



Universidad Nacional de Misiones. Facultad de Ciencias Exactas,
Químicas y Naturales. Departamento de Genética

Tesista

Silvana Beatriz Larroza

**Estudios citogenéticos en
Bothriochloa-Dichanthium (Andropogoneae)**

**Tesis presentada para obtener el título de
“Licenciada en Genética”**

Directora

Lic. Irene Caponio

Posadas, Misiones 2012



Esta obra está licenciado bajo Licencia Creative Commons (CC) Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional. <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Silvana B. Larroza
Citogenética Bothriochloa- Dichanthium
2012

Tesina para optar al Título de Licenciada en Genética

**Tema: “Estudios citogenéticos en *Bothriochloa-
Dichanthium* (Andropogoneae)”**

Alumna: Silvana Beatriz LARROZA

Directora: Lic. Irene Caponio

Lugar de Trabajo: Facultad de Ciencias Agrarias –

UNNE- IBONE, Corrientes

Año: 2012

AGRADECIMIENTOS

La presente Tesina es un esfuerzo en el cual directa o indirectamente participaron varias personas, leyendo y opinando, corrigiéndome y teniéndome paciencia, dándome ánimos de perseverancia en momentos de crisis como así también en momentos de felicidad.

Agradezco a la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Nordeste (UNNE) y al Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE) por permitirme desarrollar este trabajo.

Al Dr. Guillermo Norrmann director del Dpto. de Botánica y Ecología de la Facultad de Ciencias Agrarias, por darme su apoyo y la oportunidad de formar parte de la Cátedra de Genética y Fitotecnia y hacer uso de las instalaciones y del material de estudio.

A mi directora, la Licenciada Irene Caponio, quien con sus conocimientos y apoyo supo guiarme en el desarrollo del presente trabajo desde el principio hasta su culminación, brindándome su confianza, amistad, comprensión y consejos.

A mis padres, Gerónimo y Carolina, por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, por los ejemplos de perseverancia y constancia que los caracterizan y que me han infundado siempre, el valor para salir adelante pero más que nada, por su amor. A mis hermanos, Ariel, Hernán, Aldo y Susana; y a Buri, Andrea, Daniela, Julián Alicia, Ruth, tío Benjamín, sobrinos; a mis suegros Elsa y Javier y a mis cuñados.

A mi marido Diego y a mi hija Mili por su apoyo, comprensión y paciencia durante los años que le dediqué a este trabajo de Tesina y por su inmenso amor.

A mis queridos compañeros María Julia, Mariela, Margarita, Melisa, Carla, Mónica Vanesa, Roxana, Noelia, Alexis, Javier, Andrés y María Cecilia, que nos apoyamos mutuamente en nuestra formación profesional y que hasta ahora compartimos nuestras experiencias.

Al Dr. Claudio Bidau, por su paciencia, consejos y conocimientos compartidos.

A Mappy, Marita, y Flopy por su colaboración y consejos en el laboratorio.

Agradezco a Dios quien me regaló la vida y la ha llenado de bendiciones en todo este tiempo, a Él que con su infinito amor me ha dado la sabiduría suficiente para culminar la carrera universitaria.

Ahora puedo decir que todo lo que soy es gracias a todos ustedes.

RESUMEN

Los géneros *Bothriochloa* y *Dichanthium* están ampliamente distribuidos en regiones tropicales y subtropicales del mundo; junto al género *Capillepidium* conforman un complejo agámico, donde las especies poliploides son apomíticas y los diploides sexuales. En las especies del Viejo Mundo, se ha demostrado un flujo génico siendo *B. bladhii* la especie puente entre los géneros. Utilizando técnicas de citogenética clásica se determinaron los niveles de ploidía de las especies de *Dichanthium* cultivadas en Argentina y de especies sudamericanas de *Bothriochloa*. Se realizaron hibridaciones genómicas *in situ* con el objeto de establecer las relaciones entre especies de estos géneros. Se observaron señales de hibridación en *D. caricosum* y *D. aristatum* con *B. bladhii* confirmando que estas especies comparten parcialmente sus genomas.

ABSTRACT

The genera *Bothriochloa* Kuntze and *Dichanthium* are widely distributed in tropical and subtropical regions of the world. Along with the genus *Capillipedium* they conform an agamic complex where the polyploidy species are apomictic, and the diploid ones have sexual reproduction. In Old World species, gene flow among the different forms has been demonstrated, *B. bladhii* being the bridge species between genera. In this thesis, classic cytogenetic techniques were used to assess the ploidy level of *Dichanthium* species cultivated in Argentina, and of South American species of *Bothriochloa*. Also, genomic *in situ* hybridization (GISH) was performed in order to assess the relationships between these genera. Hybridization signals were observed in *D. caricosum* and *D. aristatum* with the *B. bladhii* genome confirming that these species share their genomic content.

ÍNDICE

Introducción.....	1
Objetivos.....	5
Materiales y Métodos.....	6
Resultados y Discusión.....	13
Conclusiones.....	19
Láminas.....	20
Bibliografía.....	26

INTRODUCCIÓN

Los géneros *Bothriochloa* Kuntze y *Dichanthium* Willemet pertenecen a la tribu Andropogoneae Dumort, subfamilia Panicoideae; *Bothriochloa* está ampliamente distribuido en regiones tropicales y subtropicales, comprendiendo alrededor de 35 especies a nivel mundial (Watson & Dallwitz, 1992). En América habitan 22 especies, 2 subespecies y una variedad; en Argentina están representadas 11 especies (Vega, 2000; Scrivanti 2007, Scrivanti et. al. 2009).

El género *Dichanthium* es propio de regiones tropicales y subtropicales, originario de Asia, África y Oceanía, según consultas realizadas en el Index Kewensis posee ca. 40 especies. Por su calidad como forrajeras, se hallan ampliamente distribuidas en todos los continentes, *D. annulatum* (Forssk.) Stapf., *D. caricosum* (L.) A.Camus y *D. aristatum* (Poir) C.E Hubb. En Argentina estas especies se encuentran naturalizadas, especialmente en la región Nordeste del país presentando citotipos diploides y tetraploides.

Ambos géneros poseen un número cromosómico básico de $x = 10$ (De Wet 1968b, Mehra and Magoon, 1974).

Dentro del género *Bothriochloa* existen diferentes niveles de ploidía desde $2x$ a $18x$, siendo más frecuentes los poliploides. En América todas presentan niveles de ploidía entre $6x$ y $18x$ (Gould, 1966; Scrivanti et al. 2010) y no se encuentran diploides ni tetraploides mientras que en el Viejo Mundo y el continente africano se encuentran diploides, tetraploides, pentaploides y hexaploides.

En *Bothriochloa laguroides* (DC.) Herter se describieron dos subespecies, la subespecie *laguroides* (D.C.) Herter y subespecie *torreyana* (Steud.) Allred & Gould; ambas presentan una distribución disyunta, con un número cromosómico de $2n=60$

(Allred & Gould, 1983) en la subespecie *laguroides* y recientemente se citó un número cromosómico de $2n=80$ (Scrivanti et al. 2010) para la subespecie *torreyana*.

Bothriochloa springfieldii (Gould) Parodi es una especie nativa que también presenta áreas de distribución disyunta en América, presente en Argentina, Bolivia, Estados Unidos de América y México. Habita en suelos arenosos y rocosos (Vega 2000); y está citada como especie con $2n=120$ cromosomas, según recuentos realizados por Gould (1957) y de Wet (1968), mientras que para las poblaciones de Sudamérica el número cromosómico es de $2n=60$ (Scrivanti 2007).

Bothriochloa longipaniculata (Gould) Allred & Gould es otra especie Americana con el mismo patrón de distribución geográfica que las anteriores, observándose que los ejemplares de Estados Unidos de América y México presentan $2n=120$ cromosomas (Gould, 1955; Gould, 1956), mientras que los que se encuentran en Sudamérica presentan $2n=60$ y $2n=80$ cromosomas (Scrivanti 2007, Scrivanti et. al. 2010).

Bothriochloa bladhii (Retz.) S.T. Blake (= *B. intermedia* (R. Br.) A. Camus; *Andropogon intermedius* R. Br.) Es una especie originaria de los trópicos del Viejo Mundo, distribuida en África, India y Australia, introducida en América y posee $2n=40$, 50, 60, 80 cromosomas (Federov, 1974).

