

INTRODUCCIÓN

La apomixis ha sido definida formalmente como una reproducción asexual (agámica) por semillas (Nogler 1984). Este evento reproductivo toma lugar en el óvulo de algunas angiospermas y procede, evitando la meiosis femenina, y la singamia para generar embriones partenogénicos genéticamente idénticos a la planta madre (Koltunow 1993). Algunas accesiones poliploides de especies del género *Brachiaria* son pastos forrajeros valiosos en Suramérica, que se reproducen a través de apomixis apospórica facultativa (Pessino *et al.* 1998). Y, aunque *Brachiaria* hace parte del pequeño grupo de cultivos de importancia económica que presentan apomixis natural (Ozias-Akins & van Dijk 2007), estos pastos apomícticos no pueden ser mejorados usando esquemas de hibridación tradicionales (Valle & Miles 1994), pues su reproducción apomíctica implica que no se pueden hacer cruzamientos entre los diferentes individuos.

Estudios genéticos indican que la aposporía en *Brachiaria* se hereda como un carácter dominante y como un factor mendeliano simple (Valle & Glienke 1993); este hecho hace concebible la introducción del carácter en cultivos no relacionados a través de transformación genética (Koltunow 2003; Savidan *et al.* 2006). Así, la identificación y caracterización de las regiones genómicas involucradas en el fenómeno de la apomixis en las diferentes especies donde ha sido descrito es un paso inicial y esencial en el proceso de introducción de la característica en cultivos de valor económico (Pessino *et al.* 1998).

No obstante, es necesario tener en cuenta experiencias previas de estudios moleculares que han revelado características complejas asociadas con la región(es) de ADN que controlan esta característica como la falta de recombinación y reguladores genéticos que previenen la transferencia de genes de apomixis a los gametos en cruces de maíz con su emparentado silvestre *Tripsacum* (Perotti & Leblanc 2006). Este fracaso para introducir la apomixis por cruzamientos tradicionales parece ser un problema común; intentos de transferencia de la apomixis a partir de

especies relacionadas silvestres a trigo, maíz y millete (*Pennisetum glaucum*) han arrojado todos resultados decepcionantes (Savidan *et al.* 2001).

Ahora bien, en el proceso de la búsqueda del “gen de la apomixis”, se ha planteado que los mejores candidatos prospectivos para ello son los genes responsables de la inducción de la meiosis en levaduras (por ejemplo los mutantes para los genes *spo-12* y *spo-13* reportados por Bilinsky *et al.* 1983) y los mutantes meióticos identificados en las plantas mayores (Pessino *et al.* 2001, Calisto *et al.* 2008). Así, la disponibilidad de un mapa molecular de la región *apo* en *Brachiaria* y de los genes que participan en el proceso de la meiosis, posee implicaciones para el aislamiento del “gen” que determina la apomixis en estas especies.

Estudios como los realizados por Rodrigues *et al.* (2003) y revisados en Koltunow (1993) han intentado evaluar la expresión genética diferencial entre plantas apomíticas y sexuales y/o las alteraciones meióticas o del ciclo celular (Pessino *et al.* 2001) presentes durante la megasporogénesis en ambos tipos de plantas. Allí, muchos de sus resultados apuntan a secuencias con función desconocida, y se ha mostrado que no ha habido consistencias con respecto a dichas alteraciones en la meiosis ni en el programa reproductivo de las células que hacen que cambien de divisiones celulares reduccionales a divisiones mitóticas, donde además el programa de diferenciación y formación del gametofito y posterior formación del cigoto, varían entre partenogénesis en las accesiones apomíticas y fertilización en las sexuales.

Por lo anterior, se hace importante detectar y ubicar genes de meiosis en *Brachiaria*, con la finalidad de determinar su relación con el o los genes que determinan la apomixis en estas especies. En este trabajo se pretendió entonces ubicar genes relacionados con la meiosis en el mapa existente de *Brachiaria decumbens*, y que posiblemente pudieran emplearse en el futuro como herramienta para la detección temprana de la apomixis.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 CARACTERÍSTICAS DEL GÉNERO *Brachiaria*

Brachiaria es actualmente uno de los géneros que componen la tribu Paniceae, junto a *Urochloa*, *Eriochloa* y *Panicum* (Pineda, 1999), al cual se le han atribuido tradicionalmente cerca de 100 especies que, aunque distribuidas en todo el trópico, se encuentran principalmente en África (Renvoize *et al.* 1998). Los hábitat en que crecen estas especies son muy variados – se encuentran en pantanos, bosques de sombra ligera y aún en áreas semidesérticas – aunque el ambiente típico de la mayoría de ellas está en las sabanas. Renvoize *et al.* (1998) mencionan que los principales caracteres que identifican al género *Brachiaria* son las espiguillas aovadas u oblongas que se organizan de un lado con la gluma inferior junto al raquis.

Con respecto a la filogenia de la tribu Paniceae, existen relaciones sin resolver. Específicamente, a los géneros *Brachiaria* y *Urochloa* se les han cuestionado las relaciones taxonómicas con base en estudios de sistemática filogenética (Morrone & Zuloaga 1992, 1993; Webster 1987, 1988). En este sentido, Keller – Grein *et al.* (1998) comentan cómo cinco especies de *Brachiaria* que han sido liberadas como cultivares comerciales en diferentes países del trópico Americano son ahora *Urochloa*, i.e., *U. brizantha*, *U. decumbens*, *U. dictyoneura*, *U. humidicola*, y *U. ruzizensis*. Más recientemente a nivel molecular, Torres – González y Morton (2005) confirmaron este planteamiento acerca de los géneros usando 22 especies de *Brachiaria* y *Urochloa* y seis especies de Paniceae como grupos externos y mediante la amplificación y análisis de las regiones ITS1 (Internal Transcribed Spacer), 5.8S e ITS2 del ADN ribosomal además de ocho caracteres morfológicos de la inflorescencia. En adición, se encontró que todas las especies de estos géneros comparten sinapomorfías moleculares y pertenecen a un mismo grupo monofilético. No obstante, en este estudio se acogió lo planteado por Veldkamp (1996) para mantener el nombre *Brachiaria* con un tipo conservado y en conformidad con la utilización general sin necesidad de eliminar un

nombre bien conocido por una razón puramente técnica y evitando así la descripción de un nuevo género.

Mientras que las especies de pasturas han sido explotadas consciente y deliberadamente por los pastores africanos durante milenios, el interés científico por *Brachiaria* para ser un forraje cultivado y manejado sólo comenzó hasta la década de los años 70 (Miles *et al.* 2004). Así, la importancia económica de los pastos del género *Brachiaria* es bien conocida. Se calcula que el área ocupada actualmente con pasturas de *Brachiaria* solamente en Brasil, está entre 30 y 70 millones de hectáreas (Keller-Grein *et al.* 1998) y un comercio anual de semillas estimado en casi US\$130 millones (Jank *et al.* 2005).

1.2 CULTIVARES COMERCIALES DE *Brachiaria*

Los pastos del género *Brachiaria* explotados comercialmente pertenecen a cuatro especies africanas: *B. brizantha* (A. Rich) Stapf (pasto alambre), *B. decumbens* Stapf (pasto brachiaria), *B. humidicola* (Rendle) Schweick (pasto humidícola) y *B. ruzi* Germain & Evrard (pasto ruzi) (Maass 1998). Su importancia económica combinada es mayor en América Tropical, donde ha habido un impacto sobre la productividad de vastas áreas, previamente subexplotadas y en suelos marginales gracias a su adopción en las últimas décadas.

1.2.1 *Brachiaria decumbens* cv. Basilisk (Oram 1990)

Es apomíctico tetraploide ($2n=4x=36$) (Valle & Savidan 1998). Este cultivar se adapta bien a suelos ácidos e infértiles, forma una pastura agresiva, de alto rendimiento, que resiste al pastoreo intensivo y el pisoteo de los animales (Pineda 1999). Es una gramínea palatable y de buena calidad nutricional y los animales que la consumen presentan buen desempeño (Pedraza 1995). La desventaja que presenta es su significativa susceptibilidad al salivazo del pasto (Homoptera: Cercopidae) (Miles *et al.* 2004).

1.2.2 *Brachiaria brizantha* cv. Marandú (Nunes *et al.* 1984)

Esta gramínea apomítica tetraploide ($2n=4x=36$) (Valle & Savidan 1998) es resistente al salivazo y a la hormiga arriera (Formicidae: Attini). Es similar a *B. decumbens* cv. Basilisk en su valor nutricional y palatabilidad, sin embargo ésta no tolera los suelos con drenaje pobre y de baja fertilidad.

1.2.3 *Brachiaria ruziziensis* cv. Kennedy (Barnard 1969)

El pasto ruzi tiene alto valor nutritivo y produce abundantes semillas por lo que se ha difundido ampliamente en los países tropicales, sin embargo es altamente susceptible al salivazo y menos productivo que *B. decumbens*, al tiempo que necesita suelos fértiles y de buen drenaje (Keller – Grein *et al.* 1998, Hare 2009).

Es la única especie comercial de este género de naturaleza diploide sexual obligada ($2n=2x=18$) (Ferguson & Crowder 1974, Lutts *et al.* 1991). Su forma de reproducción y su autoincompatibilidad la hacen el parental femenino óptimo para la implementación de programas de mejoramiento mediante la realización de cruces interespecíficos con los demás miembros del género, ya que se cuenta con un tetraploide funcional ($2n=4x=36$) obtenido por Swenne *et al.* (1981) mediante inducción por tratamiento con colchicina.

1.3 CITOGENÉTICA DE *Brachiaria*

Darlington & Wiley (1955, citado por Miles *et al.* 2004) establecieron que el número cromosómico básico de *Brachiaria* es $x=9$ ó $x=7$. Los niveles de ploidía difieren entre y dentro de las especies del género (Valle & Savidan 1998). Los diploides naturales de *B. brizantha*, *B. decumbens* y *B. ruziziensis* presentan meiosis regular, con apareamiento cromosómico normal en nueve

bivalentes. Los biotipos apomícticos tienen niveles de ploidía mayores que las sexuales de la misma especie (Miles *et al.* 2004). Los poliploides apomícticos generalmente son meióticamente irregulares, con formación de univalentes y cuadrivalentes (Valle & Savidan 1998).

Según Miles & Valle (1998), las especies de *B. decumbens*, *B. brizantha* y *B. ruziziensis* pertenecen al mismo complejo agámico, ya que pueden obtenerse híbridos fácilmente una vez se han superado las barreras de ploidía, resultando la mayoría o todos los híbridos fértiles. Ndikumana (1985) citado por Valle & Savidan (1998) hizo cruzamientos de estas mismas especies y recuperó más híbridos en los cruzamientos entre *B. ruziziensis* x *B. decumbens* que en los de *B. ruziziensis* x *B. brizantha*, evidenciando posiblemente una cercanía mayor entre las especies del primer cruce que las del segundo.

1.4 APOMIXIS

La apomixis se define como un modo natural de reproducción asexual a través de semillas que existe en muchas plantas de diferentes familias botánicas. La mayor frecuencia se presenta en las familias Eudicotiledóneas Rosaceae y Asteraceae y en la familia monocotiledónea Poaceae (Berthaud 2001). En este proceso, la reducción meiótica se evade antes de la formación del saco embrionario (apomeiosis), el desarrollo del embrión, que es genéticamente idéntico al parental materno, es autónomo (partenogénesis), y la formación del endospermo requiere ciertas adaptaciones embriológicas. A éstas características se hace referencia como “componentes” de la apomixis. Es importante resaltar que la apomixis y la sexualidad (anfimixis) no son modos de reproducción mutuamente excluyentes. Por el contrario, con pocas excepciones, la mayoría de los individuos apomícticos retienen la capacidad de reproducción sexual y por eso son apomícticos facultativos (Koltunow & Grossniklaus 2003).

De la ruta tomada en la formación del saco embrionario depende el modo de reproducción y la naturaleza de la progenie resultante (Pineda 1999). En la vía sexual, la meiosis regular de la célula megaspórica original da como resultado una tétrada de células reducidas. Sólo una de estas

sobrevive (calaza) y deriva en un saco embrionario después de pasar por tres procesos mitóticos . Este tipo de saco embrionario recibe el nombre de **Polygonum** (Crane 2001). Así, su nucléolo se replica dando origen a una oosfera, dos sinérgidas de corta vida, dos núcleos polares y tres antípodas. Por otro lado, en la vía asexual, específicamente en la apomixis apospórica, los cuatro megasporos se degeneran y el saco embrionario se desarrolla a partir de una célula nucelar agrandada y no reducida. Esta célula nucelar pasa por dos mitosis y produce un saco embrionario con una oosfera, dos sinérgidas de corta vida y un núcleo polar (Crane 2001). Este tipo de saco embrionario recibe el nombre de aposporía de tipo **Panicum**.

1.4.1 Tipos de Apomixis

En la práctica, se define la apomixis como agamosperma, cuyos elementos esenciales son (1) la evasión de la meiosis reduccional, (2) el desarrollo de la oosfera no reducida y no fertilizada, y (3) adaptación del desarrollo del endospermo para dar origen a semillas viables. Dependiendo de si se forma un gametofito femenino no reducido o no, la apomixis se clasifica generalmente en apomixis gametofítica y apomixis esporofítica (también conocida como embrionía adventicia).

1.4.1.1 Apomixis Gametofítica

En esta apomixis se producen sacos embrionarios a partir de células iniciales no reducidas. La oosfera se desarrolla partenogenéticamente, dando origen a embriones y plantas idénticas al tipo materno. Esta puede ser obligada (predominantemente apomíctica) o combinada con algún grado de sexualidad (facultativa) (Khush *et al.* 1994). Este tipo de agamosperma se clasifica con frecuencia como apospórica o diplospórica, dependiendo de si el saco embrionario asexual funcional es de origen adventicio o arqueospórico (Richards 2003). Al mismo tiempo, la apomixis gametofítica se clasifica según el tipo de desarrollo del endospermo así: apomixis gametofítica autónoma, donde el endospermo se forma sin la fertilización de la célula central, o pseudógama,

donde es necesario que la célula central sea fertilizada para el correcto desarrollo del endospermo (Grossniklaus 2001).

1.4.1.1.1 Diplosporía

El saco embrionario es arqueospórico en origen y sólo podrán producirse embriones asexuales (Richards 2003). Aquí, la célula madre de la megaspora (MMC) mantiene su constitución genética $2n$ y forma un saco embrionario no reducido (también $2n$).

1.4.1.1.2 Aposporía

La aposporía es la forma de apomixis presente en *Brachiaria* (Valle & Savidan 1998), y de la que se seguirá hablando de ahora en adelante. En este tipo, el saco embrionario no reducido se forma por mitosis de una célula diferente a la célula madre de la megaspora, por lo general una célula de la nucela (Bhat *et al.* 2005). Así, el arqueosporo permanece libre, quedando también la posibilidad de sexualidad (resultando con frecuencia en poliembrionía, donde yacen juntos embriones de origen sexual o asexual en la misma semilla; Richards 2003).

1.4.1.2 Embrionía Adventicia o Esporofítica

En este tipo los embriones se desarrollan a partir de células ubicadas en tejidos externos a un saco embrionario sexual (Lakshamanan & Ambegaokar 1984, citado por Khush *et al.* 1994). Así, una célula de los integumentos, o de la nucela del ovario se diferencia, y se forma un embrión directamente a partir de ésta. A este fenómeno se le llama embrionía adventicia o apomixis esporofítica, pues se forma un esporofito a partir de otro sin pasar por la generación haploide o gametofítica. Ocurre comúnmente en especies diploides; también en cítricos y en mango (Pineda 1999).

1.5 CONTROL GENÉTICO Y HERENCIA DE LA APOMIXIS

Si bien el control genético de las especies apomícticas ha sido estudiado en muchas especies, los mecanismos de desarrollo empleados por estas son notablemente variados (Nogler 1984). Esto posiblemente refleja el origen polifilético de esta característica entre las angiospermas (Carman 1997; Bicknell *et al.* 2000). Diferentes mecanismos conocidos de la apomixis se han categorizado de diferentes maneras y aunque típicamente los géneros son agrupados por similitudes en cuanto al tipo de reproducción que presentan (Asker & Jerling 1992), se presentan algunas dificultades a la hora de estudiar y comparar los mecanismos genéticos y hereditarios de la apomixis. Algunas de estas dificultades se deben a la complejidad de la poliploidía, la falta de recombinación y el patrón de segregación irregular de las especies apomícticas (Bhat *et al.* 2005). No obstante, se han propuesto varios modelos para explicar la regulación genética de la apomixis y se encuentran revisados en Valle y Savidan (1998). A continuación se muestra un breve resumen.

Una hipótesis inicial supuso que varios genes intervenían en este carácter aplicando la lógica de que la apomixis es un proceso fisiológico complejo. Sin embargo, el éxito ecológico logrado por la apomixis a través de especies, géneros y familias vegetales ha debilitado un poco esta hipótesis. Posteriormente, el descubrimiento de biotipos completamente sexuales en especies de gramíneas forrajeras apomícticas permitió el desarrollo de hipótesis más convincentes. A diferencia de la hipótesis inicial, se propuso una herencia genética sencilla (mono u oligogénica). Harlan *et al.* (1964) citado por Valle & Savidan (1998) afirmaron que la apomixis es dominante pero independiente a la sexualidad, es decir que no es una alternativa alélica a la sexualidad en el complejo *Bothriochloa – Dichanthium*. En experimentos realizados se ha encontrado que los cruzamientos entre plantas sexuales y apomícticas dan origen a progenies sexuales y apomícticas en una proporción aproximada 1:1 (Valle & Savidan 1998). Además, estos autores plantean que la sexualidad sería recesiva, dado que a partir de cruzamientos entre plantas sexuales (a nivel de tetraploides o diploides) se produjo sólo progenie sexual.

Hasta ahora, la evidencia indica que la apomixis es dominante sobre la sexualidad. Los genotipos propuestos son *aa* para los diploides sexuales, *aaaa* para los autotetraploides inducidos y *Aaaa* para los tetraploides apomícticos, tal como lo reporta Savidan (1983) en *P. maximum*. Esto se ve confirmado por algunas observaciones de raros eventos de tipo apomíctico en plantas sexuales que sugieren que las vías apomícticas no funcionan independientemente de las sexuales, por lo que es probable que los genes que controlan la apomixis no sean diferentes en su función sino que podrían estar alterados a nivel de regulación (Ozias-Akins & van Dijk 2007). Así, las plantas apomícticas cargan el potencial para la reproducción sexual pero en estado de represión debido a la presencia del factor dominante de la apomixis.

Además, según Bhat *et al.* (2005) la apomixis facultativa es el resultado de penetrancia incompleta. La presencia de alelos que condicionan o permiten la reproducción sexual de tipo recesivo, explicaría como en un cruce entre dos apomícticos facultativos se genera abundante progenie puramente sexual. Aunque la ocurrencia de este modo reproductivo se ajusta a este modelo, el grado de apomixis depende con frecuencia de las condiciones ambientales o de genes modificantes (Bhat *et al.* 2005).

1.6 MEIOSIS EN PLANTAS SEXUALES Y APOMÍCTICAS (Crane 1998)

1.6.1 Desarrollo Meiótico de Megagametofitos

El desarrollo del saco embrionario básico y más frecuente en las angiospermas (plantas con flor) es el de tipo Polígono (**Polygonum**-type). El programa de desarrollo que sigue puede ser detallado con suficiencia en la siguiente lista de eventos: diferenciación del megasporocito de las células parietales o nucelares, compromiso con la meiosis I, síntesis de ADN, fase G₂ premeiótica, leptoteno, cigoteno, paquiteno, diploteno, diacinesis, metafase I, anafase I, telofase I, interfase meiótica, profase II, metafase II, anafase II, telofase II, etapa de tétradas, germinación de la megaspora sobreviviente (la del extremo de la calaza), primera mitosis para la formación del saco embrionario, saco embrionario binucleado, segunda mitosis para la formación del saco

embrionario, saco embrionario tetranucleado, tercera mitosis del saco embrionario y polarización celular.

1.6.2 Desarrollo Ameiótico de Megagametofitos

Dependiendo del tipo de apomixis para la formación de sacos embrionarios, se presentarán las desviaciones de la meiosis en plantas sexuales. Particularmente, en el tipo **Panicum** se da la inducción de la segunda mitosis del saco embrionario (o la interfase precedente) en una de las muchas células nucelares.

1.7 MARCADORES MOLECULARES

El mejoramiento genético de plantas ha sido practicado desde los inicios de la civilización. El avance genético puede alcanzarse a partir del momento en que exista variabilidad genética (heredable), que el medio no enmascare por completo esta variabilidad y que sea posible realizar selección y recombinación de genotipos superiores para garantizar el establecimiento de la próxima generación (Giraldo 2000). Tradicionalmente, el progreso en el mejoramiento se ha basado exclusivamente en el análisis y selección de fenotipos. El éxito de este proceso depende de la heredabilidad del carácter; por ejemplo, herencia poligénica, dominancia parcial o completa, la influencia del ambiente, entre otros, son factores que frecuentemente limitan la eficacia del análisis.

Muchas de las complicaciones del análisis fenotípico pueden ser mitigadas a través de la identificación directa del genotipo. Para este fin, puede utilizarse un sistema de diagnóstico basado en marcadores moleculares de segregación conjunta a la de los genes de interés. En este contexto, la tecnología de marcadores moleculares puede contribuir significativamente al conocimiento básico de cultivos y del carácter estudiado, así como para la producción y desarrollo de materiales mejorados (Ferreira & Grattapaglia 1998).

No obstante, Bernardo (2008) menciona cómo en las dos últimas décadas ha sido testigo del amplio uso dado a marcadores moleculares en el estudio de características complejas y cuantitativas en diferentes especies cultivadas, y, a pesar de esto y de los QTLs (Loci de rasgos cuantitativos) que han sido reportados en la literatura, estos reportes no se han explotado de forma adecuada en programas de mejoramiento.

Los marcadores genéticos son unidades heredables que representan diferencias genéticas entre organismos individuales o especies y actúan como puntos de referencia, señalizando el genoma. Los marcadores por sí mismos no afectan el fenotipo de las características ya que sólo se localizan cerca o se encuentran ligados a los genes que controlan la característica de interés, aunque rara vez se pueden encontrar en el mismo gen. Los marcadores genéticos ocupan posiciones específicas dentro de los cromosomas, los cuales son conocidos como loci o *locus* (singular) (Collard *et al.* 2005). Un marcador genético provee información acerca de la variación alélica en un locus dado (Schlötterer 2004).

La ingeniería genética y la biotecnología generan gran expectativa con respecto al mejoramiento de plantas en la medida en que prometen acelerar el tiempo invertido para producir variedades de cultivos con características fenotípicas deseables. Con el uso de las técnicas moleculares sería posible apresurar la transferencia de genes de interés entre variedades e introducir nuevos genes a partir de especies silvestres relacionadas (pero ver Bernardo 2008).

Existen tres tipos generales de marcadores genéticos. Los marcadores morfológicos (visibles), que representan por sí mismos las características fenotípicas y los marcadores bioquímicos o alozimas (término que se originó a partir de la contracción de *variantes alélicas de las enzimas*) constituyen los primeros dos tipos. El principio de los marcadores bioquímicos consiste en que las variantes en enzimas en sus secuencias de aminoácidos pueden separarse por geles de electroforesis de acuerdo a diferencias en tamaño y carga causadas por las sustituciones aminoacídicas (Schlötterer 2004). Para visualizar las bandas de las alozimas, los geles de electroforesis son tratados con

tinciones específicas para enzimas que contienen el sustrato para las enzimas y cofactores. A pesar de que estos marcadores usualmente son neutros, su número es muy bajo para realizar estudios de mapeo y asociación a QTLs.

El tercer tipo de marcadores son los basados directamente en el ADN. La mejora tecnológica de estos marcadores permitió por primera vez el análisis de secuencias no codificantes o cambios silenciosos en la secuencia del ADN codificante de una proteína, así como la búsqueda de cambios en secuencias codificantes (Schlötterer 2004). Estas características han hecho de estos marcadores los más utilizados en estudios de genética y mejoramiento, tanto para la construcción de mapas de ligamiento, como para acceder al nivel de diversidad genética dentro de colecciones de germoplasma y la identificación inequívoca de cultivares (Jones *et al.* 1997 en Rosero 2005). Los caracteres poligénicos que han sido difíciles de analizar usando métodos de mejoramiento tradicional, han sido ya etiquetados con mayor facilidad usando marcadores moleculares. Además, también cabría la posibilidad de establecer relaciones genéticas entre cultivos de plantas sexualmente incompatibles.

Los marcadores de ADN surgen de diferentes clases de mutaciones sobre el ADN como sustituciones, rearrreglos (inserciones y deleciones – InDels) o errores en la replicación del ADN repetido en serie (Collard *et al.* 2005). Estos marcadores son divididos en tres clases según el método usado para su detección, a saber: marcadores detectados por hibridación como Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLPs), basados en reacción en cadena de la polimerasa (PCR), como RAPDs (Random – Amplified Polimorphic DNAs), SSR (Simple Sequence Repeats), Sequence Characterized Amplified Regions (SCARs), Sequence – Tagged Sites (STS), Inter Simple Sequence Repeats (ISSR), etc.; y marcadores basados en secuencia de bases en el ADN (InDels, Single Nucleotide Polymorphisms – SNPs). Los marcadores moleculares se han convertido en herramientas fundamentales para la construcción de mapas genéticos de genomas de eucariotas (Mohan *et al.* 1997).

Los primeros dos tipos de marcadores, basados en su detección, evalúan la variación siguiendo, a su vez, tres tipos de análisis diferentes: variantes proteicas (alozimas), polimorfismo en secuencias de ADN (RFLPs, AFLPs) y la variación en las repeticiones de ADN (minisatélites, microsátélites) (Schlötterer 2004). De esta manera, el uso de polimorfismos en las secuencias como marcadores ha sido lo común desde la aplicación de estudios con RFLPs, y desde ese entonces se han usado muchos métodos para detectar variaciones en las secuencias (para una revisión ver Mohan *et al.* 1997). Así, los métodos desarrollados recientemente para detectar polimorfismos en las secuencias no constituyen un avance conceptual por sí mismos, ellos son simplemente una forma de hacer las cosas a una escala mayor.

1.7.1 Sitios de Secuencias Etiquetadas o STS

Un STS (Por su sigla en inglés, Sequence Tagged Sites) es una secuencia corta y única amplificada por PCR que identifica una localización conocida en un cromosoma (Talbert *et al.* 1994). Los marcadores basados en STS son codominantes, tienden a ser mucho más reproducibles debido a que usan secuencias de cebadores un poco más largas y requieren los mismos protocolos y equipos de laboratorio básicos que una PCR estándar. Este tipo de marcador ha sido reportado como útil para programas de selección asistida por marcadores en programas de mejoramiento de cultivos de importancia comercial como cultivares élites de arroz (Kim & Sohn 2005).

Distinto a los cebadores arbitrarios como los que se han mencionado anteriormente, los STS cuentan con algún grado de conocimiento acerca de una secuencia, y presentan la ventaja de que no necesariamente deben ser como las Etiquetas de Secuencias Expresadas (ESTs, por su sigla en inglés, Expressed Sequence Tags). Los ESTs son secuencias cortas de ADN que corresponden a un fragmento de una molécula de ADN complementario (ADNc), el cual se expresa en una célula en un momento de tiempo determinado. Desde alrededor de 1991, los ESTs se están usando como un método eficiente para perfilar genes expresados en varios tejidos, tipos de células o etapas del desarrollo (Adams *et al.* 1991).

Tragoonrung *et al.* (1992) propusieron dos enfoques para obtener STSs para mapeo genómico en cebada. Uno de ellos es utilizar secuencias de ADN a partir de datos previamente publicados para construir primers. Otro, es secuenciar clones de ADN anónimos (como los provenientes de librerías de ADNc) para utilizarlos en proyectos de mapeo genético. Este enfoque fue el utilizado en este trabajo. Estudios previos como el de Lem & Lallemand (2003) demuestran que los STS no sólo constituyen una herramienta de marcadores moleculares confiable y reproducible, sino que también muestran un buen nivel de polimorfismo que puede ser útil en la construcción de mapas.

1.7.2 Polimorfismos de una sola base o SNPs

Un polimorfismo de una sola base o SNP (del inglés, Single Nucleotide Polymorphism) es una diferencia en la secuencia de ADN entre diferentes individuos de una especie (o entre cromosomas homólogos en un individuo) de un solo nucleótido A, T, C ó G. Los SNPs pueden ocurrir en una región codificante, no-codificante o intergénica en el genoma, permitiendo el descubrimiento de genes como resultado de diferencias en las secuencias de nucleótidos (Owusu 2008). La principal ventaja de los SNPs es su alto potencial para discernir entre genotipos mediante una automatización con tecnología de punta a costos moderados.

Dentro de una población la mayor cantidad de posiciones nucleotídicas son invariables, por lo que debe obtenerse información *a priori* sobre la presencia de una variación alélica en una posición dada en el genoma. Para esta situación se han seguido varias estrategias para identificar SNPs, entre ellas la más sencilla es buscar ESTs e identificar en los mismos sitios polimórficos. Otra manera de identificar SNPs y con el objetivo de hacerlo en la mayor cantidad posible del genoma es mediante la comparación de librerías provenientes de la secuenciación del genoma por *Shotgun*.

De esta manera, debido a que los métodos de identificación de alto rendimiento capaces de manejar alto número de marcadores y muestras requiere del conocimiento preciso de la secuencia

de ADN que rodea los marcadores SNP, y su utilidad está determinada por su heterocigosis en la población, cualquier enfoque para el descubrimiento de SNPs debe involucrar la determinación de la secuencia de ADN y las frecuencias alélicas. Además, estos métodos ya mencionados también requieren de la amplificación de ADN genómico, lo que hace necesario el desarrollo de cebadores STSs que amplifiquen sólo los fragmentos que contienen los SNPs y ninguna otra parte del resto del genoma (Rafalski 2002), esto debido a que existen en él segmentos repetitivos y regiones duplicadas en las que diferencias en secuencias casi idénticas pueden considerarse erróneamente alelos de un SNP, conllevando a resultados confusos en los experimentos de genotipificación.

Por otro lado, los SNPs son marcadores utilizados para mapeo por asociación de genes que gobiernan características complejas y proveen la más alta resolución en mapas. Su uso es robusto y constituyen el tipo de variación más frecuente en el ADN. Los SNPs junto con las Inserciones/Deleciones (InDels) forman la mayor parte de las diferencias existentes entre alelos. Por ende, los SNPs pueden explicarse como cualquier polimorfismo entre dos genomas que esté basado en un cambio de un solo nucleótido. En plantas, los estudios acerca de la ocurrencia y naturaleza de los SNPs está recibiendo considerable atención, particularmente en *Arabidopsis*, donde han sido identificados más de 37.000 SNPs a través de la comparación de sólo dos accesiones (Jander *et al.* 2002 citado por Rafalski 2002). Se ha reportado también en maíz una frecuencia promedio de un SNP no codificante cada 31pb y uno codificante cada 124pb en 18 genes de maíz evaluados en 36 líneas (Ching *et al.* 2000, citado por Rafalski 2002).

1.8 MAPEO GENÉTICO

El mapeo genético, también llamado mapeo de ligamiento, es uno de los métodos indispensables en genética, ya que este puede definir las distancias genéticas entre genes o loci polimórficos, las cuales pueden ser reconocidas como diferencias en la aparición de actividad enzimática, longitud de fragmentos de restricción o secuencias de nucleótidos en un locus dado. Los marcadores que se encuentren en genes altamente ligados son transmitidos juntos de parentales a la progenie con

mayor frecuencia que marcadores que se encuentran en genes que no están ligados (Collard *et al.* 2005).

Los marcadores de ADN son útiles si revelan diferencias entre individuos de la misma o diferentes especies, es decir, si son polimórficos, mientras que marcadores que no discriminan entre genotipos son considerados como monomórficos, y no son útiles. Los polimorfismos en las secuencias de nucleótidos son usualmente suficientes para que funcionen como marcadores moleculares en mapeo (Mohan *et al.* 1997). A su vez, los marcadores moleculares pueden ser codominantes o dominantes, lo cual hace referencia a si el marcador diferencia entre homocigotos y heterocigotos. Así, en los marcadores codominantes, a diferencia de los dominantes, la presencia de un alelo no afecta la habilidad para detectar simultáneamente un alelo diferente en el mismo individuo (Grant & Shoemaker 2001).

