



COLEGIO DE POSTGRADUADOS
INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS
AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

PRODUCCIÓN DE SEMILLAS

CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN
AGRONÓMICA, MORFOLÓGICA,
CITOEMBRIOLÓGICA Y MOLECULAR DE
HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS DE *Brachiaria*

JAIME POBLETE VARGAS

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

2008

Agradecimientos

Al Colegio de Postgraduados por darme la oportunidad de formarme como profesionista

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por otorgarme el financiamiento necesario para cursar los estudios de doctorado.

A la Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) por el apoyo recibido en el transcurso de los estudios del doctorado.

Al Dr. Gabino García de los Santos por su apoyo y dirección como asesor de mis estudios doctorales.

Al Dr. Aquiles Carballo Carballo por su apoyo y consejos como asesor en el aspecto genético de la tesis.

A la Dra. Ernestina Valadez Moctezuma de la UACH, por su apoyo y consejos en el aspecto molecular de la tesis.

Al Dr. Tarsicio Corona Torres por su apoyo y consejos en la parte citoembriológica de la tesis.

Al Dr. Humberto Vaquera Huerta por su apoyo y consejos en la parte estadística de la tesis.

Al M Sc. Armando Peralta Martínez por su valiosa colaboración con los materiales de la investigación, así como también, el financiamiento recibido en la parte de campo y molecular.

A los trabajadores de Agroproductos de Iguala, por su valiosa cooperación en los trabajos de campo, en especial al Ing. Héctor Figueroa.

A todos los alumnos y personal docente, de laboratorio, administrativo y de campo del Instituto de Recursos Genéticos y Productividad (Orientación en Semillas) por la colaboración que recibí de ellos durante mi estancia en el doctorado.

A todo el personal del Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Autónoma Chapingo por su valiosa colaboración y consejos en los análisis moleculares.

Al Ing. Carlos Martínez del CIMMYT, por su colaboración y asesoría en los análisis moleculares.

Al M.A. Roberto Ruiz Silva, al Ing. Guillermo Santamaría Estrada, al Ing. Santiago Valle Castro y al Ing. Bulmaro Cruz Ramos de SAGARPA Morelos, por su decidido apoyo en el logro de mis objetivos.

A todos los compañeros y compañeras de SAGARPA, por sus buenos deseos y confianza en mis estudios doctorales.

A todos mis amigos y amigas de Guerrero y Morelos por sus buenos deseos y confianza en la terminación de mis estudios.

A la Lic. Mariana Araceli Maya Vargas y a Blanca Portas por su valiosa colaboración en la edición de esta tesis.

A mis hermanos Luis, Carmela, Vicente, Héctor, Antonio, Estela y Rosa María, por sus buenos deseos y apoyo durante mis estudios.

A mis primos y primas, José, Juan, Jesús, Arturo, Alfonso, Cristina, La Guera, Paty, Juana, Gela, Mary, Beatriz, Georgina, Silvia, Vicenta, cuñados, Alejandro, Daniel, cuñadas, Sucel, Rosario, Melania, Margarita, Paty, Martha, Sara, tíos, Jesús, José, tías, Lupe, Andrea, sobrinos, sobrinas, y todos los demás por su apoyo.

Dedicatoria

En especial a mi esposa Hilda por la paciencia, comprensión y apoyo que me ha brindado.

À la memoria de:

Mis padres:

Rosalío Poblete Franco

y

Francisca Vargas Escamilla

Mi hermano:

Manuel

“Quizá no estén presentes físicamente pero su espíritu brillara por siempre”

CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN AGRONÓMICA, MORFOLÓGICA,
CITOEMBRIOLÓGICA Y MOLECULAR DE HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS DE
Brachiaria

Jaime Poblete Vargas, Dr.

Colegio de Postgraduados 2008.

Se realizó un trabajo enfocado a la caracterización de híbridos y progenitores del género *Brachiaria*, se dividió en tres etapas. En la primera se evaluaron características morfológicas y citológicas en 200 híbridos interespecíficos de este género, obtenidos a partir de 10 cruzas entre cinco híbridos elite sexuales provenientes de *Brachiaria ruziziensis*, y tres híbridos apomícticos originados de *Brachiaria brizantha*. Los resultados indicaron que las variables producción de semilla, diámetro de tallo, longitud de lámina foliar, sin pubescencia en lámina foliar, calificación de planta baja, ausencia de estolones, y sin pubescencia en vaina, presentaron la mayor variación; producto de una prueba citoembriológica se obtuvieron segregaciones del tipo reproductivo en proporción 1:1 en comportamiento apomíctico y sexual. En otra etapa del trabajo se establecieron y caracterizaron morfológicamente 135 progenies de 10 cruzas de *Brachiaria*, donde hubo tres progenitores masculinos 18, 94 y 71 y cinco progenitores femeninos 41, 29, 100, 110 y 143A; se midieron 13 variables cuantitativas y 12 cualitativas y el resultado fue que los progenitores masculinos 18 y 94 produjeron más progenies apomícticas; se realizó un análisis de componentes principales utilizando las variables cuantitativas y cualitativas, en el cual las variables que contribuyeron a explicar gran parte de la variación total observada fueron, longitud del eje de la inflorescencia (LEI), altura de la planta (ADP) y longitud del primer racimo (LPR). En el análisis de conglomerados de variables cuantitativas se formaron varios grupos, siendo los más importantes los tres primeros; el primero y tercero fueron conformados en su mayoría por híbridos del progenitor masculino 18; el segundo se conformó en mayor proporción por progenie derivada del progenitor masculino 94; en el análisis de componentes con las variables cualitativas, se formaron cuatro grupos, en el primero y segundo proliferó progenie del progenitor 18; en el cuarto grupo los ocho híbridos fueron progenie del progenitor masculino 94. En la tercera etapa del trabajo se realizó un análisis con los marcadores moleculares AFLPs y CAPS, se utilizaron 30 genotipos: ocho progenitores y 22 híbridos. La diversidad genética (DG) encontrada en la muestra de 30 genotipos evaluados mediante análisis de AFLPs fue amplia, con alto grado

de polimorfismos (90.05 %). Un dendrograma sugirió que existen dos grupos principales: el primero y más numeroso está integrado por los híbridos derivados en su mayoría del progenitor masculino 94, y en menor cantidad de los progenitores masculinos 18, y 71 y los femeninos 29, y 110; el segundo grupo lo integran los híbridos procedentes de los progenitores femeninos 41, 100 y 143A; en el análisis de CAPS de 4 bases hubo buena amplificación generándose un gran polimorfismo (79.76 %). Se observó la formación de dos grupos, siendo el grupo I el más grande con 27 genotipos, mientras que el segundo agrupó los tres restantes; En el análisis factorial de correspondencia simple de AFLPs, algunas bandas se asociaron con el progenitor masculino 18, el cual se relacionó con la banda AF8-14, mientras los progenitores femeninos 29 y 110 se relacionaron con la banda AF8-10 y el progenitor femenino 41 con la banda AF3-34.

En la prueba de CAPS el progenitor masculino 18 se relacionó con la banda C6-26, mientras el progenitor femenino 143A con la banda C15-20; todos los progenitores femeninos o sexuales se asociaron con la banda C15-8, lo que indica una asociación con la sexualidad o con algún gen otorgado por *Brachiaria ruziziensis*. En general con las técnicas utilizadas se pudo caracterizar e identificar de manera más completa los materiales genéticos utilizados en la investigación.

Palabras clave: *Brachiaria spp*, apomíctico, citoembriológica, progenie, AFLPs, CAPS.

CHARACTERIZATION AND IDENTIFICATION AGRONOMIC, MORPHOLOGICAL,
CITOEMBRIOLOGIC AND MOLECULAR OF INTERSPECIFIC HYBRID OF
Brachiaria

Jaime Poblete Vargas, Dr.

Colegio de Postgraduados 2008.

This research was focused on characterization of hybrids and parents of *Brachiaria* genus, which was divided into three stages. During the first stage morphologic and cytologic characteristics were evaluated in 200 interspecific hybrids of this genus, that were obtained from 10 crosses between five elite sexual hybrids of *Brachiaria ruziziensis* and three apomictic hybrids originated from *Brachiaria brizantha*. The results indicated that production of seed variables, stem thickness, leaf length, leaf without pubescence, ground floor qualification, no runners and pods without pubescence showed the highest variation. These results came out in an citoembriologic test with a segregation of reproductive rate in 1:1 ratio in apomictic and sexual behavior. In another stage, 135 progeny of 10 crosses of *Brachiaria* were morphologically established and characterized, where the outcome was three male parents, 18, 94 and 71 and five female parents: 41, 29, 100, 110 y 143A; 13 quantitative variables and 12 qualitative variables, from which, much of the variation observed was explained by the axis of inflorescence length (AIL), plant height (PH) and first cluster length (FCL); from the cluster analysis of the quantitative variables, several groups resulted but only three were the most important; the first and third were composed mostly by male hybrid parent 18; the second mainly by progeny of male parent 94.

Using qualitative variables in a cluster analysis, four groups were obtained; the first and second one grouped progeny of the male parent 18; the fourth group included eight hybrids derived from male parent 94. With the data of a third stage, an analysis was carried out using AFLPs and CAPS molecular markers, in 30 genotypes (8 parents and 22 hybrids). Wide genetic diversity was found from the AFLPs analysis, showing high degree of polymorphisms (90.05%). A dendrogram suggested the existence of two main groups: the first and largest contained hybrids derived from male parents 29 and 110. The second group included hybrids from female parents 41, 100 and 143A. The analysis of CAPS using 4 bases, indicated good amplification, generating great polymorphism (79.76%); two groups were obtained too, group 1 being the largest with 27 genotypes and group 2 with

the remaining three genotypes. From a correspondence simple factor analysis of AFLPs data we found that some bands were associated with male parent 18 (band AF8-14), female parent 29 and 110 (band AF8-10), and female parent 41 (band AF3-34). The CAPS analysis indicated that male parent 143A with band (C15-20); all female or sexual parents were associated in some way with the sexuality of a gen given by *Brachiaria ruziziensis*. Overall, with the techniques described above, was feasible to characterize and identify in a better extent, the genotypes used in this research.

Keywords: *Brachiaria*, apomictic, citoembriologic, progeny, AFLPs, CAPS.



INDICE

	<u>Pag.</u>
RESUMEN GENERAL.....	<i>xii</i>
GENERAL ABSTRACT.....	<i>xiv</i>
CAPITULO I	
1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1.1. Marco teórico.....	1
1.2. Objetivos.....	3
1.3. Hipótesis.....	3
1.4. Literatura citada.....	4
CAPITULO II	
2. REVISION DE LITERATURA GENERAL.....	6
2.1. Introducción.....	6
2.2. Complejos agámicos.....	7
2.3. Citoembriología.....	7
2.4. Apomixis.....	8
2.5. Prueba de progenie.....	9
2.6. Caracterización de plantas.....	10
2.7. Técnicas moleculares.....	12
2.8. AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism).....	12
2.9. CAPS (Cleaved Amplified Polimorphic Sequences).....	13
2.10. Literatura citada.....	14
CAPITULO III. SELECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE HÍBRIDOS DE <i>Brachiaria spp.</i> EN BASE A CARACTERES AGRONÓMICOS, MORFOLÓGICOS, CITOEMBRIOLÓGICOS Y DE PRODUCCIÓN DE SEMILLA.	
RESUMEN.....	19
3.1. INTRODUCCIÓN.....	20
3.1.2. Objetivos específicos.....	21
3.1.3. Hipótesis.....	21
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
3.2.1. Material genético.....	22
3.2.2. Origen del material utilizado.....	22
3.2.2.1. Progenitores masculinos.....	22
3.2.2.2. Progenitores femeninos.....	22
3.2.3. Caracterización morfología y agronómica.....	23
3.2.4. Análisis estadístico.....	24
3.2.5. Prueba citoembriológica.....	25
3.2.6. Análisis estadístico de prueba citoembriológica.....	26
3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
3.3.1. Caracterización de híbridos.....	27
3.3.1.1. Variables cuantitativas.....	27
3.3.1.2. Variables cualitativas.....	30
3.3.1.3. Prueba citoembriológica.....	36
3.3.1.4. Análisis de correlación.....	37
3.4. CONCLUSIONES.....	39
3.5. LITERATURA CITADA.....	40



