Estudios fenéticos y moleculares en *Paspalum* (Poaceae): grupos *Quadrifaria* y *Virgata*

Giussani L. M.[1], S. S Aliscioni [2], H. Cota-Sánchez [3], K. Ubayasena[3], C. L. Quarín[3], F. O. Zuloaga[1] y O. Morrone[1]

Paspalum L., perteneciente a la tribu *Paniceae*, subfamilia *Panicoideae*, es un género americano que comprende aproximadamente 330 especies distribuidas en regiones tropicales, subtropicales y templado-cálidas de ambos hemisferios. Las especies del género habitan principalmente en sabanas, márgenes de bosques o selvas y en suelos anegados, secos y arenosos como también en suelos salinos; algunas se extienden a regiones montañosas hasta los 4500 m (*P. pygmaeum* Hack.), o a áreas templado-frías de la Patagonia (*P. dasypleurum* Kunze).

Paspalum es uno de los géneros de la tribu *Paniceae* más importantes desde el punto de vista económico. Muchas de sus especies son consideradas excelentes forrajeras naturales como *P. notatum* Flügge "pasto horqueta", *P. urvillei* Steud., y otras han sido cultivadas como pasturas perennes: *P. dilatatum* Poir. "pasto miel" y *P. notatum* var. *saurae* Parodi. Además, otras especies, como las del grupo *Quadrifaria*, podrían ser utilizadas en la fabricación de papel por su alta producción de celulosa y su elevada producción de biomasa (Barreto, 1966), y especies del grupo *Virgata*, como forrajeras nativas (Valls, 1987 en Gomes, 1995).

El género *Paspalum* ha sido dividido en subgéneros y grupos informales dada la dificultad para delimitar taxones infragenéricos. Así, Chase (1929) describió dos subgéneros y 25 grupos informales sobre la base de caracteres morfológicos para las 140 especies que crecen en Norteamérica. Actualmente, Zuloaga y Morrone (2005) y Denham (2005) reconocen a los subgéneros *Anachyris*, *Ceresia*, *Harpostachys* y *Paspalum*. Dentro del subgénero tipo, y por no contar con caracteres diferenciales para establecer secciones, se incluyen los grupos informales propuestos por Chase (1929). Chase reunió en el grupo *Virgata* a ocho especies muy afines a *Paspalum virgatum* L., las que, en general, crecen también en regiones tropicales y subtropicales de Sudamérica. Barreto (1966) reunió a las diez especies afines a *P. quadrifarium* Lam. en el grupo *Quadrifaria*, en el que incluye algunas especies previamente tratadas dentro del grupo *Virgata* por Chase. *Virgata* y *Quadrifaria* fueron luego tratados como grupos informales por Zuloaga y Morrone (2005) y Gomes (1995). Sin embargo no hay consenso en el número de especies incluidas en ambos grupos.

Zuloaga y Morrone (2005) consideran dentro del grupo *Quadrifaria* a especies de alto porte, mayor a 1 m de altura, perennes, cespitosas, con inflorescencias piramidales multiracemosas y antecios claro; en *Virgata* reúnen especies con panojas cuadrangulares y antecios castaño-oscuros.

Las especies de los grupos *Quadrifaria* y *Virgata* presentan numerosas semejanzas en cuanto a su morfología tanto en caracteres reproductivos como vegetativos (Barreto, 1966; Zuloaga & Morrone, 2005) además de compartir hábitat y áreas de distribución geográfica. Asimismo, Barreto (1954) cita la similitud entre los grupos *Virgata*, *Quadrifaria* y *Plicatula* separándolos por combinaciones de estados en la compresión, forma y coloración del antecio. A la similitud morfológica se suma la probable hibridación entre especies simpátricas como *P. quadrifarium* Lam. y *P. exaltatum* J. Presl. y la diferenciación de citotipos de distintos niveles de ploidía en una misma especie (Quarín & Lombardo, 1986).

Dado la afinidad entre las especies de los grupos *Quadrifaria* y *Virgata*, el objetivo del presente trabajo es estudiar el patrón de variabilidad morfológica de ambos grupos con el fin de determinar caracteres o conjuntos de caracteres morfológicos que identifiquen especies o asociaciones de especies. Asimismo, y sobre la base de dos marcadores moleculares del cloroplasto (*rpl16* y *trnL-F*), se pone a prueba la monofilia de los grupos *Quadrifaria* y *Virgata* y se analizan las relaciones filogenéticas entre las especies de ambos grupos.