Bothriochloa radicans (Lehm.) A. Camus (= *Amphilophis radicans* (Lehm.) Stapf; *Dichanthium radicans* (Lehm.) W. D. Clayton) es originario de África tropical y está ampliamente distribuido desde Kenia, Uganda, Tanzania, Sudán y Etiopía hasta Sudáfrica e introducido en América (Clayton, 1977).

De Wet (1968a) describe una posible evolución del género *Dichanthium* basado en los ciclos poliploides; involucrando diploides, tetraploides y haploides. De Wet & Harlan (1970) describen las relaciones entre las especies de los géneros *Bothriochloa* –

Dichanthium y *Capillepidium*, abordándolos como un complejo agámico debido a la existencia de apomixis (Harlan et. al., 1964; Celarier & Harlan, 1957). Las especies apomícticas son poliploides y las barreras reproductivas quedan delimitadas por la apomixis y el nivel de ploidía, lo que tiene impacto en su aprovechamiento. En estos complejos los diploides mantienen un sistema de reproducción sexual y estos son raros fuera del centro de origen de las especies. Así el flujo génico se da a través de cruzamientos intergenéricos, sólo cuando *Bothriochloa* actúa de puente; motivo por el cual es tratado como el complejo “*Bothriochloa – Dichanthium - Capillepidium*”.

La dinámica evolutiva en estos casos es muy activa en los centros de origen de las especies, donde se ha demostrado un flujo genético entre la diversidad de niveles de ploidía (De Wet, 1968a; Savidan & Pernès, 1982). En estos centros, se encuentran individuos de diversos niveles de ploidía incluyendo euploides (diploide y tetraploide, el de mayor abundancia), e individuos aneuploides resultado de la dinámica del flujo genético. Esta dinámica reproductiva ocurre mediante la presencia cíclica de cruzamientos entre individuos con diferentes niveles de ploidía (De Wet, 1968a; De Wet & Stalker, 1974; Harlan & De Wet., 1975). Esta forma de recombinación genética de las plantas apomícticas, mediante ciclos diploide–tetraploide–dihaploide, e identificados inicialmente en *Bothriochloa* (De Wet, 1968a) y posteriormente en *Panicum maximum* Jacq. (Savidan & Pernès, 1982), ha sido reportada también en géneros como *Brachiaria* (De Wet, 1986).

La aplicación de técnicas de hibridación *in situ* permiten realizar la identificación de los genomios en híbridos, la determinación de ancestros en poliploides de origen incierto y examinar las relaciones entre especies ya que provee información sobre similitud entre el ADN de las diferentes especies analizadas; también puede dar

información sobre la distribución física de las secuencias usadas como sondas (Bennett, 1995).

GISH (genomic *in situ* hibridation) es una técnica de marcado y detección con fluorocromos en la que se utiliza como sonda, ADN genómico total. Es reproducible y no es afectado por genes de apareamiento meiótico. Permite la identificación de cromosomas pertenecientes a uno u otro parental en el análisis de híbridos y poliploides; también permite observar el comportamiento de los genomas en los híbridos intra e inter genéricos; detectar en una especie determinada la presencia de genomas, cromosomas o segmentos cromosómicos de otras especies y conocer el número y tamaño de estas secuencias introgresadas. La técnica de GISH permite dilucidar el origen y las relaciones de los genomas que los componen en poliploides de origen incierto, homologías y relaciones filogenéticas (Bennett, 1995; Schwarzacher & Heslop-Harrison 2000).

En este trabajo se propone la aplicación de estas técnicas entre especies de diversos orígenes del género *Bothriochloa* y las de *Dichanthium* a través de hibridaciones *in situ*.

OBJETIVOS

Objetivos Generales

Este trabajo pretende ampliar y profundizar los estudios filogenéticos en la tribu Andropogoneae (Poaceae: Panicoideae) a través de hibridaciones *in situ* entre especies de los géneros *Bothriochloa* y *Dichanthium*.

Objetivos específicos

- Determinar el nivel de ploidía de los citotipos que se encuentran en la cátedra de Genética y Fitotecnia de las siguiente especies: *Bothriochloa radicans*, *B. springfieldii*, *B. laguroides* ssp. *torreyana* , *B. bladhii*, *B. longipaniculata*, *Dichanthium aristatum*, *D. caricosum* y *D. annulatum* a utilizar para las hibridaciones *in situ*.

- Determinar mediante GISH (Hibridación Genómica *In Situ*) las homologías presentes en entidades representativas del género *Bothriochloa* y de *Dichanthium*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las plantas de *Bothriochloa laguroides* ssp. *torreyana*, *B. springfieldii* y *B. longipaniculata* utilizadas en este trabajo fueron coleccionadas en la Provincia de Corrientes por la Dra. L. R. Scrivanti y forman parte de la colección de gramíneas que se mantienen en invernáculo de la Facultad de Ciencias Agrarias de la UNNE-IBONE. Las plantas de *Bothriochloa radicans* y *B. bladhii* se obtuvieron a partir de semillas enviadas por INTA San Luis, Provincia de San Luis; mientras que las tres especies del género *Dichanthium*, *D. caricosum*, *D. aristatum* y *D. annulatum* fueron cedidas por el INTA El Colorado, de la Provincia de Formosa especialmente para este estudio.

Los ejemplares de cada especie fueron herborizados y depositados en los herbarios del Instituto de Botánica del Nordeste (CTES) y del Museo Botánico de Córdoba (CORD) detallándose en la Tabla 1.

Tabla 1: Detalle del material utilizado en este trabajo y depositado en herbarios.

Especie	Herbario	Coleccionista/ N° de ejemplar	Procedencia
<i>B. radicans</i>	CTES	Irene Caponio IC 151	INTA San Luis
<i>B. bladhii</i>	CTES	Irene Caponio IC 152	INTA San Luis
<i>B. longipaniculata</i>	CORD	Lidia Raquel Scrivanti SCRI 147	Chaco, Colonia Benítez.
<i>B. laguroides</i> ssp. <i>Torreyana</i>	CORD	Lidia Raquel Scrivanti SCRI 131	Corrientes, Mercedes.
<i>B. springfieldii</i>	CORD	Lidia Raquel Scrivanti SCRI 102	Córdoba Punilla, Antonio de Arredondo.
<i>D. annulatum</i>	CTES	Irene Caponio IC 153	INTA El Colorado (Formosa).
<i>D. caricosum</i>	CTES	Irene Caponio IC 154	INTA El Colorado (Formosa).
<i>D. aristatum</i>	CTES	Irene Caponio IC 155	INTA El Colorado (Formosa).

Recuentos Cromosómicos:

Los ápices de las raicillas fueron pretratadas con solución saturada de hexaclorociclohexano (Gamexanne-Lindano) durante tres horas. Posteriormente fijadas en una mezcla de etanol 100% y ácido acético glacial en una proporción 3:1; y fueron conservadas a -18°C .

Para los recuentos cromosómicos fue utilizada la técnica clásica de Feulgen, realizando una hidrólisis ácida débil con HCl 1N durante 10 minutos a 57°C , y coloreado con el reactivo de Schiff, reforzando la coloración con orceína acética en el momento del aplastado.

Para la observación de los preparados se utilizó Microscopio Marca Leica, Modelo DM500 con cámara fotográfica incorporada.

Hibridación genómica *in situ* (GISH)

Para la hibridación genómica *in situ* se utilizó el protocolo de Leitch et al. (2001); con algunas modificaciones realizadas en el laboratorio de la cátedra de Genética y Fitotecnia de la Facultad de Ciencias Agrarias de la UNNE. Esta técnica consta de las siguientes etapas:

Extracción de ADN:

Las extracciones de ADN se realizaron utilizando el método de Dellaporta, modificado por Ortiz et. al. (1997); para ello se utilizaron 0,2/0,4 gr de hojas frescas, molidas con nitrógeno líquido en mortero. A estas muestras se les agregó 1.3 ml de buffer de extracción con β -mercaptoetanol (10 μ l β -mercaptoetanol: 1ml de buffer de extracción), se incubaron a 68°C durante 20 minutos; se agregó 250 μ l de acetato de potasio 5M y se mantuvieron a 0 °C durante 45 minutos; posteriormente se centrifugaron 10 minutos a 4°C y a 13000 rpm; se colectaron los sobrenadantes y se agregó 1 ml de isopropanol a -20°C, y se mantuvieron toda la noche a -20 °C para provocar el precipitado del ADN.