	<u>Pág.</u>
CAPITULO IV PRUEBA DE PROGENIE Y CARACTERIZACIÓN MORFOLOGICA Y AGRONOMICA DE HIBRIDOS APOMICTICOS INTERESPECIFICOS DE <i>Brachiaria</i>	
RESUMEN.....	42
4.1. INTRODUCCION.....	43
4.1.1. Objetivos específicos.....	44
4.1.2. Hipótesis.....	44
4.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	45
4.2.1. Localización del sitio experimental en campo.....	45
4.2.2. Material Genético.....	45
4.2.3. Desarrollo del trabajo.....	45
4.2.4. Análisis estadístico.....	46
4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	49
4.3.1. Análisis de progenies en campo.....	49
4.3.2. Análisis de variables cuantitativas.....	50
4.3.3. Análisis de variables cualitativas.....	59
4.4. CONCLUSIONES.....	65
4.5. LITERATURA CITADA.....	66
CAPÍTULO V CARACTERIZACION DE PROGENITORES E HÍBRIDOS APOMÍCTICOS DEL GÉNERO <i>Brachiaria spp.</i> MEDIANTE LOS MARCADORES MOLECULARES AFLPs Y CAPS.	
RESUMEN.....	68
5.1. INTRODUCCIÓN.....	69
5.1.2. Objetivos específicos.....	70
5.1.3. Hipótesis.....	70
5.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	71
5.2.1. Análisis moleculares.....	71
5.2.1.1. Material vegetal.....	71
5.2.1.2. Extracción de ADN.....	71
5.2.1.3. Cuantificación de ADN.....	73
5.2.1.4. Calidad de ADN.....	73
5.2.2. CAPS (Secuencia polimórfica amplificada y cortada).....	73
5.2.2.1. Reacciones de amplificaciones con PCR.....	73
5.2.2.2. Geles de acrilamida.....	74
5.2.3. AFLPs (Polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados).....	75
5.2.3.1. Digestión para AFLPs.....	75
5.2.3.2. Ligación de adaptadores.....	76
5.2.3.3. Reacción de preamplificación.....	76
5.2.3.4. Amplificación selectiva.....	77
5.2.3.5. Electroforesis.....	78
5.2.3.6. Tinción y lavado del gel.....	79
5.2.3.7. Revelado del gel.....	79
5.2.4. Análisis estadístico.....	80
5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	81
5.3.1. Análisis CAPS (Amplificación de secuencias cortadas polimórficas).....	81



	<u>Pág.</u>
5.3.2. Análisis de AFLPs (Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados).....	83
5.3.3. Comparación de análisis CAPS y AFLPs.....	87
5.3.4. Análisis factorial por correspondencia simple de AFLPs.....	87
5.3.5. Análisis factorial por correspondencia simple de CAPS.....	94
5.4. CONCLUSIONES.....	100
5.5. LITERATURA CITADA.....	101
CAPITULO VI ANALISIS GENERAL	
6.1. ANÁLISIS GENERAL.....	104
6.2. CONCLUSIONES GENERALES.....	106
6.3. LITERATURA CITADA.....	107
CAPITULO VI ANEXOS	
ANEXOS.....	108

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN GENERAL

CAPITULO II
REVISION DE LITERATURA GENERAL

CAPITULO III

SELECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE HÍBRIDOS DE *Brachiaria spp.* EN BASE
A CARACTERES AGRONÓMICOS, MORFOLÓGICOS,
CITOEMBRIOLÓGICOS Y DE PRODUCCIÓN DE SEMILLA

CAPITULO IV

PRUEBA DE PROGENIE Y CARACTERIZACION MORFOLÓGICA Y AGRONÓMICA DE HÍBRIDOS APOMÍCTICOS INTERESPECÍFICOS DE *Brachiaria*.

CAPITULO V

CARACTERIZACIÓN DE PROGENITORES E HÍBRIDOS APOMÍCTICOS DEL GÉNERO *Brachiaria spp* MEDIANTE LOS MARCADORES MOLECULARES, AFLPs y CAPS.

CAPITULO VI
ANALISIS GENERAL

CAPITULO VII ANEXOS

FIGURAS

Pag.

CAPITULO III

Figura 1. Correlaciones de cada variable original con los componentes principales.....	29
Figura 2. Dendrograma de híbridos de diez cruzas del género <i>Brachiaria</i> en base a seis variables cuantitativas.....	30
Figura 3. Correlaciones de cada variable original con los componentes principales.....	35
Figura 4. Dendrograma con distancia euclidiana de 24 variables cualitativas de híbridos diez cruzas interespecíficas de <i>Brachiaria</i>	36

CAPITULO IV

Figura 5. Correlaciones de cada variable original con los componentes principales.....	52
Figura 6. Distribución de 44 híbridos del género <i>Brachiaria</i> en función de los componentes principales, obtenidos con la matriz de correlaciones de 13 variables cuantitativas.....	53
Figura 7. Distribución de 9 cruzas de genotipos del género <i>Brachiaria</i> en función de los componentes principales I y II, obtenidos con la matriz de correlaciones de 13 variables cuantitativas.....	54
Figura 8. Dendrograma de clasificación de nueve cruzas entre genotipos del género <i>Brachiaria</i> , con base en 13 variables cuantitativas.....	55
Figura 9. Dendrograma de 44 híbridos interespecíficos del género <i>Brachiaria</i> en base a nueve variables cuantitativas.....	57
Figura 10. Distribución de 44 híbridos del género <i>Brachiaria</i> en función de los componentes principales I y II, obtenidos con la matriz de correlaciones de 12 variables cualitativas	63
Figura 11. Dendrograma de 44 híbridos interespecíficos del género <i>Brachiaria</i> en base a 12 variables cualitativas.....	64

CAPITULO V.

Figura 12. Árbol de relación genética de progenitores y progenie de <i>Brachiaria</i> utilizando marcadores CAPS.....	83
Figura 13. Árbol de relación genética de progenitores y progenie de <i>Brachiaria</i> utilizando AFLPs.....	86
Figura 14. Representación tridimensional del conjunto de vectores propios para los genotipos asociados, producto del análisis factorial por correspondencia simple.....	91
Figura 15. Representación tridimensional del conjunto de vectores propios para las bandas asociadas, producto del análisis factorial por correspondencia simple.....	91

	<u>Pág.</u>
Figura 16. Perfiles AFLPs de los productos de amplificación del iniciador E ACC + M CAC, donde el progenitor femenino 41 se asoció con la banda AF3-34 y el híbrido 4171-9 con la banda AF3-42.....	92
Figura 17. Perfiles AFLPs de los productos de amplificación del iniciador E ACT + M CTA donde el progenitor masculino 18 se relacionó con la banda AF8-14, los progenitores femeninos 29 y 110 se relacionaron con la banda AF8-10, el híbrido 143A18-23 con la banda AF8-6 y el progenitor femenino 143A se separó de los demás genotipos y se asoció con la banda AF8-2.....	93
Figura 18. Representación tridimensional del conjunto de vectores propios para los genotipos asociados, producto del análisis factorial por correspondencia simple.....	97
Figura 19. Representación tridimensional del conjunto de vectores propios para las bandas asociadas, producto del análisis factorial por correspondencia simple.....	97
Figura 20. Perfiles CAPS de los productos de amplificación del iniciador C-15, donde el progenitor femenino 143A se relacionó con la banda C15-20, todos los progenitores femeninos o sexuales se asociaron con la banda C15-8 y el híbrido 10018-1 con la banda C15-4.....	98
Figura 21. Perfiles CAPS de los productos de amplificación del iniciador C-06, en donde el progenitor masculino 18 se relacionó con la banda C6-26 y el híbrido 4194-19 se asocio con la banda C6-21.....	99

CUADROS

Pag.

CAPITULO III.

Cuadro 1. Origen de las hembras del género <i>Brachiaria spp.</i> utilizadas para el cruce con híbridos apomícticos.....	23
Cuadro 2. Genealogía de Híbridos F ₁ de <i>Brachiaria spp.</i> , y progenitores utilizados en su formación	23
Cuadro 3. Caracteres morfológicos y agronómicos evaluados en los híbridos F ₁ de <i>Brachiaria spp.</i> en Iguala, Gro	24
Cuadro 4. Reactivos, proporción y tiempos de la prueba de clareamiento.....	26
Cuadro 5. Descripción de seis variables cuantitativas de 200 híbridos de diez cruzas de <i>Brachiaria spp.</i>	28
Cuadro 6. Valores característicos y proporción de la varianza total explicada por cada uno de los componentes principales con base en seis variables cuantitativas, en híbridos de diez cruzas del género <i>Brachiaria</i>	28
Cuadro 7. Descripción de cruzas de diez híbridos F ₁ utilizando ocho características cualitativas.....	31
Cuadro 8. Valores característicos y proporción de la varianza total explicada por cada uno de los componentes principales con base en ocho variables cualitativas, en híbridos de diez cruzas del género <i>Brachiaria</i>	32
Cuadro 9. Vectores característicos de las variables de mayor valor descriptivo de cada variable original con respecto a su componente principal de ocho variables cualitativas.....	33
Cuadro 10. Proporción de individuos apomícticos, sexuales y sin definir producidos en la F ₁ identificados en la prueba citoembriológica practicada en Montecillo, Méx.....	37
Cuadro 11. Segregación por modo reproductivo en la prueba citoembriológica de híbridos interespecíficos de <i>Brachiaria spp.</i> (prueba de ji cuadrada).....	38
Cuadro 12. Prueba de regresión ordinal entre las variables morfológicas y agronómicas y el modo reproductivo de <i>Brachiaria spp.</i>	38

CAPITULO IV.

Cuadro 13. Progenies establecidas en la parcela de investigación.....	47
Cuadro 14. Lista de descriptores morfológicos y agronómicos evaluados en las progenies de <i>Brachiaria spp.</i>	48
Cuadro 15. Progenies con comportamiento apomíctico, Iguala, Gro. 2005.....	49
Cuadro 16. Valores característicos y proporción de la varianza total explicada por cada uno de los componentes principales con base en 13 variables cuantitativas, en 44 híbridos del género <i>Brachiaria</i>	50
Cuadro 17. Vectores característicos de las variables de mayor valor descriptivo de cada variable original con respecto a su componente principal de 13 variables cuantitativas	51

	<u>Pág.</u>
Cuadro 18. Significancia entre los grupos formados en el análisis de conglomerados.....	59
Cuadro 19. Frecuencia por clase de variables cualitativas evaluadas en 44 híbridos del género <i>Brachiaria</i>	61
Cuadro 20. Vectores característicos de las variables de mayor valor descriptivo de cada variable original con respecto a su componente principal de 12 variables cualitativas.....	62

CAPITULO V.