1.8.1 Mapeo en Poliploides

La poliploidía es un fenómeno evolutivo importante en las angiospermas. De acuerdo con Stebbins (1950, citado por Albertini *et al.* 2003), los poliploides se pueden clasificar con base en su origen: los **alopoliploides** se han derivado de la combinación en el individuo poliploide de genomas distintos, seguido de un evento de duplicación; mientras que los **autopoliploides** se originan a partir de duplicación cromosomal de un solo individuo por la fusión de sus gametos $2n$ u otros mecanismos (e.g., tratamiento con colchicina). Albertini *et al.* (2003) más adelante estimaron que entre un 30-80% de las angiospermas han experimentado episodios de poliploidización. Los aloploiploides se consideran mucho más prevalentes en la naturaleza que los autopoliploides, sin embargo se ha demostrado que los autopoliploides son más comunes de lo que se pensaba (Soltis & Soltis 2000).

A pesar de que los poliploides tienen gran representatividad entre los cultivos de importancia económica, su mapeo se ha quedado atrás con respecto al de los diploides debido a varios

factores (Wu *et al.* 1992). Primero, no está claro el comportamiento cromosómico en la meiosis de muchos poliploides, lo cual dificulta definir el patrón de herencia. No obstante, en el caso de los alopoliploides, se presenta un apareamiento específico entre cromosomas homólogos, por lo cual su genética es similar a la de un diploide. Los autopoliploides en cambio, debido a la presencia de varios conjuntos de cromosomas homólogos, pueden presentar apareamiento más o menos aleatorio entre estos (Wu *et al.* 1992; Ripol *et al.* 1999).

Estas características constituyen la segunda dificultad en el mapeo de poliploides, ya que la habilidad para detectar las fases de repulsión y ligamiento en autopoliploides es baja y en la medida de lo posible debe trabajarse con marcadores en fase de acoplamiento. Tercero, debido al gran número de posibles genotipos, el patrón de bandeo obtenido puede llegar a ser tan complejo que en el caso de un cruce con un parental de máxima heterocigosidad (cuatro alelos diferentes), se pueden obtener hasta 19 genotipos diferentes por locus (Albertini *et al.* 2003). Además, debido al número extra de dosis de cada segmento de ADN, se requiere un número de genotipos grande para el análisis (Grant & Shoemaker 2001).

Como la mayoría de especies poliploides, para el género *Brachiaria* no se conoce aún el origen de la composición genética (auto-, alopoliploide) de varias de sus especies, entre las cuales se encuentra *B. decumbens*. Se han planteado varias hipótesis con respecto a esta especie. Por ejemplo, Mendes-Bonato *et al.* (2001) encontraron en un estudio citogenético de caracterización de la meiosis cromosomas univalentes, bivalentes y cuadrivalentes, con una prevalencia de configuraciones bivalentes, y afirmaron que la presencia de algunas asociaciones multivalentes en pastos tetraploides como *Brachiaria* y *Paspalum* ha sido interpretada en varias ocasiones como evidencia de alopoliploides por segmentos, es decir que los genomas originarios no son del todo homólogos. Por otra parte, Rosero (2005) propuso que *B. decumbens* se trata de una especie alotetraploide ya que encontró mayor proporción de apareamiento cromosómico preferencial al analizar los marcadores ligados en fase de acoplamiento y repulsión dentro de cada grupo de

ligamiento del mapa genético de la especie en una población híbrida de esta especie con *B. ruziziensis* según la prueba de bondad de ajuste de X^2 propuesta por Mather (1957).

Debido a estas dificultades intrínsecas, el mapeo de poliploides puede realizarse, como lo propusieron Wu *et al.* (1992), sólo a partir de marcadores en una sola dosis (SDMs, por su sigla en inglés Single Dose Markers) y utilizando los análisis de ligamiento para especies diploides (como los que se realizan mediante Mapmaker), ya que los SDM segregan de la misma forma sin importar el nivel de ploidía (diploide o tetraploide) ni constitución genómica (alo- o autotetraploide) (Wu *et al.* 1992, Barcaccia *et al.* 2003). Así, se sigue un proceso de dos etapas, en donde primero se identifican los marcadores que segregan 1:1 en una población F_1 o un BC_1 , y después se realiza el análisis de ligamiento limitándose a los SDM en fase de acoplamiento con un programa diseñado para analizar diploides. Esto se logra truncando las fracciones de recombinación con valores mayores a 0,5 y ubicando el Desequilibrio de Ligamiento (LOD) en 0.

Los grupos de cromosomas homólogos se identifican buscando marcadores codominantes y finalmente se evalúa el comportamiento cromosómico dentro del grupo ya sea analizando la segregación de estos marcadores codominantes o estudiando la distribución de marcadores en fase de acoplamiento vs. fase de repulsión en cada par de grupos homólogos (Qu & Hancock 2001).

Aunque la anterior estrategia se basa en evadir las complejidades involucradas en el modelamiento de la herencia polisómica presente en especies autopoliploides, es de abundante uso. Sin embargo, hay estudios enfocados en desarrollar metodologías adecuadas para construir mapas de ligamiento con marcadores genéticos en especies autotetraploides (Luo *et al.* 2001). Dicha metodología (la usada en software como TetraploidMap) utiliza marcadores dominantes o codominantes evaluados en los parentales y su progenie y consta de los siguientes pasos:

1. Identificación de los genotipos de los parentales a partir del fenotipo (patrón de bandas) en los parentales y la progenie.
2. Prueba de segregación independiente para cada marcador.
3. Distribución de los marcadores en grupos de ligamiento utilizando análisis de agrupamiento.
4. Estimación por análisis de máxima probabilidad, la fase, frecuencia de recombinación y LOD para todos los pares de marcadores de un mismo grupo de ligamiento con un algoritmo de esperanza-maximización.
5. Ordenar los marcadores y estimar las distancias entre ellos.
6. Reconstrucción de las fases de ligamiento.

Ambas metodologías nombradas anteriormente se utilizaron en este trabajo, y se describen en detalle en la sección (3) Materiales y Métodos.

1.8.2 Construcción del mapa genético de *Brachiaria*

Varias instituciones vienen trabajando en los últimos años en la construcción del mapa genético para *Brachiaria*, y específicamente con respecto a la región asociada con la apomixis. Así, por ejemplo, Rocha *et al.* (1997) hicieron una aproximación y una comparación entre las accesiones apomícticas de *B. decumbens* y *B. brizantha* para la región de interés a partir del ligamiento entre marcadores de tipo RFLP, AFLP y SCAR. En ese mismo año, Pessino *et al.*, identificaron un grupo de ligamiento relacionado con la apomixis en *B. brizantha* en una población F_1 de 43 individuos, y cuyas observaciones apoyaron la hipótesis de un solo locus que controla la expresión de aposporía en el género. También Pessino *et al.* (1998) en una población F_1 de 43 plantas identificaron dos marcadores más cercanamente asociados con la característica, esta vez de tipo RFLP y RAPD.

En 1996, Tohme *et al.* reportaron un marcador del tipo Sequenced Characterized Amplified Region (SCAR - N14) fuertemente ligado a esta característica, y Rosero (2005) realizó un estudio de QTLs

para tolerancia a aluminio en el género *Brachiaria* en el cual, a partir de una población F₁ altamente heterocigota proveniente del cruce entre plantas parentales heterocigotas, *Brachiaria ruzizensis* (susceptible) X *Brachiaria decumbens* (tolerante a aluminio) se construyó un mapa de ligamiento basado en 149 marcadores de tipo microsatélites y AFLPs, permitiendo identificar tres QTL's putativos, asociados con la longitud de la raíz, el número de puntas de raíz y el diámetro de la raíz, que explicaron el 13,4, 4,0 y 4,0%, respectivamente de la variación fenotípica en respuesta al estrés por aluminio.

Gorrón (2009) comparó transcriptomas a través de microarreglos de pistilos sexuales y apomícticos en el complejo agámico *Brachiaria decumbens* – *B. brizantha* – *B. ruzizensis*, específicamente, cuatro accesiones sexuales y cuatro apomícticas, con diferentes características fenotípicas. El estudio reveló finalmente 28 secuencias con expresión diferencial, de las cuales sólo dos estaban sobre-expresadas en plantas apomícticas; el resto se hallaron en mayor proporción en la muestra sexual. En cuanto a las etapas a las cuales están asociadas, se halló que 21 secuencias lo estaban para la etapa I, seis para la etapa II y una sola expresada diferencialmente en ambas etapas. De las 28 secuencias, 19 no pudieron ser identificadas claramente, y a las otras nueve se les pudo asignar un papel, básica y aparentemente vinculados a procesos degenerativos de la célula madre de la megaspóra y al hecho de que la meiosis está reducida en los ovarios apomícticos. De las 19 secuencias no identificadas, a nueve fue imposible asignarles una función, y las otras diez se agruparon en genes asociados al estado poliploide de las apomícticas más no al fenómeno como tal, genes asociados a la expresión propia de endospermo pero sin un papel claro, genes algo similares a factores de transcripción, y otros. Adicionalmente, este mismo autor identificó 19 secuencias con expresión diferencial en este mismo complejo agámico, esta vez producto de la evaluación con cebadores degenerados. Finalmente, se trabajó en el presente estudio a partir de las 47 secuencias identificadas por Gorrón (2009).

1.9 ANTECEDENTES TEÓRICOS

La apomixis aparentemente ha ocurrido en diversas taxa de plantas independientemente, y por la diversidad de mecanismos y fenotipos que presenta (autónomo, pseudógamo, aposporía, diplosporía, facultativo, etc.), parece posible que esta característica no se haya producido por una mutación simple en un solo gen (Jefferson & Bicknell 1996). Sin embargo, en la mayoría de los sistemas apomícticos estudiados hasta ahora, la apomixis se hereda como un solo locus dominante (por ejemplo los casos de *Panicum maximum* (Savidan 1982), *Ranunculus auricomus* (Nogler 1984) y *Brachiaria* (Valle y Savidan 1996). Sin embargo en *Tripsacum*, aunque no se probó la existencia de varios genes que controlaran la diplosporía, sus resultados sugirieron la posibilidad de que una agrupación de loci co-adaptados y ligados estuviera asociada al control genético de esta característica (Grimanelli *et al.* 2001).

Además, debido a que la apomixis es una característica que afecta fundamentalmente el proceso meiótico, y en particular los puntos de entrada y salida de la meiosis, sería sensato hacer uso de la información ya obtenida a partir de estudios genéticos y moleculares en levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe* (Jefferson & Bicknell 1996). Estos sistemas han permitido la caracterización de numerosos genes y productos génicos asociados con ambos procesos de la meiosis. Estos incluyen mutantes que afectan la esporulación (*spo*) (Honigberg & Esposito 1994), control de la división celular (*cdc*), inducción meiótica (*ime*) (Kassir *et al.* 1988) e incluso levaduras apomícticas que producen esporas diploides verdaderas (Bilinski *et al.* 1983).

A su vez, se ha sugerido que la apomixis resulta de la regulación diferencial del programa sexual; sin embargo, los mecanismos moleculares que controlan la apomixis continúan sin descifrarse. Una hipótesis es que estos genes podrían ser variantes alélicas de genes que actúan durante el desarrollo sexual normal (Jefferson & Bicknell 1996, pero ver el caso de *Pennisetum* donde la región genómica asociada con la aposporía no tiene contraparte en las plantas sexuales, es hemigota - Roche *et al.* 2001). Estos genes pueden revelarse mediante un análisis de plantas

sexuales modelo. En *Arabidopsis*, el gametofito femenino que contiene la oosfera y las células asociadas, se desarrolla de una a cuatro megasporas formadas a través de divisiones meióticas de una célula individual dentro del óvulo, el megasporocito. Ravi *et al.* (2008), demostraron que la mutación SWI1, que se requiere para la cohesión de cromátidas hermanas y la organización del centrómero durante la meiosis, conlleva a la formación de gametos femeninos funcionales sin que haya ocurrido la meiosis.

También en *Arabidopsis* los genes FIS (Fertilization Independent Seed: *fis*, *fis2* y *fie*) actúan como reguladores de la división celular, el desarrollo del gametofito femenino y la semilla, y muestran una iniciación espontánea del endospermo y de la división del cigoto (Ravi *et al.* 2008). Sin embargo, estas estructuras abortan tempranamente en el desarrollo y no llevan a la formación de semillas viables en la mayoría de los casos.

No obstante, el estudio de la apomixis en especies poliploides con genomas grandes debe ser una estrategia obligada (Albertini *et al.* 2005), ya que la apomixis según la literatura existente no parece resultar de la falla de un gen en una sola ruta reproductiva sino de una acción epistática, o silenciadora, ejercida sobre una ruta reproductiva normal por un conjunto de genes que se heredan como una unidad en plantas poliploides (Ozias-Akins *et al.* 1998).

Así, el gen *fis2* reduce su expresión en la megaspora que da origen al saco embrionario sexual en *Hieracium*, no manifestándose en la célula madre de la megaspora, y volviendo a aparecer desde que se forma el saco embrionario sexual, e incluso en los eventos de fertilización subsiguientes. Sin embargo, en plantas apomícticas, la expresión de *fis2* se mantiene en las cuatro megasporas incluso durante su formación y degeneración, y no se observa en las células apospóricas hasta cuando empiezan a formar el saco embrionario apospórico (Tucker *et al.* 2003).

Pessino *et al.* (2001) compararon inflorescencias de plantas apomícticas y sexuales de *Paspalum notatum*, y observaron tres transcritos con alta homología entre sí, expresados con mayor

intensidad en las accesiones apomícticas, indicando que podría tratarse de productos de un solo gen. La secuencia obtenida presentó homología con un dominio de fosforilación LSP (Lisina-Serina-Prolina) asociado a quinasas *cdc2*, que están involucradas en la regulación del ciclo celular (G_2), hecho que apoyaría su posible relación con la apomixis.

Por otra parte, Albertini *et al.* (2005) aislaron y caracterizaron a partir de la amplificación de ADNc en *Poa pratensis* dos genes PpSERK (Somatic Embryogenesis Receptor-like Kinase) y APOSTART que se diferenciaron en su expresión entre genotipos apomícticos y sexuales. Sus secuencias y otras relacionadas se han registrado con un papel en la transducción de las cascadas de señalización celular requeridas durante la esporogénesis, gametogénesis y embriogénesis en plantas. Ellos propusieron que PpSERK es el encargado de provocar que las células nucelares de genotipo apomíctico inicien el desarrollo del saco embrionario y, que puedan a su vez redirigir productos génicos de señalización hacia otros compartimientos diferentes a los típicos. El gen APOSTART, por su parte, está involucrado en la esporogénesis, ya que su expresión es muy baja o no se presenta en genotipos apomícticos.

Finalmente, Risso-Pascotto *et al.* (2006) detectaron algunas anomalías meióticas relacionadas con la poliploidía en *B. brizantha*, incluidas la migración precoz de cromosomas y retardo en la generación de micronúcleos; esto se esperaba en la accesión utilizada considerando que se trataba de un hexaploide. En muchas otras accesiones de *B. brizantha* analizadas previamente se registraron diferentes frecuencias de anomalías meióticas relacionadas con la poliploidía (Mendes-Bonato *et al.* 2001, 2006).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

- Ubicar en el mapa genético de *Brachiaria decumbens* Stapf. genes relacionados con la meiosis.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- 2.2.1 Diseñar cebadores para amplificar 47 Secuencias Relacionadas con la Meiosis (SRM), en *Brachiaria decumbens* a partir de los clones correspondientes provenientes de una librería de ADNc.
- 2.2.2 Determinar cuáles de las SRM son polimórficas entre *Brachiaria decumbens* y *Brachiaria ruzizensis*, por medio de la amplificación y secuenciación las SRM en *Brachiaria decumbens* y en *Brachiaria ruzizensis*.
- 2.2.3 Diseñar marcadores moleculares para cada secuencia dependiendo del tipo de polimorfismo encontrado entre *Brachiaria decumbens* y *Brachiaria ruzizensis*.
- 2.2.4 Evaluar los marcadores moleculares en una población proveniente del cruce entre *Brachiaria decumbens* y *Brachiaria ruzizensis*.
- 2.2.5 Ubicar las SRM en los mapas moleculares propuestos para *Brachiaria decumbens* en conjunto con los marcadores moleculares evaluados previamente para la población híbrida bajo estudio según la estrategia de pseudo cruces de prueba (Grattapaglia & Sederoff 1994).
- 2.2.6 Determinar el comportamiento del apareamiento cromosómico de acuerdo al Prueba de Mather (1957), realizando una aproximación hacia la comprensión del origen poliploide de *Brachiaria decumbens*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL

El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio de Genética Molecular del Proyecto de Agrobiodiversidad y Biotecnología del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), ubicado en el municipio de Palmira, departamento del Valle del Cauca, situado a 3°16' latitud norte, 76°32' longitud oeste y altitud de 965 msnm. Se usó las accesión CIAT 606 (*B. decumbens* cv. Basilisk), un clon derivado del material tetraploide desarrollado por Swenne *et al.* (1981) de *B. ruziziensis* (44-02), y la población híbrida F₁ segregante de 176 individuos resultante del cruce entre ellas.

Para el desarrollo de esta población se empleó como parental masculino a *Brachiaria decumbens* (CIAT 606), genotipo de reproducción apomíctica, y como parental femenino a *Brachiaria ruziziensis* (CIAT 44-02), accesión caracterizada por presentar reproducción sexual y haber sido tetraploidizada por Swenne *et al.* (1981) mediante inducción por tratamiento con colchicina. La población fue desarrollada por el programa de mejoramiento genético de forrajes tropicales de CIAT, Cali, Colombia.

3.2 METODOLOGÍA

El ADN genómico de cada genotipo de la población F₁ y de los parentales 606 y 44-02 fue extraído a partir de hojas jóvenes colectadas de invernadero en bolsas de papel y siguiendo el protocolo modificado de Dellaporta *et al.* (1983) empleado en la Unidad de Biotecnología para extracción de ADN de *Brachiaria* (Anexo A). La recolección y extracción de ADN fue realizada por personal de CIAT perteneciente al proyecto de Agrobiodiversidad y Biotecnología, y amablemente proveídos por ellos (Jaime Vargas y Harold Suárez – Unidad de Biotecnología, Proyecto Agrobiodiversidad).

El ADN obtenido para todos los individuos fue diluido a 4 ng/μL en todos los casos, dependiendo de la concentración inicial de las muestras, se sirvieron 10 μL en gel de agarosa 0,8%, TBE 0,5X

(Anexo B) y corridos en cámara de Electroforesis Horizontal (Gibco BRL, Catálogo No. 1069BD) a 80 V/cm² durante 45 minutos. El gel fue teñido con Bromuro de Etidio (EtBr) y visualizado mediante Luz Ultra Violeta con el transiluminador FOTO UV®26 (Modelo 30-3035, FOTODYNE INCORPORATED) (Figura 1).

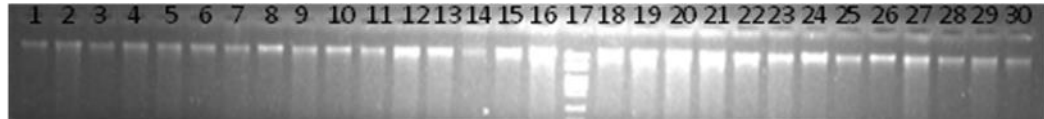


Figura 1. Diluciones de ADN a 4 ng/ μ L (en gel 40 ng/ μ L) de algunos individuos de la población híbrida CIAT 606 X CIAT 44-02 comparadas con patrones de tamaño molecular de ADN 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) mostrados en el pozo 17.

3.2.1 Amplificación de las Secuencias Relacionadas con la Meiosis (SRM)

Con el propósito de caracterizar las 47 Secuencias Relacionadas con la Meiosis obtenidas por Gorrón (2009) a partir de clones provenientes de librerías de cDNA y fruto de cebadores degenerados (Anexo C), se diseñaron marcadores específicos utilizando el programa Primer3 (en línea, <https://primer3.svn.sourceforge.net>) diseñado para seleccionar cebadores a partir de secuencias de ADN. En este caso, los marcadores diseñados reciben el nombre de Sequence Tagged Sites (STSs), ya que fueron aislados a partir de secuencias cortas conocidas de ADNc expresadas diferencialmente, durante el desarrollo reproductivo, entre los parentales *B. decumbens* y *B. ruzizensis*.

Las secuencias fueron insertadas al programa en formato FASTA y los parámetros utilizados fueron: Tamaño de los cebadores entre 18 – 25 pb con una longitud óptima de 21 pb, temperatura de anillamiento en un rango de 50 a 65° C con un óptimo de 55° C ó 60° C según la disponibilidad de opciones de cebadores para cada caso; contenido de Guanina-Citocina (GC) en un porcentaje admisible de 45 a 60% y con un óptimo de 50-55%. Además, se tuvo en cuenta que la

autocomplementariedad no excediera 8,0 y la autocomplementariedad en el extremo 3' no superara 3,0. Para el resto de parámetros se utilizaron aquellos que ofrece el programa por defecto.

En ocasiones la ubicación de los marcadores en la secuencia se seleccionó arbitrariamente, teniendo en cuenta los criterios descritos anteriormente para lograr una longitud del fragmento esperado mayor que la generada por las alternativas que mostraba el programa. En todos los casos, se eligió la mejor combinación de cebadores según los criterios mencionados para cada una de las 47 secuencias disponibles. Así, la evaluación de los STS en la primera etapa estuvo dividida en tres secciones:

- a. Estandarización de las condiciones de PCR y perfiles de temperatura en parentales para cada marcador diseñado.
- b. Evaluación en la progenie de marcadores que resultaron polimórficos entre los parentales.
- c. Lectura y registro de los datos de la población segregante.

3.2.1.1 Estandarización de las condiciones de PCR en parentales

Los Sitios Etiquetados de Secuencia (STS) evaluados en este estudio se presentan en la Cuadro 1. Éstos fueron amplificados para ambos parentales con el fin de ajustar las condiciones de la reacción para ser usadas en las reacciones de PCR subsecuentes en la población.

Cuadro 1. STS evaluados en los parentales *B. decumbens* y *B. ruzizensis*.

Referencia	Sentido	Nombre	Secuencia del Cebador
Secuencia 1	Forward	IISXL1	5'-CCCTACGATTCGAGGATCAA-3'
	Reverse		5'-GGAATTCGATTTGCACCCTA-3'
Secuencia 2	Forward	ISXL2	5'-TCAGTCGACGGTACCATACAT-3'
	Reverse		5'-GCAGTCAGCTTATGTTTCAGA-3'
Secuencia 3	Forward	IISXL3	5'-TATGAGCCAACCTGGGCTTCC-3'
	Reverse		5'-GCTGAAGGATGCTGGGATTAC-3'
Secuencia 4	Forward	IISXL4	5'-GATCCTTCGATGTCGGCTCT-3'
	Reverse		5'-GGAGTCGGCCACTGTCTTTC-3'

Secuencia 5	Forward	IAPO5	5'-CATGTTTCTACCTAGGCATCCA-3'
	Reverse		5'-CGGGAATTCGATTCATGTTT-3'
Secuencia 6	Forward	ISEC6	5'-GCCGCGCACATATCACTAGC-3'
	Reverse		5'-ATGGCAGTGC AAGCGATGG-3'
Secuencia 7	Forward	IISXL7	5'-ATCCTCTTGTCCTCCGAGATT-3'
	Reverse		5'-CGACTCACTATAGGGCGAATTG-3'
Secuencia 8	Forward	ISXL8	5'-CCGGGCAGGTACATAGGA-3'
	Reverse		5'-CCGCGGAATTCGATTAG-3'
Secuencia 9	Forward	ISXL9	5'-GGATCTTCGGAGTTGAAGC-3'
	Reverse		5'-GCGGAAATTCGATTCATGTT-3'
Secuencia 10	Forward	ISXL10	5'-TTGTCTGTTGCTATCAATG-3'
	Reverse		5'-ATTTCTCTGGACACGACAAG-3'
Secuencia 11	Forward	IISXL11	5'-ATCGGATCCTTCATTGGATG-3'
	Reverse		5'-GGGATCACCATCACTCCAG-3'
Secuencia 12	Forward	ISXL12	5'-GTGAAGGGTTCGAGTTGGAG-3'
	Reverse		5'-TCGTAGCCTAGGGATCAACG-3'
Secuencia 13	Forward	ISXL13	5'-GGGCAGGTACGAGATTACCA-3'
	Reverse		5'-GGAATTCGATTAGCGTGGTC-3'
Secuencia 14	Forward	ISXL14	5'-AATAATCAAGGGTGCATGCTG-3'
	Reverse		5'-GGGGGATATCAAATGGTGAA-3'
Secuencia 15	Forward	ISXL15	5'-TTCGTAGCCTAGGGATCAGC-3'
	Reverse		5'-GGATCTCGCAGAAGCAGAAG-3'
Secuencia 16	Forward	IIISXL16	5'-TCGATGTCGGCTCTTCTAT-3'
	Reverse		5'-CGCGGGATTCTGACTTAGAG-3'
Secuencia 17	Forward	ISXL17	5'-CCCTTTGCAACCTTCCATT-3'
	Reverse		5'-CCCAACAACCTGACTCGTT-3'
Secuencia 18	Forward	ISXL18	5'-TCGTAGCCTAGGGATCAACG-3'
	Reverse		5'-CGGGAATTCGATTCATGTTT-3'
Secuencia 19	Forward	ISXL19	5'-CGTTCTCGAAGCCGAAGAAGT-3'
	Reverse		5'-CCGCGGAATTCGATTCAT-3'
Secuencia 20	Forward	ISXL20	5'-CCAGCTTGAATGTGCTTGG-3'
	Reverse		5'-CGACTCACTATAGGGCGAATTG-3'
Secuencia 21	Forward	IISXL21	5'-TCCAGCTATCCTGAGGGAAA-3'
	Reverse		5'-ATCGCACCTCCACCCTTAG-3'
Secuencia 22	Forward	ISXL22	5'-GTTTCGTAGCCTAGGGATCA-3'
	Reverse		5'-GCCGCAGGAATTCGATTAT-3'
Secuencia 23	Forward	ISXL23	5'-ACCATTGAGAATGCTTTGC-3'
	Reverse		5'-GCCCGTGAATTCGATTAT-3'
Secuencia 24	Forward	ISXL24	5'-CGTAGCCTAGGGATCCAGTG-3'
	Reverse		5'-GCCGCCACAGTACATTAC-3'
Secuencia 25	Forward	ISXL25	5'-GTTTCGTAGCCTAGGGATCA-3'
	Reverse		5'-CGCGGAATTCGATTCAT-3'
Secuencia 26	Forward	ISXL26	5'-GCCCTCCATGTTCCAGTG-3'
	Reverse		5'-CGACTCACTATAGGGCGAATTG-3'
Secuencia 27	Forward	IAPO27	5'-CTAGGGATCGGTGCCAGAAC-3'
	Reverse		5'-AACCACCTGCCAGTTCTAA-3'
Secuencia 28	Forward	ISXL28	5'-ACCTACGATTCGAGGATCA-3'
	Reverse		5'-CAGTTCCCGTCCCAAAT-3'
Secuencia 29	Forward	ISXL29	5'-TGCCCCGACAAAATAAATTC-3'
	Reverse		5'-AGAGGTGAGTGAACGAGAGCA-3'
Secuencia 30	Forward	ab000809.1	5'-CTTTGGTTCGAGCACC AATATG-3'
	Reverse		5'-TCGACACATGTCAATGC GTA-3'

Secuencia 31	Forward	<i>af475105.1</i>	5'-TGATTGGGGTGTCTTGTCT-3'
	Reverse		5'-TGGGAGGTAGCTTCCCATT-3'
Secuencia 32	Forward	<i>aj786393.1s</i>	5'-CGGAGAAGCTGATCAAGGAT-3'
	Reverse		5'-ACGACTCACTATAGGGCGAAT-3'
Secuencia 33	Forward	<i>aj786393.1p</i>	5'-GGCAATTTGCGAAAGGAAC-3'
	Reverse		5'-GACTCACTATAGGGCGAATTG-3'
Secuencia 34	Forward	<i>aj810708.1s</i>	5'-ATGCCATCTCATCAGCAA-3'
	Reverse		5'-TCGACTCACTATAGGGCGAAT-3'
Secuencia 35	Forward	<i>aj810709.1</i>	5'-GGCATGTGCTGCTTCTTCTA-3'
	Reverse		5'-GAACATAGTCCCGACTCTTTGG-3'
Secuencia 36	Forward	<i>aj841698.1</i>	5'-GCTCAATTGGCTTATTATGAAGG-3'
	Reverse		5'-CGGGAATTCGATTAGGGTTT-3'
Secuencia 37	Forward	<i>ef517497.1</i>	5'-GAGGGAGTGGAGATAAACGACA-3'
	Reverse		5'-AACAGAGTGGACCTGCAAGC-3'
Secuencia 38	Forward	<i>ef517498.1s</i>	5'-GAGTATGAGCCAACTGGGTCT-3'
	Reverse		5'-GGAATTCGATTGACGTGAAGA-3'
Secuencia 39	Forward	<i>ef517498.1p</i>	5'-AAGCTGAGTGGAAACACAAAGA-3'
	Reverse		5'-CGGGAATTCGATTGATGTG-3'
Secuencia 40	Forward	<i>ef530198.1</i>	5'-AAGCTGAGTGGAGACACAAAGA-3'
	Reverse		5'-CGGGAATTCGATTGATGTG-3'
Secuencia 41	Forward	<i>pcu40219</i>	5'-CAGAAACCGTCCGGCTATTA-3'
	Reverse		5'-AAGGAGGTCCAGATCGATGA-3'
Secuencia 42	Forward	<i>penpsb31ab</i>	5'-CGGGAATTCGATTGGAAGTA-3'
	Reverse		5'-ACTGGGGCACAAGCCTCAAG-3'
Secuencia 43	Forward	<i>penpsbcas</i>	5'-CTGAACATTCCTCCGAAAA-3'
	Reverse		5'-ACACTCACTATAGGGCGAATTG-3'
Secuencia 44	Forward	<i>penpsbcap</i>	5'-CAGAAACCGTCCGGCTATTA-3'
	Reverse		5'-AACGACTCACTATAGGGCGAAT-3'
Secuencia 45	Forward	<i>u65082</i>	5'-GCCCATCTCATCAGCAAGAG-3'
	Reverse		5'-CGACTCACTATAGGGCGAATTG-3'
Secuencia 46	Forward	<i>u65384</i>	5'-TTTCTCGACACATGCAATGC-3'
	Reverse		5'-CTTCGGTCCGAGACCAATATG-3'
Secuencia 47	Forward	<i>yscspo13</i>	5'-GTGCCTGCCGGAGAACTAC-3'
	Reverse		5'-GGACGTGGAGGGAGACGTA-3'

Para la amplificación de dichos marcadores, se realizaron pruebas de estandarización en los parentales *B. decumbens* y *B. ruzizensis*, tomando 20ng de ADN genómico de cada uno, deoxirribonucleótidos (dNTP's) a una concentración final de 0,2 mM cada uno; Cloruro de Magnesio (MgCl₂) a una concentración final de 1,5mM en la mayoría de los casos, sin embargo en los marcadores amplificados con bajo Cloruro de Magnesio (Cuadro 2) se usó una concentración final de 1,2mM (ver Anexo D). Para los productos de difícil amplificación, se adicionó Dimetilsulfóxido (DMSO, CH₃SOCH₃) a una concentración final en la reacción de 2% (Cuadro 2).

El perfil térmico utilizado en estas reacciones se describe a continuación, usando termocicladores PTC-100™ Programmable Thermal Controller (MJ Research, Inc.) y MBS Satellite 0.2G Thermal Cycler (Thermo Electron Corporation):

1. Denaturación inicial a 95º C durante 4 minutos.
2. Denaturación 95º C por 2 minutos.
3. Temperatura de anillamiento (T_m , variable de 48– 58º C, ver Cuadro 3).
4. Extensión a 72º C durante 1 minuto 30 segundos.
5. Denaturación (ciclo) 95º C durante 30 segundos.
6. Temperatura de anillamiento (T_m , variable de 48– 58º C, ver Cuadro 2).
7. Extensión a 72º C durante 1 minuto 30 segundos.
8. Ir a paso 5, 35 veces más.
9. Extensión final a 72º C durante 10 minutos.
10. Conservación de las muestras a 10º C.
11. Fin.

