 2. <u>B.bona.</u> | 0.667 | 1 | | | | |
| 3. <u>B.brev.</u> | 0.619 | 0.857 | 1 | | | |
| 4. <u>B.paro.</u> | 0.643 | 0.595 | 0.500 | 1 | | |
| 5. <u>B.urug.</u> | 0.643 | 0.548 | 0.500 | 0.571 | 1 | |
| 6. <u>B.brach.</u> | 0.571 | 0.476 | 0.429 | 0.500 | 0.833 | 1 |

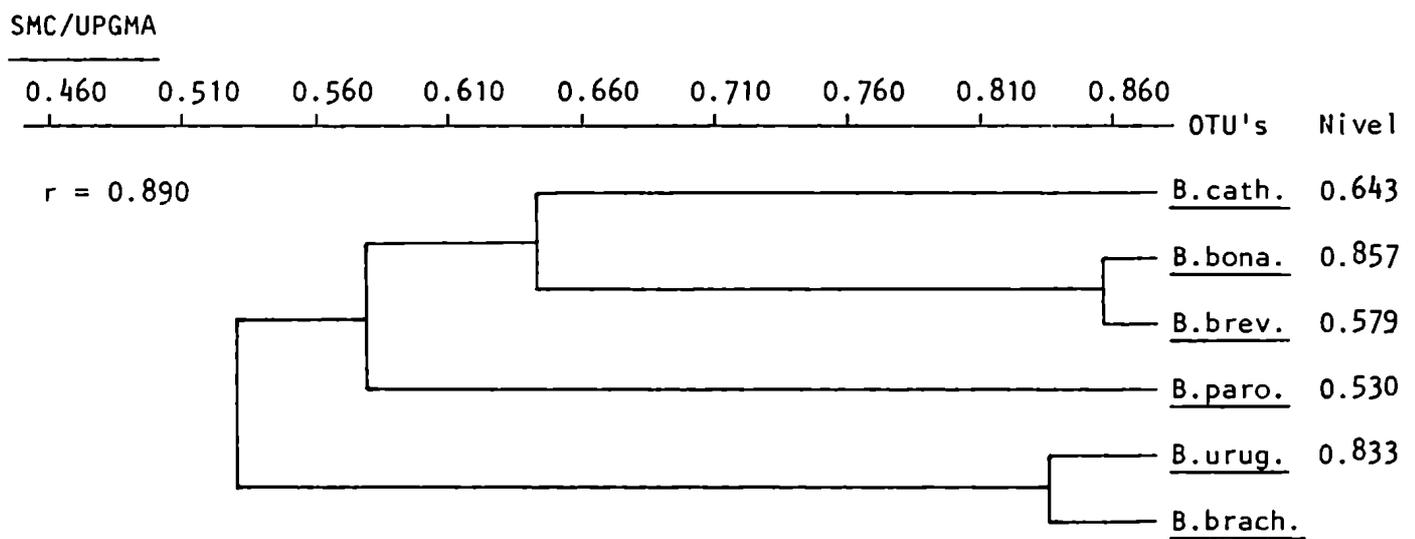


Fig. 6.12. Fenograma obtenido en base a 42 caracteres cromatográficos. Método de agrupamiento = UPGMA. r = coeficiente de correlación cofenética.

6.3.4. Estimación del grado de adición de los flavonoides de los progenitores en los híbridos y aloploidos artificiales estudiados

Se considera que la adición máxima potencial estaría dada por la suma de los compuestos de los progenitores, incluyendo aquellos presentes en ambos. Una estimación de la adición real es el número de compuestos presentes en los híbridos y poliploides expresado como porcentaje de la adición máxima potencial en cada caso.

En la Tabla 6.7. se presentan los resultados obtenidos. La media de adición real incluyendo todos los híbridos fue de 69,03%. El menor fue de 60% en la F_3 y en uno de los individuos C_2 del híbrido B. catharticus x B. brevis y el mayor 78,95% en el híbrido B. bonariensis x B. catharticus.

Tabla 6.7. Presencia y ausencia de los flavonoides propios de los progenitores en híbridos y poliploides. Estimación de la adición.

| Híbridos y Alopoliploides | 2n | Compuestos parentales | | Porcentaje de adición real (%) |
|--------------------------------------|----|--------------------------|----------|---|
| | | Presentes | Ausentes | |
| <u>B.catharticus x B.brevis</u> | | | | |
| F ₁ (132) | 42 | 14 | 7 | 66.70 |
| F ₂ (148) | 42 | 16 | 5 | 76.19 |
| F ₃ (853) | 42 | 12 | 8 | 60.00 |
| C ₁ (144) | 84 | 14 | 7 | 66.70 |
| C ₂ (145) | 84 | 15 | 5 | 75.00 |
| C ₂ (146) | 84 | 12 | 8 | 60.00 |
| <u>B.bonariensis x B.catharticus</u> | | | | |
| F ₁ (730) | 42 | 15 | 4 | 78.95 |
| Media | | 14 | 6.28 | 69.03 |

6.4. RELACIONES ENTRE LAS CUATRO ESPECIES DEL SUBGENERO CERATOCCHLOA EN BASE A CARACTERES ELECTROFORETICOS Y CROMATOGRAFICOS CONSIDERADOS EN CONJUNTO

Al comparar las relaciones establecidas por medio de proteínas seminales (electroforesis, Figura 6.2.) y flavonoides (cromatografía, Figura 6.7.), se observa que los grupos fenéticos formados son muy semejantes, existiendo por lo tanto, una alta congruencia taxonómica. Comparando los fenogramas (TD/UPGMA) obtenidos para caracteres electroforéticos (Figura 6.2.) y cromatográficos (Figura 6.7.) puede verse que el primer grupo (B. bonariensis - B. brevis) se forma en los dos fenogramas en el mismo nivel (0,447), diferenciando en el nivel en que se une a este grupo B. catharticus (0,497 para caracteres electroforéticos y 0,707 para cromatográficos). Cuando se comparan los fenogramas (Figuras 6.2. y 6.7.) obtenidos por el método SMC/UPGMA, se observa el mismo grado de semejanza.

La comparación precedente, además de mostrar la alta congruencia taxonómica, nos muestra que B. catharticus diverge con respecto al grupo B. bonariensis - B. brevis, más para caracteres cromatográficos que para caracteres electroforéticos. Esta última diferencia sería la responsable de que se hayan obtenido valores no muy altos para los coeficientes de correlación al comparar las matrices de similitud (Tabla 6.2. y 6.5.).

$$r = 0,776 \text{ para el par de matrices TD}$$

$$r = 0,765 \text{ para el par de matrices SMC}$$

En vista de la alta congruencia entre caracteres electroforéticos y cromatográficos, se trató de obtener una única estructura taxonómica a partir de caracteres bioquímicos (electroforesis + cromatografía). Para tal fin se

trabajó con 30 caracteres cromatográficos y 20 electroforéticos en forma conjunta. En la Tabla 6.8. se presentan las matrices de similitud obtenidas al aplicar los diferentes coeficientes. En las Figuras 6.13., 6.14., 6.15. y 6.16. se muestran los fenogramas que se obtuvieron aplicando los distintos métodos de agrupamiento.

Al analizar comparativamente los doce fenogramas obtenidos al procesar los 50 caracteres bioquímicos, se puede ver que se ha generado una única relación fenética. Una vez más se ve la alta congruencia obtenida aplicando distintos métodos de agrupamiento. En la única relación fenética obtenida, se forma un primer grupo de gran similitud B. bonariensis - B. brevis, luego se une a B. catharticus y queda B. parodii como la especie menos semejante.

Tabla 6.8. Matrices de similitud (OTU x OTU), considerando 50 caracteres (30 cromatográficos y 20 electroforéticos), Coeficientes usados :

T = Manhattan; TD = Distancia Taxonómica; SMC = "Simple Matching Coefficient".

| | | 1. <u>B.cath.</u> | 2. <u>B.bona.</u> | 3. <u>B.brev.</u> | 4. <u>B.paro.</u> |
|---|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| T | 1. <u>B.cath.</u> | 0.0 | | | |
| | 2. <u>B.bona.</u> | 0.600 | 0.0 | | |
| | 3. <u>B.brev.</u> | 0.663 | 0.447 | 0.0 | |
| | 4. <u>B.paro.</u> | 0.678 | 0.678 | 0.787 | 0.0 |

| | | 1. <u>B.cath.</u> | 2. <u>B.bona.</u> | 3. <u>B.brev.</u> | 4. <u>B.paro.</u> |
|----|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| TD | 1. <u>B.cath.</u> | 0.0 | | | |
| | 2. <u>B.bona.</u> | 0.360 | 0.0 | | |
| | 3. <u>B.brev.</u> | 0.440 | 0.200 | 0.0 | |
| | 4. <u>B.paro.</u> | 0.460 | 0.460 | 0.620 | 0.0 |

| | | 1. <u>B.cath.</u> | 2. <u>B.bona.</u> | 3. <u>B.brev.</u> | 4. <u>B.paro.</u> |
|-----|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| SMC | 1. <u>B.cath.</u> | 1.0 | | | |
| | 2. <u>B.bona.</u> | 0.640 | 1.0 | | |
| | 3. <u>B.brev.</u> | 0.560 | 0.800 | 1.0 | |
| | 4. <u>B.paro.</u> | 0.540 | 0.540 | 0.380 | 1.0 |

Figs. 6.13 a 16. Fenogramas obtenidos en base a 50 caracteres (30 cromatográficos y 20 electroforéticos). Coeficientes usados: idem Fig. 6.9. Se usaron los siguientes métodos de agrupamiento:

Fig. 6.13 = UPGMA ;

Fig. 6.14 = WPGMA ;

Fig. 6.15 = "Single linkage" ;

Fig. 6.16 = "Complete linkage" .