Cuadro 21. Genotipos y claves del material de <i>Brachiaria</i> utilizado en la caracterización con marcadores moleculares.....	72
Cuadro 22. Orden y volumen de reactivos para la digestión de ADN usados en las muestras analizadas con CAPS.....	74
Cuadro 23. Reactivos, concentración del stock y volumen utilizado para la amplificación de las muestras de genotipos de <i>Brachiaria spp.</i> analizados con CAPS	75
Cuadro 24. Orden y volumen de reactivos usados en la digestión de ADN de cada muestra de genotipos de <i>Brachiaria spp.</i> caracterizados por AFLPs	76
Cuadro 25. Orden de medición y volumen de los componentes de ligación que se le agregó a cada tubo con ADN de pastos previamente digerido.....	76
Cuadro 26. Volumen de cada componente para la reacción de preamplificación de ADN de los pastos evaluados.....	77
Cuadro 27. Combinaciones de iniciadores de AFLPs evaluados en las muestras de ADN de <i>Brachiaria spp.</i>	77
Cuadro 28. Composición de las mezclas utilizadas para la amplificación selectiva de ADN.....	78
Cuadro 29. Soluciones utilizadas en el gel desnaturalizante.....	79
Cuadro 30. Iniciadores aleatorios utilizados para los perfiles CAPS y total de bandas polimórficas de progenitores y progenie del género <i>Brachiaria</i>	81
Cuadro 31. Iniciadores aleatorios utilizados para los perfiles AFLPs y total de bandas polimórficas de progenitores y progenie del género <i>Brachiaria</i>	86
Cuadro 32. Valores propios de genotipos del género <i>Brachiaria</i> producto del análisis factorial por correspondencia simple de AFLPs.....	88
Cuadro 33. Relación de frecuencia y la distancia χ^2 del punto de cada genotipo estudiado al origen de la gráfica de AFLPs.....	90
Cuadro 34. Valores propios de genotipos del género <i>Brachiaria spp.</i> producto del análisis factorial por correspondencia simple de CAPS.....	95
Cuadro 35. Relación de frecuencia y la distancia χ^2 del punto de cada genotipo estudiado al origen de la gráfica de CAPS.....	96

ANEXOS VII

Cuadro 36. Vectores característicos de las variables de mayor valor descriptivo de cada variable original con respecto a su componente principal de seis variables cuantitativas.....	108
Cuadro 37. Datos de variables cuantitativas de 44 híbridos del género <i>Brachiaria</i> .	108
Cuadro 38. Vectores propios de las bandas asociadas con los 30 genotipos analizados con AFLPs.....	109
Cuadro 39. Vectores propios de las bandas asociadas con los 30 genotipos analizados con CAPS.....	111



1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. Marco teórico

En el trópico de América Latina, existen grandes extensiones de tierra dedicadas a la ganadería bovina en pastoreo extensivo, tradicionalmente los forrajes han sido la fuente más económica y disponible para la alimentación de rumiantes (Argel *et al.*, 2000; Quero *et al.*, 2007). En México, de 195.8 millones de hectáreas que conforman su territorio, la ganadería ocupa el 54%, con 105 millones de hectáreas, en las que probablemente se encuentra gran parte de la diversidad genética vegetal (www.inegi.gob.mx). No obstante que en el trópico existe gran cantidad de géneros y especies de gramíneas que crecen en la estación cálida del año, a partir de las cuales se pudieran desarrollar variedades superiores, es común que sólo se elijan una o dos especies con el mayor potencial, en los programas de investigación (Hanna, 2000; Quero *et al.* 1994; Quero *et al.*, 2007). Muchas de estas especies son apomícticas, lo que significa que no presentan segregación, resultado de la recombinación de los gametos y fusión de los mismos, fenómeno que con frecuencia es de gran importancia en el mejoramiento; la apomixis se ha considerado un fenómeno relevante en la agricultura por la posibilidad de transformar cultivos de importancia mundial, normalmente de reproducción sexual, en clones de procedencia materna, apomícticos, condición que confiere ventajas de aplicación agrícola, como de alguna forma lo señalan (Koltunow y Grossniklaus, 2003).

Varios investigadores han observado un incremento considerable en la distribución de la apomixis entre las angiospermas (Carman, 1997). Dentro de las plantas conocidas como apomícticas se confirman tres familias, *Asteraceae*, *Rosaceae*, y *Poaceae*, las cuáles constituyen el 10 % de las especies con flores.

En la actualidad se está investigando como controlar la apomixis en varios géneros de plantas. En general, se ha encontrado que la apomixis es controlada por herencia cualitativa, por lo tanto, al lograr el control genético de la apomixis en el mejoramiento y transferirlo a otras especies, se lograrían crear nuevos genotipos con mayores cualidades. Estos esfuerzos se han dirigido a varias especies entre las que destacan los géneros *Bothriochloa*, *Panicum*, *Cenchrus*, *Paspalum*, *Brachiaria*, *Tripsacum*, y posiblemente *Eragrostis* (Savidan, 2000).

Brachiaria es un género que comprende varias especies de importancia comercial como son: *B. decumbens*, *B. brizantha*, *B. dictyoneura*, *B. humidicola*, y *B. ruziziensis*, que



fueron introducidas en América Tropical (Miles y Lapointe, 1992); aunque es en Brasil donde se siembra la mayor superficie, con al menos 35 millones de hectáreas de praderas con esta gramínea forrajera (Vera *et al.*, 1992). En este género hay tres especies importantes: *Brachiaria decumbens*, *B. brizantha* y *B. ruziziensis*, las cuales pertenecen al mismo complejo agámico, donde las dos primeras son apomíticas y la última es sexual; mediante el uso de colchicina (Swenne *et al.*, 1981), *B. ruziziensis* fue convertido en tetraploide, superando las barreras de ploidía y por consiguiente abriendo la posibilidad de obtener híbridos, que pudieran ser liberados después de estudios exhaustivos (Miles y Valle, 1998); es necesario mencionar que la identificación de plantas apomíticas es uno de los pasos más importantes en un programa de mejoramiento (Savidan, 2000).

Dentro de este aspecto existen tres técnicas que son útiles para hacer la identificación de cualquier material, la morfológica, la citológica y la molecular (Bhat *et al.*, 2005).

Mediante el uso de descriptores morfológicos es posible visualizar si la progenie tiene características paternas, que permiten dilucidar si los materiales F₁, son apomíticos; el análisis de sacos embrionarios mediante la técnica de clareamiento de pistilos (Young *et al.*, 1979), permite identificar los genotipos apomíticos y sexuales; por último las diferentes técnicas moleculares RAPD, RFLP, y AFLPs, auxilian en la detección de variación de los genotipos a nivel molecular (Ozias *et al.*, 1993).

En general existen pocos programas de mejoramiento genético de gramíneas forrajeras, en donde se utilice germoplasma debidamente caracterizado, que involucre caracteres relacionados con potencial agronómico y de producción y calidad de semilla. En México se ha trabajado muy poco con mejoramiento genético, y únicamente se reportan trabajos en los géneros *Cenchrus ciliaris* en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, en Saltillo, Coahuila, y de *Brachiaria spp.*, en el INIFAP, Campo Valle del Papaloapan, Veracruz (Sánchez, 2006); sin embargo aún no se han liberado materiales sobresalientes, por lo tanto es muy importante realizar investigación tendiente a crear y caracterizar nuevos materiales considerando otros criterios y mejores características; las cuales constituyan una mayor oferta a los ganaderos, para mejores opciones de alimentación del ganado en México. Con base en la problemática y necesidades planteadas, los objetivos del presente trabajo fueron:



1.2. Objetivos

Caracterizar y seleccionar híbridos *Brachiaria spp.*, por sus características agronómicas, morfológicas, citoembriológicas y de producción de semilla.

Identificar progenies apomícticas y sexuales de híbridos interespecíficos del género *Brachiaria*.

Caracterizar progenitores e híbridos apomícticos del género *Brachiaria spp.* con dos marcadores moleculares, AFLPs y CAPS.

1.3. Hipótesis

Las características fenotípicas, agronómicas y citológicas permitirán seleccionar híbridos de *Brachiaria spp.*

Mediante la prueba de progenies se podrá identificar el modo reproductivo de híbridos interespecíficos de *Brachiaria*.

Las técnicas moleculares AFLPs y CAPS proporcionaran la relación genética de genotipos del género *Brachiaria*.



1.4. Literatura Citada

- Argel, P. J., Hidalgo, C. A., y Lobo, M. D. 2000. Pasto Toledo (*Brachiaria brizantha* CIAT 26110) Boletín Técnico CIAT, MAG, y Consorcio Tropileche. 14 p.
- Argel, P. J., y G. Séller-Grein, 1998. Experiencia Regional con *Brachiaria*: Región América Tropical-Tierras Bajas Húmedas. *In: Brachiaria: Biología, agronomía y mejoramiento.* ed. J. W. Miles, B. L. Mass y C. B. do Valle, colaboración de V. Kumble, CIAT, Cali, Colombia, y EMBRAPA/CNPGC, Campo Grande, Brasil. 312 p.
- Bhat, V., K. K. Dwivedi, J. P. Khurana and S. K. Sopory. 2005. Apomixis: An enigma with potential applications. *Current Science.* 89 (11): 1879-1893.
- Carman, J.G. 1997. Asynchronous expression of duplicate genes in angiosperms may cause apomixis, bispory, tetraspory, and polyembryony. *Biological Journal of the Linnean Society.* 61: 51-94.
- Koltunow, A. M. 1993. Apomixis: Embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. *The Plant Cell.* 5: 1425-1437.
- Hanna, W. W. 2000. Desarrollo de variedades superiores de gramíneas forrajeras tropicales para el futuro. *In: Tecnologías para la Explotación Sustentable del Recurso Forrajero.* 5 y 6 de octubre de 2000, Chapingo, México.
- Miles, J. W., S. L. Lapointe. 1992. Regional germplasm evaluation: A portfolio of germplasm options for the major ecosystems of tropical America. *In: Pastures for the tropical Lowlands: CIAT, Cali, Colombia.* pp: 9-28.
- Miles, J. W., and C. B. do Valle. 1998. Manipulación de la Apomixis en el mejoramiento de *Brachiaria*. *In: Brachiaria: Biología, agronomía y mejoramiento.* ed. J. W. Miles, B. L. Mass y C. B. do Valle, colaboración de V. Kumble, CIAT, Cali, Colombia, y EMBRAPA/CNPGC, Campo Grande, Brasil. 312 p.
- Ozias-Akins, P., E. L. Lubbers, W. W. Hanna, and J. W. McNay. 1993. Transmission of the apomictic mode of reproduction in *Pennisetum*: co-inheritance of the trait and molecular markers. *Theoretical and Applied Genetics.* 85 (5): 632-638.
- Quero, C. A. R., D. M. Talavera y J. F. Q. Enríquez. 1994. Investigación sobre forrajes en México, avances o *status quo*. I Simposio sobre la conservación de la biodiversidad en el Noreste de México. Linares, Nuevo León, México. p42. Resumen.
- Quero, C. A. R., J. F. Q. Enríquez. y L. J. Miranda. 2007. Evaluación de especies forrajeras en América tropical, avances o *status quo*. *Interciencia-Venezuela.* 32 (8): 566-571.
- Sánchez H., M. 2006. Morfología y potencial forrajero de híbridos interespecíficos del género *Brachiaria*. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas. 84p.



-
- Savidan, Y. 2000. Apomixis: Genetics and Breeding. Plant Breeding Reviews. Volume 18: 13-85.
- Swenne, A., B. P. Louant, M. Dujardin. 1981. Induction par la colchicine de formes autotétraploïdes chez *Brachiaria ruziziensis* Germain et Evrard (Graminée). Agronomie Tropicale. 36(2): 134-141.
- Vera R. R., R. Thomas, L. Sanint and J. L. Sanz. 1992. Development of sustainable ley-farming systems for the acid-soil savannas of tropical America. Anais Academia Brasileira de Ciências 64 (Suppl. 1) pp: 105-125.
- Young B. A., R. T. Sherwood, and E. C. Bashaw. 1979. Cleared-pistil and thick-sectioning techniques for detecting aposporous apomixes in grasses. Canadian Journal Botany. 57: 1668-1672.



2. REVISION DE LITERATURA GENERAL

2.1. Introducción

Las especies del género *Brachiaria* son en la actualidad los pastos forrajeros más importantes en los trópicos de América (Valle y Miles, 1994), esto debido a su excelente adaptación a suelos infértiles y ácidos (Keller-Grein *et al.*, 1998); muchas especies de este género son apomícticas; la apomixis es definida como una reproducción asexual por medio de semilla (Nogler, 1984), por otro lado, la apomixis dificulta o imposibilita los cruzamientos. El nivel de ploidía elevado (tetraploides a decaploides) se refleja en una mayor complejidad en la expresión de los caracteres de interés agronómico, dificultando la selección clonal para la obtención de variedades sintéticas (Pagano y Rimieri, 2001). La hibridación artificial en este género ha sido un objetivo de los investigadores desde principios de la década de los 70, por lo cual, Ferguson y Crowder (1974), intentaron producir híbridos mediante la polinización del diploide sexual *Brachiaria ruziziensis*, con polen de un tetraploide apomíctico de *Brachiaria decumbens*, el intento no fue exitoso debido a las diferencias en la ploidía; Hacker (1988) también realizó un cruzamiento entre una accesión diploide de *Brachiaria decumbens* y un tetraploide apomíctico, el híbrido resultante fue un triploide estéril, y por consiguiente no útil para producir progenie; por esto mismo, fue muy importante la tetraploidización de la planta sexual *Brachiaria ruziziensis* por medio de la colchicina (Swenne, *et al.*, 1981). Ésto facilitó el camino para que se pudiera realizar hibridación en plantas con esta característica, asimismo los híbridos apomícticos se reproducen fielmente y cualquier genotipo apomíctico elite se reproduce o multiplica rápidamente por semilla (Valle y Savidan, 1998). Otra de las ventajas de este tipo de reproducción es que incrementan la oportunidad para desarrollar combinaciones de genes superiores e incorporarlos rápidamente a los materiales en estudio (Hanna y Bashaw, 1987). El conocimiento actual de especies naturalmente apomícticas indica que éstas son también poliploides y de manifestación apomíctica facultativa, es decir que las plantas hembra producen proporciones variables de semillas de origen tanto sexual como asexual en sus estructuras florales, y que la dotación cromosómica en ellas es de tres o más juegos completos (Grimanelli *et al.* 2001).