El producto de estas reacciones se observó, para fragmentos mayores de 250 pb, por medio de electroforesis en geles de agarosa al 2%, teñidos con SYBR® Safe DNA Gel Stain (10000X concentrado en DMSO, Invitrogen™) y en transiluminador Safe Imager™ (Invitrogen). La visualización de fragmentos pequeños amplificados con las condiciones ya descritas se llevó a cabo en geles de Poliacrilamida al 6% en condiciones denaturantes usando concentración final de Úrea 5M, los cuales se realizaron en cámaras Thermo Scientific (Modelo S3S, Owl Separation Systems, Inc.) (Anexos E y F) y se corrieron con fuente de poder Fisher Scientific FB3000 a 120 V/cm². Los geles de acrilamida fueron teñidos con Nitrato de Plata (AgNO₃) siguiendo las especificaciones de PROMEGA y con algunas modificaciones propias del proyecto de Agrobiodiversidad y Biotecnología de CIAT (Anexos E, F y G). Previo a la corrida, las muestras se prepararon con Stop Solution (Anexo G) que contiene Formamida (denaturante) y precalentadas a 95º C durante 3 minutos.

3.2.1.2 Evaluación en la progenie de marcadores polimórficos entre parentales

Una vez se establecieron las condiciones de las reacciones de PCR para cada par de cebadores, se seleccionaron los cebadores STS polimórficos entre los parentales (por diferencia en el tamaño de los alelos o presencia/ausencia de bandas) para su evaluación en la población híbrida; se estimó en cada caso el tamaño de los alelos observados (en pares de bases –pb) por comparación con el marcador de tamaño 10 pb DNA Ladder (Invitrogen), y se amplificaron los individuos de la población según lo establecido en los parentales.

Las PCR se realizaron en placas de 384 pozos, agrupando para cada una dos marcadores con la misma temperatura de anillamiento, ya que se puede añadir dos veces la población en placas con esta capacidad. Al igual que en los parentales, los fragmentos pequeños se corrieron en geles de acrilamida con las mismas especificaciones del apartado anterior. Sin embargo, para fragmentos de más de 300 pb se corrieron los productos de PCR completos en geles de agarosa al 1,5% en cámaras APELEX® Super Maxigel 260000, donde se pueden ubicar tres marcadores completos evaluados en la población por gel servido. Estos últimos se tiñeron con Bromuro de Etidio (EtBr) y se visualizaron con luz ultravioleta.

3.2.1.3 Lectura y registro de los datos de la población segregante

La información generada por marcadores de cada locus STS fue tomada para cada alelo (banda) como presencia (1) y ausencia (0), tratando a cada alelo como un marcador diferente para la construcción de la matriz y la posterior construcción del mapa de ligamiento según la estrategia comúnmente empleada para mapeo de especies poliploides (Wu *et al.* 1992). La lectura de los marcadores en la población se realizó en una matriz en hojas de cálculo de EXCEL, ubicando los individuos en columnas y marcadores en filas. Los datos generados por los marcadores SNP se

añadieron tomando cada alelo por separado, es decir, cada secuencia con una mutación puntual dada se codificó como presencia (1) y a ausencia de esta base en la secuencia como (0).

3.2.2 Secuenciación de las bandas monomórficas resultantes

Seguido a la identificación de polimorfismos en parentales, y paralelo al proceso de evaluación de marcadores en la progenie, se tomaron los productos monomórficos de acuerdo al criterio de tamaño y se secuenciaron para identificar polimorfismos pequeños que pueden dar origen a marcadores de ADN de secuencia como lo son los polimorfismos de una sola base (SNPs) e inserciones y deleciones de una o pocas bases (InDels), que permitieran discernir entre los parentales.

Las reacciones de un mismo par de cebadores y que provenían del mismo genotipo (ADN), se limpiaron mediante el protocolo para limpieza de producto de PCR basado en PEG (Polietilén Glicol, teniendo en cuenta que el producto consistiera en una sola banda) (Anexo H). 2 μ L de los productos limpios se visualizaron en gel de agarosa 2% para asegurar que no se hubiera perdido el producto de PCR en la limpieza y para cuantificar los mismos con el fin de determinar la cantidad de producto necesario para las reacciones de secuencia (Figura 7).

Las reacciones de secuenciación se realizaron a partir de aproximadamente 3–5 μ L del producto de PCR limpio, usando el kit Big Dye (PE Applied Biosystem, Warrington, UK) 2 μ L del mix, 2 μ L del Buffer de Secuencia (Kit) y un cebador específico de la secuencia en cada caso (sentido o antisentido para cada reacción) a una concentración final de 3,2 μ mol. El perfil térmico de la reacción de secuencia comprende 32 ciclos de denaturación de 30 segundos cada uno (95 $^{\circ}$ C), anillamiento de 30 segundos, tiempo que varía con la temperatura de anillamiento de cada cebador y una extensión de 60 $^{\circ}$ C de 4 minutos cada una. Las reacciones se mantuvieron a una temperatura final de 4 $^{\circ}$ C. Posteriormente, se limpiaron las reacciones de secuencia para eliminar el exceso de cebadores y dNTP's según el protocolo descrito en el anexo I.

Las reacciones de secuencia limpias se corrieron en el secuenciador ABI Prism 377 (PE Applied Biosystem) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los cebadores usados en cada caso fueron los amplificados inicialmente en cada marcador, se realizaron reacciones para cada alelo en ambas direcciones (sentido y anti-sentido) para reconfirmar las secuencias una vez obtenidas. Las secuencias resultantes se editaron con el programa Sequencher versión 4.6.

3.2.3. Detección y Estandarización de Polimorfismos SNP

Seguido a la detección de los marcadores SNPs por comparación de las secuencias (basadas en las lecturas sentido y antisentido para cada parental) entre los parentales *B. ruziziensis* (Clon 44-02) y *B. decumbens* (CIAT 606) para cada fragmento STS monomórfico respecto al criterio de tamaño, se realizó la estandarización de los SNPs encontrados, ajustando las condiciones experimentales de la metodología de extensión de una base (Chen *et al.* 2000) de los genotipos mencionados.

3.2.3.1 Metodología de Extensión de una Base

La detección de los SNPs se realizó mediante la metodología de extensión de una base (SBE, *Single Base Extension*) descrita por Chen *et al.* (2000) con las modificaciones de Cregan (USDA Beltsville Agricultural Research Center) (<http://bldg6.arsusda.gov/~pooley/soy/cregan/snp.html>) y de Gaitán – Solís *et al.* (2004).

La metodología consiste en las siguientes etapas:

- a. Amplificación mediante PCR de los fragmentos de ADN que contienen el (los) SNP(s).

Esta amplificación se llevó a cabo siguiendo el perfil térmico y las condiciones de PCR descritas en el apartado 3.2.2.1. Para todos los marcadores, las condiciones de amplificación se ajustaron hasta producir fragmentos únicos e intensos de manera que el 10% del volumen (1µl) se visualizara

claramente en un gel de agarosa al 1,5% en 0,5X TBE, teñido con bromuro de etidio (0,2mg/ml). Esto correspondió a una cantidad de producto de PCR que osciló entre 80 y 120 ng/ μ l.

- b. Remoción enzimática del exceso de dNTPs y cebadores.
- c. Reacción de extensión de una base (SBE o minisequenciación).
- d. Hibridación a microesferas.
- e. Detección y cuantificación de la reacción mediante un citómetro de flujo (Luminex¹⁰⁰).
- f. Asignación de alelos.

La metodología utiliza la tecnología xMAP desarrollada por la compañía Luminex (Austin, TX, USA) en la cual, microesferas de 5,6 μ m de diámetro acopladas a oligonucleótidos, pueden ser reconocidas por un citómetro gracias a un código de color (dado por una mezcla de fluoroforos rojo e infrarrojos a una razón específica) específico para cada una de las 100 clases de microesferas disponibles. La unicidad de su código hace posible que se pueda identificar cada clase de microesfera cuando están mezcladas en una reacción. Cada clase de microesfera es acoplada en su extremo 5' a un oligonucleótido de captura (ZIPcode) de 20 bases de longitud (Chen *et.al.* 2000).

El cebador usado para la reacción de extensión (SBE) está formado por una secuencia antisentido complementaria al ZIPcode de la microesfera (anti-ZIPcode), unida al extremo 5' de una secuencia de 20-26 bases complementarias al ADN molde. La condición es que el cebador sea inmediatamente anterior al SNP y en consecuencia son los alelos de este sitio polimórfico quienes son extendidos. Se realiza una reacción de extensión por separado para cada alelo del SNP a identificar, usando el correspondiente ddNTP biotinilado.

Luego, se realiza la hibridación entre los oligos extendidos (una base) y las correspondientes microesferas acopladas. El análisis de varios alelos SNPs en la misma reacción de hibridación (multiplex) puede lograrse siempre y cuando los cebadores de extensión respondan a secuencias de captura (ZIPcode) diferentes y en consecuencia a microesferas distintas.

3.2.3.2. Reacción de Extensión de una Base (SBE)

Como se dijo anteriormente, cada alelo SNP es extendido por separado en una reacción de minisequenciación. Teniendo en cuenta esto, los SNPs se agruparon según la naturaleza del polimorfismo, para realizar el menor número posible de reacciones de extensión (dos), siempre y cuando cumplieran con la condición de ser detectados por diferentes microsferas. De esta manera también se limpió el menor volumen posible de producto de PCR. Para extender un alelo (base) el volumen utilizado fue de 0.5µl, por lo cual se reunió 1µl de PCR por cada SNP.

Para degradar el exceso de dNTPs y cebador, se usaron 2 U (unidades de enzima) tanto de fosfatasa alcalina como de Exonucleasa I por cada 5µl de mezcla de PCRs. El conjunto se incubó a 37°C durante 1 hora y posteriormente se desactivaron las enzimas con 15 minutos de calentamiento a 75°C. Las reacciones de extensión se hicieron a un volumen final de 7.5µl para 3-4 SNPs, dependiendo del tipo de cambio a evaluar.

Las condiciones de las reacciones de extensión fueron las siguientes:

- Buffer PCR (Promega): 10mM Tris-HCl pH9, 50mM KCl, 0.1% Triton X-100
- Cloruro de magnesio (Promega) 3mM
- Biotin ddNTPs 0.4mM
- Mezcla de 3 ddNTPs 0.4mM cada uno
- Cebadores SBE 0.12µM cada uno
- Thermo sequenase™ DNA Polymerase (Amersham) 0.064U por alelo a extender.

Se usó el siguiente perfil de temperaturas (Programa SBE96):

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
1	90	2 min
2	90	30 segs

3	50	20 segs
4	68	15 segs
5	Ir a al paso 2, 79 veces	
6	4	indefinido

Posterior a la reacción de minisequenciación, se realizó un lavado con etanol al 75%, agregando 40 μ L a cada muestra, seguido de una incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugaron a 3500 rpm por 30 minutos, se dejaron secar y se almacenaron a 4 °C en oscuridad.

3.2.3.3 Hibridación a microesferas, detección y cuantificación de las reacciones de extensión

Los productos extendidos por minisequenciación se hibridaron a las microesferas en una solución de 1X TMAC. Las microesferas, previamente acopladas al correspondiente ZIPcode, se dispersaron mediante agitación con vortex (30segs) y ultrasonido (20-30 segs) y se mezclaron en la solución de hibridación a razón de 50 μ l de TMAC y 2000 microesferas por muestra. Luego de mezclar, el conjunto se incubó a 94°C por 2 minutos seguido de 54°C por 45 minutos. Posteriormente se agregó el conjugado streptavidina-ficoeritrina (SAPE) a una concentración final de 0.2 μ g/ μ l, en 10 μ l de 1X TMAC, y se continuó la incubación a 54°C por 15 minutos adicionales.

Cada microesfera fue detectada por el citómetro de flujo Luminex¹⁰⁰ gracias a su código de color único. Simultáneamente, se cuantificó la señal fluorescente emitida en la superficie de la microesfera por los conjugados SAPE - cebador extendido. La señal de 100 lecturas por microesfera, fue convertida a un valor de intensidad de fluorescencia media que se utilizó para el análisis de asignación de alelos. La asignación de alelos para cada genotipo se realizó mediante el programa Masterplex GT (MiraiBio, Inc), tomando como referencia para definir los umbrales de lectura, los individuos control negativo. La Figura 2 presenta un resumen de la reacción de extensión.

Finalmente, los datos de estos marcadores SNP se adicionaron a la matriz de datos como se explica en el apartado 3.2.1.3.

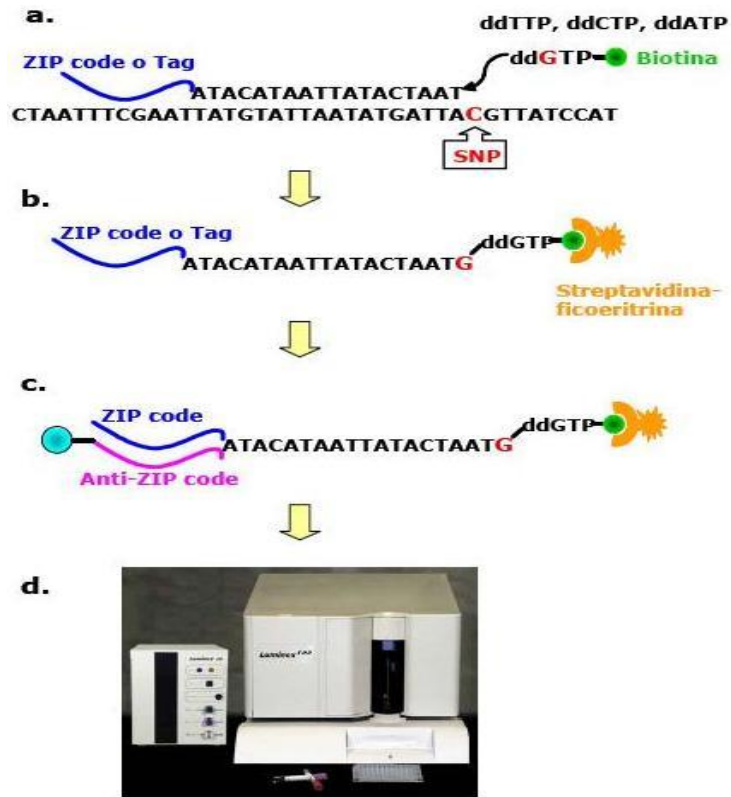


Figura 2. Reacción de extensión de un nucleótido y visualización de alelos SNPs. a) Incorporación de la base polimórfica (SNP) marcada con biotina en el cebador de extensión. b) Adición del conjugado estreptavidina-ficoeritrina. c) Hibridación del cebador extendido con la microesfera. d) Lectura de señales fluorescentes en el citómetro Lumines¹⁰⁰ (Tomado de Quintero-Valencia 2007).

3.2.4. Análisis de Segregación

Para analizar los datos obtenidos a partir de los marcadores de tipo STS, SNP e InDels, estos fueron adicionados a la matriz general de datos de mapeo en *Bracharia* del Laboratorio de Genética Molecular de la Unidad de Biotecnología, cuya información fue amablemente provista por los asistentes de investigación a cargo de este proyecto macro, en el que uno de sus objetivos es la evaluación y desarrollo de marcadores basados en PCR tipo marcadores microsatélites (SSR), AFLPs y ESTs en la misma población objeto del presente estudio.

Debido a que la especie bajo estudio (*Brachiaria decumbens*) es una especie tetraploide, con constitución genómica desconocida (alotetraploide, autotetraploide) se empleó para el análisis de segregación la metodología propuesta por Wu *et al.* (1992), utilizada para marcadores de dosis sencilla (SDM) en la generación de mapas de ligamiento de especies poliploides. Para esto, los marcadores segregantes se codificaron para presencia (1) o ausencia (0) para cada banda amplificada en todos los tipos de marcadores, tanto dominantes como codominantes. El origen parental del marcador también se registró, obteniendo así dos juegos de datos por separado, uno para cada parental.

Para identificar los SDM, se siguió la estrategia de pseudo cruce de prueba (*pseudotest-cross*, Grattapaglia & Sederoff 1994), en la cual se determina *a posteriori* cuáles marcadores son SDM. Se espera que los SDM segreguen en una proporción de presencia/ausencia 1:1. Así, se aceptaron como SDM sólo los marcadores cuya proporción de segregación observada no se desvió significativamente de lo esperado en la población F_1 , lo cual se determinó mediante una prueba de hipótesis X^2 con un nivel de significancia del 5%.

En la otra metodología de análisis de ligamiento se utilizan marcadores en todas las proporciones esperadas para un autotetraploide que sólo forma bivalentes, por lo cual también se identificaron los marcadores moleculares que presentaran una proporción de segregación presencia:ausencia de 3:1 ó 5:1 si están presentes en dosis doble (dúplex o DDM – *Double Dose Markers*) para especies alotetraploides o autotetraploides, respectivamente.

El genotipo (codificado presencia/ausencia) para los marcadores comunes entre los mapas generados por Mapmaker y TetraploidMap, es decir, los marcadores de copia sencilla, se compararon, con el programa SAS (Statistical Analysis Systems) OnlineDoc® 9.1.3, mediante pruebas de independencia de X^2 contra el fenotipo de 88 plantas de las cuales se conoce a partir de estudios citológicos de sus sacos embrionarios el tipo de reproducción (apomíctica vs sexual) en la población híbrida objeto de estudio.

3.2.5. Análisis de ligamiento de los marcadores

Mapmaker

Para el análisis de ligamiento de la especie *Brachiaria decumbens*, se utilizó bajo el supuesto de alotetraploidía el programa MAPMAKER/EXP v 3.0b para PC (Lander *et al.* 1987; http://www.genome.wi.mit.edu/genome_software) y se calcularon las distancias y el orden de los marcadores en el mapa en centiMorgans (cM) según la función de Kosambi, la cual corrige la distancia del mapa calculada en porcentaje de recombinación, pues básicamente la distancia del mapa es la proporción entre el número de individuos observados con genotipos recombinantes sobre el número total de individuos evaluados. Esta función es ampliamente utilizada para calcular las distancias de mapas debido a que acepta cierto grado de interferencia, es decir que la ocurrencia de un evento de entrecruzamiento es afectada por la ocurrencia de otro evento en una región cercana. Asimismo, se usó el programa MapDisto con el fin de generar la interfaz gráfica de cada grupo de ligamiento generado (Lorieux 2007).

Para la construcción del mapa de ligamiento del parental *B. decumbens*, se empleó la información molecular de la progenie de la población, teniendo en cuenta sólo marcadores de dosis sencilla (SDRF, de la sigla en inglés Single Dose Restriction Fragments); así, en el caso de ser *B. decumbens* una especie autotetraploide, los genotipos de los marcadores para los loci de los parentales empleados tendrán una configuración simplex (Aaaa) X nuliplex (aaaa), mientras que de ser un alotetraploide estos podrían ser heterocigoto (Aa) X homocigoto (aa), ya que se asume comportamiento de diplode. Los datos fueron tratados como una población de retrocruce (Backcross – BC1 –), siguiendo la estrategia de mapeo para un pseudo cruce de prueba (*pseudotestcross*) empleada por Grattapaglia & Sederoff (1994) y más recientemente por Barcaccia *et al.* (2003).

Para la detección de grupos de ligamiento, se aplicó la función “group” con un puntaje de LOD de 8,0 durante el procedimiento de mapeo. El LOD (sigla que proviene de su nombre en inglés, “Logarithm (base 10) of odds”) es una medida empleada para el análisis de ligamiento, que se

define como el Logaritmo Decimal de la razón entre: la probabilidad de que los datos obtenidos sean el resultado de un ligamiento con frecuencia de recombinación dada (r ; en este estudio se utilizó $r=0,3$) y la probabilidad de que estos datos sean el resultado de un no ligamiento (es decir $r=0,5$). Un LOD de 8.0 significa que es 100 000 000 (10^8) veces más factible que los datos observados hayan sido obtenidos por un ligamiento que por eventos aleatorios.

El orden de los marcadores dentro de los grupos de ligamiento se estableció empleando los comandos “*compare*”, “*three point*”, “*compare*”, “*three point*” y “*try*”, y confirmado mediante el comando “*ripple*”, que corrobora el orden al examinar la mejor posición de los marcadores dentro de una secuencia dada tomando una ventana de análisis de cuatro, cinco o más marcadores, con lo cual realiza numerosas comparaciones hasta cubrir la totalidad de la secuencia. Para cada nuevo análisis la ventana establecida va corriendo la secuencia original (orden que quiere ser confirmado) moviéndose un marcador a la vez hasta el final de la secuencia y reportando el mejor orden para cada subgrupo analizado, tras efectuar cada análisis.

También se emplearon funciones de detección de errores de MAPMAKER como “*triple error detection*” y “*error detection*” con el fin de comprobar potenciales errores en la genotipificación en la estructura de los marcadores. A su vez, para detectar de ligamiento de los marcadores en fase de acoplamiento y repulsión, el conjunto de datos se duplicó, invirtió y recodificó asignando (0) en lugar de (1) y viceversa, resultando esto en una matriz inversa (espejo). A estos nuevos marcadores invertidos se les codificó anteponiendo la letra r , para distinguirse de los originales no invertidos.

TetraploidMap

Se usaron todos los marcadores, es decir loci en configuraciones: simplex-nulplex [(Aaaa) X (aaaa)], dúplex-simplex [(AAaa) X (Aaaa)] en marcadores tipo AFLPs y SSRs, excepto los

distorsionados dúplex-simplex para construir los mapas de ambas especies, es decir aquellos que presentaron una segregación diferente de 11:1 y las demás ya mencionadas esperadas para las especies *B. ruzizensis*, de constitución genómica autotetraploide inducida y conocida, y *B. decumbens*, suponiendo para esta autotetraploidía. Para la construcción de los mapas se dividió el procedimiento en cuatro etapas fundamentalmente, mediante el uso del software TetraploidMap para Windows (Hackett *et al.* 2007; <http://www.bioss.ac.uk/>). El primer paso es la determinación de los genotipos más probables de los parentales para cada marcador, dados los patrones de bandas de sí mismos y en su progenie, es decir los datos de segregación. La configuración más informativa la constituyen los marcadores dominantes tipo simplex (presentes en una sola copia en un parental y ausente en el otro, o viceversa), las cuales se ajustan a la proporción de segregación (1:1).

El segundo paso es determinar la distribución de los marcadores en grupos de ligamiento, fin para el cual se calculó una prueba de X^2 para segregación independiente entre todos los pares de marcadores. Posteriormente, para definir los grupos de ligamiento se utiliza un análisis de agrupamiento, teniendo en cuenta que los marcadores de diferentes grupos de ligamiento segregan independientemente entre sí, mientras que algunos de los marcadores dentro de un grupo de ligamiento segregan con diferentes grados de dependencia entre sí. El nivel de significancia para la prueba de X^2 refleja la distancia entre los loci correspondientes a los marcadores evaluados. El análisis de agrupamiento se hace sobre grupos de marcadores a diferentes distancias (es decir, con diferentes niveles de significancia de la prueba de X^2), y la comparación de los diferentes agrupamientos indica cómo se deben asignar los loci a los grupos de ligamiento, por lo cual la asignación de cada agrupación se hace con base en el coeficiente de similitud y la consistencia de las agrupaciones. Seguidamente, se ordenó cada grupo según las funciones de “two-point linkage” y “ripple”, comparando el ligamiento entre dos puntos y confirmando el orden establecido dentro de cada grupo de ligamiento.

El tercer paso es calcular la tasa de recombinación de mayor probabilidad y puntaje de LOD entre marcadores sin importar la dosis de segregación de los marcadores. Finalmente, se exploraron e

identificaron cromosomas homólogos a mano, deduciendo las fases de ligamiento más probables para cada marcador simplex relativa a los marcadores codominantes, luego se ubicaron los marcadores dúplex (AAOO x OOOO), los cuales se espera que estén ligados en dos grupos simplex en acoplamiento y dos en repulsión. Esto concluyó en la generación de los mapas de ligamiento gráficos para cada especie.

3.2.6 Comportamiento de Apareamiento Cromosómico en *Brachiaria decumbens*

Todos los marcadores alélicos de STS, SNPs e InDels con segregación 1:1 fueron evaluados para la especie *B. decumbens*, cuya constitución genómica es desconocida, mediante la prueba de X^2 de Mather para acceder a la asociación entre los marcadores empleando los estimativos que para esta prueba se mencionan por Wu *et al.* (1992). Los marcadores de dosis sencilla se ordenaron en los grupos de ligamiento para conocer su fase de ligamiento de acuerdo al patrón fenotípico encontrado en la población, así: marcadores en fase de acoplamiento sí muestran un fenotipo igual al del parental, y, en fase de repulsión, muestran un fenotipo recombinante respecto al patrón del parental. Posteriormente, se evalúa mediante una prueba de bondad de ajuste si la cantidad de marcadores ligados en acoplamiento vs aquellos ligados en repulsión para cada grupo de ligamiento, difiere de una proporción de 1:1 (Barcaccia *et al.* 2003).

En este sentido, los cálculos de la prueba de Mather descritos por Wu *et al.* (1992) se implementaron y realizaron mediante un guión en lenguaje de programación Perl, y las pruebas estadísticas de X^2 se hicieron con un catálogo de guiones para estadística de Perl. Cuando el número de marcadores en fase de acoplamiento y el número de marcadores en fase de repulsión no difirieron significativamente ($\alpha=0.1$), el apareamiento cromosómico se consideró preferencial; sin embargo, si la diferencia fue significativa, el apareamiento cromosómico se consideró aleatorio (Wu *et al.* 1992; Barcaccia *et al.* 2003).

4. RESULTADOS

4.1 AMPLIFICACIÓN Y SELECCIÓN DE LAS SECUENCIAS RELACIONADAS CON LA MEIOSIS (SRM)

Se evaluaron en total 47 *loci* de sitios de secuencias etiquetadas o STS, cuyas secuencias fueron aisladas previamente por Gorrón (2009) (Anexo A) para los parentales apomícticos 606 (*B. decumbens*) y sexual CIAT 44-02 (*B. ruziziensis*), con el fin de determinar cuáles podrían ser utilizados para mapeo, teniendo en cuenta los que presentaron polimorfismo para estas especies.

Las condiciones de amplificación fueron evaluadas y estandarizadas para cada marcador, y asimismo se establecieron los posibles tamaños de los alelos de cada uno. Para el tamaño de los fragmentos observados se obtuvo un rango de 120 a 800 pb aproximadamente (Figuras 3 y 4).

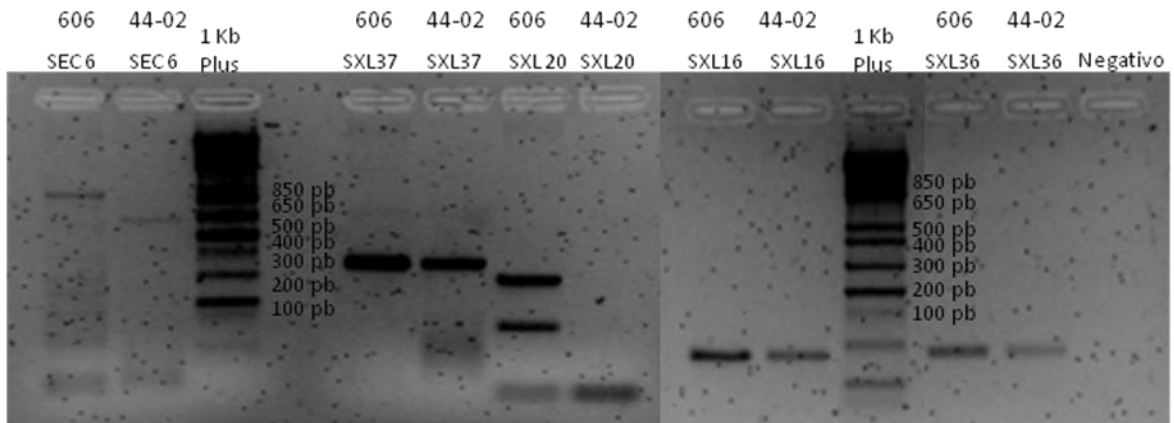


Figura 3. Estandarización de las condiciones de amplificación para algunos sitios de secuencia etiquetada (STS) (gel de agarosa 2%, visualizado con Bromuro de Etidio 0,5 µg/mL). Cebadores 6 y 20 polimórficos; cebadores 16, 36 y 37, monomórficos. El cebador 6 presenta bandeo inespecífico, el cual fue mejorado en los cebadores polimórficos cambiando las temperaturas de anillamiento y la concentración de Magnesio. El código “606” corresponde al parental donador del polen, apomíctico (*B. decumbens* accesión CIAT 606) y “44-02” al parental femenino, sexual (el clon identificado como “44-02” de *B. ruziziensis* tetraploide).

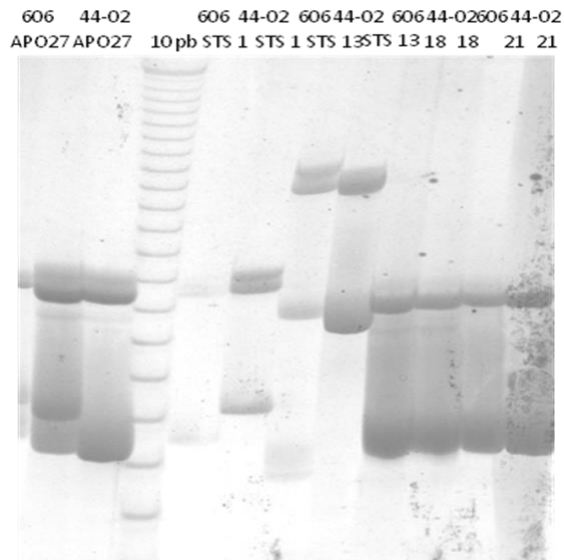


Figura 4. Estandarización de las condiciones de amplificación para algunos sitios de secuencia etiquetada (STS) (gel de acrilamida 6%, tinción con plata). Cebador 27 correspondiente a la delección identificada mediante secuencia, cebadores 1 y 13 polimórficos por diferencia en el tamaño de los alelos, no segregan en la población; cebadores 18 y 21, monomórficos. El código “606” corresponde al parental apomíctico (*B. decumbens* accesión CIAT 606) y “44-02” al parental femenino, sexual (el clon identificado como “44-02” de *B. ruziziensis* tetraploide).

Después de amplificar el ADN de los parentales del cruce, se obtuvo producto de un total de 40 de los 47 marcadores de tipo STS, correspondientes al 85,1% de las 47 SRM a evaluar. Dos marcadores, los STS 1 y 13 (Figura 4), amplificaron en los parentales mas no en la población híbrida. Inicialmente, por comparación de tamaño entre los fragmentos resultantes de las reacciones de PCR en agarosa o acrilamida según fuera el caso (Cuadro 2), se encontró un porcentaje de monomorfismo de 45%, es decir que 18 de las secuencias amplificadas no tuvieron ningún tipo de diferenciación entre los parentales. El porcentaje restante (55%), presentó

polimorfismo de tamaño o presencia/ausencia entre los parentales para los marcadores tipo STS evaluados, según se describe en la Cuadro 2. Estos fueron empleados en los análisis posteriores.

Cuadro 2. Condiciones de PCR y perfiles de temperatura resultantes de la estandarización de cada marcador (DMSO: Dimetil Sulfóxido). En morado: polimorfismo con base en secuencia.