Materiales y métodos

Análisis fenéticos

Taxones y ejemplares analizados

Se incluyeron en este estudio la totalidad de especies consideradas por los diferentes autores en cada grupo: ***Virgata***: *P. acutum* Chase, *P. arundinaceum* Poir., *P. chaseanum* Parodi, *P. commune* Lillo, *P. conspersum* Schard., *P. nelsonii* Chase, *P. palustre* Mez, *P. regnellii* Mez, *P. rufum* Nees, *P. secans* Hitchc. & Chase (= *P. arundinaceum*), *P. virgatum* L., y *P. wettsteinii* Hack. (= *P. virgatum*); ***Quadrifaria***: *P. arundinellum* Mez, *P. coryphaeum* Trin., *P. dasytrichum* Dusén, *P. densum* Poir., *P. durifolium* Mez, *P. exaltatum* J. Presl., *P. haumanii* Parodi, *P. intermedium* Munro, *P. millegrana* Schard., *P. plenum* Chase, *P. quadrifarium* Lam. y *P. quarinii* Morrone & Zuloaga, y se agregaron especies afines: *P. affine* Steud., *P. longum* Chase, *P. luxurians* R. Guzmán & L. Rico, *P. turriforme* R.W. Pohl y *P. zuloagae* Davidse & Filg.. Para cada especie se utilizaron entre (1-2)**4 a 6**(10-15) individuos de acuerdo a la disponibilidad de material de los herbarios: BAA, BLA, CTES, MEXU, MO, MVFA, MVM, PACA, PAHN, PEL, SI y US. En total se midieron 164 individuos. El material fue seleccionado para representar la variabilidad morfológica y geográfica de las especies en estudio.

Variables morfológicas

En cada uno de los ejemplares se registraron las medidas correspondientes a las variables diagnósticas citadas en estudios taxonómicos previos y otros caracteres adicionales totalizando 86 variables. Con el objetivo de que las mediciones fuesen comparables, se escogieron individuos completos donde se midieron caracteres en órganos vegetativos como reproductivos. Los caracteres de la parte vegetativa fueron tomaron sobre una innovación fértil: características de nudos, entrenudos, ramificaciones, etc. de la caña florífera; y características de las hojas, incluyendo vainas y láminas, tanto en una hoja basal de la planta como en la segunda hoja después de la hoja bandera. Los caracteres reproductivos incluyeron datos de las inflorescencias completas, del eje principal de las mismas y sus ramificaciones. Los caracteres

[1] Instituto de Botánica Darwinion. Labardén 200 San Isidro, Email: lgiussani@darwin.edu.ar,
[2] Facultad de Agronomía (UBA)
[3] University of Saskatchewan, Canadá, 4 Instituto de Botánica del Nordeste, Corrientes.

referidos a las espiguillas se tomaron sobre la porción media del racimo basal y representan la disposición, forma y tamaño de las espiguillas; nerviación, pilosidad, longitud, etc. de gluma II y lemma I; ornamentación, color, consistencia, etc. del antecio y caracteres de la flor superior.

Análisis del patrón de similitud fenética

La similitud entre las especies fue analizada por medio de las técnicas de la taxonomía numérica mediante los métodos de ordenación: análisis de componentes principales, ACP (Sneath & Sokal, 1973). En todos los casos se midió la distorsión del análisis sobre la base del coeficiente de correlación cofenético. A partir de los resultados del análisis de ordenación se establecieron grupos de especies con mayor similitud morfológica. Estos grupos fueron utilizados como grupos *"a priori"* para el Análisis discriminante (AD) (Sneath & Sokal, 1973; Affifi & Clark, 1984). Este análisis permitió corroborar la consistencia de los grupos y seleccionar un conjunto de caracteres que permita identificarlos. Los grupos fueron validados mediante el método empírico dónde la función discriminante es aplicada sobre los datos y se mide el porcentaje que es correctamente clasificado en el grupo correspondiente.