2.2. Complejos agámicos

Las pasturas de *Brachiaria* se componen de pocos genotipos, que están muy extendidos, e incluyen siete especies. Cinco accesiones pertenecen a cuatro de estas especies y han sido la fuente de 20 cultivares que fueron liberados en diferentes partes de América Tropical, en consecuencia, la base genética de los materiales cultivados de *Brachiaria*, es extremadamente estrecha (Keller-Grein *et al.*, 1998). *Brachiaria* es un género conformado de complejos agámicos (Miles y Valle, 1998); compuesto de híbridos derivados en forma natural y fijados mediante apomixis pero que no representan especies distintas, pues las diferencias observadas son debidas al vigor híbrido, las poblaciones diploides conservan sexualidad, mientras que las poliploides son apomíticas.

El complejo agámico más común en este género es el compuesto por las especies *Brachiaria brizantha*, *Brachiaria decumbens* y *Brachiaria ruziziensis*, en donde los dos primeros se utilizan como progenitores masculinos y la última como progenitor femenino; las cruces entre estas especies producen progenie híbrida, y estos híbridos son totalmente fértiles. Nidikumana (1985) hizo cruzamientos entre estas especies, y encontró más híbridos en la cruce de *ruziziensis* x *decumbens*, que en la de *ruziziensis* x *brizantha*, por lo cual se cree que los dos primeros son más compatibles; en los últimos años, se ha practicado hibridación entre diferentes accesiones de estas tres especies tanto en Brasil (CNPGC/EMBRAPA), como en Colombia (CIAT); la factibilidad de la hibridación a gran escala en el campo fue demostrada por Calderón y Agudelo- Cortés (1990), quienes obtuvieron más de 90% de híbridos entre la progenie de plantas sexuales tetraploides en polinización abierta, en *Brachiaria brizantha* o *Brachiaria decumbens*, como progenitores masculinos y como planta progenitora femenina se utilizó a *Brachiaria ruziziensis*; además, presentaron pruebas izoenzimáticas que demostraron la naturaleza híbrida de esta progenie.

2.3. Citoembriología

Existen varios métodos para determinar el modo de reproducción, aunque algunos son demasiado laboriosos, sobre todo en poblaciones híbridas grandes (Valle y Savidan, 1998); por lo que las técnicas que hacen translúcidos los tejidos (Crane y Carman, 1987; Young *et*



al., 1979) permiten realizar estudios de la apomixis, diferenciándose los dos tipos de sacos embrionarios que presenta este género; de esta manera se identifica el tipo *Polygonum* (octonucleado) de los sacos sexuales con una ovocélula, dos núcleos polares, tres antípodas y dos sinérgidas; mientras que el tipo *Panicum* (tetranucleado) de los sacos apospóricos carece de antípodas y posee un núcleo polar (Sherwood, 2001).

De un estudio en *Brachiaria ruziziensis* (Gobbe *et al.*, 1982), se observó que la meiosis masculina ocurre precozmente, mientras que el arquesporo se retarda para iniciar la meiosis, una vez que las diadas y tétradas se hayan formado en las anteras. Las divisiones meióticas femeninas son más lentas en las plantas tetraploides inducidas (4x) que en las diploides naturales (2x), además la maduración del megagametofito ocurre más rápidamente en los tetraploides que en los diploides. Nidikumana (1998) comparó el desarrollo sexual con el apospórico, dentro de los sacos embrionarios de *Brachiaria decumbens* y *Brachiaria brizantha*, y observó que los materiales apomícticos de ambas especies presentaron un desarrollo similar de los sacos embrionarios, de los cuales maduraron primero los sacos apospóricos y luego los meióticos; se considera que estas observaciones pueden ayudar a definir de manera más precisa la sexualidad o apomixis de una planta de *Brachiaria*.

2.4. Apomixis

La apomixis es un modo de reproducción asexual mediante semillas, que muchas plantas de diferentes familias botánicas poseen (Carman, 1997); ofrece ventajas para el desarrollo de genotipos con alto vigor, los cuales al ser apomícticos obligados pueden ser incrementados a través de polinización abierta y en los programas de mejoramiento es posible una rápida incorporación de características deseables (Hanna y Bashaw, 1987); por lo que resulta también de interés práctico para los genetistas como medio de fijación genética (Valle y Miles, 2001).

El término apomixis fue formalmente utilizado como un sinónimo de propagación vegetativa. En la actualidad, se utiliza también el término agamospermia para referirse a la reproducción asexual por semilla (Asker and Jerling 1992, Richards, 1997, Bhat, *et al.*, 2005). Aunque una más amplia definición aceptada de la apomixis es la de Nogler (1984), quien describe este proceso como una forma de reproducción asexual a través de semilla. El descubrimiento inicial de la apomixis en plantas superiores es atribuido a la observación



de una planta de *Alchornea ilicifolia* de Australia que luego fue cultivada en Inglaterra. Winkler (1908), introdujo el término apomixis que significa la sustitución de la reproducción sexual por un proceso de multiplicación asexual sin la fusión de la célula. Por lo tanto, algunos autores eligieron el uso de apomixis para describir todas las formas de reproducción asexual en plantas. Este modo de reproducción ocurre en alrededor de 35 familias de Angiospermas, lo cual constituye solamente 10 % de las especies que producen flores en estas se incluyen *Asteraceae*, *Rosaceae*, *Poaceae*, *Orchidaceae* y *Liliaceae*. (Hanna and Bashaw, 1987). De acuerdo con otra estimación, más de 80 familias y 300 géneros se reproducen a través de la apomixis (Khokhlov, 1976). La posibilidad de que exista poliembrionía es alta cuando se presenta la apomixis en cualquier especie que tiende a presentar esta condición (Carman, 1997), este fenómeno se presenta en el género *Orchidaceae*, pero no parece ser relativamente común. Algunos investigadores han postulado que patrones de distribución pueden reflejar la predisposición de ciertos grupos de plantas cuyo único desarrollo y cambios genéticos son característicos de la apomixis (Grimanelli, *et al.*, 2001a).

Existen tres formas diferentes de este proceso (apomítico o reproducción asexual) y han sido descritas como diplosporía, aposporía y embrionía adventicia. Los procesos apomíticos pueden ser iniciados en algún lugar durante el desarrollo del gametofito. Durante las dos formas de la diplosporía (mitótica y meiótica), la célula madre de la megaspora no entra en meiosis o se atrofia en una etapa temprana durante la meiosis y pasa solamente por divisiones mitóticas sin una reducción del genoma. En ambas formas, un saco embrionario es producido constando de una ovocélula no reducida y por lo tanto diploide (Leblanc *et al.*, 1995). En la aposporía, las células iniciales se originan de tejido nucelar y se diferencian después de tres divisiones mitóticas en sacos embrionarios que contienen una célula huevo diploide que se transforma en un embrión directamente sin la fecundación. En la embrionía adventicia, los tejidos somáticos del óvulo, nucela o célula integumentales se transforman en embriones directamente y compiten con el embrión sexual que es constituido después de la fecundación (Koltunow, 1993).

2.5. Prueba de progenie

Un aspecto deseable que deben tener los mejoradores es el conocimiento de los atributos de los progenitores a utilizar, ya que de ello depende el éxito de su programa y



objetivos (Valle y Miles, 2001); en cuanto al género *Brachiaria* se ha buscado obtener materiales vigorosos y resistentes al salivazo (Cercopideae; Cardona *et al.* 1999). Miles y Valle (1997) han mejorado poblaciones sexuales tetraploides, y luego se hibridizan con un apomítico apropiado, para producir apomíticos segregantes superiores. Los cultivares híbridos son ampliamente usados en la producción agrícola. Ellos son la primera generación (F_1) de la progenie, entre dos plantas genéticamente diferentes o líneas innatas. Las plantas F_1 , son heterocigótas, normalmente con uniformidad dentro del grupo, y pueden presentar el vigor híbrido, que es una característica codiciada. Los cultivares híbridos no pueden ser usados como semillas en la próxima generación (F_2) porque esta generación sería sumamente variable como consecuencia de la segregación genética (Koltunow *et al.*, 1995). El vigor híbrido es también reducido en la generación F_2 . Por lo tanto, los progenitores de semillas híbridas deben ser mantenidos indefinidamente para producir el híbrido deseado, el control de la apomixis permitiría la obtención y fijación del vigor híbrido en un programa de reproducción especial, las semillas podrían ser producidas por muchas generaciones sin la pérdida del vigor o alteración de genotipo.

La producción de estas semillas se simplificaría porque el aislamiento de las líneas no sería necesario para producir F_1 , y no habría la necesidad de mantener las líneas paternas, y el uso de líneas macho- estériles podría ser evitado. La contaminación por recombinación no se daría. En general, la apomixis permitiría una reducción importante en costos de producción de semillas híbridas. En este aspecto se destaca la prueba de progenies la cual se recomienda por dos años con la finalidad de observar más tiempo a los materiales (Miles y Valle, 1999).

2.6. Caracterización de plantas

La descripción morfológica, agronómica y genética de cualquier tipo de planta es muy importante. Esta debe incluir la mayoría de rasgos o características botánicas, sus posibles usos, aspectos de calidad, adaptación, y otra información como nombre común, tipo de suelo, etc. Otro aspecto importante en la descripción de variedades es el conocer las ventajas y desventajas que presenta bajo condiciones específicas de cultivo. La razón más común que se busca es que tenga una buena calidad y se desarrolle en condiciones difíciles ya que con los problemas actuales de degradación de suelos y falta de agua esta cualidad es importante (Christinck, 2000).



Las características relacionadas con manejo de la semilla cosechada, la selección de ésta, el procesamiento, el almacenamiento, el intercambio, complementadas con las medidas de control de recombinación, junto con las características morfológicas son muy importantes. Esta información en combinación con la estructura genética de las especies a estudiar, abren un nuevo panorama, lo cual, a menudo y en el caso de características genéticas, es muy difícil que estén disponibles para un genetista, por lo cual sería deseable probar los diferentes materiales genéticos en distintos ambientes para lograr mejores resultados (Marshall 1975). En lo que respecta a materiales apomícticos se pueden manejar los siguientes indicadores para realizar su caracterización: uniformidad en la progenie, hábito de crecimiento, floración, resistencia a plagas, tolerancia a sequía, y buena producción de semilla (Hanna y Bashaw, 1987). Algunas de estas evaluaciones se han realizado en Colombia por el CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical), y en Brasil (CNPGC/EMBRAPA) (Valle y Savidan, 1998).

Una de las razones importantes para desarrollar investigaciones tendientes al mejoramiento genético de este género es su carácter apomíctico. La introducción de la apomixis en un programa de mejoramiento tiene varias ventajas, ya que cuando el gene de la apomixis se introduce en especies sexuales, el germoplasma produce una F_1 , y tiene potencial para ser un nuevo cultivar si sus características indican que es un apomíctico obligado (Hanna, 1999). En este caso, el vigor no se pierde como en la generación de híbridos de cruces entre plantas sexuales, por lo cual el mantenimiento de genotipos de élite es fácil y eficiente y no hay necesidad del aislamiento para producir semillas puras de buena calidad. Por lo tanto, el objetivo fundamental de cualquier programa de mejoramiento de una especie, es la identificación entre las progenies para diferenciar genotipos superiores apropiados para el desarrollo de un nuevo cultivar, por lo que los objetivos de identificación que se han implementado para *Brachiaria* son variados (Miles y Valle, 1996).