No	Patrón de Amplificación	T _m (°C) ^a _b	DMSO 2%	Concentración de MgCl ₂	Resolución	Tamaño aproximado del (los) fragmento(s) (pb)	Tipo de Polimorfismo
1	Amplificación difícil – Polimórfico	50, 51	No	Normal	Acrilamida	155, 160 y 200	Tamaño
2	No amplificó	-	-	-	-	-	No Aplica
3	Monomórfico	51, 52	No	Normal	Agarosa	800	No Aplica
4	Polimórfico	54, 55	Sí	Normal	Agarosa	400, 350 y 300	P/A*
5	Polimórfico	51, 52	No	Normal	Acrilamida	250 – 400	Tamaño
6	Polimórfico	49, 50	Sí	Normal	Agarosa	650 y 800	Tamaño
7	Polimórfico	53, 54	No	Normal	Agarosa	200 y 210	Tamaño
8	Monomórfico	51, 52	No	Normal	Agarosa	280	No Aplica
9	Polimórfico	49, 50	Sí	Bajo	Agarosa	350	P/A*
10	Polimórfico	49, 50	Sí	Bajo	Agarosa	350	P/A*
11	Monomórfico	49, 50	No	Normal	Agarosa	300	No Aplica
12	Polimórfico	51, 52	Sí	Bajo	Agarosa	200 – 650 (4 loci)	Tamaño
13	Amplificación difícil - Polimórfico	50, 51	No	Normal	Acrilamida	180, 185, 240 y 250	Tamaño
14	Polimórfico	48, 49	Sí	Normal	Agarosa	600 y 650	Tamaño
15	Polimórfico	51,	No	Normal	Agarosa	150, 200 y 250	Tamaño

		52					
16	Monomórfico	55, 56	No	Normal	Agarosa	350	No Aplica
17	Monomórfico	53, 54	No	Normal	Agarosa	250	No Aplica
18	Monomórfico	51, 52	Sí	Normal	Acrilamida	220	No Aplica
19	Polimórfico	51, 52	No	Normal	Agarosa	300 y 750	Tamaño
20	Polimórfico	51, 52	No	Normal	Agarosa	80 y 250	P/A*
21	Monomórfico	51, 52	Sí	Normal	Acrilamida	220	No Aplica
22	No amplificó	-	-	-	-	-	No Aplica
23	Polimórfico	53, 54	Sí	Normal	Acrilamida	150	P/A*
24	Monomórfico	51, 52	Sí	Normal	Acrilamida	200	No Aplica
25	Polimórfico	50, 51	Sí	Normal	Acrilamida	220 y 230	Tamaño
26	Monomórfico	51, 52	No	Normal	Acrilamida	300	No Aplica
27	Polimórfico	51, 52	No	Normal	Agarosa	350	Delección y SNP
28	Monomórfico	51, 52	Sí	Normal	Acrilamida	330	No Aplica
29	Polimórfico	51, 52	Sí	Bajo	Agarosa	250 – 650	Tamaño
30	Polimórfico	48, 49	Sí	Normal	Agarosa	650 – 700	Tamaño
31	Polimórfico	51, 52	No	Normal	Agarosa	600 y 650	Tamaño – P/A*
32	No amplifica	-	-	-	-	-	No Aplica
33	Polimórfico	48, 49	Sí	Bajo	Agarosa	500 y 550	Tamaño – P/A*
34	Polimórfico	48, 49	No	Normal	Agarosa	250 y 300	P/A*
35	Monomórfico	51, 52	No	Normal	Agarosa	550	No Aplica
36	Monomórfico	48, 49	Sí	Normal	Agarosa	250	No Aplica
37	Polimórfico	55, 56	No	Normal	Agarosa	450	SNP
38	No amplifica	-	-	-	-	-	Tamaño

39	Monomórfico	48, 49	Sí	Normal	Acilamida	350	No Aplica
40	Monomórfico	48, 49	Sí	Normal	Acilamida	240	No Aplica
41	Polimórfico	51, 52	Sí	Normal	Agarosa	750	P/A*
42	No amplifica	-	-	-	-	-	No Aplica
43	Polimórfico	51, 52	Sí	Normal	Acilamida	250	Tamaño
44	Polimórfico	51, 52	Sí	Bajo	Acilamida	120	P/A*
45	Monomórfico	53, 54	Sí	Normal	Acilamida	292	No Aplica
46	Polimórfico	51, 52	Sí	Normal	Agarosa	650	Tamaño
47	Polimórfico	55, 56	No	Normal	Agarosa	350	SNP

^a Temperatura de anillamiento utilizada en el paso No. 3 (primer ciclo de amplificación) del perfil térmico utilizado.

^b Temperatura de anillamiento utilizada en el paso No. 6 (36 ciclos de amplificación restantes) del perfil térmico utilizado. *P/A: Polimorfismo de tipo Presencia/Ausencia entre los parentales evaluados.

4.1.1 Evaluación en la progenie de marcadores polimórficos entre parentales

Una vez se establecieron las condiciones de las reacciones de PCR para cada par de cebadores, se seleccionaron los cebadores STS polimórficos entre los parentales (por diferencia en el tamaño de los alelos o presencia/ausencia de bandas) para su evaluación en la población híbrida y se amplificaron los individuos según lo establecido en los parentales (Figuras 5 y 6).

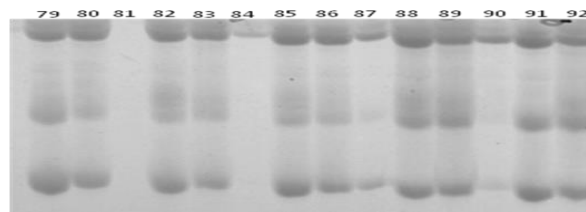


Figura 5. Cebador 27 en catorce individuos de la población híbrida entre *B. decumbens* y *B. ruzizensis* (gel de acilamida 6%, tinción con plata). Tipo de polimorfismo: Presencia/Ausencia.

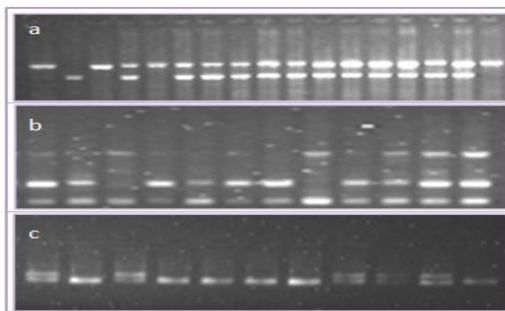


Figura 6. Cebadores polimórficos (presencia/ausencia) amplificados en diecisiete individuos de la población híbrida entre *B. decumbens* y *B. ruziziensis* (gel de agarosa 1,5%, tinción con Bromuro de Etidio 0,5 µg/mL). a. Cebador 6. b. Cebador 4. c. Cebador 41.

Los fragmentos provenientes de secuencias monomórficas se limpiaron (Figura 7) según el protocolo en el anexo H. Los volúmenes de producto a utilizar en las reacciones de secuencia variaron según la cantidad del mismo obtenido en cada amplificación para ser llevadas a una concentración aproximada homogénea de 0,5 µg/µL por reacción.

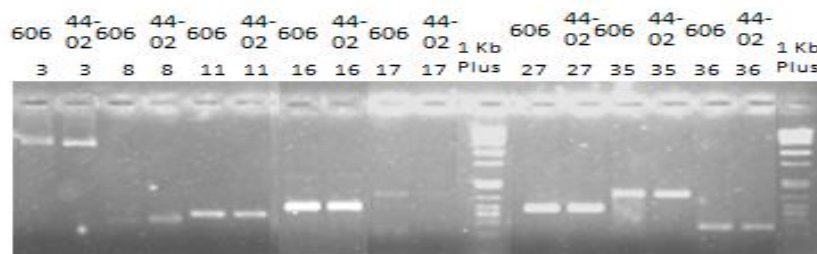


Figura 7. Limpieza de productos de PCR para secuencia. Las cantidades de producto a utilizar en las reacciones de secuencia variaron según la cantidad del mismo para ser llevadas a un aproximado homogéneo de 0,5 µg/µL por reacción. El código “606” corresponde al parental apomítico (*B. decumbens* accesión CIAT 606) y “44-02” al parental femenino, sexual (el clon identificado como “44-02” de *B. ruziziensis* tetraploide).

Se tomaron los productos monomórficos de acuerdo al criterio de tamaño también estandarizados, para identificar polimorfismos pequeños que pueden dar origen a marcadores de ADN de secuencia como son los polimorfismos de una sola base (SNPs) e inserciones y deleciones de una o pocas bases (InDels), que permitirían discriminar entre los parentales. Una vez editadas las secuencias, se obtuvieron 7 polimorfismos de tipo SNP (Figura 8) y una deleción de una base (Cuadro 2, en morado); estos se visualizaron en el programa BioEdit versión 7.0.9.0 (Hall 1999).

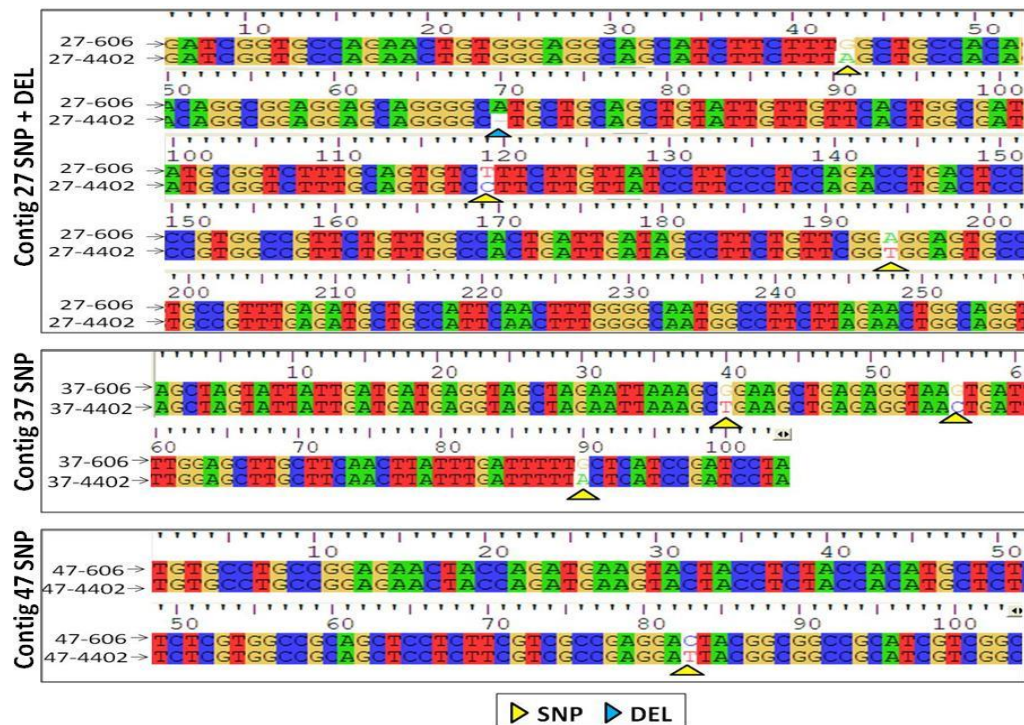


Figura 8. Visualización de SNPs utilizando BioEdit 7.0.9.0. Arriba: Secuencias producto del cebador 27; Medio: Secuencias producto del Cebador 37; Abajo: Secuencias producto del Cebador 47. Flecha azul: Deleción; Flechas amarillas: Polimorfismos de una base (SNPs).

Se realizó la primera ronda de amplificación de los siete SNPs identificados con los cebadores SBE diseñados (Cuadro 3), estableciendo la intensidad de fluorescencia usando el citómetro de flujo Luminex¹⁰⁰. La asignación de alelos se hizo por medio del paquete Masterplex GT (Miraibio, Inc). El ruido de fondo observado en el blanco de cada experimento siempre fue bajo y la lectura estuvo alrededor de 40 beads para todos los SNPs. Así, se determinó la eliminación de cuatro de los polimorfismos, debido a que no produjeron amplificación alguna pues no se detectó señal significativamente diferente del control negativo.

El resultado de la estandarización de los SNPs fue la identificación de los alelos en cada parental y once individuos elegidos al azar, lo cual permitió validar los verdaderos polimorfismos tipo SNP entre los parentales, extender el protocolo estandarizado a la población segregante F₁ e incluir estos datos en la población de mapeo bajo las condiciones de registro de datos especificadas en el apartado 3.2.1.3.

Cuadro 3. Cebadores diseñados para cada SNP identificado en las secuencias de STS.

Nombre del Cebador	Cebador SBE	Sentido	Temperatura de Anillamiento (°C)
27SNP1_4402A_606G bead_25	CAACGCTGAGCGCG TCACTGACATA TGG GAGGCAGCATCTTC TTT	+	75
27SNP2_4402C_606T bead_26	GAGACAAAGGTCTG CGCCAGCACCATGG AGGGAAGGATAACA AGAA	-	72
27SNP3_4402T_606A bead_27	TGGCCACACTGTCC ATTTGCGCGGTGAT TGATAGCCTTCTGTT CGG	+	72
37SNP1_4402T_606G bead_31	GCGATCGCCGGGA GATATACCCAACCTG AGGTAGCTAGAATT AAAGC	+	66

37SNP2_4402C_606G bead_32	TCGTGCCGGACTCG AGCACCAATACAGT TGAAGCAAGCTCCA ATCA	-	72
37SNP3_4402A_606G bead_33	ACGCCATCGCGGTG CTAAAGCAGAATGTT AGGATCGGATGAG	-	70
47SNP1_606C_4402T Bead_38	GGTGGGATTGTAC TGCTGCTCTCTTCGT CGCCGAGGA	+	75

En el Cuadro 4, se resume el número de marcadores estandarizados en relación a su polimorfismo. Se determinó también el tipo de mutación puntual presentada en cada caso, teniendo en cuenta que las transiciones se dan cuando la sustitución de nucleótidos es de una base nitrogenada púrica por otra púrica o una pirimidínica por otra pirimidínica; asimismo, las transversiones ocurren cuando el cambio es entre una base púrica por una pirimidínica o viceversa. Así, se presentaron en total dos transversiones y una transición.

Cuadro 4. Total de marcadores SNP estandarizados en los parentales *B. decumbens* (CIAT 606) y *B. ruzizensis* (Clon 44-02), además de 11 genotipos elegidos al azar a partir de la población híbrida.

Tipo de SNP	Código IUPAC ¹	Tipo de cambio	Número
A/C o C/A	M	Transversión	0
A/G o G/A	R	Transición	1
A/T o T/A	W	Transversión	0
G/T o T/G	K	Transversión	1
G/C o C/G	S	Transversión	1
T/C o C/T	Y	Transición	0

¹International Union of Pure and Applied Chemistry

La información generada por los marcadores STS, SNP e InDel se tomó para cada locus (banda o mutación puntual) como presencia (1) y ausencia (0), tratando a cada alelo como un marcador diferente para la construcción de la matriz y la posterior construcción del mapa de ligamiento

según la estrategia comúnmente empleada para mapeo de especies poliploides (Wu *et al.* 1992). Se leyeron en cada caso los marcadores que segregaron con alguna proporción diferente a la esperada para marcadores en dosis triple o mayor bajo cualquiera de las dos constituciones genómicas (alotetraploide, autotetraploide), es decir 1:1, 3:1, 5:1 y 11:1. En total, se leyeron 66 marcadores codominantes, de los cuales 27 correspondieron a SSRs, 21 a STS, 1 SCAR, 13 ESTs, 3 SNPs y un (1) InDel y que amplificaron en promedio 3 bandas por marcador, y, a su vez, de estas se presentaron en promedio dos informativas (polimórficas) por marcador.

4.2 ANÁLISIS DE SEGREGACIÓN

Para analizar los datos obtenidos a partir de los marcadores de tipo STS, SNP e *InDels*, estos fueron adicionados a la matriz general de mapeo en *Brachiaria* del Laboratorio de Genética Molecular de la Unidad de Biotecnología. Los cebadores de microsatélites, ESTs, SCAR y AFLPs evaluados previamente en la población fueron un total de 368 marcadores, de los cuales se obtuvo un total de 316 marcadores polimórficos, siendo 223 bandas el producto de doce combinaciones realizadas para AFLPs, 62 a partir de SSRs (microsatélites) y 21 de ESTs.

Se contó con un total de 341 bandas amplificadas en los parentales, de las cuales 256 estuvieron presentes en el parental apomíctico (*B. decumbens*) y 85 en el parental sexual (*B. ruziziensis*). De estos 341 bandas codificadas para presencia o ausencia en cada parental y los individuos de la progenie (176), se tiene que 306 correspondieron a los marcadores evaluados con anterioridad por el proyecto de mapeo en *Brachiaria* (CIAT – Proyecto Agrobiodiversidad y Biotecnología), distribuidos de la siguiente manera: 223 AFLPs, siendo 173 del parental apomíctico (606) y 50 del parental sexual (44-02); 62 microsatélites, 45 en *B. decumbens* y 17 en *B. ruziziensis*; 21 ESTs donde ocho corresponden a secuencias posiblemente relacionadas con tolerancia a aluminio (Suárez *et al.* 2008), once provienen de secuencias obtenidas usando análisis de expresión génica para Apomixis (similares a los evaluados para este estudio y provistos por Diana Bernal – BRU/CIAT) y tres marcadores que podrían intervenir en la resistencia a Salivazo (facilitados por

Federico Roda – BRU/CIAT) (Suárez *et al.* 2008). Finalmente, en este trabajo se aportaron 35 *loci*, originados a partir de marcadores codominantes, distribuidos en 28 STS, 6 SNPs y una delección de una base.

Se realizaron análisis de bondad de ajuste (por la prueba de χ^2) para varias proporciones de segregación (desde 1:4 hasta 5:1, presencia vs ausencia) (Figura 9). Los rangos de segregación más representativos estuvieron entre 0,75 y 1,75, correspondiendo en buena medida con lo esperado para los marcadores que segregan en una sola dosis, con un promedio de proporción para los marcadores de 1,57 para *B. decumbens* y 1,86 para *B. ruzizensis*. Se obtuvo un porcentaje bien representado de patrones de segregación desviados para ambas especies, con una desviación en el 54,3% y 43,75% de los casos, respectivamente.

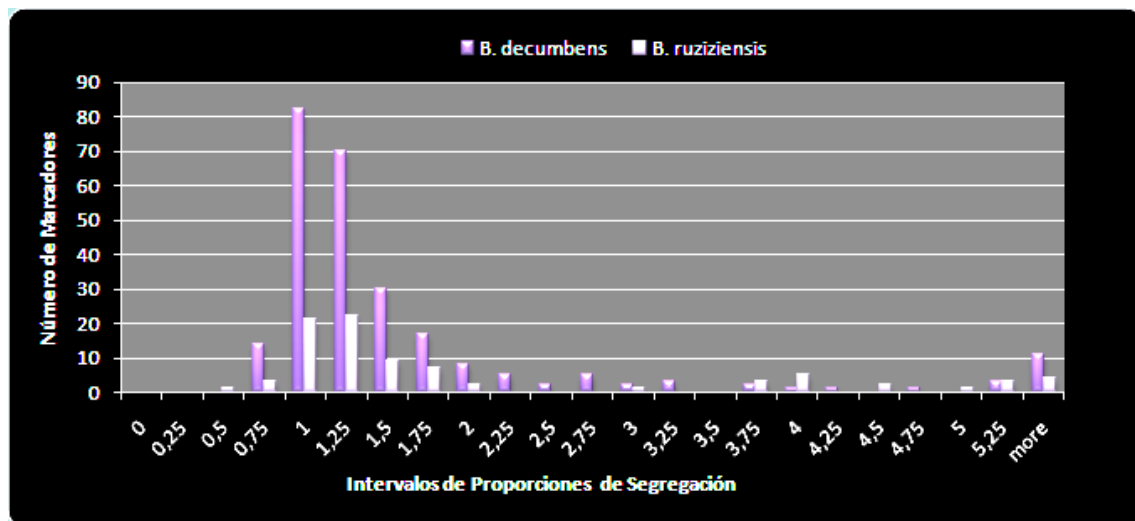


Figura 9. Distribución de las proporciones de segregación (presencia vs ausencia) de marcadores en la progenie F_1 de *B. decumbens* (CIAT 606) y *B. ruzizensis* (Clon 44-02).

Es importante resaltar las dosis en las cuales se presentaron los loci, provenientes tanto de marcadores dominantes como codominantes. En el caso de los marcadores dominantes, que corresponden únicamente al tipo AFLP, se encontró que 117 de los 173 marcadores evaluados (67,6%) en el parental apomíctico segregaron 1:1 para presencia vs ausencia; y, en el caso del *B. ruzizensis*, el parental sexual, se presentaron 47 de los 50 marcadores AFLP (94,0%) en la misma proporción, en una sola dosis. En el caso de *B. decumbens*, once loci de AFLPs, segregaron en una proporción 3:1 y cinco en proporción 5:1, el resto presentaron segregación en una sola dosis (1:1). Para el parental sexual, un marcador segregó 3:1, otro 5:1 y otro en una proporción diferente de estas y de 1:1.

A su vez, para el caso de los marcadores codominantes, se obtuvo un total de 118 loci, los cuales segregaron así: 69 en una proporción de presencia vs ausencia 1:1 para el caso de una sola dosis, 13 segregaron 5:1 para el caso de doble dosis y ninguno 3:1. Un total de 36 marcadores presentaron una segregación diferente a las esperadas para ambos casos, lo que constituye el 30,51% de los codominantes. Estas proporciones estuvieron discriminadas por tipo de marcador como se muestra en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Información acerca de los patrones de herencia observados para los marcadores codominantes, polimórficos entre parentales de dosis sencilla o doble para ambos parentales, discriminado por sistema codominante utilizado.

Sistema	Marcadores segregantes (P>0.05)		
	Proporción 1:1	Proporción 3:1	Proporción 5:1
STS y/o SNP	14	0	4
SSR	38	0	5
EST	16	0	4
Total	69	0	13

4.3. MAPEO GENÉTICO DE LAS SECUENCIAS RELACIONADAS CON LA MEIOSIS (SRM) EN *B. decumbens* y *B. ruzizensis*

Para el presente estudio se compararon los mapas genéticos generados por los programas MAPMAKER v 3.0 para Windows, diseñado para mapeo de especies diploides y por lo tanto para el cual se supuso completa alotetraploidía y sólo se usaron SDM, y TetraploidMap para Windows (<http://www.bioss.ac.uk/>; Hackett *et al.* 2007), que supone completa autotetraploidía y está diseñado para leer marcadores que se ajustan a las proporciones 1:1 ó 3:1 (marcadores en una sola dosis en la configuración simplex vs. nuliplex o simplex vs. simplex, respectivamente), 5:1 ó 11:1 (marcadores en doble dosis en la configuración duplex vs. nuliplex o duplex vs. simplex, respectivamente).

MAPMAKER

Se obtuvo un mapa de ligamiento de *B. decumbens* usando Mapmaker 3.0 empleando la opción “group” y “compare” con un puntaje LOD de 8.0. Se mapearon en total 117 fragmentos en dosis sencilla en 20 grupos de ligamiento, cubriendo un total de 688.7 cM, en promedio una distancia por grupo de 34,3 cM y 5,9 marcadores por grupo, además de una distancia promedio entre marcadores de 5,8 cM (Figura 10).

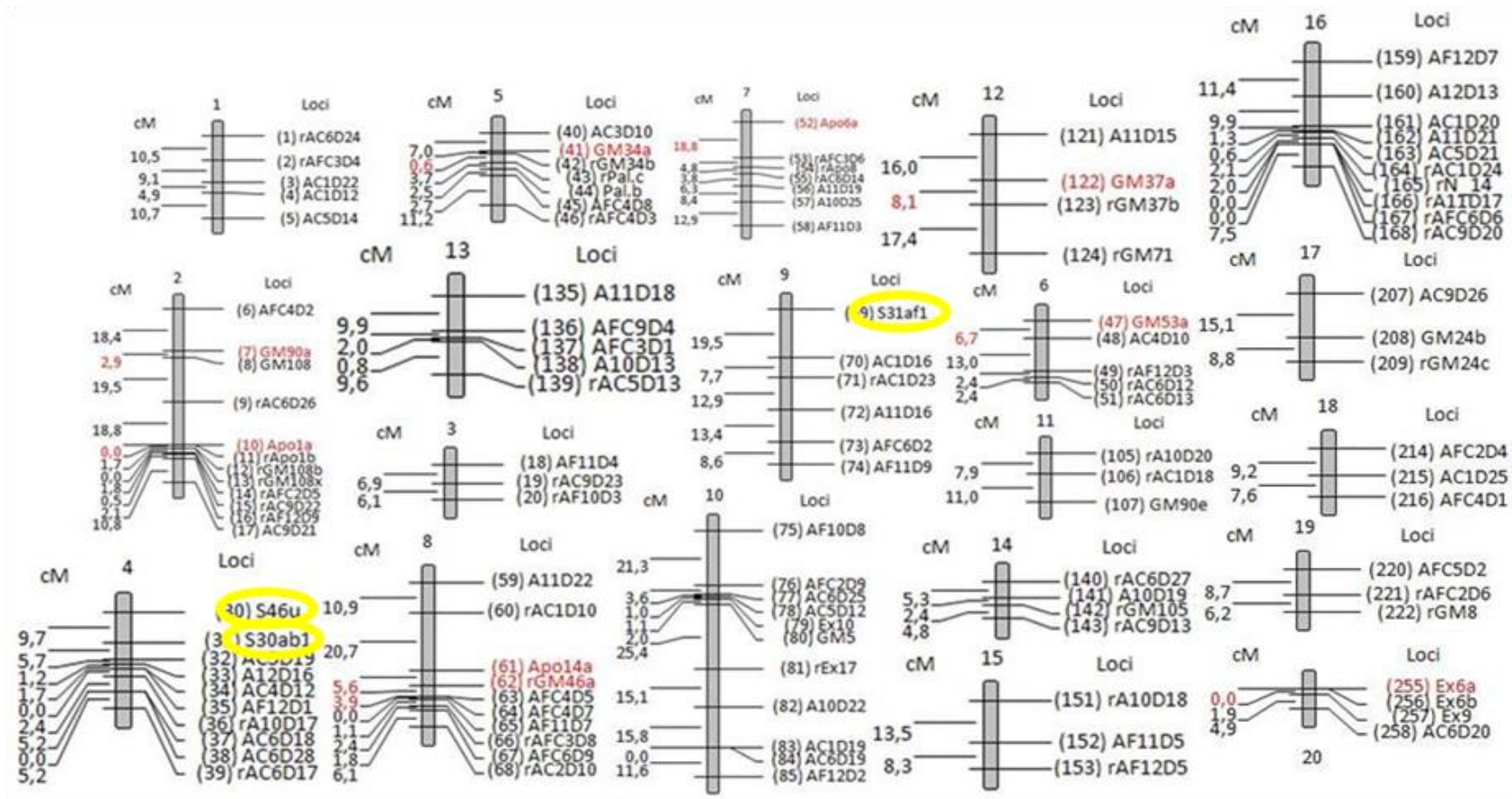


Figura 10. Mapa de Ligamiento de la especie *Brachiaria decumbens* con el programa Mapmaker 3.0 con un puntaje LOD de 8.0 y una distancia máxima entre marcadores de 25 cM. En amarillo: Secuencias Relacionadas con la Meiosis (SRM).

TetraploidMap

Para la especie *B. ruziziensis*, se obtuvo por primera vez una aproximación a su mapa de ligamiento. Este comprende nueve grupos de homología conseguidos a partir de 61 marcadores tanto dominantes como codominantes en proporciones de segregación significativas 1:1 y 5:1 (Figura 11) formados con base en la identificación manual usando la información procedente de las fases de ligamiento entre marcadores. Los nueve grupos de homología se muestran en detalle con sus respectivos grupos de ligamiento y marcadores ligados en fase de acoplamiento y repulsión en el anexo J. Los nueve grupos se formaron con una similitud de 0,3.

Para cada uno de los grupos de homología 2 y 4, se obtuvo únicamente un grupo de ligamiento, conformado por seis y dos marcadores, respectivamente. Asimismo, para el grupo de homología 6, con ocho marcadores, se obtuvieron dos grupos de ligamiento distribuidos en cinco y tres marcadores respectivamente. En el caso de los grupos de homología número 3, 5, 7 y 9 se obtuvieron tres grupos de ligamiento para cada uno; y, finalmente los grupos de homología 1 y 8 presentaron los cuatro grupos de ligamiento completos. Además, en orden ascendente, la cobertura de cada grupo de homología en cM fue de 162, 235, 120, 22.85, 178, 172, 99, 181 y 136 cM, respectivamente, lo cual resultó en una cobertura total del mapa de 1305.85 cM.

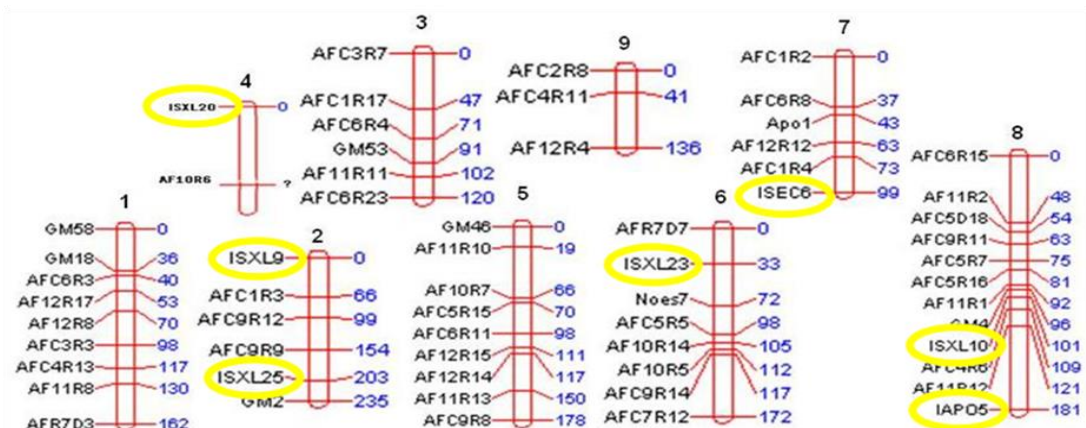


Figura 11. Mapa de ligamiento de la especie *Brachiaria ruziziensis* generado por el programa TetraploidMap con 61 marcadores. En amarillo: Secuencias Relacionadas con la Meiosis (SRM).

En cuanto a la especie *B. decumbens*, se realizó el mapa de ligamiento con 217 marcadores segregantes distribuidos en 14 grupos de homología fraccionados a partir de un coeficiente de similitud de 0,34. Los marcadores STS IISXL4 y AFLP AFC1D9 se excluyeron del análisis por la distancia a la cual se ubicaron de los grupos de ligamiento inicialmente.

La cobertura total del mapa fue de 1680 cM, distribuida en los 14 grupos de homología como sigue: en el primer grupo se ubicaron 4 marcadores en un total de 39 cM, en el segundo, 28 marcadores en 174 cM, en el tercero fueron 16 marcadores distribuidos en 56 cM, en el cuarto 7 marcadores con 57 cM, en el quinto 15 marcadores en 134 cM, en el sexto 27 marcadores en 189 cM, en el séptimo 9 marcadores en 132 cM, en el octavo, 19 marcadores se ubicaron a lo largo de 179 cM y este incluyó al SCAR N14 relacionado con apomixis; en el grupo nueve se encontraron 20 marcadores en 138 cM, en el décimo 9 marcadores en 181 cM, en el decimoprimer 20 marcadores en 120 cM, en el decimosegundo 13 marcadores en 98 cM, en el decimotercero 15 marcadores en 100cM y en el último, 9 marcadores en 83 cM (Figura 12).

Los grupos de ligamiento observados por grupo de homología fueron también variados, con una prevalencia de entre tres y cuatro grupos, así: en los grupos 1 y 3, se encontraron dos grupos de ligamiento, mientras que en los grupos de homología 4, 5, 8, 9, 11, 12 y 14 se encontraron tres grupos de ligamiento en cada uno, y en el resto cuatro (ver Anexo K). El mapa cubrió así 1680 cM, con 217 posiciones de marcadores y una distancia promedio entre marcadores de 9,02 cM. En el mapa, los marcadores con proporciones de segregación diferentes de las esperadas (distorsionados) se ubicaron dispersos por el mapa, incluyendo las secuencias relacionadas con la meiosis, que muestran expresión diferencial durante el desarrollo reproductivo.