Las muestras se centrifugaron a 13000 rpm durante 10 minutos, los pellets obtenidos fueron resuspendidos en 250 μ l de TE y tratados con 1 μ l de RNasa (10 mg/ml) durante 20 minutos agitando manualmente; se agregó una mezcla de fenol /cloroformo (125 μ l:125 μ l) y se centrifugaron durante 15 minutos a 13000 rpm; posteriormente se precipitaron los ADN con una solución de NaCl 5M y etanol absoluto a -20°C, se centrifugaron y se lavaron con etanol al 70%, una vez secos se disolvieron en 25 μ l de agua ultrapura estéril.

Para determinar la calidad y concentración las muestras de ADN, se realizaron corridas electroforéticas en geles de Agarosa al 1% de 6 x 8 cm con 8 calles. El gel fue teñido con bromuro de etidio, y observado en un transiluminador con emisión de luz ultravioleta.

Marcado (labelado) de ADN:

El ADN obtenido fue marcado con Biotina y Digoxigenina, para lo que se utilizaron el kit Bio Nick Labelling System: Cat. N° 18247 – 015 – (Invitrogen) y Dig Nick Translation Mix Cat. N° 11 745 816 910 (Roche), siguiendo los protocolos de cada kit.

Los métodos se basan en la capacidad de la DNasa I de introducir fragmentos de ADN distribuyéndolos al azar a bajas concentraciones en presencia de Cloruro de Magnesio (MgCl₂).

La Polimerasa I sintetiza la cadena de ADN complementario en la cadena 5´-3´ usando el 3´-OH terminal del fragmento (nick) como primer; simultáneamente remueve nucleótidos en la dirección de la síntesis y secuencialmente reemplaza los nucleótidos removidos por los marcados.

El kit de Biotina produce fragmentos marcados pequeños de 50-500 nucleótidos, y en Dig Nick fragmentos marcados de 200-500 nucleótidos.

Ensayos de Dot blot:

Para confirmar la correcta incorporación de los nucleótidos marcados en las sondas de ADN se utilizó el protocolo de Leitch et al. (2001). En este caso se utilizaron tiras de membrana de Hybond N+ (Amersham Pharmacia Biotech) para la siembras de las muestras de ADN, y se detectó el ADN marcado con NBT/BCIP.

Obtención de Protoplastos:

Las raicillas fijadas se lavaron 3 veces en una solución buffer citrato 1X durante de 20 minutos. Posteriormente, se colocaron en una mezcla de enzimas a 37° C a baño maría durante 1 hora y media para el caso de las especies de *Bothriochloa* y de 2 a 2 horas

y media para las especies del género *Dichanthium*. Una vez realizada la digestión enzimática los ápices se lavaron dos veces en Buffer citrato 1X durante 20 minutos. La mezcla de enzimas está compuesto por (Celulasa 2% p/v de *Aspergillus niger* ó una mezcla de Calbiochem 1,8 %, 0,2 % de Celulasa “Onozuka” y de Peptinasa al 3% de *Aspergillus Niger*, las tres en Buffer Citrato 100mM. El Buffer citrato se prepara con 40 ml de Buffer citrato 100mM más 60 ml de Citrato de sodio 100 mM.

Sólo el ápice radicular fue traspasado sobre un portaobjetos limpio, agregándose una pequeña gota de ácido acético 60% para disgregar el material y obtener los protoplastos.

Los preparados fueron observados en microscopio con contraste de fase Marca Leica 500 y seleccionados según la cantidad de placas metafásicas y calidad de protoplastos. Los de buena calidad se seleccionaron y mantuvieron a -20°C hasta el proceso de hibridación.

Lavados Pre hibridación:

Los preparados cromosómicos seleccionados se deshidrataron a 37°C durante toda la noche. Se colocó 200 µl de RNasa (1:1000) sobre cada preparado, se cubrieron con cubreobjetos de plástico, e incubaron a 37°C en una cámara húmeda durante 1 hora. Finalmente se lavaron 3 veces durante 5 minutos en una solución SSC 2X.

Deshidratación

Se realizó una deshidratación en serie de etanol 70%, 90% y 96% a temperatura ambiente durante 3 minutos en cada uno. Los preparados se dejaron secar a temperatura ambiente durante dos horas.

Hibridación:

La mezcla de hibridación se preparó con 15 µl de formamida 50%, 6 µl de Sulfan dextrano 10%, 3 µl de SSC 2X, 1 µl de DNA de esperma de salmón 0.3 mg/ml, 1 µl de SDS 10%, 3-4 µl de DNA marcado (0.5µg/ml) y agua ultrapura estéril en cantidad necesaria para alcanzar un volumen de 30 µl para cada preparado.

Esta mezcla de hibridación se desnaturalizó a 75°C, durante 15 minutos, inmediatamente se colocó en hielo durante 5 minutos. Se colocó la mezcla de hibridación a los preparados y se incubaron en un termociclador entre 38°C y 75°C por 30 minutos. Seguidamente se mantuvieron los preparados en una cámara húmeda a 37°C durante toda la noche.

Lavados Post Hibridación:

Los preparados se lavaron a 42°C 10 minutos en SSC 2X, 10 minutos en formamida 20%, 5 minutos en SSC 0.1X, 5 minutos en SSC 2X y dos lavados sucesivos en SSC 4X /Tween 20 durante 5 minutos cada uno con el objeto de remover los excesos de la sonda no hibridada.

Detección y Visualización de los Sitios de Hibridación:

Posteriormente se escurrieron bien los preparados y se agregó a cada uno 200 µl de BSA al 5% durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se escurrieron los preparados y se colocó 150 µl de la solución anti-dig FITC en cada uno, en una concentración 1/40 anti-dig en BSA al 5% y se incubaron en cámara húmeda a 37°C durante 1 hora en oscuridad absoluta. Terminado este proceso se realizaron 3 lavados en 4x SSC/Tween 20 (0.2%) de 10 minutos cada uno en oscuridad. Finalmente se agregó 50 µl de VECTASHIELD (DAPI+ medio de montaje) a cada preparado cubriéndolos con cubreobjetos de vidrio.

Los preparados se colocaron en la cámara oscura en la heladera hasta el momento de las observaciones al microscopio.

Para la observación de los preparados se utilizó Microscopio de Fluorescencia Marca Leica, Modelo DM2500 con cámara fotográfica incorporada Modelo DFC320.

Las fotografías obtenidas fueron retocadas solo en el brillo y contraste en el caso de ser necesario.

RESULTADOS Y DICUSIÓN

Recuentos Cromosómicos:

Se realizaron recuentos cromosómicos de todas las plantas utilizadas en el trabajo, a fin de verificar el número cromosómico de las mismas; especialmente en las especies de *Dichanthium* cedidas por INTA, ya que se desconocía el nivel de ploidía de las mismas. Los resultados se detallan en la tabla 2.

Tabla 2: Números cromosómicos de las plantas involucradas en este trabajo.

Especies estudiadas	Nº de células estudiadas	Recuentos realizados 2n	Recuentos anteriores (citas)
<i>B. laguroides</i> ssp. <i>torreyana</i>	10	2n= 60	Allred & Gould, 1983.
<i>B. springfieldii</i>	10	2n= 60	Scrivanti, 2007
<i>B. longipaniculata</i>	10	2n= 60	Scrivanti et. al., 2010
<i>B. bladhii</i>	10	2n= 40	Gould & Soderstrom, 1974
<i>B. radicans</i> *	10	2n= 40	Sin datos certeros.
<i>D. aristatum</i>	10	2n= 40	Sinha et. al. 1990
<i>D. annulatum</i>	10	2n= 40	Sinha et. al. 1990, Mehra 1961.
<i>D. caricosum</i>	10	2n= 40	Sinha et. al. 1990

Las tres especies de *Dichanthium* presentaron $2n=40$ cromosomas Fig. 4 coincidiendo estos con los resultados obtenidos por Sinha et al. (1990).