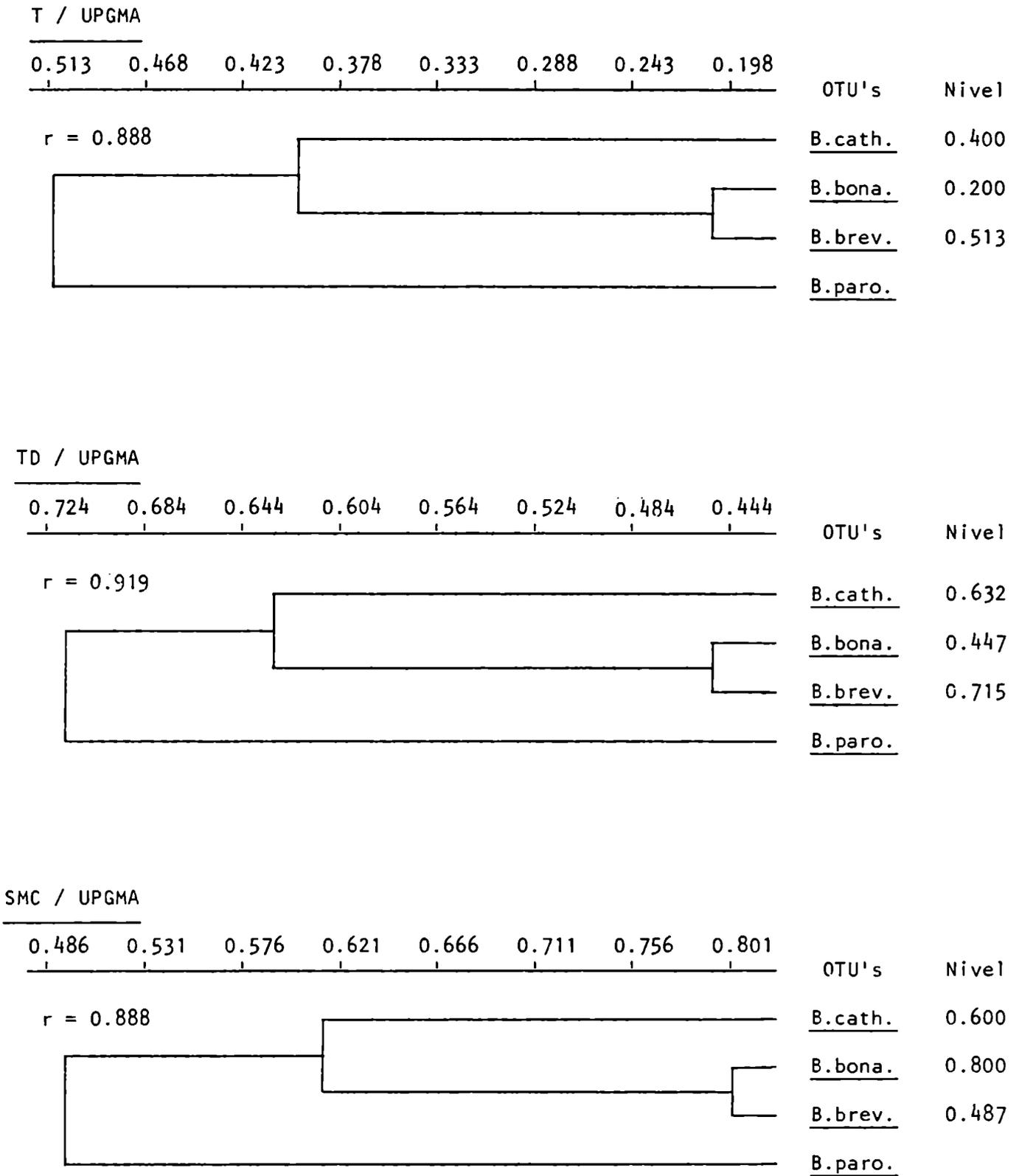


Fig. 6.13

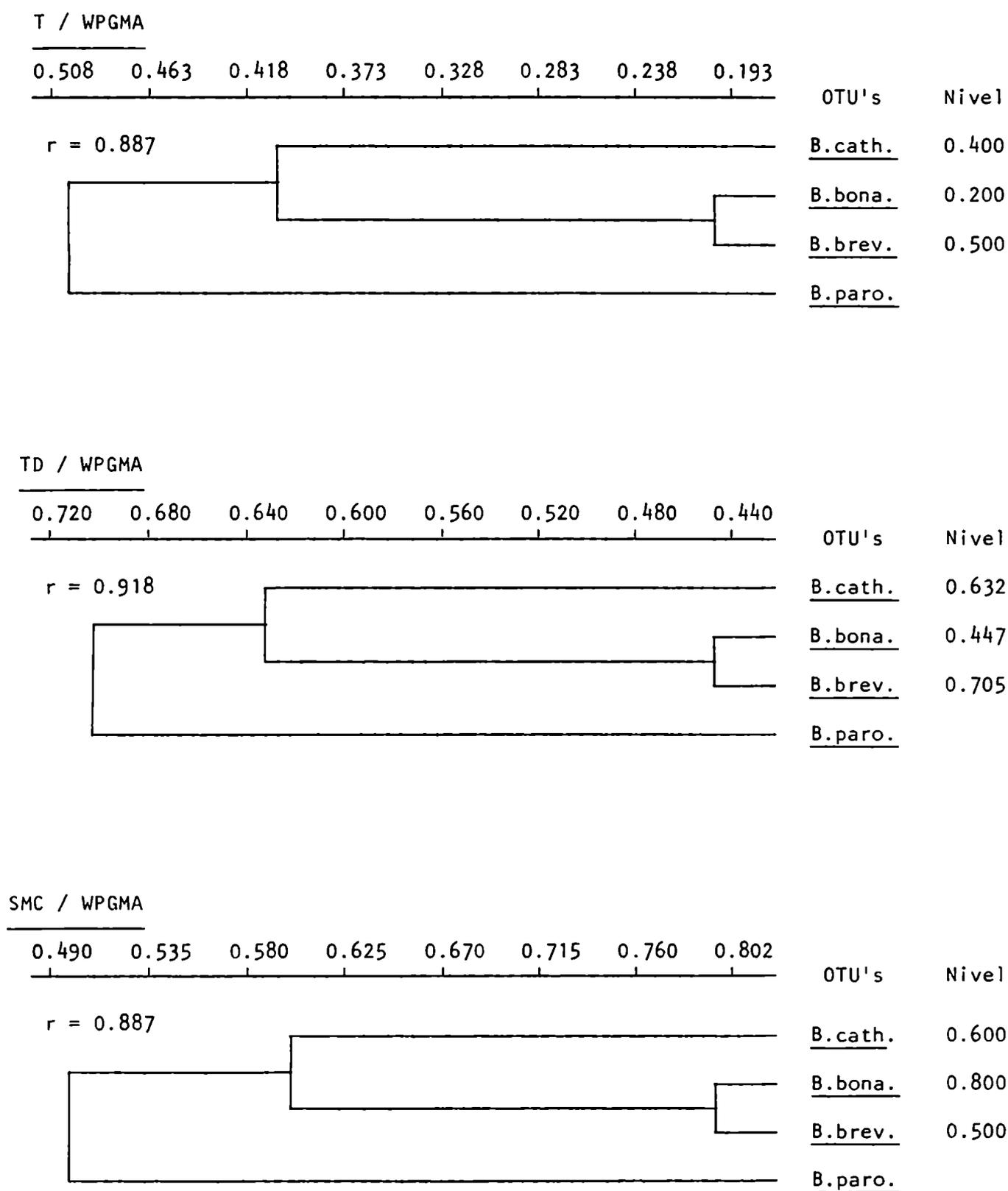


Fig. 6.14

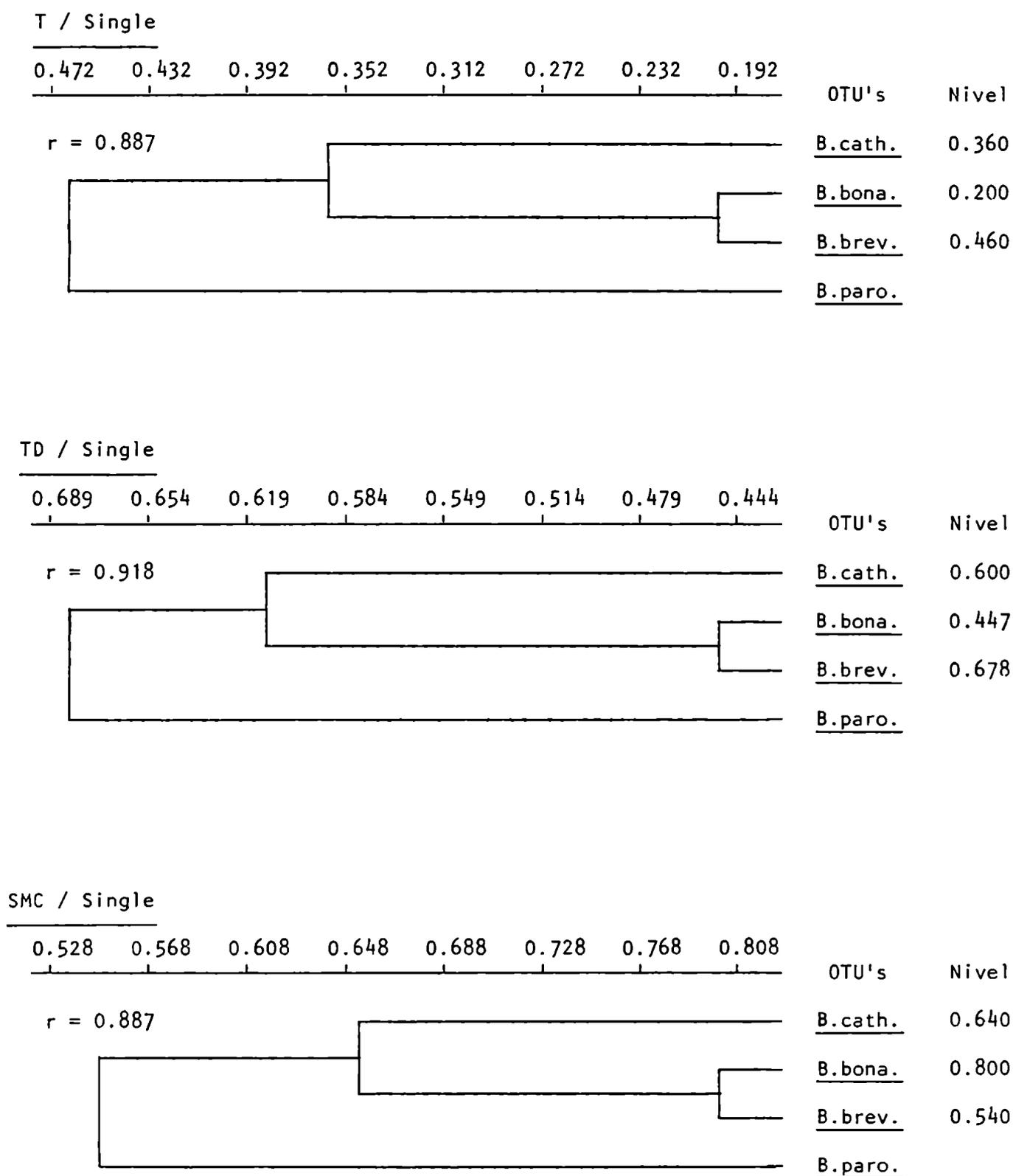


Fig. 6.15

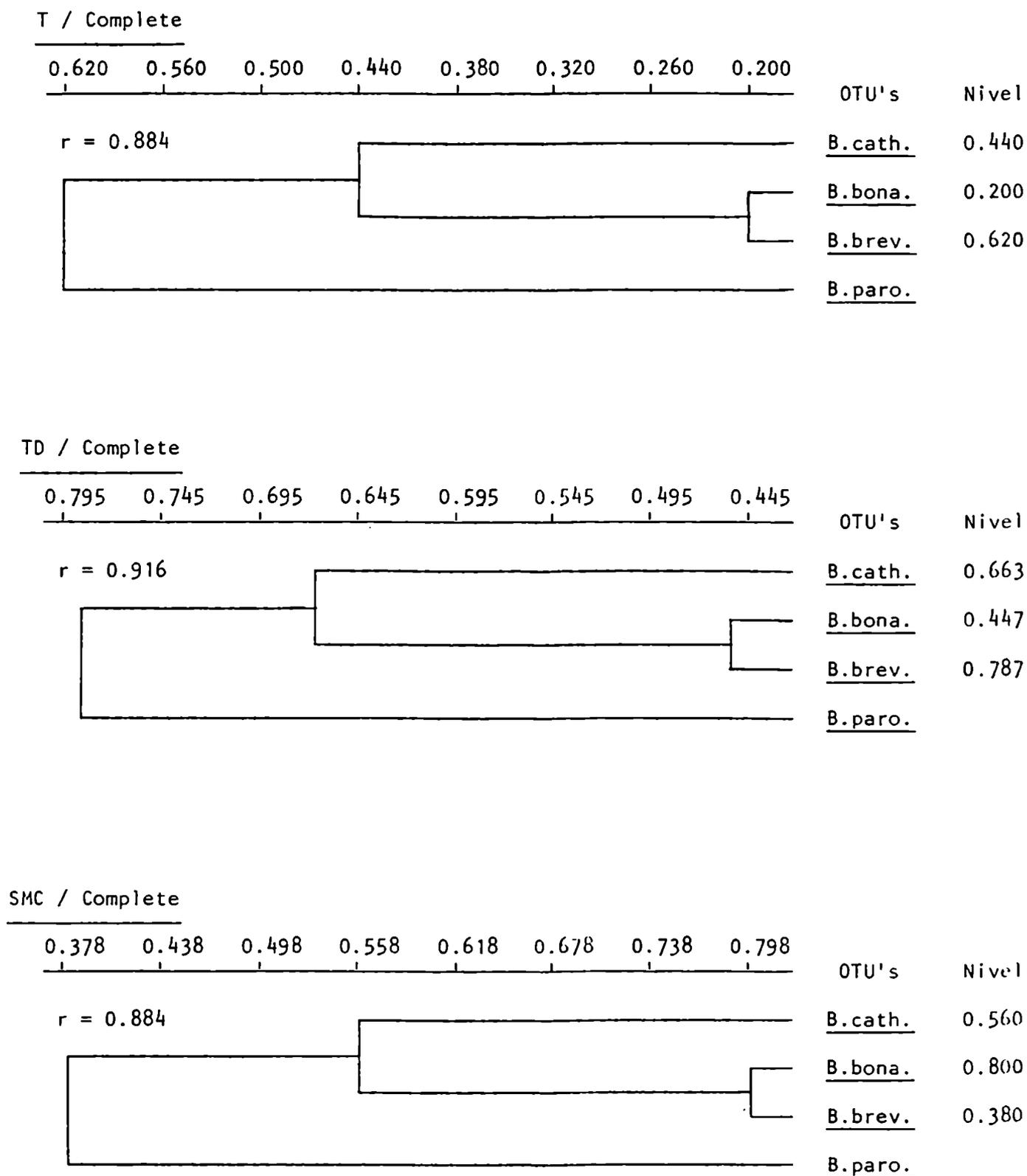


Fig. 6.16

C A P I T U L O 7

DISCUSION GENERAL Y CONCLUSIONES

7, DISCUSION GENERAL Y CONCLUSIONES

El estudio de caracteres exomorfológicos ha permitido establecer que las cuatro especies de Bromus (B. catharticus, B. brevis, B. parodii y B. bonariensis) se encuentran bien diferenciadas. Sin embargo, los métodos de taxonomía numérica sugieren que existiría un par de especies, B. brevis-B. parodii, que muestran mayor similitud y que B. bonariensis y B. catharticus son las especies más diferenciadas (Figuras 3.3. y 3.4.).

Los resultados del método de análisis de los componentes principales permiten, además, distinguir dos grupos de caracteres morfológicos: uno que presenta gran variación interespecífica, constituido por aquellos caracteres que más contribuyen al primer componente (47,44% de la variación total) y otro grupo de caracteres compuesto por los que presentan las más bajas variaciones interespecíficas (15,50% del total) que contribuyen al tercer componente. Es interesante destacar que estos dos grupos de caracteres sugieren estructuras taxonómicas algo diferentes (Figura 3.3.). El primer componente (1) muestra a B. parodii y B. brevis como las especies con mayor similitud,

mientras que B. bonariensis y B. catharticus son especies disímiles con el primer par y divergentes entre ellas (Figura 3.3. A). Por otro lado, el tercer componente (III) muestra a B. bonariensis - B. brevis como un par de especies con mucha similitud, a B. catharticus como especie cercana a dicho par y a B. parodii como la especie más distante.

Como ya fue discutido en la introducción al capítulo 3 de este trabajo la autogamia es considerada como una condición derivada (Stebbins, 1957). Del análisis de este carácter (Figura 3.5.) puede considerarse que B. bonariensis conserva la forma de reproducción primitiva (exclusivamente chasmogamia) y B. catharticus sería la más evolucionada, siendo B. brevis y B. parodii semejantes entre sí e intermedias a las anteriores. Esta relación concuerda con la que establecen los restantes caracteres morfológicos que más contribuyen al primer componente del análisis de componentes principales antes mencionado.