Para la identificación existen dos clases de marcadores genéticos: los morfológicos y los moleculares (Tanksley, 1983). En primer caso, la caracterización e identificación tradicional de variedades se ha basado en el empleo de caracteres morfológicos y/o agronómicos (Rallo *et al.*, 2002), dentro de éstos, se cuenta con la prueba de progenie (Miles y Valle, 1991), no obstante, el uso de marcadores morfológicos en las plantas tiene muchas limitantes, pues su expresión puede estar sujeta a factores ambientales o fenológicos. Con frecuencia estos marcadores solo es posible evaluarlos a nivel de toda la



planta y cuando esta llega a su estado adulto. Para la gran mayoría de frutales tropicales esto significa una espera, no deseable, de varios años. Además, pueden ocurrir cambios epigenéticos que limitan el número de marcadores que pueden ser evaluados sin equivocación en la población segregante (Powell 1992; Phillips *et al.*, 1995), por otro lado, gracias a los avances en la biología molecular, se han desarrollado métodos de identificación y caracterización basados en el uso de marcadores moleculares que superan, en la gran mayoría de los casos, las limitaciones de los métodos tradicionales, ya que, estos son lentos y tediosos. Si se pudiera encontrar un marcador genético molecular estrechamente ligado a la apomixis que permitiera la identificación del modo reproductivo en plantas, se podrían eficientar los tiempos, ya que, se seleccionarían plantas con potencial apomíctico.

2.7. Técnicas moleculares

Los marcadores moleculares son secuencias de ADN que permiten diferenciar entre un genotipo y otro a nivel del ADN (Tohmé, *et al.*, 1998).

Con la llegada de nuevas técnicas de biología molecular, una variedad de enfoques han llegado a estar disponibles para el estudio de la variación genética entre individuos a nivel de ADN. Estos métodos ofrecen ventajas como la rapidez, facilidad y precisión. Si los genes de la apomixis pueden ser identificados con marcadores moleculares tales como RAPD, RFLP o AFLP (Longitud de Polimorfismos en Fragmentos Amplificados), el material producido podría liberarse para su comercialización más rápidamente (Bhatl, 2005).

2.8. AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

La tecnología de los AFLPs fue introducida por Zabeau y Vos, (1993); y Vos, *et al.* (1995), y representa una ingeniosa herramienta para evaluar la diversidad genética de las plantas. Varios tipos de marcadores moleculares (RAPD, RFLP, SSRs, y AFLP) han sido utilizados exitosamente para evaluar la diversidad genética en algunos pastos (Xu *et al.*, 1994; Sun *et al.*, 1998; Diaby y Casler, 2003; Morales *et al.*, 2006). Los AFLPs han sido preferidos, ya que son altamente repetibles con márgenes de error de menos del 2% (Thomé *et al.*, 1996). Por lo tanto, esta tecnología ha sido aplicable a todos los organismos



sin previa información de secuencias, y generalmente los resultados son el acopio de bastantes huellas informativas, y ha sido adoptada rápidamente y utilizada por su gran accesibilidad para detectar polimorfismos de ADN. Actualmente, los marcadores moleculares de AFLPs son los métodos más usados para detectar polimorfismos (Vos *et al.*, 1995). Entre los objetivos para la utilización de los AFLPs, se encuentra la diferenciación de cultivares, la certificación de pureza varietal, la selección de parentales divergentes en caracteres específicos para obtener poblaciones de mapeo, el monitoreo de la estabilidad genética de especies que se propagan vegetativamente y por apomíxis, la evaluación de la estructura poblacional de forrajes y la discriminación entre especies similares (Forster *et al.*, 2001)

2.9. CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences)

Este método (Secuencia Polimórfica Amplificada y Cortada) involucra la amplificación del ADN, por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con un par de iniciadores específicos, y el análisis por electroforesis del producto de la PCR, después de la división con endonucleasas de restricción. Los fragmentos amplificados se someten a una restricción enzimática y se migra en un gel de agarosa. Las variaciones se detectan por presencia o ausencia de sitios de restricción; se pueden así localizar cambios finos en una zona específica. Este método simple se utilizó para detectar polimorfismo en el gene de la glicoproteína del locus S (SLG) y en el gene receptor de quinasa (SRK) en el género *Brassicaceae* (Brace *et al.*, 1993, Nishio *et al.*, 1994).

El método molecular descrito aquí es un paso importante en el desarrollo de un método seguro y rápido de identificar haplotipos en comparación con el método de cruce de prueba acostumbrado (Park, *et al.*, 2002).

Este tipo de marcador ha sido descrito también como división amplificada de secuencias polimórficas por (Konieczny and Ausubel 1993); en otro estudio realizado con este marcador se trabajó con *Brassica napus*, para distinguir distintos tipos de alelos, la digestión con endonucleasas de restricción mostró ligamiento en el locus *S*. Utilizando un marcador codominante llamado fMboI, se discriminaron tres genotipos F₂, además con este marcador y otro adicional utilizando otro par de iniciadores, fue posible distinguir entre tres de cuatro diferentes alelos y cinco de siete líneas, respectivamente (Möhrling, *et al.*, 2005).



2.10. Literatura Citada

- Asker, S. E., and L. Jerling. 1992. *Apomixis in Plants*, CRC Press Inc Boca-Raton, Florida, USA.
- Bhat, V., K. K. Dwivedi, J. P., Khurana and S. K. Sopory. 2005. Apomixis: An enigma with potential applications. *Current Science*. 89 (11): 1879-1893.
- Brace, J., D. J. Ockendon, and G. J. King. 1993: Development of a method for the identification of *S* alleles in *Brassica oleracea* based on digestion of PCR-amplified DNA with restriction endonucleases. *Sexual Plant Reproduction*. 6: 133-138.
- Calderón, M. de los A. y Agudelo-Cortés, J. 1990. Hibridaciones interespecíficas en el género *Brachiaria*. Tesis. Universidad Nacional de Colombia, Palmira, Colombia. 89 p.
- Cardona, C., J. W. Miles, and G. Sotelo. 1999. An improved methodology for massive screening of *Brachiaria* spp. Genotypes for resistance to *Aenomolia varia* (Homoptera: Cercopidae). *Journal Economic Entomology*. 92(2): 490-496.
- Carman, J. G. 1997. Asynchronous expression of duplicate genes in angiosperms may cause apomixis, bispory, tetraspory, and polyembryony. *Biological Journal of the Linnean Society*. 61: 51-94.
- Crane, C. F., and J. G. Carman. 1987. Mechanisms of apomixis in *Elymus rectisetus* from eastern Australia and New Zealand. *American Journal of Botany*. 74: 477-496.
- Christinck, A., E. Weltzien, K. vom Brocke, K. G. Kshirsagar, and P. J. Bramel-Cox. 2000. Métodos participativos para la recolección de germoplasma. *Plant Genetic Resources Newsletter*. No.121.
- Diaby, M, and M. D. Casler. 2003. RAPD Marker variation among smooth bromegrass cultivars. *Crop Science*. 43: 1538-1547.
- Ferguson, J. E. and L. V. Crowder. 1974. Cytology and breeding behavior of *Brachiaria ruziziensis* Germain et Evrard. *Crop Science*. 14: 893-895.
- Forster, J., E. Jones, R. Kölliker, M. Drayton, J. Dumsday, M. Dupal, K. Guthridge, N. Mohoney, E. van Zijl De Jong, and K. Smith. 2001. Development and implementation of molecular markers for forage crop improvement. *In: Molecular breeding of forage crops*. (ed. G. Spangenberg). Kluwer Academic Publishers. pp.101-133.
- Gobbe J. B., and B. P. Longly. 1982. Calendrier des sporogeneses et gametogeneses femelles chez le diploide et le tetraploide induit de *Brachiaria ruziziensis* (Graminee). *Canadian Journal Botany*. 60 (10): 2032-2036.



- Grimanelli, D., Tohme, J. and Gonzalez-de-Leon, D. 2001. Applications of molecular genetics in apomixis research. *In: The Flowering of Apomixis: From Mechanisms to Genetic Engineering*, CIMMYT and IRD, Mexico, pp. 83–94.
- _____, O. Leblanc, E. Perotti, and U. Grossniklaus. 2001a. Developmental genetics of gametophytic apomixis. *Trends in Genetics*. 17: 597-604.
- Hacker, J. B. 1988. Sexuality and hybridization in signal grass, *Brachiaria decumbens*. *Tropical Grasslands*. 22: (3) 139-144.
- Hanna, W. W. 1999. Use of apomixis in cultivar development. *Advances in Agronomy*. 54: 333-350.
- _____, and E. C., Bashaw. 1987. Apomixis: Its identification and use in plant breeding. *Crop Science* 27(3): 1136-1139.
- Keller-Grein G., B. L., Mass, and J. Hanson. 1998. Variación Natural en *Brachiaria* y Bancos de Germoplasma Existentes. *In: Brachiaria: Biología, agronomía y mejoramiento*. ed. J. W. Miles, B. L. Mass y C. B. do Valle, colaboración de V. Kumble, CIAT, Cali, Colombia, y EMBRAPA/CNPGC, Campo Grande, Brasil. 312 p.
- Khokhlov, S. S. 1976. Evolutionary-genetic problems of apomixis in angiosperms. *In: Apomixis and Breeding*, Amerind, New Delhi. pp. 3–17.
- Koltunow, A.M., R. A., Bicknell, and A. M., Chaudhury. 1995. Apomixis: Molecular strategies for the generation of genetically identical seeds without fertilization. *Plant Physiology*. 108: 1345-1352.
- Koltunow, A. M. 1993. Apomixis: embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. *Plant Cell*. 5: 1425-1437.
- Konieczny, A., and F. Ausubel. 1993. A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using codominant ecotype specific PCR based markers. *Plant Journal*. 4: 403-410.
- Leblanc, O., M. D. Peel, J. G. Carman, and Y. Savidan. 1995. Megasporogenesis and mega-gametogenesis in several *Tripsacum* species (Poaceae). *American Journal Botany*. 82: 57-63.
- Marshall, D. R. and A. H. D. Brown. 1975. Optimum sampling strategies in genetic conservation. *In: Crop Genetic Resources Today and Tomorrow* (eds. O.H. Frankel and J.G. Hawkes). Cambridge University Press. pp. 53-80.
- Miles J. W., C. B. do Valle. 1998. Manipulación de la apomixis en el mejoramiento de *Brachiaria*. *In: Brachiaria: Biología, agronomía y mejoramiento*. ed. J. W. Miles, B. L. Mass y C. B. do Valle, colaboración de V. Kumble, CIAT, Cali, Colombia, y EMBRAPA/CNPGC, Campo Grande, Brasil. 312 p.



- _____ and C. B. do Valle. 1996. Manipulation of apomixis in *Brachiaria* breeding. *Brachiaria: Biology Agronomy and Improvement*. Brazil: CNPGC-EMBRAPA. pp 164-177.
- _____ and C. B. do Valle. 1991. Assesment of reproductive behavior of interespecific *Brachiaria* híbrids. *Apomixis Newsletter*. 3: 9-10.
- Möhring, S., V. Horstmann and E. Esch. 2005. Development of a molecular CAPS marker for the self-incompatibility locus in *Brassica napus* and identification of different S alleles. *Plant Breeding*. 124: 105-110.
- Morales N., C. R., A. R. Quero C., O. Le Blanc, A. Hernández G., J. Pérez P. y S. S. González M. 2006. Caracterización de la diversidad del pasto nativo *Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr., mediante marcadores de AFLP. *Agrociencia* 40: 711-720.
- Nishio, T., K. Sakamoto, and J. Yamaguchi. 1994. PCR-RFLP of S locus for identification of breeding lines in cruciferous vegetables. *Plant Cell Rep*. 13: 546-550.
- Nidikudama J., and P. N., De Leeuw. 1998. Experiencia Regional con *Brachiaria*: África del Sur del Sahára. *In: Brachiaria: Biología, agronomía y mejoramiento*. ed. J. W. Miles, B. L. Mass y C. B. do Valle, colaboración de V. Kumble, CIAT, Cali, Colombia, y EMBRAPA/CNPGC, Campo Grande, Brasil. 312
- _____. 1985. Etude de l'hybridation entre especies apomictiques et sexuées dans le genre *Brachiaria*. Disertación para Ph. D. Université Catholique de Louvain, Louvain-la-Neuve, Bélgica. 210 p.
- Nogler, G. A. 1984. Gametophytic apomixis. *In: Embryology of angiosperms*. Edited by B. M. Johri. Springer Verlag, Berlin. pp. 475-518.
- Pagano, E., and P. Rimieri. 2001. Genética y Mejoramiento de especies forrajeras. *En: Forrajeras y Pasturas del ecosistema templado húmedo de la Argentina*. José Maddaloni y Liliana Ferrari. INTA. Universidad Nacional de Lomas de Zamora. Facultad de Cs. Agrarias.
- Phillips, W., H. Rodriguez, and P. Fritz. 1995. Marcadores de ADN: Teoría, aplicaciones y protocolos de trabajo con ejemplos de investigaciones en cacao (*Theobroma cacao*). Serie técnica. Informe técnico # 252. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 183 p.
- Park, J. I., S. S. Lee, M. Watanabe, Y. Takahata and I. S. Nou. 2002. Identification of S-alleles using polymerase chain reaction-cleaved amplified polymorphic sequence of the S-locus receptor kinase in inbreeding lines of *Brassica oleracea*. *Plant Breeding* 121: 192-197.
- Powell, W. 1992. Plant genomes, gene markers, and linkage maps. *In: Moss, J. P. ed. Biotechnology and crop improvement in Asia*. Patancheru, India. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics. p. 297-322.