En cuanto a las especies de *Bothriochloa* de origen Sudamericano y coleccionadas en Argentina, presentaron $2n=60$ cromosomas. El citotipo de *B. bladhii* es tetraploide ($2n=40$) Fig. 3.

Durante la búsqueda bibliográfica, no se localizó ningún trabajo en el que se confirmara el número cromosómico de *B. radicans*; en todos los trabajos existentes se estudian en detalle las relaciones del complejo *Bothriochloa-Dichanthium-Capillepidium*, y es citada como una especie tetraploide. En este trabajo se confirma el número somático de $2n=40$ cromosomas de los citotipos de *B. radicans* (Fig. 3 C) que se mantienen en la Facultad de Ciencias Agrarias –UNNE.

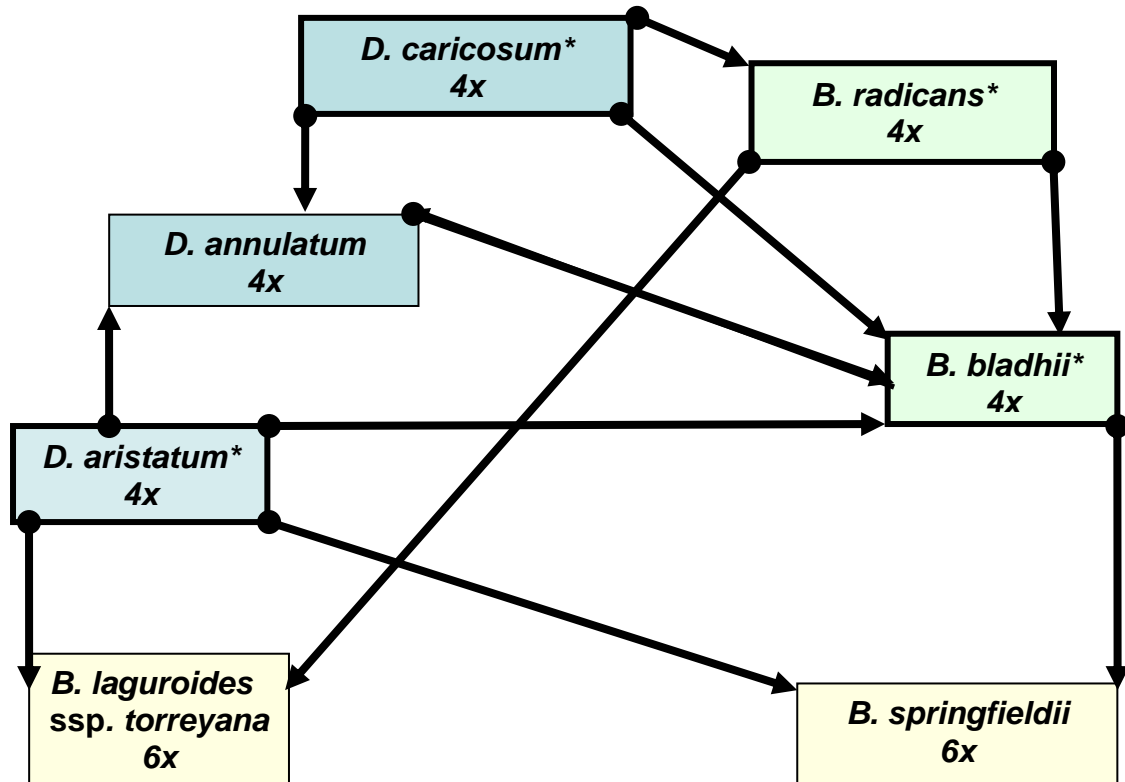
Marcado de sondas:

De las muestras de ADN obtenidas con buenas concentraciones fueron marcadas *B. radicans*, *B. bladhii*, *D. aristatum* y *D. caricosum*, mientras que la muestra de *D. annulatum* fue descartada por no presentar una concentración y marcado óptimos (Fig. 2).

Pruebas de Hibridación genómica total *in-situ* (GISH):

En las pruebas de hibridaciones *in situ* se cumplió el esquema que se presenta en el gráfico n° 1.

Grafico 1: Esquema de hibridaciones *in situ* realizadas.



En el gráfico 1 se indican las especies de los dos géneros utilizados, con su nivel de ploidía correspondiente. Los recuadros resaltados y con (*) indican las pruebas testigo realizadas en las hibridaciones. El inicio de las flechas indica la procedencia de la sonda a hibridar, las puntas de las flechas, las especies hibridadas. Los asteriscos (*) indican las especies que fueron hibridadas con su propio ADN como pruebas testigos. Las flechas llenas indican las hibridaciones realizadas.

En la tabla 3 se detallan los preparados de protoplastos que se hibridaron, con la sonda correspondiente.

Tabla 3: Detalle de hibridaciones genómicas in situ realizadas.

Nº de preparado	Especie	Sonda c/ Digoxigenina	Sonda c/Biotina	Resultados
1T	<i>B. bladhii</i>	<i>B. bladhii</i>		Con Señales de hibridación
2T	<i>D. aristatum</i>	<i>D. aristatum</i>		Con Señales de hibridación
3T	<i>D. caricosum</i>	<i>D. caricosum</i>		Con Señales de hibridación
4T	<i>B. radicans</i>	<i>B. radicans</i>		Hibridó
5	<i>B. springfieldii</i>	<i>B. bladhii</i>		-----
6	<i>B. springfieldii</i>		<i>D. aristatum</i>	Con Señales de hibridación
7	<i>B. springfieldii</i>	<i>D. aristatum</i>		Con señales de hibridación
8	<i>B. laguroides</i> ssp. <i>torreyana</i>	<i>D. aristatum</i>		-----
9	<i>B. laguroides</i> ssp. <i>Torreyana</i>	<i>B. radicans</i>		Con Señales de hibridación
10	<i>B. laguroides</i> ssp. <i>torreyana</i>	<i>D. aristatum</i>		-----
11	<i>B. laguroides</i> ssp. <i>torreyana</i>		<i>B. bladhii</i>	-----
12	<i>B. radicans</i>	<i>D. caricosum</i>		-----
13	<i>B. radicans</i>	<i>D. aristatum</i>		-----
14	<i>B. radicans</i>		<i>B. bladhii</i>	-----
15	<i>B. bladhii</i>	<i>D. aristatum</i>		Hibridó
16	<i>D. caricosum</i>	<i>B. bladhii</i>		-----
17	<i>D. caricosum</i>	<i>B. radicans</i>		Con Señales de hibridación
18	<i>D. annulatum</i>		<i>B. bladhii</i>	-----
19	<i>D. annulatum</i>	<i>D. aristatum</i>		-----
20	<i>D. annulatum</i>	<i>D. aristatum</i>		-----
21	<i>D. annulatum</i>	<i>B. bladhii</i>		-----
22	<i>D. annulatum</i>		<i>B. bladhii</i>	Hibridó
23	<i>D. annulatum</i>	<i>D. caricosum</i>		-----
24	<i>D. aristatum</i>		<i>B. bladhii</i>	-----
25	<i>D. aristatum</i>	<i>B. bladhii</i>		-----

En los procesos de hibridaciones se utilizaron los controles positivos, es decir, como testigos del método empleado. En todas las hibridaciones testigos se observaron señales de hibridación positiva; en la Fig. 5 se muestra el caso testigo de cromosomas de *B. radicans* ($2n=40$) hibridados con su mismo ADN genómico marcado con Digoxigenina donde todos los cromosomas muestran señales de hibridación completa.

Las especies del género *Bothriochloa* hibridadas con sondas de *D. aristatum*, mostraron señales parciales.

Las especies del género *Dichanthium* hibridadas con sondas de *Bothriochloa bladhii*, mostraron señales parciales en algunos cromosomas, indicando que comparten por lo menos parte de sus genomas.

Bothriochloa springfieldii mostró señales de hibridación con sondas de *D. aristatum*, afirmándose que ambas comparten parte de sus genomas.