Análisis filogenéticos

El ADN total fue extraído de material fresco conservado en sílica gel y utilizando un protocolo de extracción: CTAB total (Doyle & Doyle, 1987; Murray & Thompson, 1980). Cuando se utilizó material de herbario se utilizó el "Dneasy Plant Mini kit" (Qiagen, Hilden, Germany). Luego de la extracción, se amplificaron los siguientes marcadores moleculares: intrón del *trnL* y espaciador entre *trnL-trnF* (*trnL-F*) y el intrón del gen que codifica para la proteína ribosomal 16 (*rpl16*). La región del *trnL-F* fue amplificada con la combinación de los siguientes cebadores: C, D, E y F (Taberlet et al., 1991). Para la amplificación del *rpl16* se utilizaron los cebadores F71 (Jordan et al., 1996), y R1661 (Kelchner & Clark, 1997). La purificación de los productos de amplificación y las reacciones de secuenciación son realizadas por la compañía Macrogen, Inc. Para la edición y acoplamiento de las secuencias se utilizó el programa Chromas Pro versión 1.22 (Technelysium Pty, Ltd). El alineamiento y confección de la matriz de datos se realizó con el programa BioEdit versión 5.0.9. (Hall, 1999).

El patrón filogenético fue evaluado mediante métodos de parsimonia bajo pesos iguales utilizando el programa TNT (Goloboff et al. 2003). En todos los casos, se midió el apoyo de los clados utilizando los valores de Bootstrap (Felsenstein, 1985). Una vez obtenida una hipótesis evolutiva consistente se optimizaron otros caracteres como el número cromosómico, datos morfológicos y biogeográficos.

Resultados y discusión

Análisis fenético

El estudio fenético basado en caracteres morfológicos permitió definir asociaciones de especies afines. Ninguna de estas asociaciones morfológicas reunió a los grupos *Quadrifaria* y/o *Virgata* en un grupo independiente. Del primer ordenamiento, basado en los tres primeros componentes del ACP, se observó un grupo de individuos compuestos por las siguientes especies: *P. arundinaceum, P. arundinellum, P. conspersum, P. densum, P. exaltatum, P. haumanii, P. intermedium, P. longum, P. luxurians, P. millegrana, P. plenum, P. turriforme* y *P. virgatum*. Definido por su agrupamiento en el extremo negativo de los ejes 1 y 3, este grupo se caracteriza principalmente por la ausencia de pelos en las estructuras reproductivas y vegetativas y por el tamaño de las plantas. *P. palustre*, incluida dentro del grupo *Virgata* por Barreto, se asocia con el Grupo 1 por el tamaño de la planta pero ocupa una posición límite dentro del mismo. En sucesivos ordenamientos y analizando sólo las especies del Grupo 1 se observaron los siguientes subgrupos de especies: *P. densum* y *P. millegrana*, *P. haumanii* y *P. exaltatum*.

Al analizar las especies restantes, sin el Grupo 1, se observaron las siguientes asociaciones: *P. rufum, P. acutum* y *P. durifolium*; *P. quarinii* y *P. quadrifarium*, *P. commune* y *P. regnellii*.

P. coryphaeum fue tratada en el grupo *Coryphaea* por Chase (1929) por su hábito decumbente y ha sido citada por Gomes (1995) como afín a *P. quarinii* y *P. quadrifarium*. Sin embargo los individuos aquí estudiados presentaron gran variabilidad y no pudieron ser caracterizados por una combinación particular de caracteres.

Análisis filogenético

Se secuenciaron dos regiones no codificantes del cloroplasto: *intrones y espaciadores entre los genes trn*L-*trn*F (*trn*L-F) e introns del gen *rpl*16 (*rpl*16) para 47 individuos correspondientes a: 24 del grupo *Quadrifaria* (12 especies), 12 del grupo *Virgata* (5 especies), 7 de otros grupos taxonómicos de *Paspalum*, 3 especies de la tribu Paniceae y *Chasmanthium latifolium* de la subfamilia Centothecoideae, que fue utilizada como raíz. *Sorghum bicolor* y *Zea mays* son secuencias obtenidas de Genbank. Para corroborar la posición de algunos ejemplares, y cuando se contaba con el material pertinente, se utilizaron varios ejemplares por especie. El alineamiento del *rpl*16 resultó en 1380 pb mientras que el *trnL-F* fue de 1015 pb con 93 y 57 caracteres informativos respectivamente.