- Rallo, P., A. Belaj, R. De La Rosa, e I. Trujillo. 2002. Marcadores moleculares (en línea). Córdoba, España. Consultado 1 ago. 2002. Disponible en http://www.extremadura21.com/caudal/hemeroteca/mayojunio_2000/almazara/almazara1.htm.
- Richards, A. J. 1997. *Plant Breeding Systems*, 2nd ed. (London: Chapman and Hall).
- Sherwood R. T. 2001 Genetic analysis of apomixis. *In*: Savidan, Y., J. G. Carman, and T. Dresselhaus (eds). 2001. *The Flowering of Apomixis: From Mechanism to Genetic Engineering*. México, D.F.: Cimmyt, IRD, European Commission DG VI (FAIR). 243 p.
- Swenne, A., B. P. Louant, and M. Dujardin. 1981. Induction par la colchicine de formes autotétraploides chez *Brachiaria ruziziensis* Germain et Evrard (Graminée). *Agronomie Tropicale*. 36(2): 134-141.
- Sun, G. L., B. Salomon, and R. von Rothmer. 1998. Characterization and analysis of microsatellite loci in *Elymus caninus* (Triticeae). *Tehoric Applied Genetic*. 96: 676-682.
- Tanksley, S. 1983. Molecular markers in plant breeding. *Plant Molecular Biology Reporter* 1: 3-8.
- Thomé, J., N. Palacios, S. Lenis, y W. Roca. 1998. Aplicaciones de la Biotecnología al Género *Brachiaria*. *In*: *Brachiaria: Biología, agronomía y mejoramiento*. ed. J. W. Miles, B. L. M.ass y C. B. do Valle, colaboración de V. Kumble, CIAT, Cali, Colombia, y EMBRAPA/CNPGC, Campo Grande, Brasil. 312 p.
- Thome, J., D., O. González, S. Bebee, and M. C. Duque. 1996. AFLP analysis of gene pools of a wild bean core collection. *Crop Science*. 36:1375-1384.
- Valle, C. B. do, and J. W. Miles. 2001. Breeding of Apomictic Species. *In*: Savidan, Y., J. G. Carman, and T. Dresselhaus (eds). 2001. *The Flowering of Apomixis: From Mechanism to Genetic Engineering*. México, D.F.: Cimmyt, IRD, European Commission DG VI (FAIR). 243 p.
- _____, and I. Savidan. 1998. *Génética, Citogénética y Biología Reproductiva de Brachiaria*. *In*: *Brachiaria: Biología, agronomía y mejoramiento*. ed. J. W. Miles, B. L. M.ass y C. B. do Valle, colaboración de V. Kumble, CIAT, Cali, Colombia, y EMBRAPA/CNPGC, Campo Grande, Brasil. 312 p.
- _____, y J. W. Miles. 1994. Melhoramento de gramíneas do gênero *Brachiaria*. *En*: Peixto, A. M.; Moura, J. C. de; y Faria, V. P. de (eds.). [Memorias del] XI simposio sobre manejo de pastagem. Fundação de Estudos Agrários “Luiz de Queiroz” (FEALQ), Piracicaba, SP, Brasil. p. 1-23.
- Vos, P., R. Hogers, M., Bleeker, M., Reijans, T., Van de Lee, M., Hornes, A., Frijters, J., Pot, J., Peleman, M., Kuiper, and M., Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*. 23: 4407-4414.



-
- Winkler, H. 1908. Über parthenogenesis und apogamie im pflanzenreiche. Prog. Rei. Bot. 2: 293–454.
- Xu, W. W., D. A. Sleper, and G. F. Krause. 1994. Genetic diversity of tall *fescue* germplasm based on RFLPs. Crop Science. 34: 246-252.
- Young B. A., R. T. Sherwood, and E. C. Bashaw. 1979. Cleared-pistil and thick-sectioning techniques for detecting aposporous apomixes in grasses. Canadian Journal Botany. 57: 1668-1672.
- Zabeau, M., and P. Vos. 1993. Selective restriction fragment amplification a general method for DNA fingerprinting, European.



RESUMEN

En las zonas tropicales de México existe escasez de materiales forrajeros para la alimentación del ganado, y es necesario que las nuevas variedades incluyan características deseables, tanto de forraje como de semilla. Con el propósito de identificar materiales sobresalientes se estudiaron características morfológicas y citológicas en 200 híbridos interespecíficos del género *Brachiaria*, obtenidos a partir de 10 cruzas entre cinco híbridos elite sexuales provenientes de *B. ruziziensis*, y tres híbridos apomícticos originados de *B. brizantha*. El trabajo experimental se realizó en Iguala, Gro., en el verano del 2004 mediante la plantación de 20 híbridos F₁ a los que se les dio seguimiento durante cinco meses; las variables evaluadas en campo fueron: hábito de crecimiento; altura de planta (cm); ancho de lámina foliar (cm); longitud de lámina foliar (cm); pubescencia en lámina foliar; pubescencia en vaina; vigor; estolones; diámetro de tallo (cm); color de lámina foliar; floración; producción de semilla (g) y calificación de planta. En laboratorio se extrajeron ovarios de espiguillas previamente colectadas en campo en preantésis, se clarearon con benzil benzoato, dibutil ftalato y alcohol a diferentes tiempos y proporciones, bajo el microscopio se determinó el modo reproductivo. Los resultados indicaron que las variables cuantitativas producción de semilla, diámetro de tallo y longitud de lámina foliar fueron importantes para identificar plantas y en menor grado altura de planta; las variables cualitativas que explicaron más la variación fueron lámina foliar sin pubescencia, baja calificación de planta, ausencia de estolones, vaina sin pubescencia, color de planta verde amarillento, hábito de crecimiento erecto y vaina con pubescencia media; estos resultados indicaron una influencia de los progenitores masculinos 94, 18 y 71, además del progenitor femenino 29, en las características de la progenie. En la prueba citoembriológica se obtuvieron segregaciones del tipo reproductivo en proporción 1:1 en comportamiento apomíctico y sexual lo cual concuerda con lo reportado en trabajos anteriores.

Palabras clave: *Brachiaria*, apomíctico, hibridación, interespecífica, modo reproductivo, citoembriológico.



3.1. INTRODUCCIÓN

La producción de semillas de gramíneas forrajeras normalmente constituye una actividad secundaria o marginal dentro de la explotación ganadera, a la cual se le aplica poca inversión y técnicas muy deficientes (Faría *et al.*, 1995). Por lo tanto, una de las limitantes para el establecimiento de las pasturas, es la falta de semillas de calidad, lo cual impide el desarrollo de las especies forrajeras y restringe el avance de las etapas de producción (Barrón, 1991). A nivel mundial el suministro de semillas de especies forrajeras es muy deficiente, debido a que los estudios se concentran más en la producción forrajera, valor nutritivo, frecuencia de corte y respuesta a la fertilización (Argel, 1986). Los estudios de semillas han sido mínimos, sin embargo, éstos son indispensables dentro del proceso de evaluación y promoción de las especies forrajeras, por lo cual, es importante, que se obtenga semilla de calidad, lo cual, representa un factor indiscutible en el establecimiento de pasturas. Dentro de estas, el género *Brachiaria* incluye las gramíneas forrajeras más ampliamente utilizadas en las zonas tropicales de América, las especies comerciales de *Brachiaria* (*B. brizantha*, *B. decumbens* y *B. humidicola*) son apomícticas y poliploides (Miles, *et al.* 2004). El tetraploide sexual compatible en cruza con *B. decumbens* y con *B. brizantha* hizo posible la recombinación de genes que antes eran reproductivamente inaccesibles en genotipos apomícticos tetraploides. Los primeros híbridos experimentales se probaron en 1989 en un pequeño ensayo de campo en Colombia. Durante los años siguientes se desarrolló un programa de mejoramiento genético en gran escala (Valle y Savidan, 1996). Los ciclos continuos de hibridación y selección buscan producir híbridos con expresión cada vez mejor de resistencia al salivazo, rendimiento y calidad de forraje, rendimiento de semilla y otros atributos deseables. Para lograr estos propósitos se han requerido trabajos de investigación, en los cuales existen herramientas fundamentales para seleccionar híbridos con alto potencial, esto debe tener un enfoque integral en el cual se trate de resolver deficiencias bien definidas de cultivares comerciales y ampliamente utilizados por productores con el fin de poder justificar la inversión en mejoramiento. Entre los aspectos importantes está el definir con claridad desde un comienzo el objetivo del mejoramiento y establecer la demanda por productores de cultivares mejorados; la actividad de mejoramiento de especies forrajeras es a largo plazo y deberá partir de la caracterización de múltiples atributos en colecciones de germoplasma (i.e. variabilidad natural); se justifica la estrategia de cruzamientos



interespecíficos en la medida en que no exista variabilidad natural para los atributos que se quieran mejorar. La caracterización morfológica y agronómica es importante para poder identificar los diferentes genotipos de interés y analizar la relación existente entre las diferentes especies de *Brachiaria* (Valle y Miles 2001); además otra herramienta lo constituye el conocer el modo de reproducción y citogenética de cada genotipo de este género porque existen accesiones diploides y poliploides (Valle y Glienke, 1991), la poliploidía nos indica que las plantas pueden ser apomícticas y el análisis de saco embrionario es una de las técnicas más comunes para estudiar la apomixis, los análisis citológicos se hacen en diferentes etapas, los sacos apospóricos se desarrollan de una célula somática, en un ovario múltiples sacos embrionarios son observados cuando presenta aposporia, esto nos da la certeza de que la planta en estudio es apomíctica (Bhat, *et al.*, 2005). Además la carencia de antípodas es otra característica específica de los mismos, la técnica de clareamiento de pistilos (Young, *et al.*, 1979), es ampliamente utilizada para analizar los sacos embrionarios. Este método reduce el tiempo para saber el modo reproductivo de las plantas.

Por lo anterior nos planteamos los siguientes objetivos:

3.1.2. Objetivos específicos

Caracterizar y seleccionar 200 híbridos F₁ de 10 cruces interespecíficos de *Brachiaria* utilizando marcadores morfológicos y agronómicos.

Identificar híbridos sexuales y apomícticos de *Brachiaria spp.*, mediante pruebas citoembriológicas.

3.1.3. Hipótesis

La caracterización y selección son útiles en la identificación de genotipos con características agronómicas importantes que pueden ser utilizadas en programas de mejoramiento genético.

La prueba Citoembriológica sirve para identificar genotipos apomícticos y sexuales.



3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. Material genético

El material experimental utilizado (Cuadro 1) consistió de 200 plantas híbridas F_1 , provenientes de 10 cruzamientos entre selecciones avanzadas de híbridos sexuales (HBS) e híbridos apomícticos (HBA, Mulato 18 y FM). Dicho germoplasma ha sido seleccionado del género *Brachiaria* y forma parte del programa de mejoramiento del Ing. Armando Peralta Martínez, en Iguala, Gro.

3.2.2. Origen del material utilizado

3.2.2.1. Progenitores masculinos

Mulato 18. Híbrido tetraploide ($2n = 4x = 36$), desarrollado por el CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical) de Cali Colombia, con la clave CIAT 36601; se originó de un cruce entre el clon 44-6 de *Brachiaria ruziziensis* un tetraploide sexual ($2n = 4x$ inducido) y *Brachiaria brizantha* “Marandú”, un tetraploide apomíctico ($2n = 4x$) natural, obtenido en 1988 (Miles, 1999).