El período de floración de estas cuatro especies no ha sido considerado como carácter en los estudios de taxonomía numérica porque los límites de los mismos fueron determinados en el jardín experimental. Sin embargo, estos estudios indicaron que B. catharticus es la especie con mayor aislamiento temporal. Si bien esta especie es la que posee el período de floración más largo y además superpuesto con el de las otras tres especies estudiadas, su floración es en casi todo el período cleistógama (Figura 3.5.) y si florece en forma chasmógama sólo lo hace al principio del período. El aislamiento temporal que posee B. catharticus se hizo principalmente evidente durante los trabajos de hibridación artificial.

La obtención y el estudio de los cinco híbridos artificiales y el de

un anfiploide permitieron establecer relaciones entre estas especies en base a la fertilidad de los mismos y de la cruzabilidad como medida del flujo génico potencial entre las especies. En la Figura 7.1. se representan dichos parámetros. Puede observarse en ella, como dato más relevante, que B. catharticus es la especie reproductivamente más aislada y que los pares B. bonariensis - B. brevis y B. brevis - B. parodii representan combinaciones de especies entre las cuales sería posible cierto intercambio génico y por ende serían las más relacionadas. Dada la alta cruzabilidad de B. brevis con el resto de las especies, podría servir como especie puente o pivotal en futuros planes de mejoramiento de estas especies forrajeras.

Al analizar el comportamiento cromosómico de las cuatro especies estudiadas del subgénero *Ceratochloa* (B. catharticus, B. brevis, B. bonariensis y B. parodii) se observó completa regularidad en todos los estados meióticos. Las cuatro especies forman regularmente 21 bivalentes y tienen frecuencia de bivalentes cerrados y de quiasmas muy semejantes. La frecuencia de bivalentes cerrados varía de 20,91 a 20,99 y la de quiasmas de 41,92 a 42,02, no siendo significativas las diferencias para estos parámetros entre ninguna de las especies (Tablas 5.2., 5.3., 5.4., 5.5. y 5.6.). En las cuatro especies prácticamente los 21 bivalentes son cerrados (valor medio = 20,94) con 2 quiasmas (valor medio = 1,99), uno a cada lado del centrómero. Esto tiene relación con el hecho de que estas especies tienen cariotipos muy semejantes, formados por cromosomas con centrómero mediano o submediano y todos de tamaño semejante (Schulz-Schaeffer, 1960; Schulz-Schaeffer y Markarian, 1957; Schifino y Winge, 1983). Esto puede observarse también para B. catharticus y B. brevis en su aloploiploide (Figura 5.4. A).

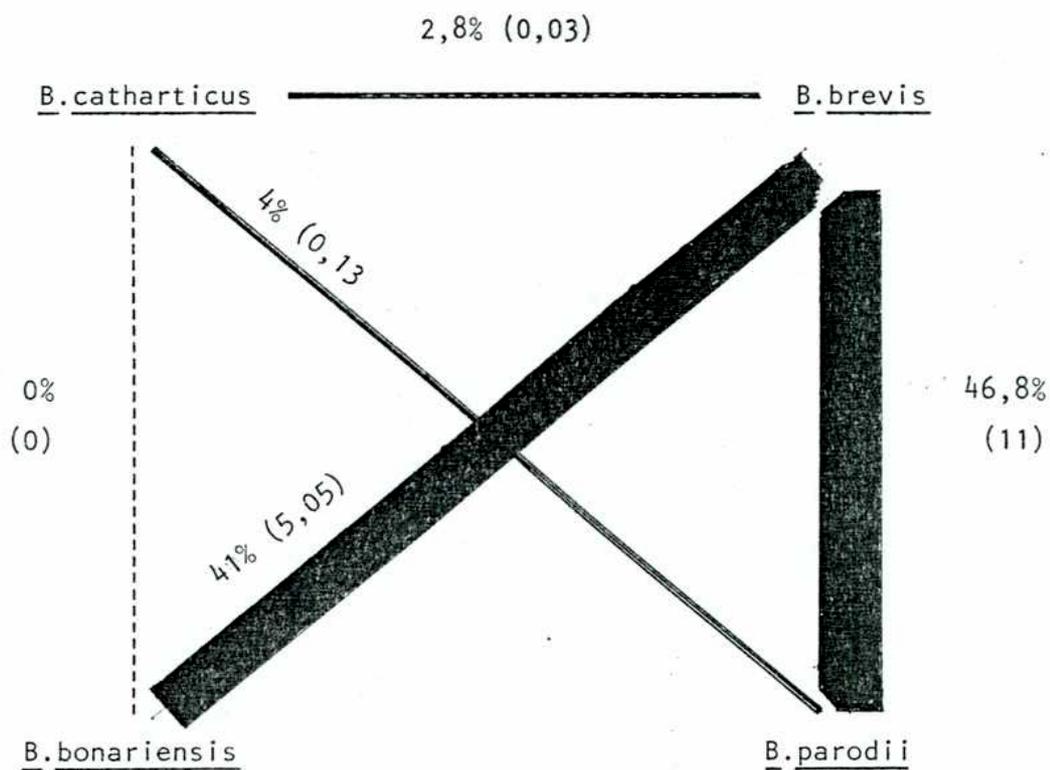


Fig. 7.1. Grado de interfertilidad y cruzabilidad entre las cuatro especies de Bromus. El espesor de las uniones son proporcionales al valor de la fertilidad de los híbridos. Se indican los valores de los porcentajes de fertilidad de los híbridos y, entre paréntesis, la cruzabilidad entre las especies.