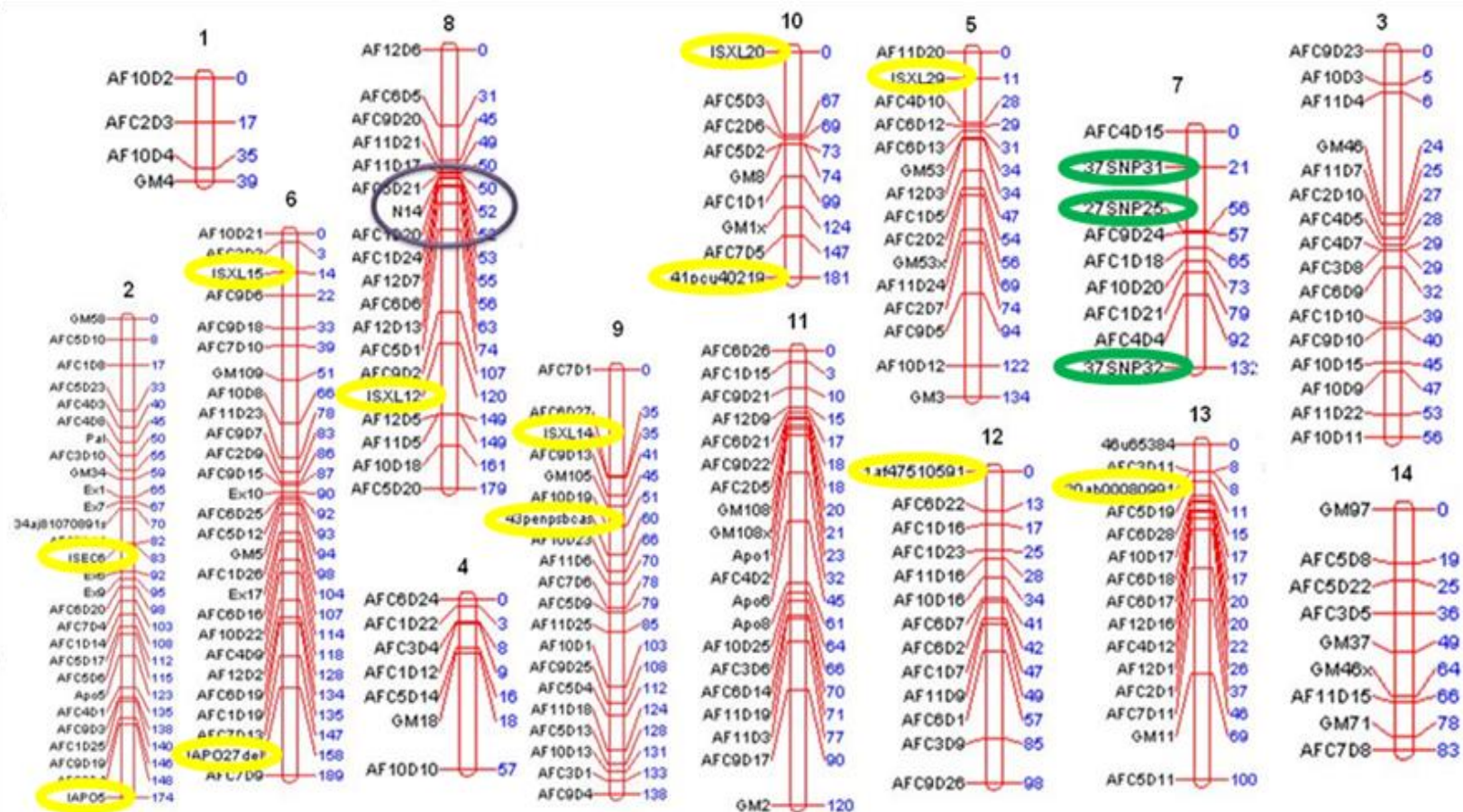


Figura 12. Mapa de Ligamiento de la especie *Brachiaria decumbens* con TetraploidMap. Dentro del círculo morado se muestra el marcador SCARN14, potencialmente asociado con la apomixis. En amarillo: STS relacionados con la meiosis. En verde: SNPs relacionados con la meiosis.

El grupo de ligamiento al cual pertenece el SCAR N14 corresponde con el número 16 en el mapa generado con Mapmaker (Figura 13) y con el número 8 en el mapa de ligamiento con TetraploidMap (Figura 14), en ambos el SCAR N14 se encuentra cercanamente ligado a marcadores AFLP como AF12D7, A12D13, AC1D20, A11D21, AC5D21, AC1D24, A11D17, AFC6D6 Y AC9D20. A pesar de que el orden es diferente entre ellos, sus fases de ligamiento en acoplamiento y repulsión se mantienen para los marcadores mencionados más arriba (Figuras 13 y 14). Es importante recalcar que los marcadores ligados en fase de repulsión AFC6D5 (a 19 cM), AFC5D21 (a 5 cM) y AFC5D1 ligado en acoplamiento (a 22cM) con respecto al SCAR N14 en el mapa de TetraploidMap no se encuentran en el mapa generado por Mapmaker debido a que sus proporciones de segregación son diferentes de una sola dosis (1:1).

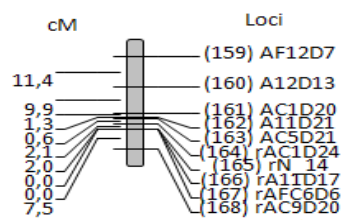


Figura 13. Grupo de Ligamiento 16, al cual pertenece el SCAR N14, con 10 marcadores y cubriendo un total de 34,8 cM generado con Mapmaker 3.0.

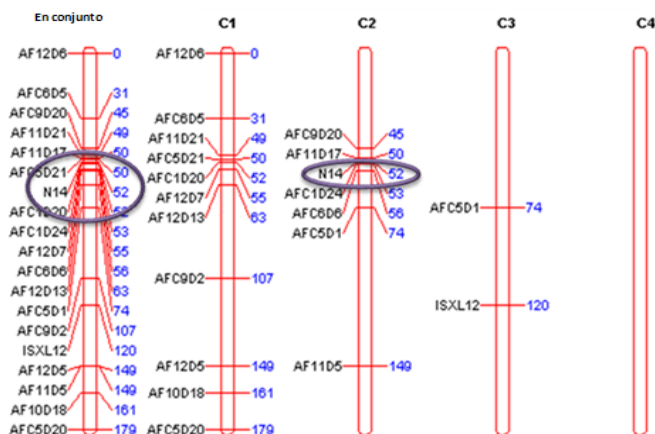


Figura 14. Grupo de homología 8, al cual pertenece el SCAR N14, y sus respectivos grupos de

ligamiento con 19 marcadores y cubriendo 179 cM, generado con TetraploidMap. En conjunto: Grupo de homología; C1, 2, 3 y 4: Cromosomas o grupos de ligamiento.

En la prueba de X^2 , la hipótesis nula se definió como independencia (no asociación) entre el marcador molecular analizado y el tipo de reproducción apomítica y se rechazó teniendo en cuenta el valor de chi cuadrado calculado y una probabilidad de 1/10000 ($p < 0.0001$). A partir de este análisis, se obtuvo una potencial asociación entre los marcadores pertenecientes al grupo de ligamiento del SCAR N14 ($p < 0.0001$), asociándose aquellos que se encuentran en acoplamiento entre sí pero en repulsión con el SCAR N14 con mayor probabilidad potencialmente ligados a la sexualidad, detectándola de 74 al 81% de los casos; y los que se encuentran ligados en acoplamiento con el SCAR detectan la apomixis del 79 al 86% de los casos, en comparación con el mismo N14 que la detecta con una probabilidad de 0.89. El marcador AF12D13 es el único perteneciente al grupo de ligamiento del SCAR N14 (Figura 13) que tiene una probabilidad moderada de asociación ($p < 0,02$) con el fenotipo apomítico.

Además de estos marcadores, se encontraron potencialmente asociados los loci de AFLPs AFC6D14 ($p < 0,05$) ligado en repulsión y reconociendo la apomixis en un 64% de los casos, y AF10D22 ($p < 0,03$) ligado en acoplamiento y con detección de la sexualidad en el 63% de los casos. Asimismo, también constituyen potenciales asociados los loci AFC9D1 ($p < 0,03$), GM105 ($p < 0,0093$) y Ex17 ($p < 0,02$) ligados en repulsión y con un poder de detección de apomixis de 70% en cada caso.

Teniendo en cuenta que el error permitido para la detección del tipo de reproducción en cada caso para estos marcadores es de 5% a nivel individual, se procedió a realizar una corrección de Bonferroni, dividiendo el error permitido por el número de marcadores evaluados en una sola dosis, para disminuir la probabilidad de error global, convirtiéndola a un máximo permitido del 5%, pero esta vez a nivel colectivo. Al realizar esta corrección, el α para cada marcador debe ser igual o menor a 0,00043, razón por la cual los marcadores del grupo de ligamiento del SCAR N14 son los únicos que continúan siendo potencialmente asociados al modo de reproducción en *Brachiaria*.

4.4 COMPORTAMIENTO DE APAREAMIENTO CROMOSÓMICO

De acuerdo con el procedimiento para realizar la prueba de Mather (1957), los marcadores de una sola dosis se ordenaron en 20 grupos cosegregacionales con el programa MAPMAKER 3.0 (Lander *et al.* 1987) y se evaluaron para la fase de ligamiento con base en el número de recombinantes vs no-recombinantes. Se contó el número de marcadores en dosis sencilla ligados en acoplamiento y el número de aquellos ligados en repulsión y se evaluó el ajuste a la proporción esperada 1:1 (Wu *et al.* 1992). De los grupos cosegregacionales de *B. decumbens*, 13 de los 20 grupos de ligamiento mostraron una desviación no significativa ($P < 0.1$) y 7 una desviación significativa, lo que sugiere un comportamiento de apareamiento cromosómico mixto, con formación de bivalentes en mayor proporción, aunque con una representatividad de apareamientos uni y/o multivalentes no despreciable (35%) (Cuadro 6).

Cuadro 6. Fase de ligamiento de los loci de cada marcador perteneciente a los grupos de ligamiento generados acorde con el prueba de Mather para *Brachiaria decumbens*.

Grupo de Ligamiento	Número de Marcadores en Fase de Ligamiento		χ^2	P	Pareo cromosómico
	Acoplamiento	Repulsión			
1	37	45	0,376992	NS	p
2	228	244	0,46145099	NS	p
3	40	38	0,82084724	NS	p
4	151	184	0,07139096	*	a
5	111	113	0,89369467	NS	p
6	62	52	0,34897166	NS	p
7	156	146	0,56499691	NS	p
8	114	125	0,47675534	NS	p
9	117	130	0,4081406	NS	p
10	165	171	0,7434207	NS	p
11	17	25	0,21704402	NS	p
12	13	12	0,84148058	NS	p
13	23	22	0,88149745	NS	p
14	21	34	0,07961582	*	a
15	11	11	1	NS	p
16	28	71	1,5486E-05	*	a
17	16	28	0,07044044	*	a
18	44	23	0,01030099	*	a
19	5	14	0,03894746	*	a
20	45	14	5,4404E-05	*	a

P, significancia del valor p de la prueba χ^2 . *, Valor significativo de la prueba de χ^2 .

NS, no significativo.

a, Apareamiento cromosómico al azar.

p, Apareamiento cromosómico preferencial.

5. DISCUSIÓN

5.1 AMPLIFICACIÓN Y SELECCIÓN DE LAS SECUENCIAS RELACIONADAS CON LA MEIOSIS

Este estudio confirma la utilidad en el uso de métodos alternativos y complementarios a los marcadores dominantes de tipo AFLP y RAPD, y codominantes de tipo SSR para mapeo genómico. En este sentido, se presentó un porcentaje de amplificación alto para los cebadores STS utilizados (85,1%) además de una diferenciación moderada (55% de polimorfismo), esto sugiere que existe variación suficiente dentro de los fragmentos amplificados, lo cual soporta lo encontrado en estudios tanto en animales (Weber & May 1989; Patzak *et al.* 2007) como en plantas (Tragoonrung *et al.* 1992).

En un estudio similar, Lem & Lallemand (2003) desarrollaron 14 STS a partir de secuencias de *Lolium* disponibles en bases de datos y 28 STS a partir de secuencias encontradas en especies de gramíneas relacionadas. De los 42 marcadores de sitios de secuencia etiquetada (STS) desarrollados, el 85,8% produjeron amplificación exitosa y el 62% revelaron un alto nivel de polimorfismo con un promedio de cinco alelos por locus, en comparación con 55% de polimorfismo encontrado en el presente estudio con un promedio de 3 alelos por locus.

Uno de los factores que pudo contribuir al menor porcentaje de amplificación es la identificación de los clones que son realmente diferenciales en un análisis de microarreglos. A pesar de los métodos estadísticos desarrollados para tratar de corregir las principales fuentes de ruido y permitir detectar los genes que realmente están teniendo cambios en su tasa de transcripción de una muestra a otra, la detección de falsos positivos y falsos negativos se debe ante todo a las diferencias de expresión de los genes y a factores inherentes a los fluorocromos (Quackenbush 2002). En genes con altos niveles de expresión, diferencias sutiles y reales en la misma son difíciles de detectar. Por otro lado, en genes con muy bajo nivel de expresión, cualquier intensidad debida a ruido podría leerse como expresión diferencial, creándose falsos positivos (Quackenbush 2002).

El grado de polimorfismo detectado (55%) está relacionado con la estrategia utilizada, en la cual se buscó polimorfismo en regiones exónicas e intrónicas, amplificando ambas regiones a

partir de ADN genómico y utilizando cebadores diseñados sobre regiones exónicas, para las cuales se había detectado expresión diferencial en etapas tempranas del desarrollo en los parentales bajo estudio (Gorrón 2009). Como resultado, al igual que en *Lolium* (Lem & Lallemand 2003), no se requirió la digestión de los fragmentos amplificados para la detección de polimorfismos; lo cual sí debió hacerse en estudios en *Triticum aestivum* L. (Chen *et al.* 1994; Talbert *et al.* 1994), *Hordeum vulgare* L. (Tragoonrung *et al.* 1992), *Oryza sativa* L. (Ghareyazie *et al.* 1995) y *Pisum sativum* L. (Gilpin *et al.* 1997) donde se necesitó con frecuencia el uso de enzimas de restricción, ya que para todos o la mayor parte de pares de cebadores utilizados se obtuvieron fragmentos monomórficos y, en consecuencia, debieron digerirse.

Todos los marcadores de tipo STS desarrollados en *Humulus lupulus* L. por Patzak *et al.* (2007) fueron de utilidad en la identificación de genotipos por la técnica de huella digital de ADN (DNA Fingerprinting). Estos autores plantean que pueden sustituir y complementar a los marcadores microsatélites, que aparecen principalmente en regiones no codificantes del genoma de las plantas. Además, concluyeron que el uso de los nuevos marcadores STS puede ser una herramienta poderosa para estudios de análisis de diversidad genética, mapeo genómico, selección asistida por marcadores y evaluación de recursos genéticos.

Según Monna *et al.* (1994), los polimorfismos en fragmentos amplificados son causados por: (1) sustituciones de bases o deleciones en los sitios de anillamiento de los cebadores, (2) inserciones que causan que los sitios de anillamiento de los cebadores se encuentren muy distantes para soportar amplificación, o (3) inserciones/deleciones que cambian el tamaño del fragmento amplificado. Los dos primeros tipos generan polimorfismos de presencia/ausencia, el tercero de tamaño. Así, este estudio muestra que los polimorfismos obtenidos por PCR entre los genotipos de *Brachiaria* se deben a ambos tipos de polimorfismos (Cuadro 2). Esto es similar a lo encontrado por Tragoonrung *et al.* (1992), quienes en cruces con cebada identificaron dos tipos de polimorfismos a partir del uso de STS para mapeo en dicha especie, a saber: 1) eventos de inserciones/deleciones que leyeron directamente a partir de geles de agarosa, y 2) eventos de mutaciones puntuales. Estos últimos polimorfismos se detectaron

mediante el uso de enzimas de restricción en comparación con la secuenciación y validación de SNPs mediante el uso del citómetro de flujo Luminex¹⁰⁰ que se realizó en este estudio.

Por otro lado, se plantea que la sensibilidad para la detección de polimorfismos depende en buena medida de la resolución de la electroforesis. Con geles de electroforesis de agarosa entre 1,5 y 2% se pudieron distinguir fragmentos entre 0.3 y 1.5 kb (Figura 3) en comparación con fragmentos entre 0,6-2 kb amplificados en arroz en el cruce entre Nipponbare y Kasalath evaluado por Lem & Lallemand (2003). Sin embargo, con geles de acrilamida al 6%, se separaron con claridad fragmentos entre 80 y 300 pb (Figura 4). El uso conjunto de ambos tipos de geles de electroforesis permitió detectar un mayor número de polimorfismos. El gran polimorfismo generado por *B. decumbens* comparado con el del parental sexual, puede ser debido a su condición de poliploide natural, ya que se ha referenciado que las especies de este tipo exhiben una considerable variación a causa de rearrreglos en el genoma que no afectan la estabilidad de la especie, sino que contribuyen a una mayor divergencia, confiriéndoles ventajas adaptativas, al compararse con sus contrapartes diploides (Osborn *et al.* 2003, Ma & Gustafson 2005).

Los productos monomórficos que, de acuerdo al criterio de tamaño fueron secuenciados, produjeron siete polimorfismos de una sola base (SNPs) y una delección de una base, que permitieron discernir entre los parentales. La frecuencia de SNPs fue de uno en 86 pb y uno en 94 pb en los fragmentos producidos por los STS 27 y 37, respectivamente. Asimismo, se observó un SNP en el fragmento del STS 47 y una sola delección de una base en los 818 pb analizados que permitieron una diferenciación entre parentales. Estos resultados contrastan con los hallados por Lem & Lallemand (2003) para *Lolium*, quienes encontraron una frecuencia de SNPs de 1/43 pb en secuencias exónicas y 1/17 pb en secuencias intrónicas. En este mismo trabajo, se reportan los resultados obtenidos en un estudio similar llevado a cabo por Lauvergeat, los cuales se asemejan más a los obtenidos aquí con una frecuencia de SNPs en secuencias exónicas de tres SNPs en 164 pb (1/54 pb) comparando cuatro alelos del locus SER (de su sigla en inglés, Somatic Embryogenesis Receptor) en la misma especie.

De los tres SNPs que se pudieron validar para asegurar que reprodujeran el polimorfismo esperado, dos pertenecieron a la secuencia del STS 37 y una al 27 (Cuadro 4). Este resultado

pudo derivarse más probablemente del diseño de los cebadores, debido a que estos deben forzarse a estar adyacentes a la mutación puntual (o SNP), cuando en ocasiones sus características de amplificación no serían las más propicias para el anillamiento en la extensión. No obstante, es importante resaltar que la metodología de extensión de una base (SBE) es una de las más precisas en cuanto a determinación de alelos SNPs se refiere (Quintero-Valencia 2007). Lee *et al.* (2004) citado por Quintero-Valencia (2007) compararon éste método con el ASPE (Allele-Specific Primer Extension), el OL (Oligonucleotide Ligation) y el DH (Direct Hibridization), que también usan como plataforma el citómetro de flujo Luminex¹⁰⁰. Ellos plantean que aunque el costo de la metodología SBE es mayor, esto se compensa por su mayor resolución que permite identificar con certeza individuos heterocigotos de homocigotos, lo cual es de gran importancia en estudios de mapeo como este.

5.2 ANÁLISIS DE SEGREGACIÓN

El presente trabajo tiene como base individuos tetraploides que se caracterizan por tener cuatro conjuntos completos de cromosomas. Por lo tanto, se utilizó una analogía para calcular las proporciones fenotípicas de los alelos polimórficos empleados para mapeo (Figura 9, Da Silva *et al.* 1993) y se centró la atención en el parental *B. decumbens* pues aún no se conoce su constitución genómica. Para discutir los resultados obtenidos aquí, se distinguió entre los tipos de poliploides usando la clasificación de Stebbins (1950) citado por Soltis & Soltis (2000), quien afirmó que los aloploiploides son aquellos poliploides que han surgido a través de procesos de hibridización interespecífica y duplicación cromosómica (no necesariamente en ese orden), los autoploiploides son aquellos poliploides surgidos a partir de parentales conespecíficos, y aloploiploides segmentales que son aquellos poliploides producto de parentales con arreglos cromosómicos parcialmente divergentes tal que algunas regiones cromosómicas son homólogas entre los parentales y otras son homeólogas.

El histograma obtenido para la distribución de las proporciones de segregación de ambos parentales (Figura 9) sugiere que una buena parte de los alelos en los individuos de la población híbrida presentan una distribución unimodal alrededor de 1, es decir que estos alelos están presentes en un 50% de la población F_1 y es equivalente a una proporción fenotípica 1A:1a. Con respecto a esto, es importante resaltar que para el caso de los

marcadores dominantes tipo AFLP, tomados del proyecto de mapeo de la Unidad de Biotecnología de CIAT, sólo se leyeron aquellas bandas que por su apariencia era evidente que su segregación era de una sola dosis, y esto se espera que aumente la proporción de marcadores SDM en el análisis general de proporciones de segregación, a su vez que limita las inferencias en cuanto a la capacidad de los AFLPs utilizados aquí para hacer inferencias en cuanto a la segregación presentada por marcadores en dosis doble. En el caso de *B. decumbens*, las proporciones esperadas de segregación en marcadores de tipo codominante (Cuadro 5), mostraron que ninguno de aquellos presentes en doble dosis se desvió significativamente de la proporción 5:1, lo que se esperaría en un genotipo autotetraploide.

Estos resultados son relevantes en relación con los datos publicados por Lutts *et al.* (1991), quienes analizaron la fertilidad de *B. ruziziensis* en cruces interespecíficos con *B. decumbens* y *B. brizantha* y llegaron a estimar que el parental *B. decumbens* tiene una fuerte tendencia a formar bivalentes comparado con *B. ruziziensis* (autotetraploide). Asimismo, Mendes-Bonato *et al.* (2001) mediante estudios citológicos confirmaron la condición poliploide de *B. decumbens* al observar en la diacinesis de la meiosis cromosomas univalentes, bivalentes y cuadrivalentes, con una prevalencia de configuraciones bivalentes, e interpretaron este fenómeno como evidencia de alopoliploides por segmentos, es decir, los genomas de los parentales son parcialmente homólogos. Lo anterior expuesto para *B. decumbens* podría ser debido a que este parental es un autotetraploide muy antiguo que con el tiempo los dos pares de cromosomas homólogos se han diferenciado o, a que se trate de un individuo con alotetraploidía por segmentos (Ver sección 5.4).

Estas posibilidades no son excluyentes ya que según Allard (1960), la distinción entre auto- y alopoliploidía no siempre será clara porque la hibridación y subsiguiente duplicación del número cromosómico puede referirse a especies cuyo ADN está en diferentes estados de diferenciación.

En cuanto a los resultados obtenidos para *B. ruziziensis* (44-02), se confirmó nuevamente que es un individuo autotetraploide artificial, producto de la duplicación artificial de su genoma (diploide) por acción de la colchicina (Swenne *et al.* 1981). Como se observa en el histograma (Figura 9), se observan picos de frecuencias alélicas para *B. ruziziensis* alrededor de 1,0 y 3,8,

que son valores aproximados a las proporciones fenotípicas 0,87A:1a, 3,7A:1a. Esas proporciones son las esperadas para individuos autotetraploides que durante la meiosis han completado la formación del cuadrivalente, es decir, se han asociado los cuatro cromosomas homólogos mantenidos juntos por un quiasma, y hay partición al azar de cromátides en los gametos (Allard 1960). Estos resultados también son consistentes con aquellos encontrados por Lutts *et al.* (1991) en cuanto a la alta tendencia de *B. ruziziensis* a formar cuadrivalentes, en comparación con *B. decumbens*.

Partiendo de estos resultados obtenidos y de la evidencia de que *B. decumbens* tiende a formar bivalentes (asociación en dos pares de los cuatro cromosomas homólogos), ya que los dos pares de cromosomas homólogos son diferentes (Lutts *et al.* 1991), podría considerarse un primer factor sugerido por Allard (1960), es que partiendo del supuesto que el genotipo del parental fuese un simplexo (Aaaa) en el cual sólo se forman bivalentes, sus gametos se originan por repartición al azar de los cromosomas, y la proporción fenotípica esperada es 1A:1a, que coincide con las frecuencias alélicas obtenidas para este parental.

Por otro lado, se observó un porcentaje alto de patrones de segregación desviados para ambos parentales, siendo de 54,3% para *B. decumbens* y 43,75% para *B. ruziziensis*. Esto puede atribuirse, entre otros factores, a la comigración de fragmentos durante la electroforesis principalmente en el sistema AFLP que se incrementa en especies con genomas poliploides a causa de su complejo patrón de restricción (Wu *et al.* 1992). Además, en general, los sistemas de marcadores codominantes fueron más eficientes para detectar marcadores de dosis múltiples (Cuadro 5), lo que se espera en especies con niveles de ploidía mayores que los diploides.

Un análisis de progenie de un cruce entre *Citrus x Poncirus* resultó en la adición de siete marcadores STS al mapa genético de *Citrus* (Thomas *et al.* 1998). Su localización, en todas las instancias, se encontró en un grupo de ligamiento diferente indicando una amplia distribución de los marcadores STS a través del genoma (Kijas *et al.* 1997). El análisis de la segregación de los alelos de estos marcadores reveló que dos de nueve STS provenientes a partir de microsatélites mostraron una segregación distorsionada; en el caso de este estudio, 13 de 28 marcadores STS aportados presentaron una desviación de la proporción de segregación 1:1. Al

examinar el sentido de la distorsión en la segregación (entre todos los alelos parentales de *B. decumbens* y *B. ruzizensis*), se observó que en la mayoría de los casos, para todos los tipos de marcadores evaluados, el alelo de *B. ruzizensis* se encontraba sub-representado. Esto indica que existe una segregación alélica inequitativa a favor del parental *B. decumbens* independiente del tipo de marcador y también independiente del tipo de polimorfismo que se esté evaluando. Estos resultados también sugieren que debe considerarse la dominancia de *B. decumbens* a la hora de diseñar cruces cuyo objetivo sea la integración de genes de este parental en mejoramiento. Thomas *et al.* (1998) afirman que este fenómeno de dominancia posiblemente es de ocurrencia general en cruces de plantas.

5.3 MAPEO GENÉTICO DE LAS SRM EN *B. decumbens* Y *B. ruzizensis*

Un paso crucial en la construcción de mapas genéticos en especies poliploides es la determinación de las dosis en las que se encuentran los marcadores (Porceddu *et al.* 2002). En *Brachiaria*, esto se realizó hallando la proporción de plantas en la progenie de un cruce que exhibía un alelo de un marcador dado y probando estas proporciones contra las esperadas para varias dosis (específicamente 1:1 para marcadores de dosis sencilla, 3:1 para marcadores de configuración símplex en doble dosis y 5:1 para marcadores dúplex de dosis doble). De esta forma se implementó la estrategia de un pseudo cruce de prueba (pseudotestcross). Esta estrategia de mapeo es conceptualmente sencilla de implementar y puede aplicarse a cualquier tipo de marcador molecular (Grattapaglia & Sederoff 1994). Del total de marcadores moleculares polimórficos entre los parentales, más del 56% no segregó en la progenie como consecuencia de alelos en dosis múltiples en los loci evaluados, mientras que aproximadamente 43% se heredaron como marcadores en dosis sencilla (SDMs). Esto es comparable con los resultados encontrados por Barcaccia *et al.* (2003) que evaluaron 743 loci polimórficos en una población tetraploide híbrida F_1 de *Salix alba* X *Salix fragilis*, y encontraron un 58% de marcadores con proporciones de segregación diferentes de 1:1.

Si se cuenta con numerosos marcadores en la construcción de un mapa de ligamiento, se espera que estos se distribuyan sobre todo el genoma y que los grupos de ligamiento formados correspondan al número cromosómico haploide de la especie bajo estudio (Jones *et*

al. 1997). Así, al suponer que *B. decumbens*, según lo evidenciado en este trabajo (ver secciones 5.2 y 5.4), se trata de una especie con una parte considerable del genoma con segmentos provenientes de dos genomas diferentes (alopoliploides), su número haploide sería aproximado a $n=18$; además, para *B. ruzizensis*, que se conoce su constitución genómica autotetraploide inducida, se esperan un total de nueve cromosomas como número haploide. En los mapas aquí reportados, para *Brachiaria ruzizensis* se obtuvo el primer reporte de su mapa de ligamiento generado además con un software apropiado para su análisis de ligamiento (TetraploidMap). Se obtuvieron nueve grupos de ligamiento como era esperado (Figura 11). Sin embargo su cobertura de 1295,85 cM se encuentra poco saturada, lo que puede haber generado que los grupos de homología observados en este mapa muestren variaciones importantes a medida que se agreguen progresivamente marcadores al mismo.

En el caso de *Brachiaria decumbens*, con el software TetraploidMap, para especies autotetraploides, se obtuvo un mapa de 1680 cM distribuidos en 14 grupos de homología (Figura 12) y una distancia promedio entre marcadores de 9,02 cM frente a un mapa de 20 grupos de ligamiento generado con el software Mapmaker 3.0 (Figura 10), del cual se cubrió un total de 688,7 cM con 117 marcadores y una distancia promedio de 5,8 cM entre marcadores. Para ambos mapas, los grupos obtenidos no correspondieron con el número de cromosomas haploides esperados ni para una autotetraploide ni para una alotetraploide; no obstante, el mapa generado con Mapmaker 3.0 fue mucho más consistente tanto para la estimación de la cobertura total del mapa como para las agrupaciones obtenidas, ya que debido a la prevalencia de sus configuraciones bivalentes en meiosis y su apareamiento cromosómico de aloploidía segmental, se esperarían 18 grupos de ligamiento. En el presente estudio se encontraron 20, y esto puede esperarse por el número de marcadores utilizados, ya que se ha visto en otros estudios cómo, debido a la falta de saturación del mapa, los grupos de ligamiento se fragmentan pues hay espacios vacíos o “brechas” que no se han llenado entre dos grupos que deberían ser uno solo (Kesselli *et al.* 1990).

A pesar de la posibilidad de unir algunos grupos de ligamiento en ambos mapas generados para *B. decumbens* para conseguir el número esperado de cromosomas, se encontró más apropiado coordinar ambos mapas con un rigor similar permitiendo así una comparación al mismo nivel entre los mismos. Se ha reportado en otras especies un exceso de grupos de

ligamiento con relación al número haploide de cromosomas, por ejemplo en *Phaseolus vulgaris* (Nodari *et al.* 1993), *Lactuca sativa* (Kesselli *et al.* 1990) y *Eucalyptus grandis* y *Eucalyptus urophylla* (Grattapaglia & Sederoff 1994).

El hecho que *B. decumbens* tenga cromosomas pequeños (Valle y Savidan 1998), puede explicar el resultado que con 117 marcadores se haya obtenido un número de grupos de ligamiento cercano al esperado según el número haploide. Esto es de especial interés pues para alcanzar un grado de saturación alto posiblemente no sea necesario evaluar un gran número de marcadores, ya que esta cantidad depende del tamaño y número de cromosomas del organismo bajo estudio (Bert *et al.* 1999, citado por Rosero 2005). Esto se confirma con los resultados de Rosero (2005) quien para otra población híbrida con los mismos genotipos parentales utilizados en el presente estudio, obtuvo un total de 19 grupos de ligamiento con 169 marcadores evaluados.

Un total de tres SNPs fueron agregados al mapa de *Brachiaria* con el software TetraploidMap, siendo este el primer registro de ubicación de este tipo de marcador molecular en un mapa de ligamiento de *Brachiaria*. La distribución de los SNPs en los grupos de ligamiento no fue uniforme, ya que estos se asociaron a un mismo grupo en el mapa (GL 7, Figura 12). Sin embargo, hay que anotar que dos de ellos pertenecían a la misma secuencia. Un hecho de agregación similar se reportó previamente en *Phaseolus vulgaris* L. con 130 marcadores SNP, donde estos marcadores se observaron acumulados en algunos grupos de ligamiento (Quintero-Valencia 2007).

La distribución agregada de marcadores moleculares en mapas de ligamiento ha sido reportada en otras especies como en frijol para microsatélites (Blair *et al.* 2003) y para AFLPs por Johnson y Gepts (2002), siendo más frecuente la concentración de ambos tipos de marcadores en el centro de los grupos de ligamiento. En el presente trabajo, en todos los grupos de ligamiento hubo distancias no cubiertas por SNPs, AFLPs ni microsatélites que sí estuvieron cubiertas por parte de los STSs y ESTs en ambos mapas de *B. decumbens* (Figuras 11 y 12). Esto se puede explicar teniendo en cuenta que es un hecho conocido que diferentes tipos de marcadores moleculares mapean preferencialmente partes distintas del genoma (Patzak *et al.* 2007). Por ende, es mejor usar muchos tipos de marcadores moleculares juntos.

En este mismo sentido, Thomas *et al.* (1998) encontraron que el modo de herencia codominante y la amplificación dentro de un rango amplio de cruces para mejoramiento de los marcadores STS sugiere que estos son marcadores ideales para actuar como loci anclados para alinear mapas de ligamiento basados en RFLPs, AFLPs y RAPDs generados en diferentes cruces de mapeo a partir de varios laboratorios. Asimismo, Lem & Lallemand (2003) observaron altos porcentajes de amplificación (81%) a través de varias especies relacionadas, lo que a su vez los convierte en herramientas útiles en estudios de sintenia. También Monna *et al.* (1994) afirman que un número suficiente de STSs permite la combinación de mapas de ligamiento con mapas físicos.