Los resultados preliminares obtenidos, utilizando las dos matrices en forma independiente o combinándolas, indican que los grupos *Quadrifaria* y *Virgata* son polifiléticos. El grupo 1, que surgiera por similitud morfológica en los análisis fenéticos, está representado por 10 especies de los grupos *Quadrifaria* y *Virgata* que conforman un clado monofilético. Este grupo puede ser caracterizado por un conjunto de caracteres cuantitativos y cualitativos, no por sinapomorfías únicas. Otras especies de los grupos *Quadrifaria* y *Virgata* forman pequeños clados o grupos naturales que deben ser revaluados dentro de una filogenia general para el género *Paspalum*: *P. quadrifarium* + *P. quarinii*, *P. regnellii* + *P. commune*, *P. rufum* + *P. durifolium* y que coinciden con asociaciones de especies determinadas por similitud morfológica.

Aunque plantas diploides son frecuentes en *Paspalum*, Quarín (1994) considera que gran parte de las especies del género contienen citotipos tetraploides (2n= 4x= 40) apomícticos, pero también citotipos diploides sexuales y autoincompatibles, de los que probablemente derivan las formas tetraploides o con otros grados de poliploidía. Al optimizar los números cromosómicos en la filogenia molecular, se observan individuos diploides y poliploides reunidos en clados monofiléticos, pudiendo representar casos de origen autopoliploide (Normann et al., 1989). Sin embargo, la variación en el número cromosómico puede tener también un origen híbrido y la relación de parentesco entre las especies resulta en diferentes asociaciones de especies en la filogenia derivada del cloroplasto, reflejando al menos una línea de herencia materna.

Bibliografía

AFFIFI, A. A. & CLARK, V. *Computer-Aided Multivariate Analysis*. Wadsworth, Inc., California, USA, 1984.

CHASE, A. The north American species of *Paspalum*. *Contr. U. S. Natl. Herb.* 28 (I): 1-310, 1929.

BARRETO, I. L. Las especies afines a Paspalum virgatum en la América del Sur. *Revista Argent. Agron.* 21: 125-142, 1954.

_____. Las especies afines a Paspalum quadrifarium (Gramineae) en la América del Sur de clima subtropical y templado. *Darwiniana* 14: 130-135, 1966.

DENHAM, S. S. Revisión sistemática del subgénero *Harpostachys* de *Paspalum* (Poaceae: Panicoideae: Paniceae). *Ann. Missiouri Bot. Gard.* 92: 463-532, 2005.

DOYLE, J. J. & DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15, 1987.

GOLOBOFF, P.; FARRIS, J. & NIXON, K. *TNT: Tree Analysis using New Technology*. Program and documentation, available at http://www.zmuc.dk/public/phylogeny/tnt, 2003.

GOMES, M. J. *Estudos taxonômicos no gênero* Paspalum *L. grupos* "Virgata" *e* "Quadrifaria" *no Brasil*. Dissertações de Mestrado. Inst. Biol., Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 1995.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98, 1999.

JORDAN, W. C.; COURTNEYY, M. W. & NEIGEL, J.E. Low levels of intraspecific genetic variation at a rapidly evolving chloroplast DNA locus in North American Duckweeds (Lemnaceae). *American Journal of Botany* 83: 430-439, 1996.

KELCHNER, S. & CLARK, L. Molecular evolution and phylogenetic utility of the chloroplast rpl16 intron in Chusquea and Bambusoideae (Poaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 8: 385-397, 1997.

MURRAY, M. G., & THOMPSON, W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* 8: 4321-4325, 1980.

NORRMANN, G. A.; QUARÍN, C. L. & BURSON, B.L. Cytolgenetics and reproductive behavior of different chromosome races in six Paspalum species. *J. Heredity* 80: 24-28, 1989.

QUARÍN, C. L. & LOMBARDO, E.P. Niveles de ploidía y distribución geográfica de Paspalum quadrifarium (Gramineae). *Mendeliana* 7 (2): 101-107, 1986.

QUARÍN, C. L. A tetraploid cytotype of Paspalum durifolium: cytology, reproductive behavior and its relationship to diploid P. intermedium. *Hereditas* (Lund.) 121: 115-118, 1994.

SNEATH, P. H.A. & SOKAL, R.R. *Numerical Taxonomy. The Principles and Practice of Numerical Classification*. Freeman, San Francisco, 1973.

TABERLET, P.; GIELLY, L.; PAUTOU, G. & BOUVET, J. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17: 1105-1109, 1991.

ZULOAGA, F.O. & MORRONE, O. Revisión de las especies de *Paspalum* para América del Sur Austral (Argentina, Bolivia, sur de Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay). Monogr. Syst. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 102: 1-297, 2005.