El tamaño relativamente pequeño de los cromosomas y la gran constancia y simetría de los cariotipos de estas especies del subgénero *Ceratochloa* ya fue anteriormente señalada por Stebbins (1981) donde, además, sugiere que se trata de un carácter primitivo dentro del género Bromus.

Al estudiar el apareamiento cromosómico en los cinco híbridos artificiales (secciones 5.2.1. al 5.2.5.) resulta notorio el contraste entre el alto grado de regularidad en diacinesis - metafase I y la baja viabilidad de polen y fertilidad de estos híbridos. Aunque en la mayoría de los híbridos es significativa la disminución de la frecuencia de bivalentes cerrados y de quiasmas respecto a los progenitores, las máximas diferencias observadas fueron de 20,91 a 18,73 para bivalentes cerrados y de 41,87 a 39,36 para quiasmas (B. catharticus x B. brevis, Tabla 5.2.). Por otro lado, hay muy pocas evidencias en diacinesis - metafase I de los híbridos sobre diferencias en grandes reestructuraciones cromosómicas (translocaciones recíprocas) entre los progenitores. Sólo en B. catharticus x B. brevis y B. parodii x B. catharticus (Tablas 5.2. y 5.4.) aparecen con baja frecuencia (0,02) cuadrivalentes o trivalentes debidos muy probablemente a heterocigosis para una translocación.

El análisis de la anafase I y los estados II de la meiosis de los híbridos mostraron en cambio, evidencias de heterocigosis estructural y de posibles interacciones génicas, responsables de irregularidades en la migración de los cromosomas. Estas últimas se manifestaron en anomalías en la formación del huso acromático (husos tripolares), activación de regiones neocentroméricas, etc. Además, en anafase I y anafase II se ha visto, en la mayoría de los híbridos, formación de puentes, en algunos casos con fragmento, y la presencia de rezagados que, en su mayoría, constituirán los micronúcleos

observados en telofase I y telofase II (Figuras 5.2., 5.6., 5.7., 5.8. y 5.9.). Es indudable que estas anomalías meióticas son, en gran parte, responsables de la esterilidad de los híbridos.

Luego de comparar el comportamiento meiótico de los cinco híbridos estudiados se puede decir que B. brevis x B. bonariensis (C29) es el que presenta meiosis más regular. Este híbrido es el que presenta menor frecuencia de univalentes en diacinesis - metafase I ($\bar{x} = 0,07$, Tabla 5.5.) y la disminución de la frecuencia de bivalentes cerrados no es muy grande, respecto a la de sus progenitores, aunque es significativa. En anafase I y estados II, este híbrido presenta bastante regularidad pues como máximo sólo el 12% de las células analizadas presentaron alguna irregularidad. Su recíproco (B. bonariensis x B. brevis, C30, Tabla 5.5.) presentó igual o mayor regularidad meiótica. Como ya se ha mencionado en esta discusión estos híbridos conjuntamente con el híbrido B. parodii x B. brevis fueron los más fértiles y con más alta cruzabilidad entre las especies progenitoras (Tabla 4.3., Figura 7.1.).

Por otro lado, los híbridos que presentaron mayor irregularidad meiótica fueron aquellos en los que ha participado B. catharticus como progenitor. De dichos híbridos el que presenta meiosis más regular es B. bonariensis x B. catharticus (C9, Tabla 5.3.). Paradójicamente, éste es el único híbrido que es totalmente estéril (Figura 7.1.).

Es evidente que las irregularidades meióticas detectadas en los híbridos no justifican, en la mayoría de los casos, la magnitud de la esterilidad que poseen. Esto es especialmente cierto en los híbridos que participa B. catharticus. Stebbins (1949) y Hall (1955) han postulado la presencia de hibridez estructural críptica para explicar la falta de correspondencia entre

regularidad meiótica y fertilidad como la encontrada en estos híbridos. Existen varios hechos que apoyan la existencia de hibridez estructural críptica en los presentes híbridos. Según Stebbins (1971) una de las evidencias de la hibridez estructural críptica estaría dada por el apareamiento preferencial en los poliploides obtenidos de híbridos altamente estériles con meiosis regular. En nuestro caso vemos que en el híbrido F_1 B. catharticus x B. brevis ($2n = 42$) se pueden formar 21 bivalentes y en su poliploide C_1 ($2n = 84$) se pueden formar por apareamiento preferencial hasta 34 bivalentes + 4 cuadrivalentes (Tabla 5.2.). Una segunda posible evidencia de la existencia de hibridez estructural críptica en estos híbridos es que en la F_2 de B. catharticus x B. brevis la viabilidad de polen ha aumentado (22 a 35%, sección 4.4.) en relación a la de la F_1 (7,9%, Tabla 4.3.). Este aumento de viabilidad de polen en la F_2 puede deberse a segregación en F_1 y formación de homocigotas estructurales en la F_2 . Aunque es posible también que en la F_1 la heterocigosis fue sólo génica y que la homocigosis génica en la F_2 sea la responsable del aumento de viabilidad del polen.

Además de señalar la existencia del mencionado apareamiento preferencial, el análisis del apareamiento cromosómico en el alododecaploide artificial B. catharticus - B. brevis ($2n = 84$), nos sugiere que las especies progenitoras comparten un genomio altamente homólogo. En el siguiente esquema se presenta la posible constitución genómica de los progenitores, la F_1 y el aniploide C_1 :

B. catharticus

$$\widehat{AA} \widehat{B_1B_1} \widehat{C_1C_1} \quad (21 \quad 11)$$

$$F_1 = \widehat{AA} \widehat{B_1B_1} \widehat{C_1C_1} \quad (21 \quad 11)$$

$$C_1 = \widehat{AAAA} \widehat{B_1B_1} \widehat{B_1B_1} \widehat{C_1C_1} \widehat{C_1C_1} \quad (7 \quad IV + 28 \quad 11)$$

B. brevis

$$\widehat{AA} \widehat{B_1B_1} \widehat{C_1C_1} \quad (21 \quad 11)$$

La existencia de posibles diferencias en rearrreglos estructurales entre las especies de Bromus aquí estudiadas, no impide, en los híbridos, un buen apareamiento y una frecuencia de quiasmas relativamente alta. Es probable que el apareamiento no sea total pero su magnitud no podría establecerse hasta que sean realizados estudios en paquitene o análisis del complejo sinaptonémico.

Jackson y Casey (1980) y Jackson (1982) postulan que uno o pocos genes que alteren los sitios de unión de los genomios a la membrana nuclear pueden producir asinapsis en los híbridos. Estos autores sugieren que la magnitud del apareamiento de los cromosomas meióticos en los híbridos puede no ser una buena estimación de la homología de los genomios de los progenitores. En esos casos no habría apareamiento preferencial, en sus poliploides derivados, basado en afinidades estructurales. No obstante estas observaciones, la existencia de hibridez estructural críptica y apareamiento preferencial en nuestro caso se pueden justificar con el siguiente razonamiento: supongamos que los genomios A, B y C ocupan posiciones alejadas en la membrana nuclear, tal vez por el efecto de un gen semejante al Ph (apareamiento homeólogo) del trigo (Jackson, 1982). Es probable que los genomios A de las distintas especies

ocupen lugares cercanos (ocurriendo lo mismo para los genomas B y C), lo que permitirá la formación de bivalentes en el híbrido. Al producirse el poliploide artificial se esperaría una alta frecuencia de cuadrivalentes, sin embargo, en nuestro caso sólo se observa un máximo de 7 IV (Tabla 5.2.). Es por esto muy probable que por lo menos para dos genomas (B y C) exista apareamiento preferencial. Si éste se debe a afinidades estructurales o al hecho de que los genomas se encuentren a una distancia "límite" que dificulta la formación de IV, no puede afirmarse, aunque existen, por el momento, mayores evidencias a favor de la primera posibilidad.

Bennett y Smith (1976) y Bennett et al. (1982) comunicaron el contenido de ADN nuclear de varias especies de Bromus. En el primero de dichos trabajos (Bennett y Smith, ibid) determinaron para B. brevis Nees et Steud. 12,6 pg para núcleos 2C, valor que coincide con el de 12,87 pg obtenido para dicha especie en el presente trabajo (Tabla 5.7.). Como puede verse en la Tabla 5.7. las cuatro especies aquí estudiadas presentan variación en el contenido de ADN. Esta podría explicarse de varias maneras: duplicaciones o deficiencias, polinemia diferencial y diferencias en el contenido de heterocromatina. Con la información que poseemos, ninguna de estas hipótesis puede ser descartada o adoptada.

Es conocida la alta correlación existente entre volumen y contenido de ADN nuclear (Martín, 1966; Ayonoadu, 1974; Edwards y Endrizzi, 1975; Poggio et al., 1984). La alta correlación encontrada en este trabajo, estaría indicando que los errores debidos a diferencias en la coloración está bien compensada por el uso del testigo, porque la medición del volumen es independiente de la coloración.