Bothriochloa laguroides ssp. *torreyana* fue hibridada con sonda de *B. bladhii*, *B. radicans* y *D. aristatum* obteniéndose resultados positivos visibles con *B. radicans*. Con las otras dos especies no hubieron resultados positivos, lo que sugiere que *B. laguroides* ssp. *torreyana* no comparte su genoma con el género *Dichanthium* pero si podría compartir con *B. bladhii*, por ser de su mismo género.

Bothriochloa radicans fue hibridada con las sondas de *B. bladhii*, *D. aristatum* y *D. caricosum*, no dando resultados positivos visibles.

B. bladhii se hibridó con la sonda de *D. aristatum* dando resultado positivo (Fig. 6). De esta manera surgen evidencias que ambos géneros comparten sus genomas, lo que resulta coincidente con hipótesis previas, pues *B. bladhii* es una de las especies intermedias en las relaciones intergenéricas.

Dichanthium caricosum fue hibridada con las sondas de *B. bladhii* y *B. radicans*, dando señales positivas de hibridación visible únicamente con *B. radicans*.

Dichanthium annulatum se hibridó con sonda de *B. bladhii* y *D. aristatum*, con resultados positivos visibles y fotografiados con *B. bladhii*, confirmando que ambas especies comparten parte de su material genético.

Dichanthium aristatum fue hibridada con sonda de *B. bladhii* no obteniéndose resultados positivos de hibridación.

CONCLUSIONES

Los preparados utilizados como controles de *Bothriochloa radicans*, *B. bladhi*, *Dichanthium aristatum* y *D. caricosum*, mostraron resultados positivos en las hibridaciones; indicando que la calidad de la sonda estaba en buenas condiciones.

Sin embargo las señales de hibridación en *B. laguroides* ssp. *torreyana* y *B. springfieldii* al hibridarse con ADN de *B. radicans*, *D. aristatum* respectivamente, y *B. radicans* con *D. caricosum* fueron muy débiles probablemente debido a que los preparados de protoplastos no fueron óptimos.

En *Dichanthium annulatum* y *D. aristatum* se observaron señales de hibridación con *Bothriochloa bladhi*, lo que indicaría que podría haber flujo génico entre ambos géneros.

Con los resultados obtenidos no se puede confirmar la hipótesis de que los géneros *Bothriochloa* y *Dichanthium* presenten homologías en sus genomas, hasta tanto se identifique correctamente los cromosomas y zonas donde se observaban señales de hibridación, para ello se necesitarían realizar más pruebas de hibridaciones con preparados de mejor calidad y que puedan confirmar la hipótesis de Harlan & De Wet (1963).

Sin embargo de darse la oportunidad de repetir las hibridaciones con *Dichanthium aristatum* y *B. bladhi* podría confirmarse, que a través de *D. aristatum* también habría flujo génico entre los géneros.

BIBLIOGRAFÍA

- Allred, K.W. & F.W. Gould. 1983. Systematics of the *Bothriochloa saccharoides* complex. (Poaceae: Andropogoneae). Systematic Botany 8, 168-184.
- Bennett, M.D. 1995. Development and use of genomic *in situ* hybridization (GISH) as a new tool in plant cytogenetics. In Kew Chromosome Conference IV. Eds. P.E. Brandham & M.D Bennett. Royal Botanical Garden, Richmond, UK. 167-183.
- Celarier, R.P. & J.R. Harlan. 1957. Apomixis in *Bothriochloa*, *Dichanthium* and *Capillipedium*. Phytomorphology 7(1): 93-102.
- Clayton, W.D. 1977. New Grasses from eastern Africa. Kew Bulletin 32(1):1-4.
- De Wet, J.M.J. 1968a. Diploid- tetraploid- haploid cycles and the origin of variability in *Dichanthium* agamospecies. Evolution 22:394-397.
- De Wet, J.M.J. 1968b. Biosystematics of the *Bothriochloa barbinodis* complex (Gramineae). American Journal of Botany, 55, 1246-1250.
- De Wet, J.M.J. & J.R. Harlan. 1970. Apomixis, polyploidy, and speciation in *Dichanthium*. Evolution 24: 270-277.
- De Wet J.M.J. & H.T. Stalker. 1974. Gametophytic apomixis and evolution in plants. Taxon; 23:689-697.
- De Wet J.M.J. 1986. Hybridization and polyploidy in the Poaceae. In Soderstrom T.R., Hilu K., Campbell C.S, Barkworth ME editors. Grass systematic and evolution 1st ed. Washington, DC USA; Smithsonian Institution Press. pp188-194.
- Federov, A. 1974. Chromosome numbers of flowering plants. Koenigstein, Fed. Rep. Germany, Otto Koeltz Science Publishers.
- Gould, F. W. 1955. *Andropogon saccharoides* Swartz var. *longipaniculatus* var. nov. Field & Lab. 23: 17-19.

- Gould, F.W. 1956. Chromosome counts and cytotaxonomic notes on grasses of the tribe Andropogoneae. *American Journal of Botany*. 43: 395-404.
- Gould, F.W. 1957. Pollen size as related to polyplidy and speciation in the *Andropogon saccharoides* - *A. barbinodis* complex. *Brittonia* 9: 71-75.
- Gould, F.W. 1966. Chromosome numbers of some Mexican Grasses. *Canadian Journal of Botany* 44: 1683-1696.
- Gould, F.W. & T.R. Soderstrom. 1974. Chromosome numbers of some Mexican and Colombian grasses. *Canad. J. Bot.* 48: 1633-1639.
- Harlan, J.R. & J.M.J. de Wet. 1963. The compilospecies concept. *Evolution*, 17: 497-501.
- Harlan, J.R.; Brooks, M.H.; Borgaonkar D.S. & J.M.J. de Wet. 1964. Nature and inheritance of apomixis in *Bothriochloa* and *Dichanthium*. *Botanical Gazette*. 125: 41-46.
- Harlan, J.R. & J.M.J. de Wet. 1975. On a wing and prayer: the origins of polyploidy. *The Botanical Review*, 41, 361-391.
- Leitch A.R., K.Y. Lim, D.R., Webb & G.I. McFadden. 2001. Plant cell biology, Second Edition. In situ hybridization. 12: 267-293. B.D. Hames Ed., Oxford University Press.
- Mehra, K.L. 1961. Chromosome number, geographical distribution and taxonomy of the *Dichanthium annulatum* complex. *Cytologia* 17, 176.
- Mehra, K.L. And Magoon & M.L. 1974. Collection, conservation and exchange of gene pools of forage grasses. *Indian Journal of Genetics* 34, 26.
- Ortiz, J.P.A., Pessino, S.C., Leblanc, O., Hayward, M.D., & L. Quarin. 1997. Genetic fingerprinting for determining the mode of reproduction in *Paspalum notatum*, a subtropical apomictic forage grass. *Theor Appl Genet* 95:850-856.
- Savidan Y.H, Pernès J. 1982. Diploid-tetraploid-dihaploid cycles and the evolution of *Panicum maximum* Jacq. *Evolution* (36):596-600.

- Schwarzacher & Heslop-Harrison 2000. Practical *in situ* hybridization. Bios, Oxford, pp. xii-203.
- Scrivanti, L.R. 2007. Estudios embriológicos, citológicos y físicoquímicos en *Bothriochloa*. Poaceae: Pinacoideae: Andropogoneae. Tesis Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Scrivanti, L.R., G.A. Norrmann & A. Anton. 2009. Reproductive biology of South American *Bothriochloa* (Poaceae: Pinacoideae: Andropogoneae). *Flora*, 204: 644-650.
- Scrivanti, L.R., I. Caponio, A.M. Anton, & G.A. Norrmann. 2010 Chromosome number in South American species of *Bothriochloa* (Poaceae: Andropogoneae) and evolutionary history of the genus. *Plant Biology* 12(6) 910-916.
- Sinha, R.R.R., Bhardwaj A.K. & R.K. Singh. 1990. SOCGI plant chromosome number reports IX. *J. Cytol. Genet.* 25: 140–143.
- Vega, A.S. 2000. Revisión taxonómica de las especies americanas de *Bothriochloa* (Poaceae: Pinacoideae: Andropogoneae). *Darwiniana* 38 (1-2) 127-186.
- Watson, L. & M.J. Dallwitz 1992. *The grass genera of the World*. C.A.B. international pp. 305.