La prueba de independencia constituye la mejor opción para buscar asociación entre un marcador molecular y una característica cualitativa (Myriam C. Duque, *comunicación personal*). Los resultados de la prueba de independencia para cada uno de los marcadores pertenecientes al grupo de ligamiento del SCAR N14 permitieron rechazar la hipótesis nula en la que los marcadores segregarían independientemente, estableciendo una asociación potencial con la apomixis a partir de los datos fenotípicos de 88 individuos. Los resultados indican que el marcador SCAR N14, que detecta el fenotipo apomíctico con un 11% de error, continúa siendo la mejor opción para proyectos de selección asistida por marcadores (MAS, por sus siglas en inglés), lo cual se evidenció en el estudio realizado por Vargas *et al.* (2009), en el que se evaluaron 7031 híbridos de *Brachiaria* en un proyecto de este tipo (MAS) en CIAT.

Según Ripol *et al.* (1999), el problema de construir mapas genéticos en autoploiploides es doble, ya que no sólo se deben ordenar los loci a lo largo de cromosomas individuales, sino que estos cromosomas deben asignarse a grupos homólogos, siendo este último problema únicamente de los autoploiploides. Para esto, los fragmentos en dosis mayores a copia sencilla permiten asignar los cromosomas a grupos homólogos.

La existencia de una aproximación al mapa genético de *Brachiaria* permite la adquisición de información importante para el mejoramiento genético de la especie que va desde la asociación de marcadores con caracteres cualitativos y la localización de los mismos en grupos de ligamiento, hasta la identificación de regiones genómicas asociadas a caracteres

cuantitativos. Además, con la agregación progresiva al mapa de nuevos marcadores microsatélites, AFLPs y RFLPs a los grupos formados por pocos marcadores, será posible realizar un muestreo homogéneo del genoma de la especie y un estudio más profundo y certero de la región asociada con la apomixis.

Con respecto a lo anterior, en este trabajo no se puede descartar la asociación de varios genes con la apomixis. El argumento más relevante presentado en contra de la teoría de un único gen es la pobre recombinación observada alrededor del locus de apomixis. En la gran mayoría de los géneros donde se han llevado a cabo cruces interespecíficos con miras a mapear este locus, se observa multitud de marcadores que muestran frecuencias de recombinación (distancias en el mapa) muy pequeñas o incluso nulas con respecto a la apomixis. En *Pennisetum squamulatum*, se observa que una región de al menos 50Mpb cosegrega con el carácter apomixis y con 20 marcadores moleculares adicionales (Roche *et al.*, 2001). Una región de no recombinación y hemizigosidad es reportada en *Paspalum*; el locus de apomixis cosegrega simultáneamente con 5 marcadores de arroz, marcadores RAPD y RFLP que también muestran altas tasas de ligamiento en *P. notatum*. Y estos son sólo algunos ejemplos.

Pessino *et al.* (1998), tratando de mapear el locus de apomixis con el cruce *B. ruziziensis* X *B. brizantha*, observaron homología de la región del locus de apomixis con regiones del cromosoma 5 del maíz y cromosoma 2 del arroz, indicando posible conservación de esta agrupación entre las gramíneas. Estos autores no lograron hacer un mapeo fino; 3 marcadores RAPD y 2 RFLP cosegregaron con la apomixis y cubrieron una amplia región en la que no se observaba recombinación.

Finalmente, como se observa en las figuras 10, 11 y 12, los marcadores aportados en el presente trabajo relacionados con la meiosis, que muestran expresión diferencial durante el desarrollo reproductivo (Gorrón 2009), se distribuyeron a lo largo de los mapas generados por ambas especies y no se observaron ni en el grupo de ligamiento donde se ubica el SCARN14, ni se encontraron potencialmente asociados con la característica fenotípica por el análisis de asociación con la misma. Esto, por el momento, sólo indica su distribución en el genoma, pero no conlleva a descartar ni a confirmar la herencia monogénica o poligénica de la apomixis.

5.4 COMPORTAMIENTO DE APAREAMIENTO CROMOSÓMICO

En especies poliploides, el apareamiento cromosómico puede ser preferencial y/o al azar sugiriendo un origen genómico alopoliploide, autopoliploide o mixto. Tradicionalmente, los poliploides que presentasen apareamiento cromosómico multivalente se consideraban autopoliploides, mientras que aquellas con apareamiento cromosómico bivalente se creían alotetraploides. Este método se ha probado poco fiable debido a que en ocasiones los cromosomas homólogos en autotetraploides se asocian al azar en bivalentes antes que en multivalentes (Qu & Hancock 1998). Recientemente se han propuesto métodos de identificación del tipo de poliploidía más confiables que consisten en la comparación del número de loci ligados en fase de acoplamiento vs fase de repulsión (Wu *et al.* 1992) y en la comparación de las proporciones de segregación de marcadores en una sola dosis o en múltiples dosis (Da Silva *et al.* 1993, ver sección 5.2). Ambos han sido utilizados aquí y han arrojado resultados consistentes.

El análisis pareado de los grupos co-segregacionales ligados en acoplamiento y repulsión indicó que 13 cromosomas de 20 (65%) aparean preferencialmente en el parental *B. decumbens*, los otros grupos de ligamiento presentaron un valor de X^2 que se desvió significativamente de 1:1. Se ha sugerido que las proporciones de marcadores ligados en repulsión a marcadores ligados en acoplamiento pueden usarse para distinguir entre autopoliploides y alopoliploides, debido a que la mitad de los marcadores de un cromosoma estarán en fase de acoplamiento entre sí, y en fase de repulsión con la otra mitad de los marcadores si hay apareamientos sólo entre dos cromosomas. Pero si el apareamiento se da entre más de dos cromosomas, la proporción entre marcadores en fase de acoplamiento entre sí y en repulsión con otros es diferente de 1:1. Además, debido a que los ligamientos en fase de repulsión son mucho más difíciles de detectar en autopoliploides que en alopoliploides (Wu *et al.* 1992; Qu & Hancock 2001), la prueba de Mather (1957) se verá afectada negativamente, ya que perdería su capacidad de distinguir entre autopoliploides y alopoliploides. Así que es importante tener en cuenta que con el tamaño poblacional evaluado en este trabajo ($n=176$), es posible detectar ligamientos en fase de repulsión con una confiabilidad mayor al 95% y con un error de variación bajo si se tiene en cuenta que se trata de una población con nivel de ploidía igual a cuatro (Wu *et al.* 1992).

También Wu *et al.* (1992) infirieron a partir de la prueba de Mather (1957) que una prueba de X^2 significativamente diferente ya fuera de 1:1 ó de 0:1, sería indicativo de que los cromosomas en el grupo de ligamiento pueden tener apareamiento preferencial parcial o apareamientos cromosómicos multivalentes; asimismo, un valor de X^2 no significativo para una proporción 1:1 indicará apareamiento cromosómico preferencial bivalente, y para 0:1 indicará asociación de cromosomas homólogos al azar. En esta línea de análisis se tiene para el presente estudio que habiéndose detectado un número suficiente de marcadores en dosis sencilla en una población híbrida con el tamaño apropiado y agrupado en grupos co-segregacionales, los resultados para la prueba de X^2 de Mather (1957) sugerirían que *B. decumbens* es una especie con origen genómico mixto, lo que confirmaría los resultados producto tanto de análisis citológicos (Mendes – Bonato *et al.* 2001) como los análisis de las proporciones de segregación (Ver apartado 5.2). Con respecto a esto, Allard (1960) mencionó en su trabajo sobre herencia en autoploidoides que probablemente algunos estudios revelen casos de plantas cuyo comportamiento cromosómico indique una constitución intermedia entre auto y alotetraploidía.

La misma prueba de Mather (1957) fue aplicada por Barcaccia *et al.* (2003) al estimar las fases de ligamiento usando una estrategia de pseudocruce de prueba en ambos sentidos similar a la aplicada en este trabajo (en un solo sentido) en un cruce de *Salix alba* X *Salix fragilis*. En los grupos co-segregacionales que identificaron para ambas especies, encontraron un número comparable de marcadores ligados en acoplamiento y repulsión. Estos hallazgos les sugirieron entonces que la mayoría de cromosomas tienen apareamiento preferencial como ocurre en las especies alotetraploides que exhiben herencia disómica. Asimismo, Rosero (2005) en un análisis de 19 grupos co-segregacionales, encontró que 15 de ellos mostraron una desviación no significativa ($p < 0.05$) a la proporción 1:1 (marcadores acople vs repulsión), lo que le llevó a sugerir un posible origen alotetraploide de la especie *B. decumbens* por el comportamiento cromosómico preferencial observado en la mayoría de los grupos.

No se sabe con certeza si la diploidización, que corresponde al evento observado para *B. decumbens*, se deba a la acumulación de mutaciones menores o mayores que regulan las relaciones de apareamiento cromosómico. Sin embargo, se sabe que se han descrito

poliploides con apareamiento preferencial a diferentes niveles, lo cual lleva a inferir que la diploidización puede ser un proceso gradual (Qu & Hancock 2001).

El uso de SDMs como estrategia para la construcción de mapas de ligamiento es ampliamente aceptada y empleada hoy en día por la comunidad científica (Wu *et al.* 1992, Porceddu *et al.* 2002, Albertini *et al.* 2003, Barcaccia *et al.* 2003). Esto se debe a que la teoría estadística para el análisis a diferentes niveles de ploidía y para las diversas constituciones genéticas no se encuentra bien establecida (Hackett *et al.* 1998) y se carece de programas estadísticos que puedan realizar análisis para cada especie según sus características propias de ploidía. A la fecha, existe un programa para el análisis de ligamiento en especie autotetraploides (TetraploidMap) desarrollado por Hackett *et al.* (2007); sin embargo no existen programas para el análisis de especies con constitución genómica mixta ni autopoliploide para niveles de ploidía mayores a cuatro, lo que retrasa el estudio de este tipo de genomas, entre los que presumiblemente se encuentra *B. decumbens*.

6. CONCLUSIONES

Los marcadores STS permitieron una buena detección de polimorfismo en la población segregante de *Brachiaria* conformada por 176 individuos, confirmando que constituyen una herramienta nueva y adecuada para la construcción de mapas y el establecimiento de grupos de homología cromosómica.

El análisis por marcadores moleculares codominantes permitió determinar una baja variabilidad genética de *B. ruzizensis* con respecto a *B. decumbens*.

En este trabajo se realizó un aporte de 35 loci derivados de las Secuencias Relacionadas con la Meiosis (SRM), a los mapas genéticos de *B. decumbens* y *B. ruzizensis*, originados a partir de marcadores codominantes, entre ellos 28 STSs, 6 SNPs y una delección de una base.

Por primera vez se reportaron marcadores de tipo SNP, STS e InDel en el mapa molecular de *B. decumbens*.

Se construyó un mapa molecular de *Brachiaria decumbens* empleando marcadores microsatélites, AFLPs, ESTs, STSs, SNPs, un InDel y el SCAR N14, a un LOD=8.0 y una distancia máxima de 25 cM.

Se realizó el primer reporte del mapa molecular de *Brachiaria ruzizensis* empleando 61 marcadores de tipo dominante y codominante con un software especializado en su tipo y nivel de ploidía, o sea, autotetraploide.

Del análisis de frecuencias alélicas hecho con la población F1, se pudo confirmar que el parental *B. ruzizensis* es un clon autotetraploide, lo que es consistente con lo que se sabe de su origen (Swenne *et al.* 1981); adicionalmente, los resultados obtenidos para *B. decumbens* (CIAT 606) sustentan la evidencia de que en esta accesión existe una herencia de aloploidía por segmentos en una parte considerable de su genoma.

Los estimativos calculados a partir de la prueba de Mather (1957) de la fase de ligamiento de los marcadores alélicos de los grupos co-segregacionales, sugieren que la especie *B. decumbens* tiene un comportamiento de pareo cromosómico característico de especies de constitución genómica mixta.

7. RECOMENDACIONES

Con base en lo encontrado en los mapas de ligamiento de ambos parentales, es necesario continuar con la saturación de los mismos mediante marcadores de tipo codominante, especialmente en el caso de *B. decumbens* para la región asociada con la apomixis y otras características de interés.

BIBLIOGRAFÍA

- ADAMS, M.D.; J.M. KELLEY, J.D. GOCAYNE, M. DUBNICK, M.H. POLYMEROPOULOS, H. XIAO, C.R. MERRIL, A. WU, B. OLDE, R.F. MORENO, A.R. KERLAVAGE, W.R. McCOMBIE & J.C. VENTER. 1991. Complementary DNA Sequencing: Expressed Sequence Tags and Human Genome Projects. *Science*, 252: 1651 – 1656.
- ALBERTINI, E.; A. PORCEDDU, G. MARCONI, G. BARCACCIA, L. PALLOTTINI & M. FALCINELLI. 2003. Microsatellite-AFLP for genetic mapping of complex polyploids. *Genome*, 46 (5): 824–832.
- ALBERTINI, E.; G. MARCONI, L. REALE, G. BARCACCIA, A. PORCEDDU, F. FERRANTI & M. FALCINELLI. 2005. *SERK* and *APOSTART*. Candidate genes for Apomixis in *Poa pratensis*. *Plant physiology*, 138: 2185 – 2199.
- ALLARD, R.W. 1960. Principles of Plant Breeding. New York & London, John Wiley & Sons, Inc. p. 385 – 399.
- ALVES, E.R.; V.T.C. CARNEIRO & A.C.G. ARAUJO. 2001. Direct evidence of pseudogamy in apomictic *Brachiaria brizantha* (Poaceae). *Sexual Plant Reproduction*, 14: 207 – 212.
- ASKER, S.E. & L. JERLING. 1992. Apomixis in plants. CRC Press, Boca Raton. 298 p.
- BARCACCIA, G.; S. MENEGHETTI, E. ALBERTINI, L. TRIEST & M. LUCCHIN. 2003. Linkage mapping in tetraploide willows: segregation of molecular markers and estimation of linkage phases support an allotetraploid structure of *Salix alba* X *Salix fragilis* interspecific hybrids. *Heredity*, 90: 169 – 180.
- BARNARD, C. 1969. Herbage plant species. Australian Herbage Plant Registration Authority. CSIRO. Canberra, ACT, Australia. 154 p.
- BERNARDO, M. 2008. Molecular Markers and Selection for Complex Traits in Plants: Learning from the last 20 years. *Crop Science*, 48: 1649 – 1664.

- BERTHAUD, J. Apomixis and the Management of Genetic Diversity. En: Savidan, Y., J.G. Carman & T. Dresselhaus, (eds.). 2001. *The Flowering of Apomixis: From mechanisms to Genetic Engineering*. Mexico, D.F.: CIMMYT, IRD, European Commission DG VI (FAIR). p. 8 – 23.
- BHAT, V.; K.K. DWIVEDI, J.P. KHURANA & S.K. SOPORY. 2005. Apomixis: An Enigma with Potential Applications. *Current Science*, 89 (11): 1879 – 1893.
- BICKNELL, R.A.; N.K. BORST & A.M. KOLTUNOW. 2000. Monogenic inheritance of apomixis in two *Hieracium* species with distinct developmental mechanisms. *Heredity*, 84: 228 – 237.
- BILINSKY, C.A.; J.J. MILLER & S.C. GIRIVITZ. 1983. Events Associated with Restoration by Zinc of Meiosis in Apomictic *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 155 (3): 1178-1184.
- BLAIR, M.W.; F. PEDRAZA, H.F. BUENDÍA, E. GAITÁN-SOLÍS, S.E. BEEBE, P. GEPTS & J. TOHME. 2003. Development of a genome-wide anchored microsatellite map for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 107 (8): 1362 – 1374.
- CALISTO, V.; V.A. FUZINATTO, H.G. MESSAGE, A.B. MENDES – BONATO, K.R. BOLDRINI, M.S. PAGLIARINI & C.B. Valle. 2008. Desynapsis and precocious cytokinesis in *Brachiaria humidicola* (Poaceae) compromise meiotic division. *Journal of genetics*, 87 (1): 27 – 31.
- CARMAN, J.G.; C.F. CRANE & O. RIERA-LIZARAZU. 1991. Comparative histology of cell walls during meiosis and apomictic megasporogenesis in two hexaploid australasian *Elymus* species. *Crop Science*, 31: 1527 – 1532.
- CARMAN, J.G. 1997. Asynchronous expression in duplicate genes in angiosperms may cause apomixis, bipospority, tetraspority, and polyembryony. *Biological Journal of the Linnean Society*, 61: 51 – 94.
- CHEN, H.B.; J.M. MARTIN, M. LANVIN & L.E. TALBERT. 1994. Genetic diversity in hard red spring wheat based on sequence-tagged-site PCR markers. *Crop Science*, 34: 1628 – 1632.
- CHEN, J.; M.A. IANNONE, M. LI, J.D. TAYLOR, P. RIVERS, A.J. NELSEN, K.A. SLENTZ-KESLER, A. ROSES & M.P. WEINER. 2000. A Microsphere-Based Assay for Multiplexed Single Nucleotide Polymorphism Analysis Using Single Base Chain Extension. *Genome Research*, 10: 549 – 557.

- COLLARD, B.; M. JAHUFER, J. BROUWER & E. PANG. 2005. An introduction to markers, Quantitative Trait Loci (QTL) Mapping and Marker-Assisted Selection for Crop Improvement: The Basic Concepts. *Euphytica*, 142: 169 – 196.
- CRANE, C.F. Classification of Apomictic Mechanisms. En: Savidan, Y., J.G. Carman & T. Dresselhaus, (eds.). 2001. *The Flowering of Apomixis: From mechanisms to Genetic Engineering*. Mexico, D.F.: CIMMYT, IRD, European Comission DG VI (FAIR). p. 24 – 43.
- DA SILVA, J.A.G.; M.E. SORRELLS, W.L. BURNQUIST & S.D. TANKSLEY. 1993. RFLP linkage map and genome analysis of *Saccharum spontaneum*. *Genome*, 36: 782 – 791.
- DELLAPORTA, S.; I. WOODS & J.B. HICKS. 1983. A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1 (14): 19 – 21.
- FERGUSON, J.E. & L.V. CROWDER. Cytology and breeding behavior of *Brachiaria ruziziensis* Germain et Evrard. *Crop Science*, 14: 893 – 894.
- FERREIRA, M.E. & D. GRATTAPAGLIA. 1998. Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. Brasilia: EMBRAPA – CENARGEN, Brasil. 218 p.
- FISHER, M.J. & P.C. KERRIDGE. Agronomía y Fisiología de las especies de *Brachiaria*. En: Miles, J.W., B.L. Maass & C.B. Valle (eds.). 1998. *Brachiaria: Biología, Agronomía y Mejoramiento*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT): Cali – Colombia, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa): Campo Grande – Brasil, Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte (CNPGC). Publicación CIAT No. 295, Colombia. p. 46 – 57.
- GAITÁN-SOLÍS, E.; C. QUIGLEY & J. TOHME. 2004. Single Nucleotide Polymorphisms in CIAT's crops: Genotyping implementation on Luminex¹⁰⁰. Proyecto SB-2, Informe Anual 2004, CIAT. p. 152 – 154.
- GHAREYAZIE, B.; N. HUANG, G. SECOND, J. BENNETT & G.S. KHUSH. 1995. Classification of rice germplasm. I. Analysis using ALP and PCR-based RFLP. *Theoretical and Applied Genetics*, 91: 218 – 227.

- GILPIN, B.J.; J.A. McCALLUM, T.J. FREW & G.M. TIMMERMAN-VAUGHAN. 1997. A linkage map of the pea (*Pisum sativum* L.) genome containing cloned sequences of known function and expressed sequence tags (ESTs). *Theoretical and Applied Genetics*, 95: 1289 – 1299.
- GIRALDO, O.X. 2000. Construcción del Mapa genético de *brachiaria* utilizando microsatélites y AFLPs. Facultad de Ciencias, Programa académico de Biología, Universidad del Valle, Cali. 96 p.
- GORRÓN, E.A. 2009. Identificación de transcritos expresados diferencialmente entre plantas apomícticas y sexuales de *Brachiaria* sp. en etapas tempranas del desarrollo reproductivo. Tesis de Maestría. Universidad de los Andes. Facultad de Ciencias Biológicas. Maestría en Ciencias Biológicas. Bogotá, Colombia. 193 p.
- GRANT, D. & R.C. SHOEMAKER. 2001. Plant Gene Mapping Techniques. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1: 1 – 6.
- GRATTAPAGLIA, D. & R. SEDEROFF. 1994. Genetic Linkage Maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* Using a Pseudo-Testcross: Mapping Strategy and RAPD markers. *Genetics*, 137: 1121 – 1137.
- GRIMANELLI, D.; J. TOHME & D. GONZÁLEZ DE LEÓN. Chapter 6: Applications of Molecular Genetics in Apomixis Research. 83– 94 p. En: Savidan, Y., J.G. Carman & T. Dresselhaus, (eds.). 2001. *The Flowering of Apomixis: From Mechanisms to Genetic Engineering*. Mexico, D.F.: CIMMYT, IRD, European Comission DG VI (FAIR). p. 83 – 94.
- GROSSNIKLAUS, U. From Sexuality to Apomixis: Molecular and Genetic Approaches. 168 – 211 p. En: Savidan, Y., J.G. Carman & T. Dresselhaus, (eds.). 2001. *The Flowering of Apomixis: From Mechanisms to Genetic Engineering*. Mexico, D.F.: CIMMYT, IRD, European Comission DG VI (FAIR). p. 168 – 211.
- HACKETT, C.A.; I. MILNE, J.E. BRADSHAW & Z. LUO. 2007. TetraploidMap for Windows: Linkage Map Construction and QTL Mapping in Autotetraploid Species. *Journal of Heredity*, 98 (7): 727 – 729.
- HALL, T.A. 1999. BioEdit: A User-Friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95 – 98.

- HARE, M.D.; P. TATSAPONG & S. PHENGPHEET. 2009. Herbage yield and quality of *Brachiaria* cultivars, *Paspalum atratum* and *Panicum maximum* in north-east Thailand. *Tropical Grasslands*, 43: 65 – 72.
- HONIGBERG, S.M. & R.E. ESPOSITO. 1994. Reversal of cell determination in yeast meiosis: postcommitment arrest allows return to mitotic growth. *Proceedings of the Natural Acadademy of Sciences of the United States of America*, (9) 1: 6559 – 6563.
- JANK, L.; R.M.S. RESENDE & C.B. do VALLE. 2005. Genética em Pastagem. Dossiê Brasil Rural. Revista USP, 64 (dez./2004 – fev./2005): 86 – 93.
- JEFFERSON, R.A. & R. BICKNELL. 1996. The potential impacts of apomixis: A molecular genetics approach. En: *The Impact of Plant Molecular Genetics*. B.W.S. Sobral (ed)., Birkhäuser, Boston. p. 87-101.
- JOHNSON, W.C. & P. GEPTS. 2002. The role of epistasis in controlling seed yield and other agronomic traits in an Andean x Mesoamerican cross of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Euphytica*, 125: 69 – 79.
- JONES, N.; H. OUGHAM & H. THOMAS. 1997. Markers and Mapping: We are all genetics now. *New Phytology*, 137: 165 – 177.
- KASSIR, Y.; D. GRANOT & G. SIMCHEN. 1988. IME1, a positive regulator gene of meiosis in *S. cerevisiae*. *Cell*, 52: 853 – 862.
- KELLER – GREIN, G.; B.L. MAASS & J. HANSON. Variación Natural en *Brachiaria* y Bancos de Germoplasma Existentes. En: Miles, J.W., B.L. Maass & C.B. Valle (eds.). 1998. *Brachiaria: Biología, Agronomía y Mejoramiento*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT): Cali – Colombia, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa): Campo Grande – Brasil, Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte (CNPGC). Publicación CIAT No. 295, Colombia. p. 18 – 45.
- KESSELLI, R.V.; I. PARAN & R.W. MICHELMORE. 1990. Genetic linkage map of lettuce (*Lactuca sativa*, 2n = 18), pp. 6100 – 6102 en *Genetic Maps*, editado por S.J. O'Brien. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

- KHUSH, G. S.; D.S. BRAR, J. BENNETT & S.S. VIRMANI. 1994. Apomixis for rice improvement. En *Apomixis: Exploiting Hybrid Vigour in Rice*, International Rice Research Institute (IRRI), Philippines. p. 1–22.
- KIJAS, J.M.H.; M.R. THOMAS, J.C.S. FOWLER & M.L. ROOSE. 1997. Integration of trinucleotide microsatellites into a linkage map of *Citrus*. *Theoretical and Applied Genetics*, 94: 701 – 706.
- KIM, S.M. & J.K. SOHN. 2005. Identification of a Rice Gene (*Bph1*) Conferring Resistance to Brown Planthopper (*Nilaparvata lugens* Stal) using STS Markers. *Molecules and Cells*, 20 (1): 30 – 34.
- KOLTUNOW, A.M. 1993. Apomixis: embryo sacs and embryo formed without meiosis or fertilization in ovules. *Plant Cell*, 5: 1425 – 1437.
- KOLTUNOW, A.M. & U. GROSSNIKLAUS. 2003. Apomixis: A Developmental Perspective. *Annual Review of Plant Biology*, 54: 547 – 574.
- LANDER, E.S.; P. GREEN, J. ABRAHAMSON, A. BARLOW, M.J. DALY, S.E. LINCOLN & L. NEWBURG. 1987. MAPMAKER: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics*, 1: 174 – 181.
- LEE, S.H.; D.R. WALKER, P.B. CREGAN & H.R. BOERMA. 2004. Comparison of four flow cytometric SNP detection assays and their use in plant improvement. *Theoretical and Applied Genetics*, 100: 167 – 174.
- LEM, P. & J. LALLEMAND. 2003. Grass consensus STS markers: an efficient approach for detecting polymorphism in *Lolium*. *Theoretical and Applied Genetics*, 107: 1113 – 1122.
- LORIEUX, M. 2007. MapDisto: A Free User-Friendly Program For Computing Genetic Maps. Computer demonstration (P958) given at the Plant and Animal Genome XV conference, Jan 13-17 2007, San Diego, CA. URL: <http://mapdisto.free.fr/>.
- LOTAN, T.; M. OHTO, K.M. YEE, M.A. WEST, R. LO, *et al.* 1998. *Arabidopsis* *LEAFY COTYLEDON1* is sufficient to induce embryo development in vegetative cells. *Cell*, 93: 1195 – 1205.

- LUO, M.; P. BILODEAU, A. KOLTUNOW, E.S. DENNIS, W. J. PEACOCK & A.M. CHAUDHURY. 1999. Genes controlling fertilization-independent seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96 (1): 296 – 301.
- LUTTS, S.; J. NDIKUMANA & B.P. LOUANT. 1991. Fertility of *Brachiaria ruziziensis* in interspecific crosses with *Brachiaria decumbens* and *Brachiaria brizantha*: meiotic behavior, pollen viability and seed set. *Euphytica*, 57: 267 – 274.
- MA, X. & J. GUSTAFSON. 2005. Genome evolution of Allopolyploids: A process of Cytological and Genetic Diploidization. *Cytogenetic and Genome Research*, 109: 236 – 249.
- MAASS, B.L. 1998. Identificación y Nomenclatura de las Especies de *Brachiaria*. En: Miles, J.W., B.L. Maass & C.B. Valle (eds.). 1998. p. ix- xiii. *Brachiaria: Biología, Agronomía y Mejoramiento*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT): Cali – Colombia, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa): Campo Grande – Brasil, Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte (CNPGC). Publicación CIAT No. 295, Colombia.
- MATHER, K. 1957. The Measurement of Linkage in Heredity. Methuen & Co. Ltda, Londres. 149 p.
- MENDES-BONATO, A.B.; M.S. PAGLIARINI, N. da SILVA & C.B. do VALLE. 2001. Meiotic instability in invader plants of signal grass *Brachiaria decumbens* Stapf. (Gramineae). *Acta Scientiarum*, 23 (2): 619 – 625.
- MENDES-BONATO, A.B.; M.S. PAGLIARINI & C.B. do VALLE. 2006. Abnormal Spindle Orientation during microsporogenesis in an interspecific *Brachiaria* (Gramineae) Hybrid. *Genetics and Molecular Biology*, 29 (1): 122 – 125.
- MILES, J.W. & C.B. do VALLE. 1998. Manipulación de la Apomixis en el Mejoramiento de *Brachiaria*. En: Miles, J.W., B.L. Maass & C.B. Valle (eds.). 1998. p. 181 – 195. *Brachiaria: Biología, Agronomía y Mejoramiento*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT): Cali – Colombia, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa): Campo Grande – Brasil, Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte (CNPGC). Publicación CIAT No. 295, Colombia.

- MILES, J.W.; C.B. do VALLE, I.M. RAO, V.P.B. EUCLIDES. 2004. Brachiariagrasses. p. 745 – 783. En: L.E. Moser, B.L. Burson & L.E. Sollenberg (eds.). *Warm Season (C4) Grasses*, Agronomy Monographs no. 45. ASA, CSSA, SSSA, Madison, WI, USA.
- MOHAN, M.; N. SURESH, A. BHAGWAT, T.G. KRISHNA, M. YANO, C.R. BHATIA & T. SASAKI. 1997. Genome Mapping, Molecular Markers and Marker Assisted Selection in crop plants. *Molecular Breeding*, 3: 87 – 103.
- MONNA, L.; A. MIYAO, T. INOUE, S. FUKOKA, M. YAMAZAKI, H.S. ZHONG, T. SASAKI & Y. MINOBE. 1994. Determination of RAPD Markers in Rice and their conversion into Sequence Tagged Sites (STSs) and STS-Specific Primers. *DNA RESEARCH*, 1: 139 – 148.
- MORENO, M.I. 2005. Mapeo fino de la región del gen CMD2 el cual confiere resistencia a la enfermedad del mosaico de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz) y otros avances hacia su clonación posicional. Tesis (Magister en Ciencias Biológicas). Universidad del Valle, Facultad de Ciencias, Programa Académico de Biología, Santiago de Cali, CO. 145 p.
- MORRONE, O. & F.O. ZULOAGA. 1992. Revisión de las especies sudamericanas nativas e introducidas de los géneros *Brachiaria* y *Urochloa* (Poaceae: Panicoideae: Paniceae). *Darwiniana*, 31: 43 – 109.
- MORRONE, O. & F.O. ZULOAGA. 1993. Sinopsis del género *Urochloa* (Poaceae: Panicoideae: Paniceae) para México y América Central. *Darwiniana*, 32: 59 – 75.
- NODARI, R.O.; S.M. TSAI, R.L. GILBERTSON & P. GEPTS. 1993. Towards an integrated linkage map of common bean. II. Development of an RFLP-based linkage map. *Theoretical and Applied Genetics*, 85: 513 – 520.
- NOGLER, G.A. 1984. Gametophytic apomixis. En: Embriology of angiosperms (ed. BM Johri). Springer Verlag, Berlin. p. 475 – 518.
- NUNES, S.G.; A. BOOCK, M.I. de O. PENTEADO & D.T. GOMES. 1984. *Brachiaria brizantha* cv. Marandú. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA vinculada ao Ministério da Agricultura. Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte – CNPGC, Campo Grande, MS. 31 p.