Es interesante que B. catharticus, que es la especie que posee menor contenido de ADN, y B. bonariensis que es la que posee mayor contenido de ADN, produjeron el híbrido (B. bonariensis x B. catharticus) que fue el de menor fertilidad (0% de producción de semillas). La meiosis de este híbrido fue muy regular, no presentando bivalentes heteromorfos a pesar de diferir en casi el 20% en contenido de ADN (Figura 5.6.). Seal y Rees (1982) han encontrado en híbridos de Festuca un apareamiento muy efectivo entre cromosomas homeólogos en paquitene, entre especies que diferían entre 20 y 40% en el contenido de ADN. Estos autores han encontrado algunos bivalentes heteromorfos, lo que indicaría que el aumento de ADN habría sido mayor en algunos cromosomas del complemento. El no encontrar bivalentes heteromorfos en nuestro híbrido B. bonariensis x B. catharticus estarían indicándonos que la diferencia del contenido de ADN está uniformemente repartida entre todos los cromosomas del complemento.

Las especies perennes B. parodii y B. bonariensis poseen mayor contenido de ADN que las no perennes (anuales o bienales) B. brevis y B. catharticus. Schifino y Winge (1983) en un estudio sobre especies de Briza incluyen datos sobre el contenido de ADN en especies de Bromus, encontrando también que las especies perennes B. parodii y B. bonariensis poseen mayor contenido de ADN que B. brevis y B. catharticus. Esta correlación entre longevidad y contenido de ADN ya fue observada en otras especies herbáceas, en especial, en otras gramíneas (Bennett, 1972; Bennett y Smith, 1976). Por otro lado, se observa una correlación entre perennidad y alogamia en estas especies de Bromus. B. bonariensis es la única especie que posee sólo floración chasmógama, mientras que las restantes alternan chasmogamia con cleistogamia. Es interesante ver que el porcentaje de cleistogamia aumenta con la disminución del

contenido de ADN. La especie con mayor porcentaje de cleistogamia es B. catharticus, donde la floración chasmógama puede no ocurrir y florecer durante todo el período en forma cleistógama (Figura 3.5.).

Correlacionado con el carácter chasmogamia-cleistogamia está la relación de cantidad de polen a cantidad de óvulos. La relación P/O está determinada por el tamaño de las anteras, las cuales son extremadamente reducidas en las plantas cleistógamas (Cruden, 1977).

Por lo tanto, en B. bonariensis, el mayor contenido de ADN se encuentra correlacionado con perennidad, chasmogamia y alta relación P/O. Estos últimos caracteres son considerados como primitivos (Ornduff, 1969; Cruden, 1977). Teniendo en cuenta la distribución restringida de B. bonariensis (endémica de Sierra de Lihuel Calel y Sierra de La Ventana) y los caracteres mencionados, puede considerársela como la especie más antigua del complejo. Esto sugiere que la disminución del contenido de ADN sería la tendencia evolutiva del grupo estudiado. Parece que esta estrategia evolutiva no sería general pues Ayonoadu (1974) encuentra en Phaseolus que las especies estrictamente perennes o bianuales poseen menor contenido de ADN, asumiendo también que las especies perennes serían más primitivas.

Se pudo caracterizar electroforéticamente y cromatográficamente a cada una de las cuatro especies del subgénero Ceratochloa (Bromus catharticus, B. bonariensis, B. brevis y B. parodii). Las relaciones fenéticas obtenidas independientemente por medio de caracteres electroforéticos y cromatográficos son congruentes. Del estudio numérico de estas características tomadas en conjunto se observa que se forma un primer grupo, de gran similitud, entre B. bonariensis y B. brevis luego se une B. catharticus quedando B. parodii como la

especie más diferenciada. Estos resultados coinciden en gran parte con los citogenéticos y de sistemática experimental, pues el híbrido B. bonariensis x B. brevis es uno de los más fértiles (31 al 40% de granos fértiles) y existe una serie de caracteres morfológicos, aquellos que contribuyen al tercer componente del ACP, que muestran esta misma relación fenética entre las especies.

Al estudiar las relaciones fenéticas cromatográficas entre Bromus uruguayensis y B. brachyanthera (subgénero Festucoides) y con las especies del subgénero Ceratochloa se observó que las especies del subgénero Ceratochloa forman un grupo separado del de las especies del subgénero Festucoides (Figura 6.12.). Además, B. uruguayensis y B. brachyanthera, aunque son similares morfológicamente, muestran menor similitud cromatográfica que el par B. bonariensis - B. brevis. Este análisis indicó que B. uruguayensis y B. brachyanthera se encuentran bastante diferenciadas bioquímicamente. Sumando a este resultado el que no se ha podido obtener el híbrido artificial entre ellas, a pesar de los reiterados intentos, se sugiere que las mismas deberían conservarse como especies distintas contrariamente a lo que opinan algunos taxónomos que las tratan como subespecies o variedades.

Como ya hemos discutido anteriormente los estudios bioquímicos (electroforesis y cromatografía) son frecuentemente usados como métodos para esclarecer la naturaleza híbrida de ciertas entidades y para poder determinar sus presuntos progenitores. La validez de estos métodos está basada en la existencia de adición de los compuestos estudiados en los híbridos. Es por ello muy importante conocer el grado de adición de los mismos en híbridos artificiales cuyos progenitores son conocidos. El estudio de estimación del grado de

adición de las proteínas seminales y los flavonoides de los progenitores en los híbridos y poliploides artificiales de Bromus indicó que existen diferencias entre el grado de adición de proteínas seminales y flavonoides en los mismos híbridos, siendo mayor la adición respecto a las proteínas que a los compuestos fenólicos. Resultados semejantes han encontrado otros autores en otras gramíneas como por ejemplo en Avena (Rajhathy y Thomas, 1974).

Dado que los flavonoides son compuestos secundarios, siendo productos finales de complejas vías metabólicas, la menor adición y la aparición de un compuesto nuevo en los híbridos, podría deberse a interacciones génicas (alélicas y no alélicas) entre los genotipos de los progenitores. En cambio, en relación a las proteínas seminales, al ser éstas productos génicos primarios, sólo la producción de alopolímeros (en el caso de aquellas que no sean monoméricas) daría origen a una nueva proteína en los híbridos. Además la desaparición de una proteína de uno de los progenitores en un híbrido se podría deber a interacción entre genes reguladores.

De todo lo expuesto puede concluirse que, de las cuatro especies analizadas, B. bonariensis posee características prioritivas tales como perennidad y chasmogamia. Presenta, además, una distribución geográfica y ecológica restringida y el mayor contenido de ADN. B. catharticus, por otro lado, es la especie aparente más evolucionada con caracteres morfológicos avanzados, presentando un mayor grado de cleistogamia y menor perennidad. Esta especie posee el menor contenido de ADN y la distribución geográfica más amplia, llegando a tener tendencia invasora y constituyendo una maleza benigna con gran adaptabilidad a suelos tanto naturales como modificados por el hombre. Debido a esta última característica y a su alto valor forrajero se la ha introducido

al cultivo en países distantes como U.S.A., Nueva Zelandia y Australia, donde constituye una especie forrajera de importancia.

B I B L I O G R A F I A

BIBLIOGRAFIA

- Abrahamson, W.G. & O.T. Solbrig. 1971. Soil preference and variation in flavonoid pigments in species of Aster. Rhodia, 72:201-261.
- Adams, R.P. 1972. Numerical analysis of some common errors in chemosystematics. Brittonia, 24:9-21.
- Adriaanse, A., W. Klop & J.E. Robbers. 1969. Characterization of Phaseolus vulgaris cultivars by their electrophoretic pattern. J. Sci. Food Agric. 20:647-650.
- Alston, R.E. & B.L. Turner. 1962. New techniques in analysis of complex natural hybridization. Proc. Nat. Acad. Sci., 48:130-137.
- . 1963. Natural hybridization among four species of Baptisia (Leguminosae). Amer. J. Bot., 50:159-173.
- & K. Hempel. 1964. Chemical documentation of interspecific hybridization. J. Hered., 55:267-269.
- , H. Rosler, K. Naifeh & T.J. Mabry. Hybrid compounds in natural interspecific hybrids. Proc. Nat. Acad. Sci., 54:1458-1465. (1965)
- Ayonoadu, U.W.U. 1974. Nuclear DNA variation in Phaseolus. Chromosoma 48:41-49.

- Ballard, R.E. & R.W. Cruden. 1978. C-glycosyl-flavones and xanthenes in leaves of Ridigella, Sessilantha and Fosteria. Biochem. System. Ecol. 6:139-140.
- Bennett, M.C. 1972. Nuclear DNA content and minimum generation time in herbaceous Plants. Proc. R. Soc. Lond. B 181:109-135.
- & J.B. Smith. 1971. The 4C nuclear content of several Hordeum genotypes. Can. J. Genet. Cytol. 13:607-611.
- . 1976. Nuclear DNA amount in angiosperms. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 274:227-274.
- & J.S. Heslop-Harrison. 1982. Nuclear DNA amount in angiosperms. Proc. R. Soc. Lond. B 216:179-199.
- Bowden, W.M. & H.A. Senn. 1962. Chromosome numbers in 28 grass genera from South America. Can. J. Bot. 40:1115-1124.
- Bragg, L.H., J.D. Bacon, C. Mc Millan & T.J. Mabry. 1978. Flavonoid patterns in the Prosopis juliflora complex. Biochem. System. Ecol. 6:113-116
- Brehm, B.G. & R.E. Alston. 1964. A chemotaxonomic study of Baptisia leucophaea var. laevicaulis (Leguminosae). Amer. J. Bot. 51:644-650.
- & M. Ownbey. 1965. Variation in chromatographic patterns in the Tragopogon dubiuspratensis - porrifolius complex (Compositae). Amer. J. Bot. 52:811-818.
- Brunsberg, K. 1965. The usefulness of thin-layer chromatographic analysis of phenolic compounds in European Lathyrus L. Botaniska Notizer, 118:378-401.