LÁMINAS

Fig.1: Fotografía de los geles de Agarosa al 1% realizados para corroborar la integridad y concentración de los ADN extraídos de las muestras

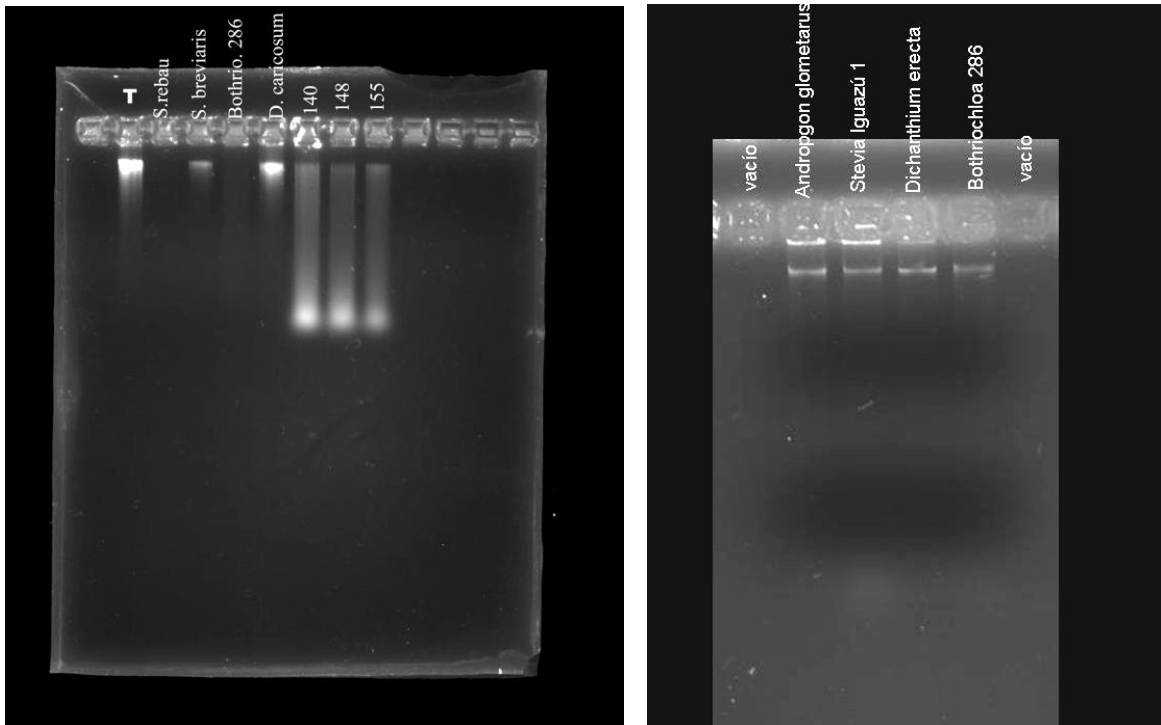


Fig. 2. Fotografía de la membrana de “Dot Blot” realizada para detectar las concentraciones y marcado de ADN. Las siembras 3, 5 y 9, indicadas con las flechas, no se utilizaron por poseer menor concentración que la muestra testigo.

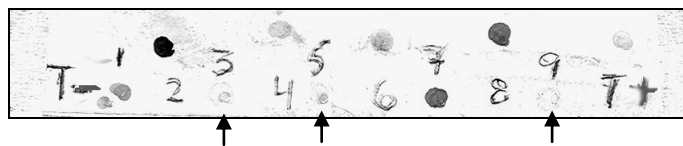
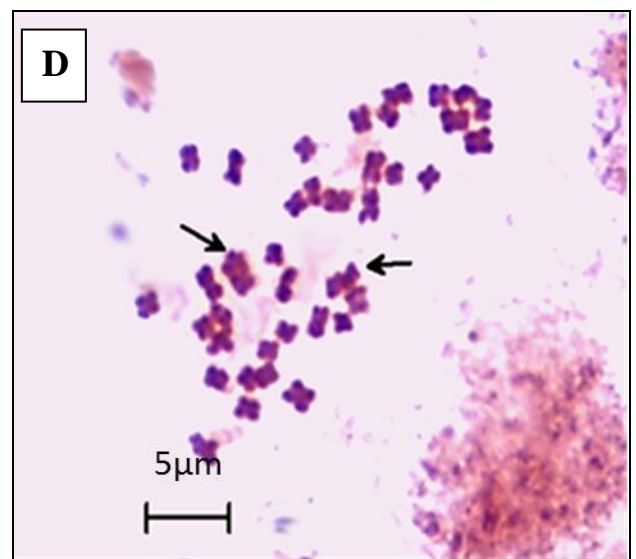
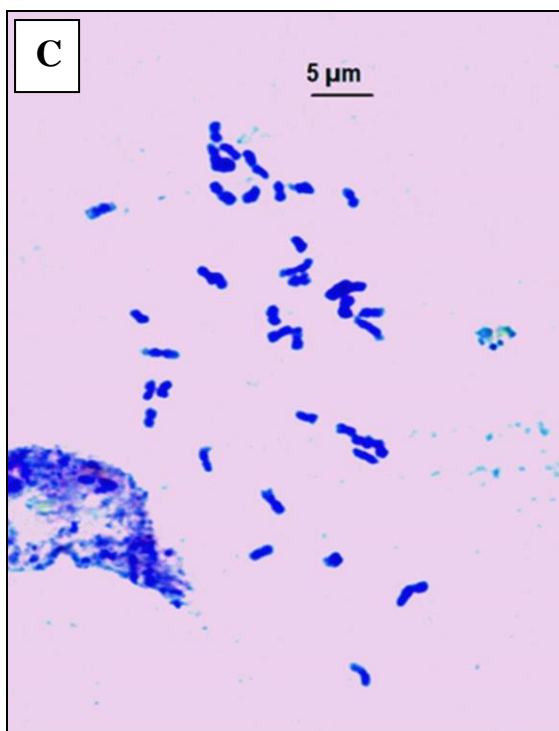
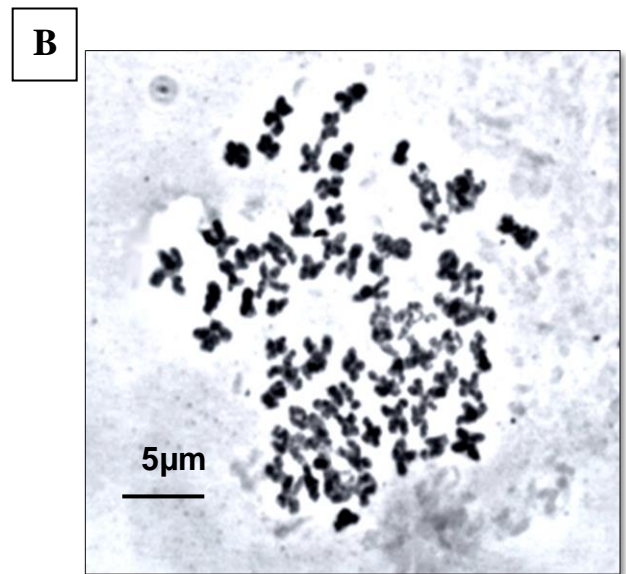
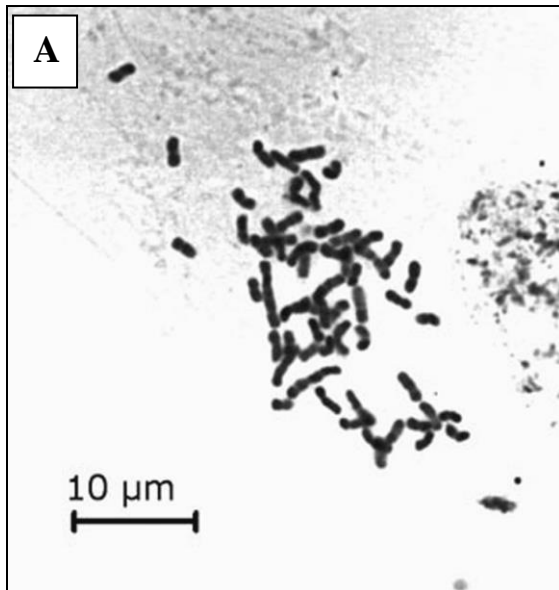


Fig. 3: Placas metafásicas de *Bothriochloa* **A)** *B. laguroides* $2n=60$ cromosomas; **B).** *B. springfieldii* metafase muy avanzada (protoplasto) (foto tomada con contraste de fases) $2n=60$ cromosomas **C)** *B. radicans* y **D)** *B. bladhii* $2n=40$. Las flechas indican que hay 2 cromosomas.