FM1371. Derivado de un cruce entre el clon 44-3 de *Brachiaria ruziziensis* (818) con el CIAT 16829, una accesión de *Brachiaria brizantha*, muy similar al cultivar Marandú, que se realizó en el año de 1990 (Miles, 1999).

HBA2094. Híbrido apomíctico originado del cruce entre el híbrido sexual MX95 con el apomíctico CIAT 26124.

3.2.2.2. Progenitores femeninos

Todas las hembras se originaron de *Brachiaria ruziziensis* y un macho apomíctico y han sido seleccionadas para cruza específicas debido a sus características agronómicas deseables. Sus orígenes se especifican en el Cuadro 1.



Cuadro 1. Origen de las hembras del género *Brachiaria spp.* utilizadas para el cruce con híbridos apomícticos.

Cruza	F ₁
FM08 x 26318	HBS2902
FM10 x 46024	HBS11003
FM10-41 x 46024	HBS4103
FM07 x 26124	HBS10002
FM01 x 36062	HBS143A02

3.2.3. Caracterización morfológica y agronómica

La fase de campo se realizó en Tuxpan, Gro., ubicado geográficamente a los 18° 21' Latitud Norte, 99° 29' Longitud Oeste; tiene un clima subhúmedo con lluvias en verano, temperatura media anual de 25.4 °C y una precipitación pluvial anual promedio de 1000 mm (SEMARNAP, 1998).

El experimento se realizó durante el verano del 2004, seleccionando inicialmente los materiales indicados en el Cuadro 2. La siembra se efectuó en charolas durante el mes de mayo, y se trasplantaron al campo en el mes de julio. Se seleccionaron 20 plantas por cada cruza, constituyendo en total 200 unidades experimentales. Las plantas se colocaron en surcos distanciados de 2 m, y a 2 m entre ellas.

Cuadro 2. Genealogía de híbridos F₁ de *Brachiaria spp.*, y progenitores utilizados en su formación.

Hembra Sexual		Macho Apomíctico	Híbridos F ₁
HBS4103	X	Mulato 18	4118
HBS2902	X	Mulato 18	2918
HBS10002	X	Mulato 18	10018
HBS143A02	X	Mulato 18	143A18
HBS4103	X	FM1371	4171
HBS2902	X	FM1371	2971
HBS10002	X	FM1371	10071
HBS143A02	X	HBA2094	143A94
HBS4103	X	HBA2094	4194
HBS11003	X	HBA2094	11094

El experimento estuvo libre de maleza mediante tres deshierbes manuales, los cuales se dieron cada 20 días, desde el momento de la plantación, se evitó la utilización de herbicidas, para no afectar a la planta; se fertilizó con el tratamiento 80-40-0, aplicando



primero 40-40-0, a los 20 días de la plantación, y después 40-0-0 a los 60 días; la cosecha se realizó a los 120 días de la plantación cuando la semilla se encontraba en plena madurez, se realizó en forma manual desgranando la espiga manualmente evitando recoger semilla del suelo para no alterar los resultados. Se midieron 14 caracteres morfológicos y agronómicos (Cuadro 3), de los cuales 6 fueron de tipo cuantitativo y 8 de tipo cualitativo, mismos que se utilizaron para comparar y diferenciar los genotipos; esta práctica se realizó a partir del mes de octubre, cuando la planta ya se encontraba en etapa adulta y terminó de crecer sin cambios fisiológicos.

Cuadro 3. Caracteres morfológicos y agronómicos evaluados en los híbridos F₁ de *Brachiaria spp.* en Iguala, Gro.

Carácter *	Código	Escala y unidades
Cuantitativos		
Altura de planta	ADP	De la base al punto de crecimiento (cm)
Diámetro de macollo	DDM	Circunferencia de la base (cm)
Ancho de lámina foliar	ALF	De la mitad de la lámina foliar (cm)
Longitud de lámina foliar	LLF	Donde termina la lígula a la punta (cm)
Diámetro de tallo	DDT	En el tercer fitómetro (cm)
Producción de semilla	PDS	Semilla pura de una planta (g)
Cualitativos		
Vigor	VIG	a) bajo, b) medio, c) alto
Calificación de planta	CDP	a) bajo, b) medio, c) alto
Hábito de crecimiento	HDC	a) erecto, b) decumbente, c) postrado
Pubescencia en lámina foliar	PLF	a) presente, b) ausente
Pubescencia en vaina	PEV	a) presente, b) ausente
Estolones	EST	a) ausentes, b) medios, c) abundantes
Color de lámina foliar	CLF	a) verde intenso, b) verde oscuro
Floración	FLOR	a) temprana, b) normal, c) sin floración

*Fuente (Valle, 1997).

Nota. Los datos se tomaron a los 120 días de la plantación.

3.2.4. Análisis estadístico

Se realizaron usando el programa de computo Minitab 14 (<http://www.minitab.com/> 2005). Para identificar grupos de genotipos con características similares, se usó el análisis de conglomerados (Manly, 1986), y para realizar las comparaciones de distancia euclidiana en las diferentes cruces se utilizó la siguiente fórmula:



$$d_{ij} = \left\{ \sum_{k=1}^p (x_{ik} - x_{jk})^2 \right\}^{1/2}$$

Donde: x_{ik} es el valor de la variable x_k por el objeto i , y x_{jk} es el valor de la misma variable por el objeto de análisis.

Se usó la prueba de χ^2 (ji cuadrada; Little y Hills, 1981) para determinar la relación entre variables; la regresión binaria (Johnson y Albert, 1999), se usó para determinar la relación entre variables morfológicas y agronómicas y la variable de laboratorio modo reproductivo, utilizando el modelo de regresión binaria siguiente:

$$P(y = y/x) = \frac{e^{B_0 + B_1 + x}}{1 + e^{B_0 + B_1 + x}}$$

Donde: $P(y = y/x)$ es la probabilidad de que el modo “ y ” suceda, dado que la variable “ x ” es la variable explicatoria y B_0 y B_1 son los parámetros del modelo.

Además se utilizó el programa SAS, para realizar un análisis de conglomerados (Manly, 1976), y una prueba de componentes principales; esta última es una técnica matemática que no requiere un modelo estadístico para explicar la estructura probabilística de los errores. Sin embargo, se requiere que la población muestreada tenga una distribución multinormal. Mediante la prueba de componentes principales se generan nuevas variables que expresen información contenida en el conjunto original de datos y así reducir la dimensionalidad del problema que se está estudiando como paso previo para futuros análisis y poder eliminar cuando sea posible algunas variables originales que aportan poca información.

3.2.5. Prueba citoembriológica

De cada unidad experimental se colectaron 10 espigas provenientes de los híbridos de las cruzas, antes de la antesis, e inmediatamente se colocaron en una solución fijadora (FAA), que consistió de: Alcohol 50%, Ácido Acético 5%, Formaldehido 10%, Agua destilada 35%; después de 48 horas se cambiaron a la solución GAA, que consistió de: glicerina 25%, alcohol 50%, y agua destilada 25%, conservándose así hasta su uso. La prueba citoembriológica se realizó en el laboratorio de Citogenética del Colegio de



Postgraduados, ubicado en Montecillo, México. Se extrajeron 30 ovarios por cada muestra, que fueron utilizados para observar e identificar el desarrollo de la célula madre de la megaspora, con el propósito de determinar el carácter sexual o apomíctico de la planta. Posteriormente, se realizó el clareamiento *in toto* (con óvulos enteros) los cuales se examinaron en el microscopio de contraste de fases, utilizando la técnica de Young *et al*, (1979), aunque con algunas adecuaciones en los tiempos (Cuadro 4).

Cuadro 4. Reactivos, proporción y tiempos de la prueba de clareamiento

Reactivo	Proporción	Tiempo
ETOH/BB	2:1	45 min
BB/ETOH	2:1	45 min
BB/DPh	2.1:1	45 min

ETOH: Alcohol al 96%; BB: Benzil Benzoato; DPh: Dibutil Ftalato

3.2.6 Análisis estadístico de prueba citoembriológica

Se calculó el modo reproductivo de cada cruce, considerando el desarrollo gametofítico, con base en el número de sacos embrionarios. Los genotipos con un solo saco embrionario, se consideraron sexuales, y apomícticos los que presentaron más de un saco embrionario. El género *Brachiaria* se caracteriza por un desarrollo gametofítico del tipo *Panicum*, por lo que no fue difícil diferenciar cuando se trataba de un saco embrionario sexual (octonucleado) o apomíctico. Para determinar diferencias en esta variable se realizó una prueba de χ^2 (ji cuadrada; Little y Hills, 1981), mediante la siguiente fórmula:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^k \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}$$

Donde: O_i = valor observado en la muestra; E_i = valor esperado cuando la hipótesis nula es cierta = $n\pi_i$; si el tamaño de muestra es grande y los valores esperados son mayores de 5 entonces χ^2 tiene una distribución aproximadamente ji-cuadrado con $k-1$ grados de libertad.



3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1. Caracterización de híbridos

3.3.1.1. Variables cuantitativas

Los híbridos mostraron una gran diversidad morfológica en lo que se refiere a caracteres cuantitativos (Cuadro 5); en altura de planta (ADP) los valores más altos fueron para los híbridos de las cruzas 4118 y 143A18 con medias de 92.75 cm y 90.05 cm, mientras los valores menores los obtuvieron los híbridos de las cruzas 2971 y 2918 con 72.30 y 60.60 cm respectivamente; en diámetro de macollo (DDM) los híbridos de la crusa 143A18 tuvieron el más alto valor con 23.25 cm y el menor lo obtuvieron híbridos de la crusa 2918 con 14.30 cm; en la variable ancho de lámina foliar (ALF) el valor más alto lo consiguieron los híbridos de las cruzas 2918 y 143A18 con 2.18 cm; en cuanto a diámetro de tallo (DDT) los mayores valores fueron de los híbridos de las cruzas 4118 y 143A94 con medias de 4.23 y 4.17 cm; estas variables se han utilizado en el programa de mejoramiento del CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical) para la evaluación de híbridos (Miles y Valle, 1997); además de que fueron evaluadas en un estudio comparativo de materiales apomícticos del género *Brachiaria* (Guiot y Meléndez, 2002); en la variable agronómica de producción de semilla (PDS), los híbridos de la crusa 143A18 fueron los de mayor valor (36.15 g), en este caso, su comportamiento se explica en función que sus progenitores mulato 18 y HBS143A02, que han sido ampliamente identificados por ser buenos productores de semilla, este atributo es muy importante, ya que, en este género la producción de semilla es fundamental, pues la propagación asexual es económicamente incosteable.

Se realizó un análisis de componentes principales con base a la matriz de correlaciones de seis variables cuantitativas evaluadas (Cuadro 5), donde en base a los tres primeros componentes se explicó el 84.5 % de la variación de los materiales (Cuadro 6); el primer componente contribuyó con el 42.1%, el segundo con el 26.2% y el tercero con el 16.2%.

Las variables de mayor importancia en el componente uno fueron en orden descendente producción de semilla (PDS), diámetro de tallo (DDT), longitud de lámina foliar (LLF) y ancho de lámina foliar (ALF); en el componente dos fue altura de planta (ADP); mientras



en el tercer componente fue diámetro de macollo (DDM; Cuadro 36 Anexos). Este resultado indica que las seis variables contribuyeron a explicar la variación total observada.

Cuadro 5. Descripción de seis variables cuantitativas de 200 híbridos de diez cruzas de *Brachiaria spp*

Híbridos de Cruza	Carácter					
	ADP (cm)	DDM (cm)	ALF (cm)	LLF (cm)	DDT (cm)	PDS (g)
4118	92.75	18.15	2.04	40.20	4.23	17.35
2918	60.60	14.30	2.18	33.90	3.25	10.00
10018	75.85	23.00	2.05	34.90	3.60	15.2
143A18	90.05	23.25	2.18	36.15	3.95	36.15
4171	69.60	22.20	2.12	36.10	4.05	5.70
2971	72.30	20.25	2.03	30.80	3.40	12.8
10071	49.95	18.30	1.92	33.78	3.88	10.85
143A94	77.50	19.65	2.11	36.93	4.17	18.25
4194	74.85	19.35	1.95	34.40	3.50	10.80
11094	84.50	18.90	1.82	32.35	3.65	13.35

ADP: Altura de planta; DDM: Diámetro de macollo; ALF: Ancho de lámina foliar; LLF: Longitud de lámina foliar; DDT: Diámetro de tallo; PDS: Producción de semilla

Cuadro 6. Valores característicos y proporción de la varianza total explicada por cada uno de los componentes principales con base en seis variables cuantitativas, en híbridos de diez cruzas del género *Brachiaria*.