- Burghardt, A.D. & R.A. Palacios. 1984. Variabilidad electroforética en cuatro especies de Prosopis (Leguminosae). XV. Congr. Arg. Genét., Corrientes : 65.
- Burkart, A. 1969. Flora Ilustrada de Entre Ríos. Parte II, Gramíneas. INTA. Col. Cient. 6(2).
- Cámara Hernández, J. 1970. Bromus, en A.L. Cabrera, Dir.: Flora de la Provincia de Buenos Aires, INTA. Col. Cient. 4(2):85-101.
- . 1978. Bromus, en M.N. Correa, Dir.: Flora Patagónica. INTA, Col. Cient. 8(3):77-93.
- Campbell, C. S. 1982. Cleistogamy in Andropogon L. (Gramineae). Amer. J. Bot. 69:1625-1635.
- , J.A., Quinn, G.P., Cheplick & T.J. Bell. 1983. Cleistogamy in grasses. Ann. Rev. Ecol. Syst. 14:411-441.
- Cladera, J.L. 1979. Polimorfismo isoenzimático y variación para la longitud de las anteras en la cebadilla (Bromus unioloides H.B.K.). Tesis de "Magister Scientiae", Esc. Grad. Cs. Agrop. INTA - Univ. Nac. La Plata.
- & A. von der Pahlen. 1984. Genetic and populational study of esterases on Bromus catharticus Vahl. Bol. Genét. Inst. Fitotec. Castellar, 12:25-30.
- Comas, C.I., J.H. Hunziker & J.V. Crisci. 1979. Species Relationships in Bulnesia as shown by Seed Protein Electrophoresis. Biochem. Syst. Ecol. 7:303-308.
- , A.D. Burghardt & J.H. Hunziker. 1984. Estudio electroforético de proteínas seminales en Bulnesia retama y B. chilensis y su relación con las otras especies del género. Darwiniana 25:227-234.

- Conger, A. & L.M. Fairchild. 1953. A quick freeze method for making smear slides permanent. Stain Technol. 28:281-283.
- Connor, H.E. 1979. Breeding systems in the grasses: a survey. N.Z.J. Bot. 17:547-574.
- . 1981. Evolution of reproductive systems in the Gramineae. Ann. Missouri Bot. Gard. 68:48-74.
- Covas, G. 1981. Las especies pampeanas de Bromus (Gramineae). Apuntes para la Flora de La Pampa (R.A.), INTA, N°62, 63, 64:247-255.
- & B. Schnack. 1946. Número de cromosomas en Antófitas de la región de Cuyo (Rep. Arg.) Rev. Arg. Agr. 13:153-166.
- & C.D. Itria. 1968. Nueva especie de "Bromus" de la Flora Argentina. Bol. Soc. Arg. Bot. 12:113-116.
- Crisci, J.V. 1984. Taxonomic congruence. Taxon 33:233-239.
- & M.F. López Armengol. 1983. Introducción a la teoría y práctica de la taxonomía numérica. Ser. Biol. Monogr. 26 O.E.A. 132 pp.
- Cruden, R.W. 1977. Pollen-ovule ratios: A conservative indicator or breeding systems in flowering plants. Evolution 31:32-46.
- Cherry, J.P., F.R.H. Katterman & J.E. Endrizzi. 1971. A comparative study of seed proteins of allopolyploids of Gossypium by gel electrophoresis. Can. J. Genet. Cytol., 13:155-158.
- Darlington, C.D. & L.F. La Cour. 1976. The handling of chromosomes. 6th. edition, George Allen and Unwin, London.

- De Azkue, D. & A. Martínez. 1984. Variación del cariotipo, volumen nuclear y contenido de ADN en siete especies de Oxalis. Darwiniana 25:267-277.
- Dement, W.A. & T.J. Mabry. 1972. Flavonoids of North American species of Thermopsis. Phytochemistry. 11:1089-1093.
- Dennis, W.M. & M.W. Bierner. 1980. Distribution of Flavonoids and their systematic significance in Clematis Subsection Viornae. Biochem. System. Ecol., 8:65-67.
- Dobzhansky, T. 1970. Genetics of the Evolutionary Process. Columbia Univ. Press, New York.
- Edmonds, J.M. & S.M. Glidewell. 1977. Acrylamide gel electrophoresis of seed protein from some Solanum (Section Solanum) species. Plant Syst. Evol., 127:277-291.
- Edwards, G.A. & J.E. Endrizzi. 1975. Cell size, nuclear size and DNA content relationships in Gossypium. Can. J. Genet. Cytol. 17:181-186.
- Enus Zeiger, S. & C.A. Naranjo. 1983. Cromatografía de fenoles y morfología en especies e híbridos de Prosopis de La Pampa. XIX Jornadas Argentinas de Botánica. Esperanza (Santa Fe): 32.
- Fernández, A. & M. Queiros. 1969. Contribution a la connaissance cytotaxinomique des Spermatophyta du Portugal. I. Gramineae. Bol. Soc. Brot. 43:3-140.
- Ferrari, M.R., C.A. Naranjo & A.M. Palermo. 1981. Estudios cromatográficos en especies Argentinas de Vicia (Leguminosae). XVIII Jornadas Argentinas de Botánica. Tucumán: 73-74.

- Fox, D.J., D.A. Thurman & D. Boulter. 1964. Studies on the proteins of seeds of the Leguminosae. I. Albumins. Phytochemistry 3:417-419.
- Fox, D.P. 1969. Some characteristics of cold hydrolysis technique for staining plant tissues by the Feulgen reaction. J. Histochem. Cytol. 17:266-272.
- Fröst, S. & S. Asker. 1977. Flavonoid patterns and polymorphisms in wild Hordeum species. Hereditas 85:145-150.
- Furuta, Y. 1975. Quantitative variation of nuclear DNA in genus Aegilops. Japan J. Genetics 50:383-392.
- Grant, V. 1963. The origin of Adaptations. Columbia Univ. Press, New York.
- . 1981. Plant Speciation (2nd. ed.). Columbia Univ. Press, New York.
- Gray, J.R., D.E. Fairbrothers & J.A. Quinn. 1973. Biochemical and anatomical population variation in the Danthonia sericea complex. Bot. Gaz. 134:166-173.
- Hackel, E. 1906. Über kleistogamie bei der gräsern. Ostr. Bot. Zeit. 54:81-88; 143-154; 180-186. Traducción al italiano en Rev. Arg. Agr. 4(1):1-26, 1937.
- Hall, B.M. 1955. Genetic analysis of interspecific hybrids in the genus Bromus, Section Ceratochloa. Genetics 40:175-192.
- Hall, O. 1959. Immuno-electrophoretic analyses of allopolyploid rye-wheat and its parental species. Hereditas 45:495-504.
- . 1964. Use of proteins in determination of parental species of unknown hybrids. Bio.Science 14:37.

- Hall, O. & B.L. Johnson. 1963. Electrophoretic analysis of the amphidiploid of Stipa viridula x Oryzopsis hymenoides and its parental species. Hereditas, 48:530-535.
- Halloran, G.M. 1981. Tetraploid wheat crossability with rye (Secale). Genetica 55:191-194.
- Harborne, J.B. 1967. Comparative Biochemistry of Flavonoids. Academic Press, New York.
- . 1973. Flavonoids as systematic markers in the angiosperms. In: Bends, E.M.G. & A. Santesson (Eds.). Chemistry in Botanical Classification. Academic Press, New York.
- Harlan, J.R. 1945 a. Cleistogamy and chasmogamy in Bromus carinatus Hook and Arn. Amer. J. Bot. 32:66-72.
- . 1945 b. Natural breeding structure in the Bromus carinatus complex as determined by population analyses. Amer. J. Bot. 32:142-148.
- Hauman, L. 1917. Notes floristiques. Quelques cryptogames, gymnospermes et monocotylédones de L'Argentine. Anales Museo Nac. Hist. Nat. 29:391-443.
- Hickenbick, M.C.M. 1983. Relações Fenéticas e Cladísticas entre as Espécies do Complexo Briza (Gramineae): Flavonoides. Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Genética da Univ. Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do grau de Doutor em Ciências.
- Hitchcock, A.S. 1934. New species, and changes in nomenclature of Grasses of The United States. Amer. J. Bot. 21:127-139.

- Hitchcock, A.S. & A. Chase. 1951. Manual of the Grasses of the United States, 2nd Ed.; U.S. Dep. Agr. Misc. Publ. 200.
- Houts, K.P. & G.R. Hillebrand. 1976. An electrophoretic and serological investigation of seed proteins in Galeopsis tetrahit (Labiatae) and its putative parental species. Amer. J. Bot. 63:156-165.
- Hristova, J. & R. Baeva. 1972. Investigation on the nature of protein phenotypes in Triticale. Z. Pflanzenzücht. 67:327-336.
- Hubbard, C.E. 1956. Bromus catharticus Vahl (Symb. Bot. 2:22, 1791) versus Bromus unioloides H.B.K. (Nov. Gen. et Sp. 1:151, 1816) versus Bromus unioloides (Willd.) Rasp. (Ann. Sci. Nat., Bot. 5:439, 1825). Agron. Lusit. 18:7.
- Hunziker, J.H. 1966 a. Números cromosómicos y cariotipos de varias especies sudamericanas de Agropyron y Elymus (Gramineae). Kurtziana 3:151-156.
- . 1966 b. Diferenciación cromosómica en el complejo hexaploide Agropyron scabriglume. Kurtziana, 3:127-149.
- . 1967. Chromosome and protein differentiation in the Agropyron scabriglume complex. Taxon, 16:259-266.
- . 1969. Protein electrophoresis as an aid in genome analysis. The Nucleus (Calcutta) 1968 Suppl. Vol.:226-236.
- . 1978. Los mecanismos de aislamiento entre las especies biológicas. Anal. Acad. Nac. Cs. Ex. Fis. Nat. Buenos Aires 30:13-31.
- & L. Maumús. 1964. Evolutionary relationship between two South American species of Hordeum. Cytologia 29:32-41.

- Hunziker, J.H., C.A. Naranjo, A.B. Andrada, C. Itria & M. Costas. 1975. Natural hybridization between Hordeum parodii and H. jubatum: A morphological cytogenetical and protein electrophoretic study. Cytologia 40:649-662.
- , R.A. Palacios, A.G. de Valesi & L. Poggio. 1978. Hybridization in Larrea (Zygophyllaceae). A morphological, cytogenetic and chemosystematic study. Bol. Acad. Nac. Cs. Córdoba, Argentina 52:281-314.
- Itria, C.D. 1958. Identificación de algunas gramíneas pampeanas por sus caracteres vegetativos. Rev. Arg. Agr. 25:81-84.
- Jackson, R.C. 1982. Polyploidy and diploidy: New perspectives on chromosome pairing and its evolutionary implications. Amer. J. Bot. 69:1512-1523.
- & J. Casey. 1980. Cytogenetics of polyploids. In W. Lewis (ed.), Polyploidy, biological relevance, p. 17-44. Plenum Publ. Corp., New York.
- Jain, S.K. 1975. Population structure and the effects of breeding system. In: "Crop Genetic Resources for Today and Tomorrow", O. Frankel and J.G. Hawkes (Eds.) Cambridge Univ. Press. Pp. 15-36.
- . 1976. The evolution of inbreeding in plants. Ann. Rev. Ecol. Syst. 7:469-495.
- Johnson, B.L. 1972. Seed protein profiles and the origin of the hexaploid wheats. Amer. J. Bot. 59:952-960.
- . 1975. Gossypium palmeri and a polyphyletic origin of the new world cotton. Bull. Torr. Bot. Club 102:340-349.
- & O. Hall. 1965. Analysis of phylogenetic affinities in Triticinae by protein electrophoresis. Amer. J. Bot. 52:506-513.