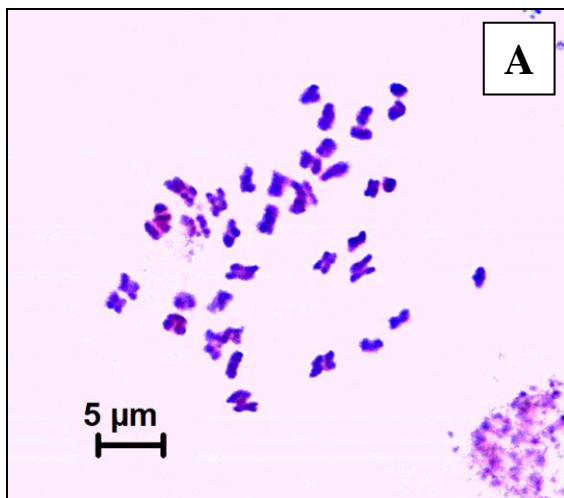


Fig. 4: Placas metafásicas de las especies de *Dichanthium* estudiadas.

A) *D. aristatum*; B) *D. caricosum*; C) *D. annulatum* Todas las especies con $2n=40$ cromosomas.
Las barras 5 μm

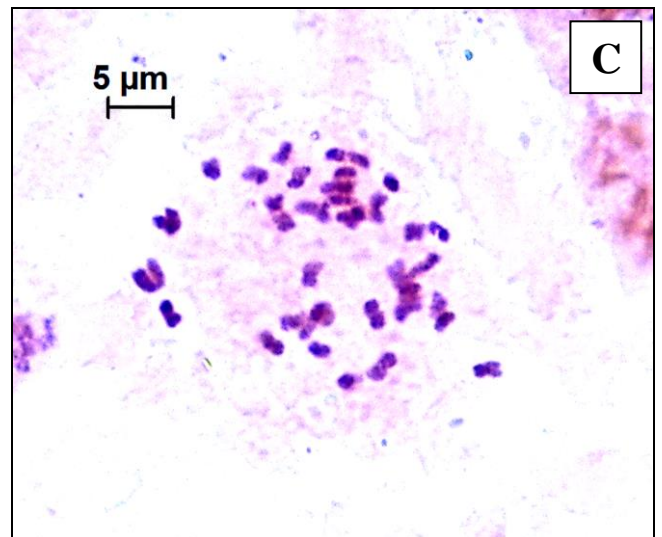
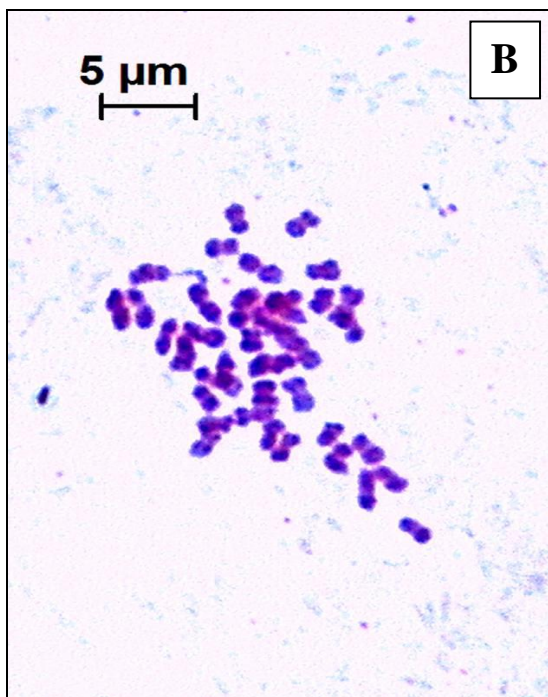


Fig. 5: Prueba de hibridación utilizada como testigo en una metafase mitótica de *Bothriochloa radicans*. **A)** Coloración con DAPI; **B)** Cromosomas hibridados con ADN de *Bothriochloa radicans* DIG. La barra corresponde a 5 μ m

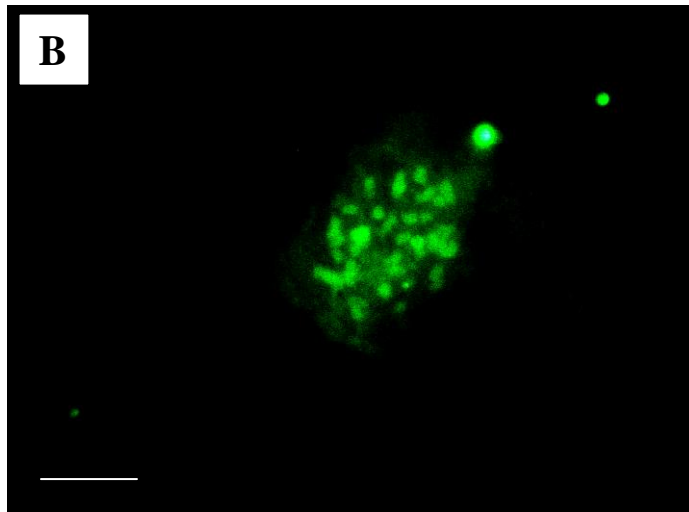
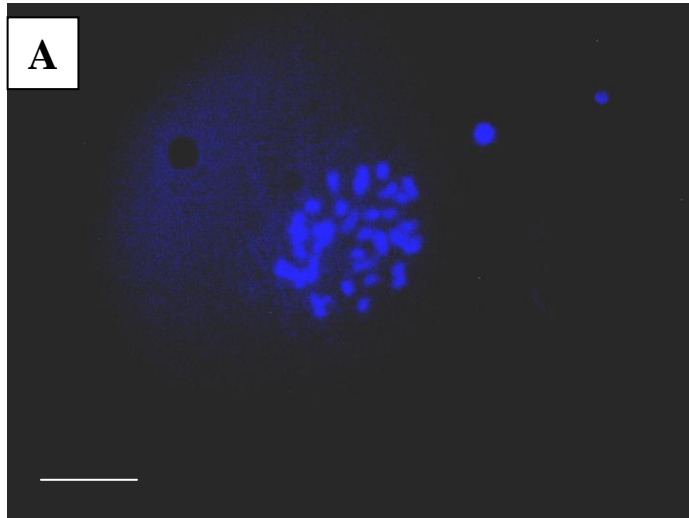


Fig. 6: *Bothriochloa bladii*. Profase mitótica **A)** Coloración con DAPI; **B)** Cromosomas hibridados con ADN de *Dichanthium aristatum* DIG. La barra corresponde a 5 μ m.