- ORAM, R.N. (comp.) 1990. Register of Australian herbage plant cultivars. 3rd ed. Australian Herbage Plant Registration Authority, Division of Plant Industry, CSIRO, East Melbourne, Vic., Australia. 304p.
- OSBORN, T.; J. PIRES, J. BIRCHLER, D. AUGER, Z. CHEN, H. LEE, L. COMAI, A. MADLUNG, R. DOERGE, V. COLOT & R. MARTIENSEN. 2003. Understanding Mechanism of Novel Gene Expression in Polyploids. *Trends in Genetics*, 19: 141 – 147.
- OWUSU, K. 2008. Expressed Sequence Tags (ESTs) and Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs): Emerging molecular marker tools for improving agronomic traits in plant biotechnology. *African Journal of Biotechnology*, 7(4): 331 – 341.
- OZIAS-AKINS, P.; D. ROCHE & W.W. HANNA. 1998. Tight clustering and hemizyosity of apomixis-linked molecular markers in *Pennisetum squamulatum* implies genetic control of apospory by a divergent locus that may have no allelic form in sexual genotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95 (9): 5127 – 5132.
- OZIAS-AKINS, P. & P.J. van DIJK. 2007. Mendelian Genetics of Apomixis in Plants. *Annual Review of Genetics*, 41: 509 – 537.
- PATZAK, J.; L. VRBA & J. MATUOSEK. 2007. New STS molecular markers for assessment of genetic diversity and DNA fingerprinting in hop (*Humulus lupulus* L.). *Genome*, 50: 15 – 25.
- PEDRAZA, G.F. 1995. Hacia la localización del gen de Apomixis en *Brachiaria* usando marcadores moleculares RAPD. Tesis de Grado. Facultad de Ciencias, Universidad nacional de Colombia. Palmira, Valle del Cauca, Colombia. 70 p.
- PENNELL, R.I. & K.A. ROBERTS. 1990. Sexual development in the pea is presaged by altered expression of arabinogalactan protein. *Nature*, 334: 547 – 549.
- PEROTTI, E. & O. LEBLANC. 2006. En: France and the CGIAR: Delivering scientific results for agricultural development. D. Rochi (Editor). Consultative Group on International Agricultural Research. CGIAR, Washington, D.C., USA. 169 p.

- PESSINO, S.C.; J.P.A. ORTIZ, O. LEBLANC, C.B. do VALLE, C. EVANS & M.D. HAYWARD. 1997. Identification of a maize linkage group related to apomixis in *Brachiaria*. *Theoretical and Applied Genetics*, 94: 439 – 444.
- PESSINO, S.C.; C. EVANS, J.P.A. ORTIZ, I. ARMSTEAD, C.B. do VALLE & M.D. HAYWARD. 1998. A genetic map of the apospory region in *Brachiaria* hybrids: identification of two markers closely associated with the trait. *Hereditas*, 128: 153 – 158.
- PESSINO, S.C.; F. ESPINOZA, E.J. MARTÍNEZ, J.P.A. ORTIZ, E.M. VALLE & C.L. QUARÍN. 2001. Isolation of cDNA clones differentially expressed in flowers of apomictic and sexual *Paspalum notatum*. *Hereditas*, 134: 35 – 42.
- PINEDA, R.P. 1999. Aislamiento y Caracterización de Secuencias Microsatélites en *Brachiaria decumbens* Stapf. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia. Medellín, Antioquia, Colombia. 102 p.
- PORCEDDU, A.; E. ALBERTINI, G. BARCACCIA & M. FALCINELLI. 2002. Linkage mapping in apomictic and sexual Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.) genotypes using a two-way pseudotestcross strategy based on AFLP and SAMPL markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 104: 273 – 280.
- QU, L. & J.F. HANCOCK. 1998. Evolution in an autopolyploid group displaying predominantly bivalent pairing at meiosis: genomic similarity of diploid *Vaccinium darrowi* and autotetraploid *V. corymbosum*. *American Journal of Botany*, 85: 698 – 703.
- QU, L. & J.F. HANCOCK. 2001. Detecting and mapping repulsion-phase linkage in polyploids with polysomic inheritance. *Theoretical and Applied Genetics*, 103: 136 – 143.
- QUACKENBUSH, J. 2002. Microarray data normalization and transformation. *Nature Genetics Supplement*, 32: 496 – 501.
- QUINTERO-VALENCIA, C.M. 2007. Validación experimental, saturación del mapa genético y estudio piloto de flujo de genes en el frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) con polimorfismos de un nucleótido (SNPs). Tesis (M.Sc.). Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Escuela de Posgrados, Palmira, Valle del Cauca, CO. 110 p.

- RAFALSKI, A. 2002. Applications of single nucleotide polymorphism in crop genetics. *Current Opinion in Plant Biology*, 5: 94 - 100.
- RAVI, M.; M.P.A. MARIMUTHU E I. SIDDIQI. 2008. Gamete formation without meiosis in *Arabidopsis*. *Nature*, 451: 1121 – 1125.
- RENVOIZE, S.A.; W.D. CLAYTON & C.H.S. KABUYE. Morfología, Taxonomía y Distribución Natural de *Brachiaria* (Trin.) Griseb. En: Miles, J.W., B.L. Maass & C.B. Valle (eds.). 1998. p. 1 – 17. *Brachiaria: Biología, Agronomía y Mejoramiento*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT): Cali – Colombia, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa): Campo Grande – Brasil, Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte (CNPGC). Publicación CIAT No. 295, Colombia.
- RICHARDS, A.J. 2003. Apomixis in Flowering Plants: An Overview. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B*, 358: 1085 – 1093.
- RIPOL, M.; G. CHURCHILL, J. DA SILVA & M. SORRELLS. 1999. Statistical Aspects of genetic mapping in Autopolyploids. *Gene*, 235: 31 – 41.
- RISSE-PASCOTTO, C.; D.V. MENDES-BONATO, N. SILVA, M.S. PAGLIARINI & C.B. do VALLE. 2006. Evidence of Allopolyploidy in *Brachiaria brizantha* (Poaceae: Paniceae) through chromosome arrangement at metaphase plate during microsporogenesis. *Genetics and Molecular Research*, 5 (4): 797 – 803.
- ROCHA, P.; J. VARGAS, N. PALACIOS, F. PEDRAZA, A. BERNAL, M. ESCANDON, J.W. MILES & J. TOHME. 1994. Mapping the apomixis gene in *Brachiaria*. Assessing and Enhancing Agrobiodiversity through biotechnology. Proyecto SB-2, Reporte Annual, CIAT. p. 105 – 110.
- ROCHE, D.; Z. CHEN, W.W. HANNA & P. OZIAS-AKINS. 2001. Non-mendelian transmission of an apospory-specific genomic region in a reciprocal cross between sexual pearl millet (*Pennisetum glaucum*) and an apomictic F₁ (*P. glaucum* x *P. squamulatum*). *Sexual Plant Reproduction*, 13: 217 – 223.

- RODRIGUES, J.C.M.; G.C. CABRAL, D.M.A. DUSI, L.V. de MELLO, D.J. RIGDEN & V.T.C. CARNEIRO. 2003. Identification of differentially expressed cDNA sequences in ovaries of sexual and apomict plants of *Brachiaria brizantha*. *Plant Molecular Biology*, 53: 745 – 757.
- ROSERO, L.C. 2005. Mapeo de QTL (Quantitative Trait Loci) asociados a Resistencia a Aluminio en *Brachiaria sp.* Trabajo de Grado. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. 80 p.
- SAS Institute Inc. 2008. SAS OnlineDoc® 9.1.3. Cary, NC: SAS Institute Inc.
- SAVIDAN, Y. 1982. Nature et heredité de l'apomixie chez *Panicum maximum Jacq.* Tesis de doctorado. Universidad de París XI. 166 p.
- SAVIDAN, Y.; J.G. CARMAN & T. DRESSELHAUS. 2001. Transfer of apomixis through wide crosses. En: The flowering of apomixis: From mechanisms to genetic engineering. CIMMYT, Houston, Texas. p. 153 – 167.
- SAVIDAN, Y.; J.W. MILES & C.B. do VALLE. 2006. Apomixis at work: Breeding tropical forage grasses. En: France and the CGIAR: Delivering scientific results for agricultural development. D. Rochi (Editor). Consultative Group on International Agricultural Research. CGIAR, Washington, D.C., USA. 169 p.
- SCHLÖTTERER, C. 2004. The Evolution of Molecular Markers – Just a matter of fashion? *Nature Reviews*, 5: 63 – 69.
- SOLTIS, P.S. & D.E. SOLTIS. 2000. The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97 (13): 7051 – 7057.
- SUÁREZ, H.G.; J. VARGAS, A.F. GUTIÉRREZ, G. GALLEGU, M.C. DUQUE & J. TOHME. 2008. CIAT, Informe Anual, Proyecto Agrobiodiversidad y Biotecnología. Cali, Colombia.
- SWENNE, A.; B.P. LOUANT & M. DUJARDIN. 1981. Induction par la colchicine des formes autotetraploides chez *Brachiaria ruziziensis* German et Evrard (Graminée). *Agronomie Tropical*, 36 (2): 134 – 141.

- TALBERT, I.E.; N.K. BLAKE, P.W. CHEE, T.K. BLAKE & G.M. MAGYAR. 1994. Evaluation of "Sequence – Tagged Site" PCR products as molecular markers in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 87: 789 – 794.
- THOMAS, M.R.; N.S. SCOTT, R. BOTTA & J.M.H. KIJAS. 1998. Sequence Tagged Sites in Grapevine and Citrus. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 67 (6): 1189 – 1192.
- TOHME, J.; N. PALACIOS, S. LENIS & W. ROCA. 1996. Applications of biotechnology to *Brachiaria*. *Brachiaria: Biology, Agronomy and Improvement*. J.W. Miles, B.L. Maas & C.B. Valle. Cali, Colombia, CIAT. p. 196 – 204.
- TORRES-GONZÁLEZ, A.M. & C.M. MORTON. 2005. Molecular and morphological phylogenetic analysis of *Brachiaria* and *Urochloa* (Poaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 37: 36 – 44.
- TRAGOONRUNG, V.; KANAZIN, P.M. HAYES & T.K. BLAKE. 1992. Sequence – Tagged – Site facilitated PCR for Barley genome mapping. *Theoretical and Applied Genetics*, 84: 1002 – 1008.
- TUCKER, M.R.; A.C. ARAUJO, N.A. PAECH, V. HECHT, E.D.L. SCHMIDT, J.B. ROSSEL, S.C. de VRIES & A.M. KOLTUNOW. 2003. Sexual and Apomictic Reproduction in *Hieracium* subgenus *Pilosella* Are Closely Interrelated Developmental Pathways. *Plant Cell*, 15: 1524 – 1537.
- VALLE, C.B. do, Y. SAVIDAN & L. JANK. 1989. Apomixis and Sexuality in *Brachiaria decumbens* Stapf. XVI International Grassland Congress, Nice, France. p. 407-408.
- VALLE, C.B. do & C. GLIENKE. 1993. Towards defining the inheritance of apomixis in *Brachiaria*. *Apomixis Newsletters*, 6: 24 – 25.
- VALLE, C.B. do & J.W. MILES. 1994. Melhoramento de gramíneas do gênero *Brachiaria*. En: Simposio sobre manejo pastagens, 11. Fundação de Estudos Agrários Luis de Queiroz, Piracicaba.

- VALLE, C.B. do & Y.H. SAVIDAN. Genética, Citogenética y Biología Reproductiva de *Brachiaria*. En: Miles, J.W., B.L. Maass & C.B. Valle (eds.). 1998. p. 163 – 180. *Brachiaria: Biología, Agronomía y Mejoramiento*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT): Cali – Colombia, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa): Campo Grande – Brasil, Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte (CNPGC). Publicación CIAT No. 295, Colombia.
- VARGAS, J.; G., GALLEGU & J. TOHME. 2007. Using of sequence characterized amplified regions SCAR-N14 for marker-assisted selection in *Brachiaria* breeding to select for apomixis (poster). Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, CO. 1 p.
- VARGAS, J.; D. BERNAL, M. GIRALDO, C. QUINTERO, J. CHACÓN, J.W. MILES & J. TOHME. 2009. Marker Assisted Selection of apomixis in *Brachiaria* breeding through SCAR-N14 and FTA® DNA technology (póster). Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, CO. 1 p.
- VELDKAMP, J.F. 1996. Proposal to conserve the name *Brachiaria* (Trin.) Griseb. (Gramineae) with a conserved type. *Taxon*, 45: 319 – 320.
- WEBER, J.L. & P.E. MAY. 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *American Journal of Human Genetics*, 44: 338 – 396.
- WEBSTER, R.D. 1987. The Australian Paniceae (Poaceae). J. Cramer, Berlin and Stuttgart, Germany. p 228 – 255.
- WEBSTER, R.D. 1988. Genera of the North American Paniceae (Poaceae: Panicoideae). *Systematic Botany*, 13: 576 – 609.
- WU, K.K.; W. BURNQUIST, M.E. SORRELLS, T.L. TEW, P.H. MOORE & S.D. TANKSLEY. 1992. The detection and estimation of linkage in polyploids using single-dose restriction fragments. *Theoretical and Applied Genetics*, 83: 294 – 300.
- ZUO, J.; Q.W. NIU, G. FRUGIS & N.H. CHUA. 2002. The *WUSCHEL* gene promotes vegetative-to-embryonic transition in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 30: 349 – 359.

ANEXOS

1. Anexo A.

Protocolo de extracción de ADN de *Brachiaria*.

a. Colección de muestras:

- Tomar aproximadamente 5 hojas de cada planta (1g) en bolsas de papel separadas y numeradas.
- Secar en horno a 50° C hasta que las hojas estén quebradizas (20 horas aproximadas).
- Cortar el tejido seco en trozos pequeños dentro de tubos FALCON de 50 mL de capacidad. Macerar con trituradora hasta pulverizar.

b. Extracción de ADN:

- Tomar el tejido pulverizado, aproximadamente 0,1g y ponerlos en tubo *Eppendorf*, hasta 100 µL (0,03g tejido seco).
- Agitar en vórtex 10 segundos a máxima velocidad.
- Agregar 600 µL de Buffer de Extracción (200mM Tris-HCl pH 8.0, 250mM NaCl, 25mM EDTA pH 8.0, 0,5% SDS, 1% β-mercaptoetanol) durante 10 minutos a 65° C. En ocasiones, agitar vigorosamente.
- Agregar 600 µL de Cloroformo:Alcohol Isoamílico 24:1 y agitar hasta observar una emulsión.
- Tomar 500 µL de sobrenadante y transferir a tubo nuevo.
- Agregar 400 µL de Isopropanol frío.
- Agitar por inversión.
- Incubar a -20° C mínimo durante una hora.
- Centrifugar 5 – 10 minutos a 14000 rpm a temperatura ambiente.
- Descartar el sobrenadante.
- Lavar con 250 µL de Etanol 70%.
- Agitar suavemente por inversión.
- Centrifugar 2 minutos a 12000 rpm.
- Dejar secar a temperatura ambiente.

- Disolver el pellet en 100 µL de 10mM Tris-HCl pH 8.0 con RNAsa concentración final de 20 µL/mL y no incubar a 37º C durante 30 minutos.
- Observar 2 µL en gel de Agarosa 0,8%.

2. Anexo B.

Preparación de geles de agarosa (2% TBE 0,5X Vol 250 mL):

Agarosa 2g

TBE 10X 12,5mL

Aforar hasta 250 mL con agua Deionizada

Calentar hasta ebullición

Adicionar 10 µL de SYBR Safe (10000X)

Servir en bandeja de Electroforesis con peines adecuados y dejar polimerizar 30 minutos.

Usar 2000 mL de TBE 0,5X para la cámara de electroforesis.

3. Anexo C.

Cuadro con secuencias de expresión diferencial entre el parental apomíctico y sexual (Tomado de Gorrón 2008, 2009).

No.	Nombre de la Secuencia	Secuencia	Longitud (pb)	Etapas de Expresión diferencial	Tipo de Reproducción con mayor expresión
1	>1_04¥PLATE_1_P13	TGCACCCTACGATTCGAGGATCAAGAAACAC GATAGGACAAAGCAGAGCTCGCNGACCTGA GAAAACAAGCTTACCTTTTGCCGTACTCCAC GGCCAGATCGATAGGCCACGCTTTCACGGTTC GTATTCGTACTGGAAATCAGAATCAAACGAG CTTTTACCCTTTTGTCCACACGAGATTTCTGT TCTCGTTGAGCTCATCTTAGGACACCTGCGTT ATCTTTTAACAGATGTGCCGCCCCAGCCAAAC TCCCCACCTGACAATGTCTTCCGCCCGGATCC TCGAATCGTAGGGTGCAAATCGAATTCCCGC GGCCGCCATGGCGGCCGGGAGCATGCGACG TCNGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTAT	383	II	Sexual

TACAG					
2	>51¥PLATE_1_P48	CATAACTTCGTATATTATACATTATACCAAGTT ATCAGTCGACGGTACCATACATATGCCCGGAA ATTCGGCCATTACGGCCTGTGNCTGCCGAAA AAACCTACCACACTTACCCTTGTATCTGAAAC ATAAGCTGACTGC	141	I	Sexual
3	>06¥p8-B12_(14)	AAGCTGAGTGGAGACACAAAGAGTATGAGCC AACTGGGTCTTCCCTGACCGAAACTCCCCGAA TGCCTCTGTGATGCAAAGTGTTCATCCCTC CACCAAGCAGCTCGTCAAGTGCTGGCTCCCA GTTGTAATTCGAACAACAGACTTCCGCTTAAG AAGGAGATCACTACCTGTATGAAGCCCTGG CTCAGAAGTTTTTCAGCTGCCTCACAGATCTT ATCAACTTTTGCTTCAGATAAACCTTTGATTCC TGTAAGGCTCTTCTGGTATGCATCATCAAAC CATTGCAAGTGAAATCCCAGCATCCTTCAGC TTCTTACGTCAATCGAATTCCCGCGGCCGCC ATGGCGGCCGGGAGCNTGCGACGTTCCGGGC CCANTTCGCCCTTA	395	II	Sexual
4	>07¥PLATE_1_P16	TTGGAGCTCTCCCATATGGTCGACCTGCAGCG GGCCGGAATTCAGTGTGATTGTTTCGT ACCTAGGATCCTTCGATGTCGGCTTCTCTAT CATTTGTGAAGGCAAATTCACCAAGTGTGGGA TTGTTACCCACCAATAGGAACGTGAGCTGG GATTAGACCGTGTGAGGACAGGTTAGTTTT ACCCTACTGATGACCGTCCGCGATAGAAATT AACCTAGTCGAGAGGAACCGTGATCACACA ATTGTCATCGCGCTTGTGAAAGACAGTGGCC GACTCCCGGTGTCCGATAGACTGAC	312	II	Sexual
5	>08¥PLATE_2_P21	CATGTTTCTACCTAGGCATCCATCATAGATAA ATATCCTATTACACCATTGAAATGCTTTCACA AGACTTCATTGATACAAGAAACCAGCACTTT GCCACCGACGTTCTTCTCCTGGCTATCCTCAT GGTCCATGATGCCAGCAACGTTGTGACAAT GTAGCCNAACTGACCCAGATGGGAGCAACCCG GCANTCCNACCCTCGATCCCTAAGCTACCAAA CATGAATCGAATTCGCGCGCCGATGGCG GCCGGGAGCATGCCACATCGGCCCAATTCGC CCTATAGTGA	296	I	Apomictica
6	>09¥BANDA_3_A	ATATGTGATGCCGACCTGACAGGCGGCCGCG CACATACACTAGCTCGATTACCAGCGATAAN ATCGGTACAGGCTACATATCAATACACAGCAT CCATCTGCGCACTGCAAAGCGAG	118	-----	-----
7	>09¥PLATE_1_P20	CATGTTTNGTAGCCTANGGATCCTTGTCC CGAGATTGCTCATATGTACAAGACGGACCGG CCAAGGTATGAGACGACAGCCCGCAGCTGGA CGCAGAAATACGCGATGGGATGACAAGGCAC CTCCGACGCTCAGTTGGCGATGACGTGCCCC GTGTCGTCTCAAGAAATTGTCGGTGGGCCATT GTTTCCTTCGATTGTGCTGGTTGTGTATC CCCATCCCTAGGCTACGAAACATGAATCGAA TTCCCGCGGCCCATGGCGGCCGGGAGCAT GCGACGTCGGGCCAATTCGCCCTATAGTGA GTCGA	320	II	Sexual
8	>40¥CANDIDATO_1	TCGAGCGGCCGCCGGGAGGTACATAGGA NTTCCAAGATCCGTTGCCACTGTAAAGGGAG	247	I	Sexual

		GGAGGTGCACCTTCCTGGTTATCTNCCCCAA ATCCCCTGACTTCTTACAATAAATAGGTAATC GGAGCTATACAACTGTCCGTACCTCGGCCG GACCACGCTAATCGAATTCCCGCGGCCCAT GNCGGCCGGGAGCATGCGACGTCGGGCCA ATTNCCCTATAGTGAGTCGATTTACAA			
9	>48¥CANDIDATO_7	CATGTTTCGTAGCCTAGGGATCTTCGGAGTTT GAAGCTAGAGGTGTCAGAAAAGTTACCACAG GGATAACTGGCTTGTGGCAGCCAAGCGTTCA TAGCGACGTTGCTTTTTGATCCACCATAACT TAATACATAATAACATGCAGCTAATGCGGAG TAACATGTAGTGCTCCAACAGCATGCCATATC CCACCCAAAAGGCCAAAACATGTTATCATGCC TAAACCTGATCCCTAGCTACGAAACATGAATC GAATTCCGCGGCCGATGGGCGGAGCGATGC TACGTCGGGCCA	299	I	Sexual
10	>45¥CANDIDATO_16.1	ATCATCATACGATGCTTGTCTGTTGCTATCAAT GCACGATGCACCTGTCTGTCCAGAGAAATCC CAGATGCGTCCACTAGCGTACAGACAGA	95	I	Sexual
11	>59¥PLATE_1_P9	CATGTTTCGTAGCCTAGGATCGGATCCTTCA TTGGATGGATGGCTAAGACGGCAGTCATGGT TGGGGCCGCGTTGTCCATCATGAAGCTGCT GGCTATGAGCCGGTTATCAGGACAAATAGCA TCAAACGGACATCACAGGGCTGTTTGGTAAA GCGGCGACTGGCAAAGAAGAGCTGAGCACTC GTCTCTGCCCTCCTGGAAGTGATGGTGATCCC TAGGCTACAAACATGAATCGAATCCGCGCCCC ATGCGCCGGAGCATGCGACGTCGCCATCGCT ATAGGAGCGAT	295	II	Sexual
12	>Contig[0001]	CATGTTTCGTAGCCTAGGGATCTTCTGTGAAG GGTTCGAGTTGGAGCACGCTGTGGGACCC GAAAGATGGTGAACATGCCTGAGCGGGGG AAGCCAGAGGAACTCTGGTGGAGGCTCGAA GCGATACTGACGTGCAAATCGTTCGTCTGACT TGGGTATAGGGGCGAAAGACTAATCGAACCA TCTAGTAGCTGGTCCCTCCGAAGTTCCCTCA GGATAGCTGAAGCCCCGCTACTCTGCGTTG ATCCCTAGGCTACGAAACATGAATCGAATTC CGCGGCCGCCATGGCGGCCGGGAGCATGCG ACGTCGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAG	343	I	Sexual
13	>Contig[0008]	TCGAGCGGCCGCCGGGCGAGGTACGAGATTA CCACAGCCTGGAAGATAACACCTNAGTGTTA GAGCTCCACACAATGCTAGCGCTTAGGCATG GTCATTGAGGTCTTACATGTCATTTCTCGATCC TACTAAACCTTTATAGTACTCTGTTCTGCT CTAGTGCTGTATGGACTACTCGGAACTGGTAC CATACCAATTTTCAGACTTGGTCAGTCATCCTT TTACGTCAGATAGACGTTGTTCTCCTTCTTA GATTTTAGCCCCGCGGTACCTCGGCCGCGACC ACGCTAATCGAATCCCGCGGGCCCCCATG GGCGGCCGGGAGCATGCGACGTCGGGCCA ATTCGCCCTATAGTGAGTCGATTACA	378	I	Sexual
14	>Contig[0015]	AGCGTGGTCGAGCCGATGTACATTCTTTCAC CAAAAAGGAAAAGGTATACTTCGTCTGTAG CACTACACAATAAATCATCAATGTGTTTCTA TCTTGGTATTCACTTACGATCTCTAGGATACA ATAATCAAGGGTGCATGCTGGTTCAAACTGC	594	I	Sexual

		AAACTCCTTAGCGAAGTCCAGAATCCAGAATT ACGGCTGACGAAGAAAGAAACACGGCAGGC AAAAACCAATAGGGAATTTTGTTCACA CAAACATTATGATAGGTTTGGCGCAATTCAG ATGCACTGCTGGCTGATCCAATAGGTTCTTGT AGGGCAAGGTTACGCGAAACATTTCACT GAGCAATATGTGCCATGGGCTGTCCATGAGG ACCAATGCAGCCATAGATTCCACCATAGGAAC AGCTCGGGGGACAACACATGGGTCATGGCGG CCCCTTGCCAAAAGTTCAACATCCTCGTTGCTC CCTTGATACAGTATTTTGTTCCTTCCAATAGT TGCTGTTGGCTTAAAAGCCTTTTTGAAGTAA ATAATTTACCATTGTATCCCCCCTGTACC TGCCCGGGCGCCGCTCGA			
15	>Contig[0020]	CATGTTTCGTAGCTAGGGATCAGCTACATTG TATTTAAGATGACAATAGATGTGCGGATACAT CAAATCCTGGTAACCTCTGGGCAAACTTGAC AAGGGTAAAACATGTTCAATTTCACTAATCTA GGCCTTGATAGCATACTTCTCATCGGAAAT ACTTCTCATGCTTCTTCCCTCTCGGTCTTCA AAGAGAGCTGGTCTTGGTGAGGCGCCTGG GATGGCGCGGTCTTCTTGAGCGGAGGTCA AGAGGGAGATGCTTCTTCTTGTACGCCTC CCGCAACGCCCTTCTGCTTCTGCGAGATCC CTAGGCTACAAAACATGAATCGAATCCGCGG CCGC	355	I	Sexual
16	>Contig[0022]	CATGTTTCGTAGCTAGGGATCCTTCGATGTC GGCTTCTCTATCATTGTGAAGCAGAATTCAC CAAGTGTGGATTGTTCAACCACCAATACGGA ACGTGAGCTGGGATTAGACCGTCGTGAGACA GGTTAGTTTTACCCTACTGATGACCGTGCCGC GATAGTAATCAACCTAGTGCAGAGGAACC GTTGATTCACACAATTGGTCATCGCGCTTGGT TGAAAAGCCAGTGGCGGAAGCTACCGTGTG TCGGATTATGACTGAACGCCTAAGTCAGAA TCCCGCTACTCTGCGTTGATCCCTAGGCTAC GAAACATGAATCGAATCCCGCGGCCCAT GGCGGCCGGGAGCATGCGACGTCCG	373	I y II	Sexual
17	>Contig[0034]	TCCCTTTGCAACCTTCCATTGGCCCCCTTGGTC ACCAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGC GAGGAAGCGGCCGATAACTTCTATAGCAT ACATTATACGAAGTTATCAGTCGACGGTACCG GGACATATGCCCGGAATTCGGCCATTACGG CCCGTACGCGGGGAGGAGAAGAACTTACA AGGATTCCCCTAGTAACGGCGAGCGAACC GG GATCAGCCAGCTTGAAAATCGGGTAGCTTTT GTTGCCGAATTGTAGTCTGGAGAGGCGTCC TCAGAGACGGACCGGGCCAAGTTCCTGGA AAGGGACGCTGGAAAGGGTGAGAGCCCCG TCCGGCCCCGACCCTGTCTACCACGAGGCC GCTGTCAACGAGTCAGGTTGTTTGGGAATGC ATCCCAAATCGGGCGGGAAAACCTCGTCCAA GG	440	I	Sexual
18	>Contig[0116]	CATGTTTCGTAGCTAGGGATCAACGCCGAGT ACGCGGGGCTCCAGCTATCCTGAGGGAAACT TCGGAGGGAACAGCTACTAGATGGTTTCGAT TAGTCTTTCGCCCTATACCAAGTCAGACGA	345	I	Sexual

		ACGATTTGCACGTACGTATCGCTTCGAGCCTC CACCAGAGTTTCTCTGGCTTCGCCCGCTCA GGCATAGTTCACCATCTTTCGGTCCCGACAG GCGTGCTCCAACCTCGAACCTTCACAGAAGAT CCCTAGGCTACGAAACATGAATCGAATCCCG CGGCCGCGATGGCGGCCGGAGCATGCGAC GTCGGGCCAATTGCGCCTATAGTGAGTC			
19	>Contig[0129]	CATGTTTCGTAGCCTAGGGAWCGTTCTCGAA GCCGAAGAAGTSTCCCCGCGGGAAGGCGAA SGCCAAGCCAAGACCGTCAAGTCCCCGTCT CCAAGAAGACCCGGAAGGTCGCTGCTGAGG TTGTTCCATAGGTCGTAGCTTTCTGATTGTGG AGTCGTGCTGCCTAGGAGTTGTACAAACGGA GTGCGTGCCCAAGTGTCTCTGATCCCTAGGC TACGAAACATGAATCGAATCCCGCGGCCGCC ATGGCGGCCGGGAGCATGCGACGTCGGGCC CAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATT	308	I	Sexual
20	>Contig[0131]	CATGTTTCTGTAGCCTTAGGGATCCTCTGGC CAGCTTGAATGTGCTTGGGCATGAGGGGCAC ACGCTTGGCATGGATGGCGCACACGGTTGGT GTCCTCAAACAGTCCAACGAGGTAAAGCCTCA GCAGCCTCTGGAGGGCAAGCACAGCATGGC TCTGAAACGCAGATCCCTAGGCTACGAAAC ATGAATCGAATCCCGCGGCCCATGGCGG CCGGGGAGCATGCCGACGTCNNGGCCAATTC GCCCTATAGTGAGTCGTATTACA	273	I	Sexual
21	>03¥PLATE_1_P12	TCGTAGCCTAAGGATCAACGCCGAGTACGCG GGGCTCCAGCTATCTGAGGGAAACTTCGAG GGAACCAGCTACTAGATGGGTGATAGCTTC GCCCCATACCCAAATCAGACCAACGAATTGC ATGTCAGTAACGCTTCGAGCCTCCACCAGAGG TCCCTGGCTTCCCCCGCTCAGCATAGTGAC CATCGTACCGGGCCCGACAGGCGTGCTCAAC TCGAACCTTCACAGAAGATCCCTAGCTACGA AACATGAAGCGGAAGGGCGCGGCCCAATG GCGGCCGGGAGCAGTGCGAGGGAGCGGGC CCAAGGGTCGGCGCTAAGGGTGGAGGTGCG AT	345	II	Sexual
22	>12¥PLATE_1_P24	ATGAGACATGTTTCGTAGCCTAGGGATCACG GTACTAATAGCAGCATCTCTGGCCTGACGCAG CACCTCACGAATCATCTAGTACTCTTCACT CCTCACCTTTCTCACTATTCGCAAACCTCAGCAC CAACCTTCTCATAGTACCATTCTCGAGCGCAT CCATGTCTCACAGGGCCTCAATGAACTACC CTCTCCATGCCCTACCCGCTACTCTGCGTT GATACCACTGCCTAGGCATACGAAACATGTCT TATAATCGAATTCCTGCGGCCGCTGGTGGC CGGCAGCATGCTACGTCGGGCC	313	I	Sexual
23	>13¥PLATE_1_P25	ATGAGACATGTGACGATGACACATGATCATA ACATAAATATCCTATTACACCTTCGAGAATG CTTTGCAAGACTTCATTAGTAGAAGAAACCG CAGCACTTGGCCCGACGTTCTTCTCTCTGG CTTCTCATGGTCCATGATGCCAGCAGAGGTT GTCAGGACAATGTAGCCAAACTGACGAGATG GGAGCAGCCGTGAGTCTAGCCTTCGATCCG TACGCTACGAAACATGTCTCATAATCGAATTC ACGCGGCCGATGGTGG	270	I	Sexual