- Khush, G.S. & G.L. Stebbins. 1961. Cytogenetics and evolutionary studies in Secale. I. Some new data on the ancestry of S. cereale. Amer. J. Bot. 48(8):723-730.
- Ladizinsky, G. & A. Adler. 1975. The origin of chickpea as indicated by seed protein electrophoresis. Israel J. Bot., 24:183-189.
- & T. Hymowitz. 1979. Seed Protein Electrophoresis in Taxonomic and Evolutionary Studies. Theor. Appl. Genet., 54:145-151.
- Langer, R.H.M. & D. Wilson. 1965. Environmental control of cleistogamy in prairie grass (Bromus unioloides H.B.K.) New Phytol. 64:80-85.
- Levin, D.A. 1966. Chromatographic evidence of hybridization and evolution in Phlox maculata. Amer. J. Bot., 53:238-245.
- . 1978. The origin of isolating mechanisms in flowering plants. Evol. Biol. 11:185-317.
- & B.A. Schaal. 1970. Reticulate evolution on Phlox as seen through protein electrophoresis. Amer. J. Bot. 57:977-987.
- Levy, M. & D.A. Levin. 1971. The origin of novel flavonoids in Phlox allotetraploids (glycosidating enzymes/gene repression). Proc. Nat. Acad. Sci., 68:1627-1630.
- Lillie, R.D. 1951. Simplification of the manufacture of Schiff reagent for use in histochemical procedures. Stain Technol. 26:163-165.
- Longhi, H.M. 1977. O gênero Bromus L. (Gramineae) no Rio Grande Do Sul. Trabalhos de XXVI Congresso Nac. Bot. Acad. Brasil. de Ciencias. Rio de Janeiro. R.J.:333-342.

- Mabry, T.J., K.R. Markham & M.B. Thomas. 1970. The Systematic identification of Flavonoids. Springer - Verlag, New York.
- Markham, K.R. 1982. Techniques of Flavonoid Identification. Acad. Press. N.Y.
- , T.J. Mabry & W.T. Swift Jr. 1970. Distribution of flavonoids in the genus Baptisia (Leguminosae). Phytochemistry, 9:2359-2364.
- Martin, P.G. 1966. Variation in the amounts of nuclear acids in the cell of different species. Expt. Cell. Res. 44:84-90.
- Mayr, E. 1963. Animal Species and Evolution. Belknap, Cambridge.
- Mc. Leish, J. & N. Sunderland. 1961. Measurements of Desoxyribo nucleic Acid (DNA) in higher plants by Feulgen Photometry and Chemical Methods. Expt. Cell Res. 24:527-540.
- Mehra, P.N. & M.L. Sharma. 1975. Cytological studies in some central and eastern Himalaya grasses. III. Cytologia 40:441-452.
- Mickevich, M.F. 1978. Taxonomic congruence. syst. Zool. 27:143-158.
- Murray, B.E., I.L. Craig & T. Rajhathy. 1970. A protein electrophoretic study of three amphiploids and eight species in Avena. Can. J. Genet. Cytol. 12:651-665.
- Naranjo, C.A. 1976. Estudios citogenéticos en el híbrido artificial Bromus unioloides x B. brevis (Gramineae). VII Congr. Arg. Genét., Ushuaia: 42-43.
- . 1977 a. Homologías cromosómicas y proteicas en Bromus (Gramineae). Simposium Citogenética Animal y Vegetal. III Cong. Latinoam. Genét., Montevideo: 55.

- Naranjo, C.A. 1977 b. Estudios cromatográficos y electroforéticos en cuatro especies de Bromus (Gramineae). XVI Jorn. Arg. Bot. Paraná: 16-17.
- . 1978. Chromosomal and protein homologies in Bromus (Gramineae) In Drets, M.E., N. Brum-Zorrilla & G.A. Folle (eds.). Actas III Congr. Latinoam. Genét., Montevideo: 160-167.
- . 1979. Estudios citogenéticos en el híbrido artificial Bromus bonariensis x B. unioloides. Secc. Ceratochloa (Gramineae). Actas IV Cong. Latinoam. Genét., Mendoza, 1:17.
- . 1982. Estudios citogenéticos y evolutivos en algunas especies Sudamericanas de Bromus (Gramineae). In R. Cruz-Coke & Danko Brncic (Eds.). Genética (V Cong. Latinoam.), Santiago: 340-341.
- . 1984. Contenido de ADN y volumen nuclear en cuatro especies de Bromus (Secc. Ceratochloa). XV. Cong. Arg. Genét., Corrientes: 13.
- & J.H. Hunziker. 1971. Adición de proteínas en anfiploides. Reun. Anual Soc. Arg. Genet. Balcarce: 34-35.
- & L. Poggio. 1983. Contenido de ADN y evolución del cariotipo en el género Hippeastrum. XIV Cong. Arg. Genet., San Luis: 39.
- , L. Poggio & S. Enus Zeiger. 1984. Phenol Chromatography, Morphology and Cytogenetics in three Species and Natural Hybrids of Prosopis (Leguminosae, Mimosoideae). Plant Syst. Evol. (Viena) 144: 257-276.
- Narayan, R.K.J. & H. Rees. 1977. Nuclear DNA divergence among Lathyrus species.. Chromosoma 63:101-107.

- Núñez, O. 1968. An acetic-haematoxylin squash method for small chromosomes. Caryologia 21:115-119.
- Ornduff, R. 1969. Reproductive biology in relation to systematics. Taxon. 18:121-133.
- , B.A. Bohm & N.A.M. Saleh. 1973. Flavonoids of interspecific hybrids in Lasthenia. Biochem. System. Ecol. 1:147-151.
- Palacios, R.A. & L.D. Bravo. 1981. Hibridización natural en Prosopis (Leguminosae) en la región chaqueña argentina. Evidencias morfológicas y cromatográficas. Darwiniana 23:3-35.
- Parodi, L.R. 1947. Las gramíneas del género Bromus adventicias en la Argentina. Rev. Arg. Agr. 14(1):1-19.
- . 1956. Noticias sobre el ejemplar tipo de "Bromus catharticus" Vahl. Rev. Arg. Agr. 23:115-121.
- . 1962. Gramíneas Argentinas Nuevas o Críticas. IV. Rev. Arg. Agr. 29 (1-2):12-22.
- Pérez López, F. 1975. Estudio de variabilidad en poblaciones de Bromus unioloides. Tesis de "Magister Scientiae", Esc. Grad. Cs. Agrop. INTA - Univ. Nac. de La Plata.
- Pinto-Escobar, P. 1976. Nota sobre el ejemplar tipo de "Bromus catharticus" Vahl. Caldasia XI (54):9-16.
- . 1981. The genus Bromus in northern South America. Bot. Jahrb. Syst. 102:445-457.

- Planchuelo, A.M. 1983. Una nueva especie de Bromus (Poaceae) de Argentina. Kurtziana 16:123-131.
- Poggio, L. 1980. Cromatografía de compuestos fenólicos en el género Bulnesia Bol. Soc. Arg. Bot., 19:103-114.
- , A. Wulff & J.H. Hunziker. 1984. Cariotipo, longitud del genomio, volumen nuclear, contenido de ADN y heterocromatina en Bulnesia. XV. Congr. Arg. Genet., Corrientes:10
- & J.H. Hunziker. . Nuclear DNA content variation in Bulnesia (Zygophyllaceae). J. Hered. (enviado para su publicación).
- Przybylska, J., S. Blixt, J. Hurich & Z.Z. Przybylska. 1977. Comparative study of seed proteins in the genus Pisum. I. Electrophoretic patterns of different protein fractions. Genet. Pol. 18:27-38.
- Puff, C. 1975. Leaf Flavonoids of Galium sect. Aporinoides (Rubiaceae), Plant Syst. Evol., 124:57-66.
- Quarín, C.L. 1977. Recuentos cromosómicos en gramíneas de Argentina subtropical. Hickenia 1(13):73-78.
- Ragonese, A.E. & P.R. Marcó. 1941. Observaciones sobre la biología floral de la cebadilla criolla. Rev. Arg. Agr. 8:196-199.
- . 1943. Influencia del fotoperíodo sobre la formación de flores cleistógamas y chasmógamas en cebadilla criolla. Rev. Arg. Agr. 10:178-185.
- Raven, P.H. 1957. The introduced species of Bromus Sect. Ceratochloa in California. Leaf. West. Bot. 8:151-154.

- Raven, P.H. 1960. The correct name for rescue grass. Brittonia 12:219-221.
- Raymond, S. & Y.J. Wang. 1960. Preparation and properties of acrylamide gel for use in electrophoresis. Anal. Biochem., 1:391-396.
- Robinson, P.J. & R.C. Megarrity. 1975. Characterization of Stylosanthes introductions by using seed protein pattern. Austr. J. Agric. Res. 26:467-480.
- Rohlf, F.J., J. Kishpaugh & D. Kirk. 1982. NT-SYS Numerical taxonomy system of multivariate statistical programs. Tech. Rep. State Univ. of New York at Stony Brook, New York.
- Rosengurtt, B., B. Arrillaga de Maffei & P. Izaguirre de Artucio. 1970. Gramíneas Uruguayas. Departamento de Publicaciones de la Universidad de la República. 489 pp.
- Sáez, F.A. 1960. El empleo de la hematoxilina acética o propiónica para el estudio de los cromosomas con la técnica de aplastamiento. Comun. Soc. Biol. Montevideo, 11 de mayo, 1960 (Mimeografiado).
- Scheffé, M. 1959. The analysis of variance. John Wiley and Sons, Inc.
- Schifino, M.T. & H. Winge. 1983. Karyotypes and nuclear DNA content of species of Briza complex and some other genera of Poaceae (Gramineae). Rev. Bras. Genet. 6:245-259.
- Schilling, E.E. 1983. Flavonoids of Helianthus Series Angustifolii. Biochem. Syst. Ecol. 11:341-344.
- & T.J. Mabry. 1981. Flavonoids of Helianthus Series Coronae-solis. Biochem. Syst. Ecol., 9:161-163.