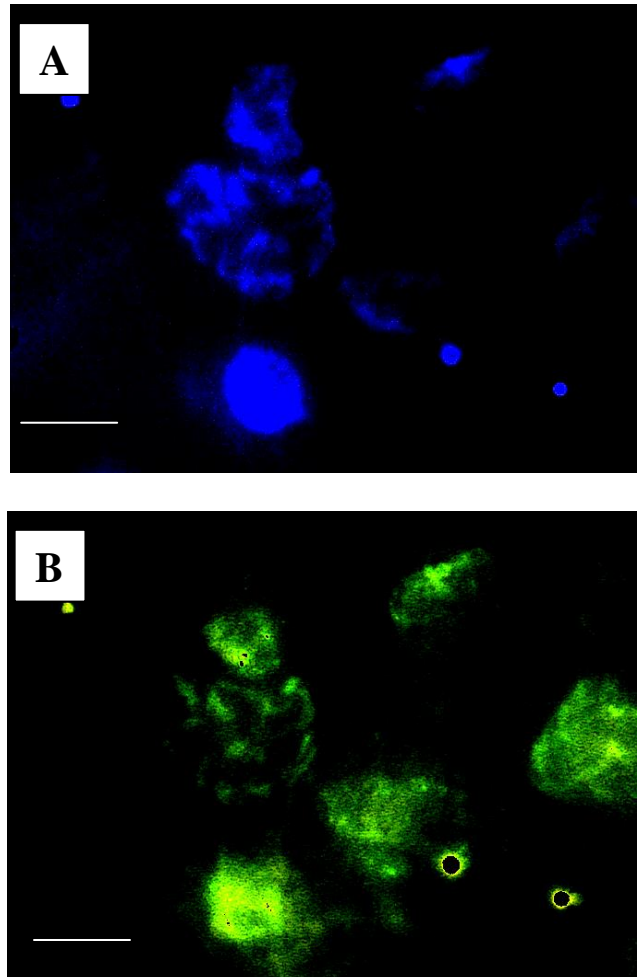
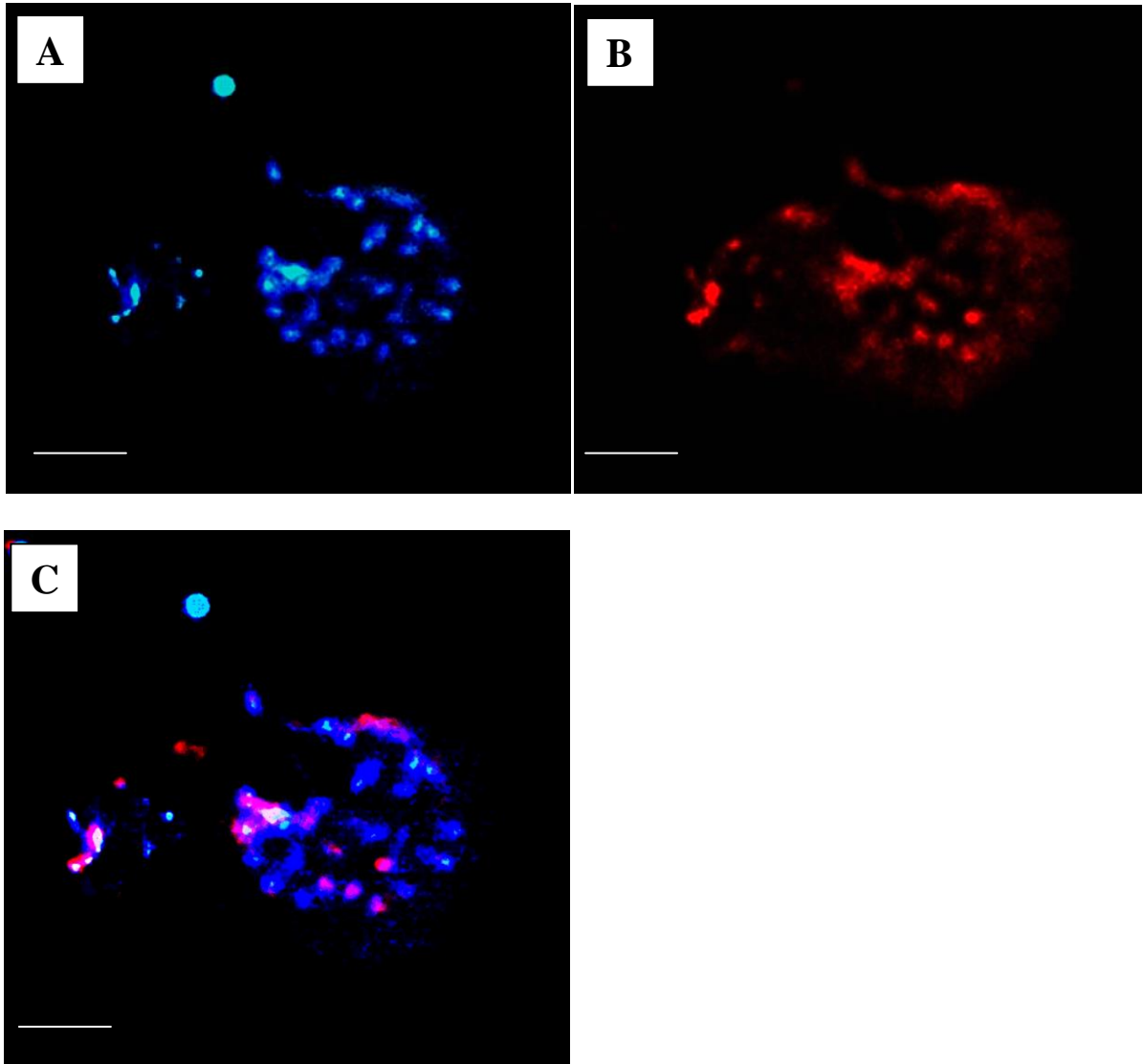


Fig. 7: *Dichanthium annulatum* Metafase mitótica de *D. annulatum* (metafase incompleta) A) Coloración con DAPI; B) Cromosomas hibridados con *Bothriochloa bladhii* Biotina. C) superposición de ambas imágenes A y B. La barra corresponde a 5 μ m.



**Formulario de autorización de depósito de tesis/trabajo final integrador en la
Comunidad Ciencias Exactas, Químicas y Naturales del RIDUNaM
(Repositorio Institucional Digital de la UNaM)**

Por intermedio de la presente, el abajo firmante, AUTOR de la Tesis/TFI (Grado) titulada/o
"Estudios Citogenéticos en *Bothriochloa Dichanthium* (Andropogoneae)."

Da FE de la autoría y originalidad de la obra mencionada, que fue dirigida por, Dra. Irene
Caponio

presentada y defendida en la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales de la Universidad
Nacional de Misiones (FCEQyN-UNaM), el (fecha) 21./03./2013, Acta/Expdte.
Nº, con el fin de obtener el título de Licenciada en Genética

Tildar según corresponda

- Tesis de Posgrado
 Doctorado Maestría Trabajo Final Integrador
 Tesis de Grado

Derechos patrimoniales

Como autor, expreso mi conformidad en cuanto a la cesión gratuita de los derechos de reproducción y circulación de esta obra, en forma NO EXCLUSIVA, a la Facultad de Humanidades y Ciencias Sociales-UNaM. Dicha reproducción y circulación se podrá realizar, una o varias veces, en cualquier soporte, para todo el mundo, con fines sociales, educativos y científicos.




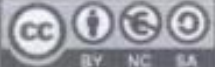
En virtud del carácter no exclusivo de esta cesión, el autor podrá reproducir y comunicar libremente la tesis o trabajo final integrador, a través de los medios que estime oportunos.

Condiciones de acceso en línea

- Autorizo el depósito de la tesis o trabajo final integrador en forma inmediata
 Autorizo el depósito del documento con embargo por el plazo de _____ meses a partir de la defensa de la misma.

Condiciones de uso de la tesis/TFI

Será puesta a disposición pública bajo las siguientes condiciones de uso:

	(BY) Atribución — Debe reconocer los créditos de la obra de la manera especificada por el autor o el licenciante (pero no de una manera que sugiera que tiene su apoyo o que apoyan el uso que hace de su obra).
	(NC) No Comercial — No puede utilizar esta obra para fines comerciales.
	(SA) Permite trabajos derivados — Siempre que se mantenga la misma licencia.
	Reconocimiento – NoComercial – Compartirigual (by-nc-sa): No se permite un uso comercial de la obra original ni de las posibles obras derivadas, la distribución de las cuales se debe hacer con una licencia igual a la que regula la obra original.

Referencias:

- CC (Licencias Creative Commons).
BY (Atribución).
NC (No comercial).
SA (Compartir igual).

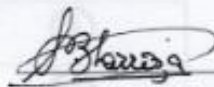
Dados personales (llenar un cuadro por cada autor)

Apellido y Nombres	LARROZA SILVANA BEATRIZ
Correo electrónico	silvana160483@gmail.com

Apellido y Nombres	
Teléfono/Celular	
Correo electrónico	

Apellido y Nombres	
Teléfono/Celular	
Correo electrónico	

Se firma la presente en la Ciudad de Posadas, Misiones a los... 8 (ocho) días del mes de septiembre de 2025...



Silvana Beatriz Larroza.

DNI N° 30.075.264