24	>50¥CANDIDATO_8	CATGTTTCGTAGCCTAGGGATCCAGTGACGAC TACGGACGCGGACAGGGCGCTCAGTCACTG TCTCCAGGAATTCCTTGTATGCACAATTA ACTCCCTTTGTTGTTACCGAGAGTGTACTTCT CTTCTTACCTCGGAGCAATCGTTGAAAGGGTG GTAACAGATTGGACGTGCTTGAACAGTGATC CAAGCAAATTGAGCTGCCATACATCGTAACG GCGCACACGTGAATGTACTGTGGCGGCGTGA TCCTAGGCTACGAACATGATCGATG	278	I	Sexual
25	>52¥CANDIDATO_9	CATGTTTCGTAGCCTAGGGATCACCGTAATCC TTTGATATATCCTGATGTATACCCTTCATGAAG CTTGTACGAGTAACATTCGACGCTGCCTAACT CAACTTGGTTGTTACGTGTACATCTCTCTTG TTTGCCAGAGATGTGATATCTCTGCGCCTATA TGATGATGGCGTGCCTGTCGTAATGTTCTGAT ATACTACACAATGCAGATCCCTAGGCTACGAA ACATGAATCGAATCCCGCGGCCGCGCATGGC GCCGGGAGCATGCGACGTCGGGGGCCAATTC GCCCTATAGTGAGTCGT	305	I	Sexual
26	>56¥CANDIDATO_12	TCGAGCGGCCCGCCGGGAGGTGGCGGCGG CGGCTATGACAGGTAAGGGGTTTTGCGCC CTCCATGTTCCAGTGAGGCGTCCCCNAGA TGGGTGACCATGGCCTGCTGTTGTGATGGTG TTGGCCCTCCCTCCGTGACTCTGGGTAGATT GTTGTAGCTGTACCTCGGCCGACACGCTA ATCGAATCCCGCGGCCCATGGCGGCCGG GAGCATGCGACGTGGGGCCAATTCGCCCTA TAGTGAGTCGT	261	I	Sexual
27	>A1_8_Contig	CATGTTTCGTAGCCTAGGGATCGGTGCCAGA ACTGTGGGAGGCAGCATCTTCTTAGGTGCCA CAGGCGGAGGAGCAGGGGCTGCTGCAGCCG TATTGTTGTTCACTGGTGTGCGGTCTTTGCA GTGTCCTTCTGTTATCCTTCCCTCCAGACCTG ACTCCGTGGCCGTTCTGTTGGCCACTGATTGA TAGCCTTCTGTTGCGTGGAGTACCGTTTGAGA TGCTGCCATTCACTTTGGGGCAATGGCCTTC TTAGAACTGGCAGGTGCGTTTCGGGCTCACTC GTGATCCCTAGGCTACGAAACATG	309	I	Apomíctica
28	>S1_Contig	TGCACCCTACGATTTCGAGGATCACCGTGTGTG CAGGGATTTTTGTTACATTATCTTTATGCCTTA TTTACCTAGTAATAAAGCAAGTAATGTTTCTG TTCAAATTGTGAATTGTGGTACGTCAACCAA AACCGTTATTAGACCGGCTAAACCGAGACA AAACCGCTTCTTAGGCCCAAACCGAGAGA AATCCCGCTCGACCGCGCCGACCATCACCGA ACCGAAAAGAAACCTGAAATCCCGCTGGA CCGGAAAAAACCGGCCTGCTAATAAAACCAA ACGATCCTCGAATCGTAGGGTGCCATGTTTCG TAGCCTAGGGATCAATGTTTCATGAGCATAAA AAGAAGTATAACACGCAAAACCTTATACTTG CAGAGGCTGGGGCCAGGCTCCATACGA ACTACTACTAATCGTTACTTTGCTCCCGATGC CATCTCCCTGTCCTCCATCATGCGATGGGGG CTCGAGATATGAAAAGAATGTAGTTTCTCT CGTGTTCTTCTGATTTCTATCATTGGGTCT TGTAACCTCAGCAAGGTRGTTGGGAWACAAC AMCRGCTGGSATTTGGGGACGGAACTGAN	625	I	Sexual

		KCCCTARGCTASSAAACAAGTG			
29	>Contig[0083]	TATGCCCGACAAAATAACTTCTCGTTGGTTA AAATGCATCATCAAATAAATAATGACCGGG CGGTGTGTTTTGTTTCTCCTTTCTCGCTC CTTTGATAGTATCTTTTTGACCCACCTTCTC GATTCCCCGCCGACTCATACGTAGTGATTGA ATATGCAACACAACACTTATCCGTCGTGCTTC CTTGAAACAATCGCTATCCGATAGTCTGTCA CGTTCTCTAACTCCGAACACATCGCACCAGT AGTGATACGACACATGTCGAAGCGATCTCTAC TACTACACATATTCTACATGCTACATACTGCAT CCTCTCCGACTCTATCACTCTACATACAACT AAATGCTCTCGTTCACTCACCTCTATCGCTGC CTTAGTCTCTATATCTCGTG	409	I	Sexual
30	>ab000809.1	ATTCGGCTTTGGTCGAGCACCATATGGTATT CTTTGATATCTTGATCCACACATATCACCTG ACAGACTATGCCAAGTCTTGGAACAACGTATG TGCTTGCAATGCCAGCGAGTTCAAAAAGTATG AGATTGCTCCTCATTACCAAATTTAGATAGC GACGTCAGTACGATTGACATGTGTCGAGAA AGCTGTTGAA	202	----	----
31	>af475105.1	CCTAATGATTGGGGTGTCTTGTCTTTTCCAA GGTCCACTGCGGCACCAGCCTTTTGAGGATT TGGGCACACTTCAACTCACCATATCCACAAGC AAAATGTAAGGCCCTTCTCCCTCGGAGTCTT CTTCGTCCTTGTCTGCTCCACCATCCAGTGCCT TCTTCAGACCTCGTCATCACCACACTAGCT GTGTGATGAACAATGGATTTCATTTTCCCC ACCCTCCTCAGTTTCTCAGTACCAGAAGGTT CAGCAGAAGAACCAGCACCAAATGGGAAGCT ACCTCCATTGCTGGCCAATCTTTGAAGAG TATCAGGGTCATTCCAGTACTTC	344	----	----
32	>aj786393.1s	GAGGCACGGAAATTCATCAAAGAATCCGGAG AAGCTGATCAAGGATCCAATCGAATCCCGCG GCCGCATGGCGGCCGGGAGCATGCGAGGTC GGGCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTA CA	128	----	----
33	>aj786393.1p	GCTTGCTCGACCGTCAAGCTTTATATGGGCA ATTTGCGAAAGGAACATATCCCGACTTTTGG CCATGGGAAAGGAGCCACATATCCCTTGGC GGTGGTATCAAACAGTGCAGCTTTTCTTCTG CGGCGGGCAGTGCCTCYCTGTAGTTCATGT TCATCCGAGGGAATTTATCGCCCTGTTCTG ATCGTTGACAAGGTATAATCCGTGTACCGAT CAAGGGCACGGCTTGAACCTTTCACCGGCAA AACAAGATCGCTGGAGCTGCTGCCAGCTTTA GAATGGTGCGTGTGAAGCTGAGGTTCCGGCA AGACGGTGCAGTCCGTGCGCTTGGTATCGC CAGCGGATGCTGTCCCTTGCCGAACCCGC TCTTCTGCCACGCCCCGAGGATGTAGAAGAA GCAGCACATGCCAATCGAATCCCGCGGCCG CCATGGCGGCCGGGAGCATGCGACGTCCGG CCCAATTCGCCCTATAGTGAGTC	495	----	----
34	>aj810708.1s	TTCTTGACTGGTCTCCATGAATGGGATGCC ATCTCATCAGCAAGAGCCTTGCTGCTTCATA TGACACAATTTGTTTGTGTCAAGTCACACTT GTTCCCAACAAGGAGCTTGTACATTGTCCG	363	----	----

		CTTGATAGCCGATCAATTTCAATCAACCATTG CTTTACGTTGTTAAAGCTTTCTTGGTCTGTGAC ATCATACACGATGATAATGCCATGGGCTCCTC GGTAGTAGCTGCTGGTAATTGCCTGAAACGT TCTTGCCAGCAGTATCCCAAATTTGAATCGA ATTCCCGCGGCCCATGGCGGCCGGGAGCA TGCGACGTCGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGA GTCGATTAC			
35	>aj810709.1	GGCATGTGCTGCTTCTTCTACATCTCGGGGC GTGGCACGAAGAGCGGGTTCGCAAGGGGG ACAGCATCGCGTGGAGATACCAAGCGCAC GGACTGCACCGTCTTGCCGAACCTCAGCTTCG ACACGCACCATTTAAAGCTGGCAGCAGCTCC AGCGATCTGTTTTYGCCGGTGAAGAAGTTCAA GCCGTGCCCTGATCGGTACACGGATTATACCC CTTGTCAAGATCAGAACAGRGGATGAARTTC CCTCGGGAGAACATGAACTACAGAGAGAGGC ACTGCCCGCCGAGAAGGAAAAGCTGCACTG TTTGATACCACCGCCGAAGGGATATGTGGCTC CTTTCCATGGCAAAGAGTCGGGACTATGTT CCTTCGCAAATTGCCATATAAGAGCTTGAC RGTCGAGCAAGC	423	----	----
36	>aj841698.1	GACCAGATAGCTCAATTGGCTCTATTATGAAG GATGACGAATCATGAGGATCCTCTTGTGCGGA CAGAGAACTGTAAGGGCTCCATAAGGAAG AGGTTCTCTATTCAACTCAACGCTGCTCTGTC CAGCGTCACGTTAGCTTCAAGAGCATGTAGA ACTTCTTGACATCTTAGGCCGAAGGATGGGG TTGGTCTGCGTGCATTGGATGATCACGTC AAC TGAACACTCCAGCTCAGCAACATCGAATGAAT CCTTGAGATCCCTGTCAACCAGCTTATCCAGT TTCTTTCTCCTCAGTTCTTAACCCAATCTAG AATCATGCCCTTCTTAGACTGGCCATGTCCATT GCTCAAGGTTTTAGGACCAGTAATCAGTTCCA ACAGGAGAATACCAAACCTAATCGAATTCCC GCGGCCGCCATGGCGGCCGGGAGCATGCGA CGTTCGGGCCCAATTCGCCCTAT	469	----	----
37	>ef517497.1	GGCAAATTTAGAAAAAGAGGGAGTGGAGAT AAACGACAAGATAGCTAGTATTATTGATGATG AGGTAGCTAGAATTAAGCTGAAGCTGAGAG GGAGAACATCAAACAGCCTAAAAGGAACATA AGGCCACTACTTGAAGGTGCTACAGCTGTTGC TTTAGGTCTCATCATGTGGGTGGAATGGTATG AGATCCATGTTGAGTGACCAAGAAATTAATT TTCACAATCCTTTTTGGTAAAAAAAATAACT AGGGCTTGACAGTCCACTCTGTTTATGGTATG TAAAACCAAGCAAGT	300	----	----
38	>ef517498.1s	AAAGTGAGTGGARACAAAAGAGTATGAGCC AAACTGGGTCTTCCCTGACCGAAACTCCCCGA ATGCCTCTGTGATGCAAAGTGTTCATCCCT CCACCAGCAGCTCGTCAAGTGCTGGCTCCCA GTTGTAATTCGAACAACAGACTTCCGCTTAAG AAGGAGATCACTACCTGTCATGAAGCCCTGG CTCAGAAGTTTTTCAGCTGCCTCACAGATCTT ATCAACTTTTGCTTACAGATAAACCTTTGATTCC TGTAAGGCTCTTCTTGGTATGCATCATCAAC CATTGCAAGTGAAATCCCAGCATCCTKCAGC	371	----	----

		TTCTTCACGTCAATCGAATTCCTCCGCGGCCG ATGGCGGCCGGAGCATGCG			
39	>ef517498.1p	AAGCTGAGTGGAACACAAGAGTATGAGCC AACTGGGTCTTCCCTGACCGAAACTCCCCGAA TGCTCTGTGATGCAAAGTGTTCATCCCTCC ACCAAGCAGCTCGTCAAGTGCCTGGCTCCCAG TTGTAATTCGAACAACAGACTTCGGCTTAAGA AGGAGATCACTACCTGTCATGAAGCCCTGGCT CAGAAGTTTTTCAGCTGCCTCACAGATCTTAT CAACTTTTGCTTCAGATAAACCTTTGATTCCTG TAAGGCTCTTCTGGTATGCATCATCAAACCA TTGCAAGTGTAATCCCAGCATCCCTTCAGCT TCTTCACATCAATCGAATTCCTCCGCGGCCGCA TGCGCGGCCGGAGCATGCGACGTCGGGCC	382	----	----
40	>ef530198.1	AAGCTGAGTGAGACACAAGAGTATGAGCC AACTGGGTCTTCCCTGACGAAACTCCCCGAAT GCCCTCTGTGATGCAAAGTGTTCATCCCTC CACCAAGCAGCTCGTCAAGTGCCTGGCTCCCA GTTGTAATTCGAACAACAGACTTCGGCTTAAG AAGGAGATCACTACCTGTCATGAAGCCCTGG CTCAGAAGTTTTTCAGCTGCCTCAAGATCTTAT CAACTTTTGCTTCAGATAAACCTTTGATTCCTG TAAGGCTCTTCTGGTATGCATCATCAAACCA TTGCAAGTGTAATCCCAGCATCCCTTCAGCTT CTTCACATCAATCGAATTCCTCCGCGGCCGCA GGCGGCCGGAGCATGCGACGTCGGGCCA	382	----	----
41	>pcu40219	CATGCCTTTGCCTTTTCTCAGAAACCGTCCGG CTATTACCACCATCAACGTCAATCTTGTCCCA AGAACAACAATGGGAAATTCTCTGGATCAG ATGGGCTAGCTTGAATTAGGAATTCCTCGCGC CAGTTGTTAAGCTTTTCAAATGATTTGGTAAC ATTGACATCATATAACAAGAACAGCAGTCAG CTCCCCGATAAAATGCCACCAAGACTCTGA AACCGCTCCTGTCTGCTGTATCCCATATCTGC AATGTGAAGTGGCGGTCATCGATCTGGACCT CCTTGGTGAGGAAATC	305	----	----
42	>penpsb31ab	GGGCGAATTGGGCCCAGCTCGCATGCTCCC GGCCGCCATGGCGGCCGCGGAATTCGATTG GAAGTATTGGAATGACCCTGATACTCTTCAA AGATTGGCCAGGCAATGGGAGGTAGCTTCCC ATTTGGTGCTGGTTCTTCTGCTGAACCTTCTG GTAAGTGAAGAACTGAGGAGGTGGGGATG AAGATGAATTCATTGTTTCATCACACAGCTAG TGTTGGTGATGACGAGGGTCGAAGAAGGCAC TGGATGGTGGAGCAGACAAGGACGAAGAAG ACTCCAGGGAAGAAGGGCCTTACATTTTGCT TGTGGATATGGTGAGTTGAAGTGTGCCAAA TCCTCCTGAGGCTTGTGCCCACTG	369	----	----
43	>penpsbcas	TAACTGAACATTCTCCTGAAAATTTTCAATA ATCGAATTCCTCCGCGGCCCATGGCGGCCGG GAGCATGCGACGTCGGGCCAATTCGCCCTA TAGTGAGTGATTACA	111	----	----
44	>penpsbcap	CATGCTTTGCCTTTTCTCAGAAACCGTCCGGC TATTACCACCATCAACGTCAATCTTGTCCAAG AACAAACAACAATGGGAAATTCTCTGGATCA NATGGGCTAGCTTGGATTAAGAATTCCTCAGG CCAGTTTTAAGCTTTTCAAATGATTTGGTACCT	371	----	----

		TGCATCATATACAAGAACACAGCAGTCAGTTC CCGATAAATGCCACACCAAGACTCTGAACCGC TCCTGTCTGCTGTATCCCATATCTGCATGTGA AGTGGCGGTCGTCGATCTGGACCTCCTTGGT GAGGAAATAATCGAATTCGCGGCCGCCATG GCGGCCCGGAACATGCCAATTCGGCCAATTC GCCCTATAGTGAGTCGTT			
45	>u65082	GGTCTCCATGAATGGGATGCCCATCTCATCAG CAAGAGCCTTGCCTGCTTCATRTGACACA TTGTTTGTGTCAAGTCACTTGTCCCAACA AGGAGCTTGTACATTGTCGCTGCATAGCG ATCAATTTCAATCAACATTGCTTTACGTTGTT AAAGCTTCTTGGTCTGTGACATCATAACGA TGATAATGCCATGGGCTCCTCGGTAGTAGCTG CTGGTAATTGCTGAAACGTTCTTGCCAGC AGTATCCCAAATTTGAATCGAATTCGCGGC CGCCATGGCGGCCGGAGCATGCGACGTCG GGCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCG	346	----	----
46	>u65384	TCAACAGCTTCTCGACACATGTCAATGCGT ACTTGACGTGCTATCTGAAATTTGGTAATGG AGGACGAATCTCATACTTTTGAACGCTRG CATTSCAAGCACACTACSTTTTCAAGACTTG GCATAGTCTGTCAGGTGATATGTGTGGATCCA AGATATCAAAGAATACCATATTGGTCTCGACC GAAGCCGAAT	203	----	----
47	>yscpo13	ATGCAGGCGTGCAACCTGATGTGCTGCCGG AGAAGTACCAGATGAAGTACTACCTACCAC ATGCTCTGTTGGCGCAGCTCCTTTCGTCGC CGAGGACTACGGCGGACGCATCGTCGGCTAC GTGCTCGCAAGATGGAGGAGGACCCCTCGG AGCCCTGCCACGGCCACATCACCTCCCTCGCC GTCCTCCGCTCCACCGCAAGCTCGGGCTCGC CACCAAGCTCATGTCCGCCGCGCAGGCCGCC ATGGACCAGGTCTTCGGCGCCGAGTACGTCT CCCTCCACGTCC	295	----	----

4. Anexo D.

Preparación de Reactivos Stock de uso general:

Buffer TBE 10X (1 L)

Tris – Base 108 g

Ácido Bórico 55 g

EDTA 0.5M 40 mL

Ajustar a 1 L con agua destilada

EDTA 0.5M pH 8.0 (1 L)

EDTA 186,1 g

NaOH 18 g

Ajustar pH 8.2 y Autoclavar.

Tris – HCl 1 M pH 8.0 (1 L)

A 800 mL de agua deionizada destilada adicionar:

Tris – Base 121,1 g

HCl Concentrado 42 mL

Ajustar volumen a 1000 mL

Autoclavar

Blue Juice 6X (Tampón de carga para los geles de Agarosa)

Azul de Bromofenol al 0,25%

Glicerol en agua 30%

Almacenar a 4° C

5. Anexo E.

Preparación del gel de Poliacrilamida.

- Lavar el vidrio y la cámara con detergente y agua. Asegúrese de remover todo el detergente en el lavado; para esto se emplean gasas limpias y por separado.

- Limpiar con Etanol al 96% el vidrio y la cámara 3 veces con ayuda de pañitos suaves *Kimwipes* (Kimberly – Clark).
- Aplicar a una de las caras de los vidrios la mezcla de 1000 μL de Etanol 95% + Ácido Acético 0,5% y 0,35 μL de Bind Silane (Pharmacia Biotech, Catálogo No. 17-1330-01), esparcir con la pipeta y con un *Kimwipes* y dejar evaporar por cinco minutos.
- Aplicar 400 μL de Sigmacote (Sigma) al vidrio de la cámara, esparcir con *Kimwipes* y dejar evaporar por 5 minutos.
- Limpiar los separadores y peines con Etanol 96% y colocarlos en cada borde lateral de la cámara.
- Colocar el vidrio por el lado tratado con Bind Silane sobre la cámara, ase gurándose que los separadores queden en su lugar y agarrar con ganchos a cada lado. Adicionalmente, colocar soporte en la parte superior de la pieza armada para facilitar el paso de la acrilamida a través de los vidrios.
- Mezclar 70 μL de Acrilamida 6% con 350 μL de Persulfato de Amonio al 10% y 70 μL de TEMED (GibcoBRL, Catálogo No. 15524 – 010).
- Servir la acrilamida por la parte superior de la pieza armada con una jeringa de 60mL entre el vidrio y la cámara teniendo cuidado de no hacer burbujas. Remover el soporte de la parte superior para que la pieza armada quede sin inclinaciones.
- Colocar el peine en el borde superior de la cámara para hacer el Frente de Corrido.
- Dejar polimerizar 30 minutos.
- Tomar la pieza armada, lavar los restos de Acrilamida y ubicarla en la plancha del --- *Thermo* con solución Tampón de corrida (TBE 0,5X) y precalentar hasta 50° C.

6. Anexo F.

Electroforesis del gel de Acrilamida y Tinción con Nitrato de Plata:

- Pre-correr el gel a 120W/cm² con una fuente de poder, hasta una temperatura de 50° C.
- Adicionar a cada reacción de amplificación 5 μL de solución tampón de carga (Stop Solution).

- Denaturar la placa por 3 minutos a 95° C en un termociclador de 96/384 pozos dependiendo del tipo de placa empleada y colocar en hielo hasta el momento de servir las muestras en el gel.
- Sembrar 3 µL o de la muestra denaturada (de cada individuo de la progenie y de los dos parentales) en cada pozo de un peine de 100 pozos (Bio-Rad laboratorios, catálogo No 165-3847) de 30 cm de longitud y espesor de 4mm, y correr el gel a 110W/cm², en el caso de microsatélites; o bien sembrar 4 µL de las muestras en pozos de 68 pozos, en el caso de las estandarizaciones.
- Para STSs se realizaron múltiples servidas con intervalos de corrida de 15 minutos entre las muestras, de esta manera evaluando todos los individuos de la población y la mayor cantidad de marcadores posibles por gel.
- Una vez finalizada la corrida se separa el vidrio con el gel de la cámara y se coloca en un marco para facilitar la manipulación en los tanques durante el proceso de tinción.
- Tinción:
 - a) Solución de Fijación durante 20 minutos.
 - b) Lavados en agua deionizada: Tres lavados de tres minutos cada uno.
 - c) Solución de Tinción durante 30 minutos.
 - d) Lavado en agua deionizada durante 10 segundos.
 - e) Revelado de 5 a 15 minutos dependiendo de la temperatura de la solución (óptimo de 12° C, 8 minutos).
 - f) Solución Stop durante 10 minutos.
 - g) Lavado en agua deionizada durante 15 minutos.

7. Anexo G.

Preparación de reactivos para geles de Acrilamida y Tinción con Plata.

Stop Solution (Tampón de carga geles de Acrilamida)

Formamida 95%

EDTA 20mM

Azul de Bromofenol 0,05%

Xilen Cianiol FF 0,05%

Acrilamida (Acrilamida:bis-Acrlamida 19:1) 6%; Úrea 7M (Volúmen final: 3333mL – Oscuridad)

- Se diluyen 1401,39 g de Úrea en 1 Litro de agua deionizada y destilada.
- Acrlamida 190 g.
- Bis – Acrlamida 10 g.
- TBE 10X 166,7 mL.
- Aforar a 3333 mL con agua deionizada.
- Filtrar la solución por membranas de 0,2 µm en la bomba de vacío y almacenar a 4º C en oscuridad.

Solución Fijadora (Ácido acético glaciado al 10%).

Ácido Acético Glaciado 1700 mL

Agua Bidestilada 15300 mL

Solución Stop (Tinción con Plata)

Glicina 340 gr

Tris – HCl 85 gr

Agua Bidestilada aforar a 17000 mL

Solución de Tinción

Nitrato de Plata (AgNO_3) 17 g

Formaldehído (H₂CO₄) 37% 21,9 mL

Agua bidestilada 17000 mL

Solución de Revelado

Carbonato de Sodio 105 g

Formaldehído (H₂CO₄) 37% 4,5 mL

Tiosulfato de Sodio 650 µL

Agua deionizada 3500 mL

8. Anexo H.

Protocolo para limpieza de producto de PCR basado en PEG.

- Preparar la solución:

PEG 8000 10 g, concentración final 20%.

NaCl 7,3 g; concentración final 2,5% .

Aforar con agua deionizada y dejar resuspender a 37º C.

Filtrar por membrana de 0,02 µM.

- A un PCR de 50 µL adicionar 1 volumen de la solución anterior (Tapar con cinta si se está trabajando con placa de 96).
- Mezclar por vórtex. Si es en placa de 96, hacerlo con suavidad y dar un spin para bajar la muestra de la tapa.
- Incubar a temperatura ambiente por 15 minutos.
- Centrifugar:
 - Tubos de 1,5 mL a 13000 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente.
 - Placas de 96 a 2800 rpm, durante 30 minutos a 4º C.
- Invertir (en tubos sacar con puntas).

- Adicionar 100 μ L de Etanol al 70%.
- Centrifugar:
 - Tubos de 1,5 mL a 13000 rpm por 2 minutos a temperatura ambiente.
 - Placas de 96 a 2800 rpm durante 10 minutos a 4^o C.
- Sacar el líquido con pipeta para tubos de 1,5mL y por inversión para placas de 96.
- Invertir placas sobre una toalla y centrifugar durante 5 segundos a 1000 rpm.
- Dejar secar.
- Resuspender en 10 μ L de agua y revisar 2 μ L en gel de agarosa con resolución según el tamaño de los productos limpiados.

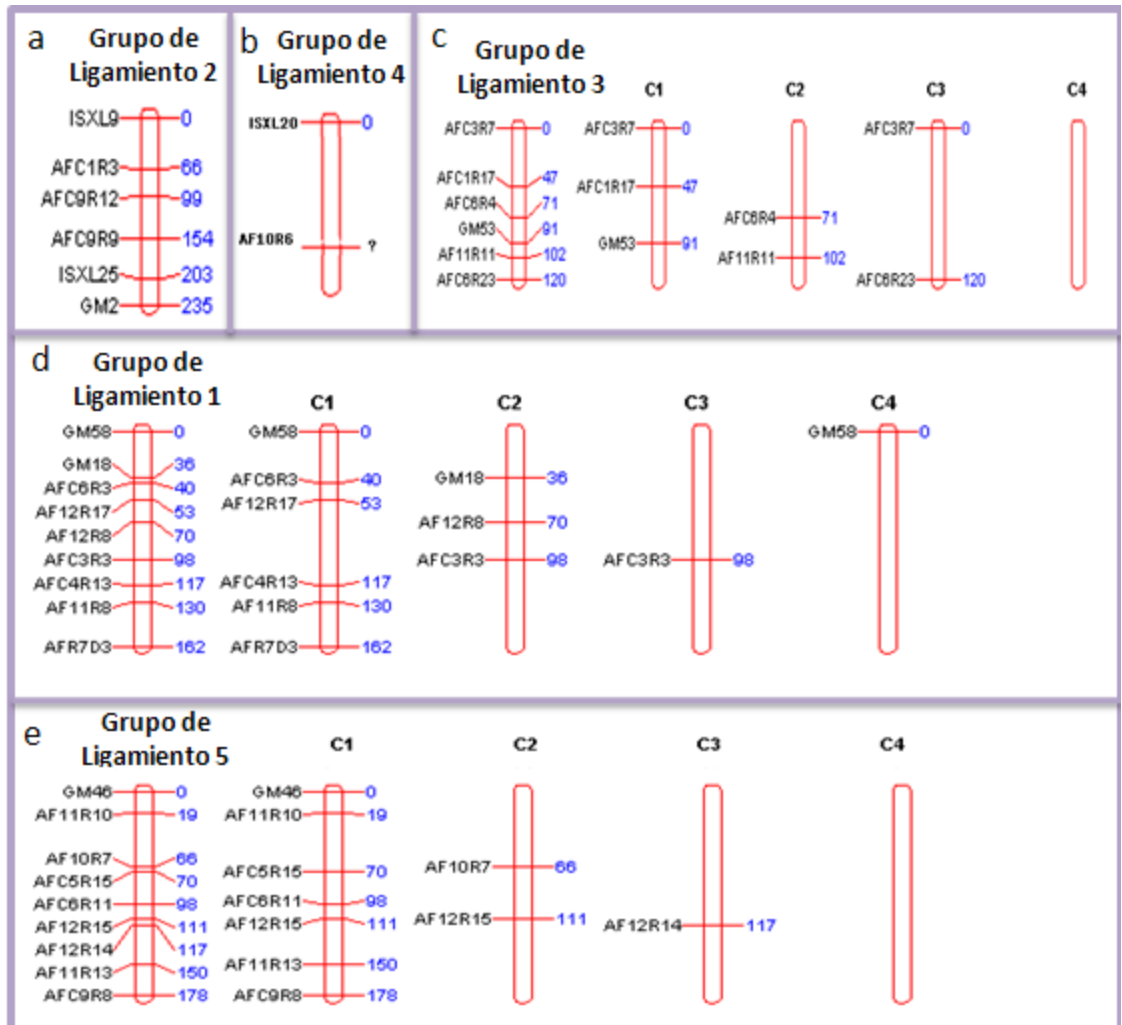
9. Anexo I.

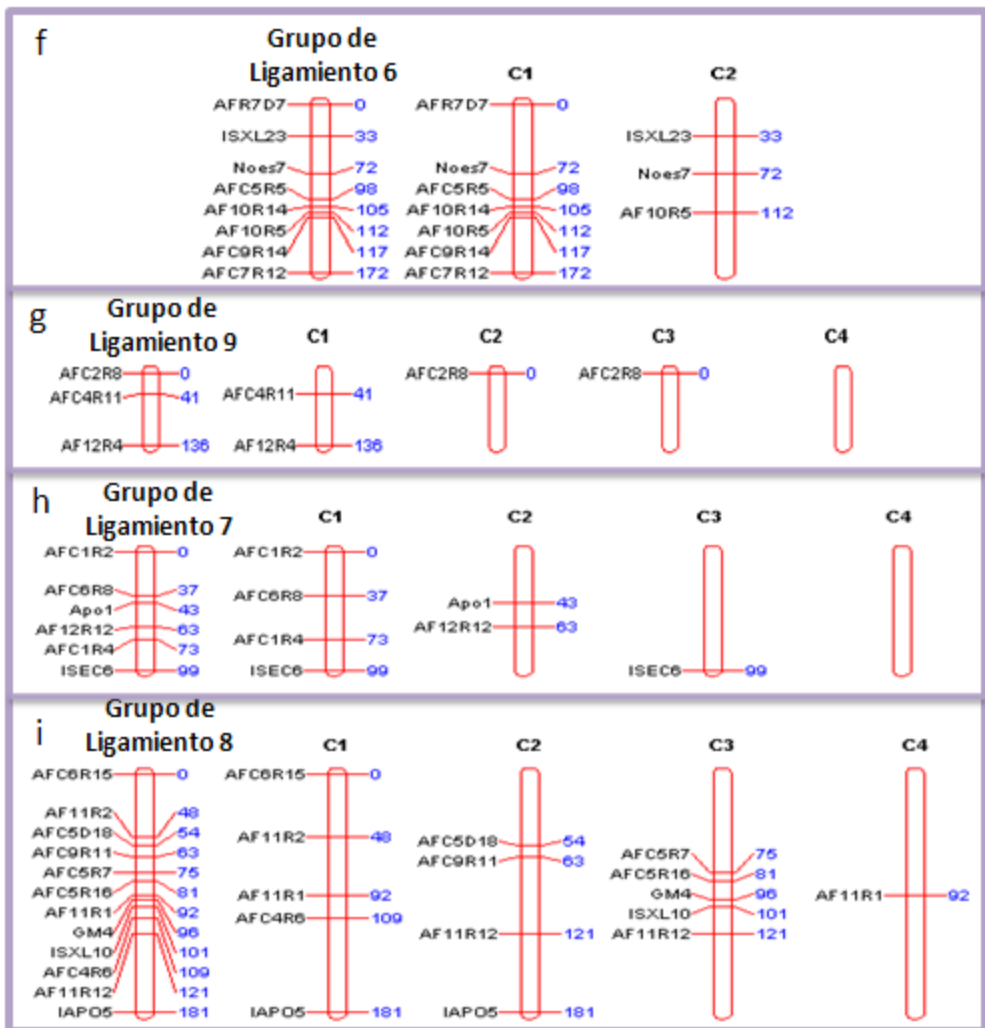
Limpieza de Reacciones de Secuencia.

- Preparar por reacción:
 - 24 μ L de Etanol 100% (grado molecular).
 - 1 μ L de Acetato de Sodio 3M.
- Adicionar los 25 μ L a cada producto de secuencia de 8 μ L.
- Mezclar por vórtex.
- Incubar 30 minutos en hielo.
- Centrifugar 30 minutos a 2800 rpm a 4^o C para placas de 96 o centrifugar 20 minutos a 14000 rpm para tubos de 1,5 mL a temperatura ambiente.
- Descartar líquido (con pipeta para tubos de 1,5mL o por inversión para placas de 96).
- Centrifugar durante 5 segundos a 1000 rpm con la placa invertida sobre la toalla.
- Dejar secar unos minutos.
- Resuspender en Buffer de Carga, que contiene:
 - Formamida Redestilada : Azul (Loading Buffer kit Big Dye, PE Applied Biosystem), 4:1.
- Servir en gel.

10. Anexo J.

Grupos de Ligamiento con marcadores en fase de acoplamiento y repulsión de la especie *Brachiaria ruziziensis* generados a partir del software TetraploidMap.





11. Anexo K.

Grupos de Ligamiento con marcadores en fase de acoplamiento y repulsión de la especie *Brachiararia decumbens* generados a partir del software TetraploidMap.