- Schulz-Schaeffer, J. 1960. Cytological investigations in the genus Bromus.
J. Hered. 51:269-277.
- & D. Markarian. 1957. Cytologische Untersuchungen in der
Gattung Bromus L. II. Untersuchungen an Wurzelspitzen zur Klärung der
Chromosomenmorphologie bei den Untergattungen Ceratochloa und Bromus.
Z. Pflanzenzüchtg. 37:299-316.
- Seal, A.G. & H. Rees. 1982. The distribution of quantitative DNA changes
associated with the evolution of diploid Festuceae. Heredity 49:179-190.
- Smith, P. 1969. Serological relationships of Bromus L. and Boissiera Hochst.
ex Steud. Feddes Rep. 79:337-345.
- . 1970. Taxonomy and nomenclature of the brome-grasses (Bromus L. s.
l.) Notes R. Bot. Gdn. Edinb. 30:361-375.
- Smith, D.M. & D.A. Levin. 1963. A chromatographic study of reticulate
evolution in the Appalachian Asplenium complex. Amer. J. Bot., 50:952-958.
- Sneath, P.H.A. & R.R. Sokal. 1973. Numerical Taxonomy; the principles and
practice of numerical classification. San Francisco; W.H. Freeman.
573 pp.
- Soderstrom, T.R. & J.H. Beaman. 1968. The genus Bromus (Gramineae) in Mexico
and Central America. Publ. Museo Mich. State Univ. Biol. Ser.
3(5):465-520.
- Sokal, R.R. & F.J. Rohlf. 1962. The comparison of dendrograms by objective
methods. Taxon 11:33-40.

- Sokal, R.R. & P.H.A. Sneath. 1963. Principles of Numerical Taxonomy. San Francisco. W.H. Freeman.
- Solbrig, O.T. 1968. Fertility, Sterility and the Species Problem. In Modern Methods in Plant Taxonomy (V.H. Heywood, ed.), pp. 77-96, Academic Press London.
- Stebbins, G.L. 1947 a. The origin of the complex of Bromus carinatus and its phytogeographic implications. Contr. Gray Herb. 165:42-55.
- . 1947 b. Types of polyploids: their classification and significance. Adv. Genet. 1:403-429.
- . 1949. The evolutionary significance of natural and artificial poliploids in the family Gramineae. Proc. Eight Int. Congr. Genet. Hereditas, Suppl.: 461-485.
- . 1950. Variation and Evolution in Plants. Columbia Univ. Press, New York.
- . 1956. Cytogenetics and Evolution of the Grass Family. Amer. J. Bot. 43:890-905.
- . 1957. Self fertilization and population variability in the higher plants. Amer. Nat. 91 (861):337-354.
- . 1958. The inviability, weakness, and sterility of interspecific hybrids. Adv. Genetics 9:147-215.
- . 1971. Chromosomal evolution in higher plants. Addison-Wesley, Reading. Mass.
- . 1974. Flowering Plants. Evolution above the Species Level. The Belknap Press of Harvard Univ. Press. Cambridge, Mass.
- . 1981. Chromosome and evolution in the genus Bromus (Gramineae) Bot. Jahrb. Syst. 102:359-379.

- Stebbins, G.L. & R.M. Love. 1941. A cytological study of California forage grasses. Amer. J. Bot. 28:371-382.
- & H.A. Tobgy. 1944. The cytogenetics of hybrid in Bromus. I. Hybrids within the Section Ceratochloa. Amer. J. Bot. 31(1):1-11.
- , H.A. Tobgy & J.R. Harlan. 1944. The cytogenetics of hybrids in Bromus. II. Bromus carinatus and Bromus arizonicus. Proc. Calif. Acad. Scien. Fourth Series 25 (13) :307-322.
- ; M.S. Walters. 1949. The evolutionary significance of two synthetic allopolyploid species of Bromus. Portugaliae Acta Biol. Sér. A, Vol. R.B. Goldschmidt: 106-136.
- , B.L. Harvey, E.L. Cox, J.N. Rutger, G. Selcovic & E. Vagil. 1963. Identification of the ancestry of an amphiploid Viola with the aid of paper chromatography. Amer. J. Bot., 50:830-839.
- Stuckert, T. 1906. Segunda contribución al conocimiento de las gramináceas. Anal. Mus. Nac. Bs. Aires. Ser. 3:409-555.
- Taylor, R.J. 1971. Intraindividual phenolic variation in the genus Tiarella (Saxifragaceae); its genetics regulation and application to systematics. Taxon, 20:467-472.
- Torres, A.M. & D. Levin. 1964. A chromatographic study of cespitose zinnias. Amer. J. Bot., 51:639-643.
- Vaughan, J.G. & A. Waite. 1966. Comparative study of the seed proteins of Brassica campestris, Brassica ole racea and Brassica nigra. J. Exp. Bot. 17:332-343.

- Vaughan, J.G. & A. Waite. 1967. Comparative Electrophoretic Studies of the Seed Protein of Certain Amphidiploid of Brassica. J. Exp. Bot. 18:269.
- Waines, J.G. & B.L. Johnson. 1975. Incomplete concurrence of evidence from protein electrophoresis and genome analysis regarding the origin of Aegilops ovata. Can. J. Genet. Cytol. 17:1-8.
- _____. 1971. New protein bands in an amphiploid of Aegilops caudata and Ae. umbellulata. Wheat Inf. Serv. 32:22-24.
- Walters, M.S. 1957. Studies of spontaneous chromosome breakage in interspecific hybrids of Bromus. Univ. Calif. Publ. Bot. 28:335-447.
- _____. 1963. A nuclear body in meiosis of Bromus. Chromosoma 14:423-450.
- Wilken, D.H. 1982. The balance between chasmogamy and cleistogamy in Collomia grandiflora (Polemoniaceae). Amer. J. Bot. 69:1326-1333.
- Williams, C.A., J.B. Harborne & P. Smith. 1974. The taxonomic significance of leaf flavonoids in Saccharum and related genera. Phytochemistry 13:1141-1149.
- Wooten, J.W. 1971. Chromatographic studies in the Sagittaria gramineae complex. Can. J. Bot. 49:1793-1797.




A P E N D I C E

En la lista que se da en la siguiente tabla se consignan las localidades de los materiales estudiados. Se indican los números de cultivo y los números de herbario (C.A.Naranjo). En la última columna de la lista, se señala en que estudio fue usado cada material, de acuerdo con las siguientes abreviaciones: M = exomorfología, H = hibridación, C = citogenética y fertilidad, A = contenido de ADN y volumen nuclear, Cr = cromatografía, E = electroforesis, Ac = determinación de autocompatibilidad.

| Especie | N° de Cultivo | N° de herbario | Localidad | Estudios en que fue usado |
|-----------------------|---------------|----------------|--|---------------------------|
| <u>B. catharticus</u> | 103 | 400 | Prov. de Buenos Aires, Castelar | E, M |
| | 129 | 198 | Prov. de Entre Ríos, Brazo Largo. | Ac, H, E, Cr, M, |
| | 643 | 1114 | Ciudad de Buenos Aires, Nuñez. | H, C |
| | 908 | 1116 | Ciudad de Buenos Aires, Nuñez. | H, C |
| | 911 | 1118 | Ciudad de Buenos Aires, Nuñez. | A, M |
| | - | 572 | Prov. de Entre Ríos, Gualaguaychu. | A, M |
| | - | 402 | Ciudad de Buenos Aires, Nuñez. | Cr, M |
| | 639 | 1114 | Ciudad de Buenos Aires, Nuñez. | H |
| | 644 | " | " " " " | H |
| | 645 | " | " " " " | H |
| | 646 | " | " " " " | H |
| <u>B. brevis</u> | 125 | 176 | Prov. de Buenos Aires, Cardenal Cagliaro. | H, C, E, Cr, M, Ac |
| | 842 | 1211 | Prov. de La Pampa, ruta 152, Km118 Gral. Acha. | H, C |
| | 118 | 957 | Prov. de La Pampa, Anguil | Cr, M, Ac |
| | 636 | " | " " " | H, C |
| | 845 | 1232 | " " " | A |
| | - | 337 | Prov. de La Pampa, Gral Acha. | M |
| | - | 455 | " " " | M |
| | - | 328 | Prov. de Buenos Aires, Trenque Lauquen | M |
| <u>B. parodii</u> | 104 | 422 | Prov. de La Pampa, Lihuel Calel | H, C, E, Cr, M |
| | 841 | 1211 | " " " " | H, C, A, M, Ac |
| | 634 | 977 | Prov. de La Pampa, Quehué. | H, M |
| | 635 | " | " " " | |
| <u>B. bonariensis</u> | 98 | 599 | Prov. de Buenos Aires, CuraMalal | H, C, E, Cr, M, A |
| | 98 | 965 | " " " | H, C, E |
| | 015 | 480 | Prov. de La Pampa, Lihuel Calel | A |

Continuación

| Espece | N° de cul- tivo | N° de herbario | Localidad | Estudios en que fue usado |
|------------------------|-----------------------|-------------------|---|------------------------------------|
| <u>B.brachyanthera</u> | 620 | 1139 | Prov. de Entre Ríos, Concepción del Uruguay. | Ac, Cr |
| <u>B.uruguayensis</u> | 638 | 1147 | Prov. Entre Ríos, Delta Inferior (Leg. A.Burkart.) | Ac,Cr |
| <u>B.laevipes</u> | | | Estados Unidos de Norteamérica, California. | E |
| <u>B.anomalous</u> | | | Estados Unidos de Norteamérica, Utah. | E |
| <u>B.ciliatus</u> | | | Estados Unidos de Norteamérica, Wyoming. | E |
| <u>B.marginatus</u> | | | Estados Unidos de Norteamérica, Colorado. | E |
| <u>B.carinatus</u> | | | Estados Unidos de Norteamérica, California. | E |
| <u>B.maritimus</u> | | | Estados Unidos de Norteamérica, California. | E |

* Semillas de estos materiales fueron legados por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, se usaron dichas semillas en los estudios electroforéticos. No se hicieron ejemplares de herbario pues no se las cultivó.