Componente Principal	Valor Característico	Proporción de varianza global explicada (%)	Proporción de varianza acumulada (%)
1	2.52	42.08	42.08
2	1.57	26.21	68.29
3	0.97	16.16	84.46
4	0.56	9.32	93.78
5	0.31	5.11	98.89
6	0.07	1.11	100.00

De acuerdo a datos de los dos primeros componentes principales (Figura 1), fundamenta que la producción de semilla, esta relacionada positivamente con variables vegetativas como ancho de lámina foliar y diámetro de macollo; en esta figura (1) se observa una correlación positiva entre longitud de lámina foliar y diámetro de tallo, lo que significa que si el tallo es grueso la hoja por consiguiente será mas ancha; en tanto altura de planta tiene una correlación negativa con las otras variables y no se relaciona cercanamente con ninguna, esto debido a la gran variación en altura de los híbridos evaluados

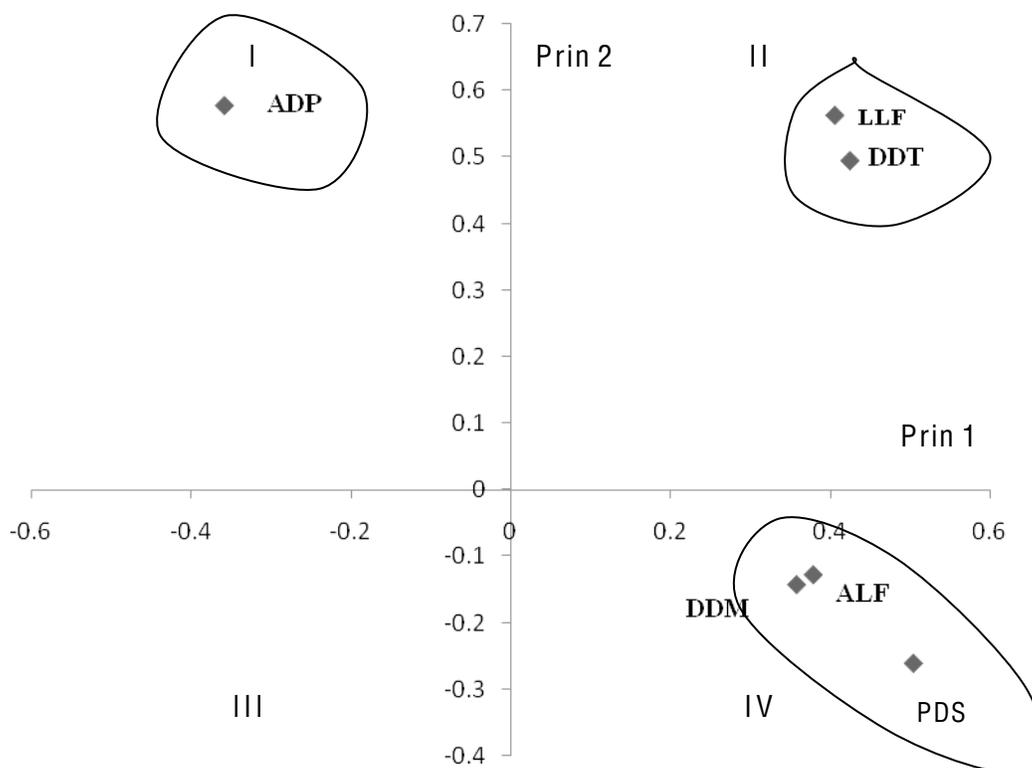


Figura 1. Correlaciones de cada variable original con los componentes principales.

Con el análisis de conglomerados de las variables cuantitativas (Cuadro 5), se obtuvo un dendrograma (Figura 2), con cuatro grupos, el primero fue compuesto por los híbridos de las cruzas 4118 y 143A94 relacionándose cercanamente en las variables producción de semilla, diámetro de tallo, ancho de lámina foliar y diámetro de macollo (Cuadro 5), una herencia de los progenitores masculinos mulato 18 y FM1371, además también hubo relación de híbridos de las cruzas 10018 y 4171; en el grupo II tuvieron relación cercana híbridos de las cruzas 10071 y 4194 en las variables ancho de lámina foliar, diámetro de tallo y producción de semilla, mientras híbridos de la crusa 11094 se relacionaron en menor escala con estas cruzas, mientras el 2971 lo hizo también, se puede decir que los progenitores masculinos FM2094 y FM1371 tuvieron influencia en este agrupamiento, ya que, los híbridos 4171 y 2971 produjeron muy poca floración y por consiguiente poca semilla, algo característico del progenitor masculino FM1371 (Miles, 1999); el grupo III estuvo formado por híbridos de la crusa 2918, y el grupo IV por híbridos de la crusa 143A18 que no tuvieron relación cercana con los híbridos de las demás cruas

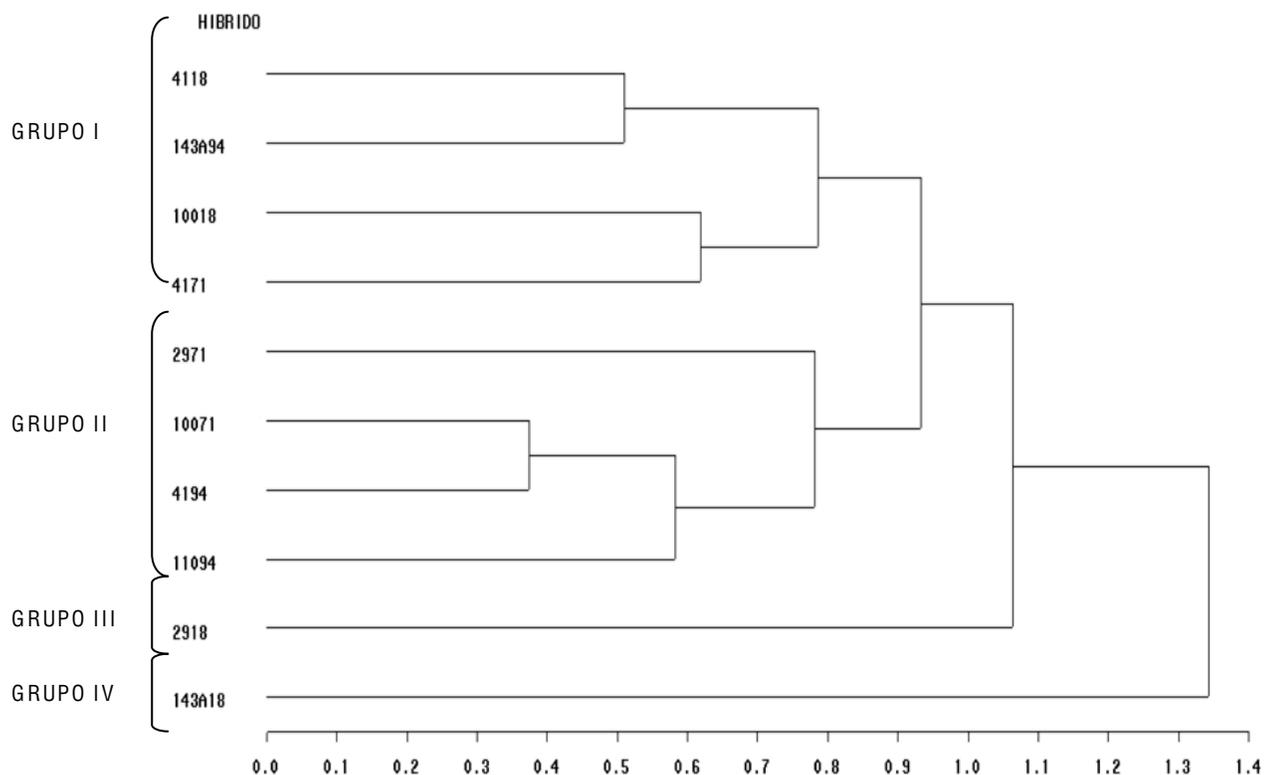


Figura 2. Dendrograma de híbridos de diez cruzas del género *Brachiaria* en base a seis variables cuantitativas.

3.3.1.2. Variables cualitativas

Los híbridos de las diez cruzas, mostraron diferencias en las variables cualitativas (Cuadro 7), en hábito de crecimiento (HDC) el 63.5% de los híbridos mostró porte decumbente, por lo cual este hábito predominó sobre el erecto y postrado; en pubescencia de lámina foliar abundante (PLF-A) representó el 45%; en cambio la pubescencia abundante en vaina (PEV-A), obtuvo un porcentaje del 73.5% en las diferentes cruzas. La presencia de estolones abundantes (EST-A) obtuvo los valores mayores con el 54%, por lo cual estos predominaron en las plantas muestreadas; también en color de planta verde intenso (CDP-VI) fue el carácter predominante con un 86.5%; en floración normal o media (FLOR-N) que fue medida en etapa fisiológica, se observó predominantemente en la mayoría de las cruzas con un 62%.



Cuadro 7. Descripción de cruzas de diez híbridos F₁ utilizando ocho características cualitativas.

HIBRIDOS DE CRUZA	HDC			PLF			PEV			EST			CDP			FLOR			VIG			CAL		
	E	D	P	A	M	AU	A	M	AU	A	M	AU	VO	VI	VA	T	N	SF	B	M	A	B	M	A
4118	6	14	0	16	4	0	20	0	0	13	7	0	1	19	0	2	18	0	0	3	17	0	3	17
2918	8	10	2	3	0	17	3	11	6	6	3	11	0	11	9	4	16	0	1	18	1	7	11	2
10018	2	11	8	13	5	2	10	8	2	12	7	1	0	20	0	15	5	0	0	7	13	0	4	16
143A18	0	17	3	19	1	0	20	0	0	19	0	1	3	17	0	4	16	0	0	5	15	1	1	18
4171	0	2	18	11	3	6	20	0	0	15	5	0	8	12	0	4	11	5	1	15	4	1	4	15
2971	8	10	2	1	2	17	2	10	8	7	7	6	1	18	1	4	14	2	1	8	11	4	10	6
10071	0	13	7	3	3	14	14	2	4	11	8	1	1	19	0	2	18	0	2	13	5	2	15	3
143A94	1	13	6	7	2	11	19	1	0	11	9	0	0	20	0	7	13	0	0	12	8	0	9	11
4194	0	18	1	11	1	8	19	0	1	3	10	7	1	18	1	9	8	3	5	8	7	5	6	9
11094	0	19	1	6	1	13	20	0	0	11	9	0	0	19	1	15	5	0	0	13	7	0	16	4
TOTAL:	25	127	48	90	22	88	147	32	21	108	65	27	15	173	12	66	124	10	10	102	88	20	79	101

HDC: Hábito de crecimiento= E: Erecto; D: Decumbente; P: Postrado; PLF: Pubescencia en Lámina foliar; PEV: Pubescencia en vaina; EST: Estolones = A: Abundante; M: Medio; AU: Ausente; CDP: Color de planta; VO: Verde oscuro; Verde intenso, VA: Verde amarillento; FLOR: Floración = T: Temprana, N: Normal, SF: Sin floración; VIG: Vigor= B: Bajo, M: Medio, A: Alto; CAL: Calificación de planta= B: Bajo; M: Medio; A: Alto.

En vigor de planta alto (VIG-A), los valores mayores fueron para los genotipos 4118 y 143A18, que provienen del progenitor masculino apomítico mulato 18, que se identifica con estas características; lo cual indica hibridación en estas plantas; mientras en calificación de planta alta (CDP-A) considerada como otra variable importante que comprende todos los atributos fisiológicos de la misma, la crusa 4118 fue la mejor ubicada con 17 plantas F₁, esto permitió comprobar que el mulato 18 es una gramínea perenne de naturaleza apomítica, lo que significa que es estable genéticamente (Argel y Pérez, 2003), además de ser una excelente progenitor, ya que, se acopla, bien en los cruzamientos con la mayoría de progenitores hembras.

Se realizó un análisis de componentes principales con base a la matriz de correlaciones de 24 frecuencias de las 8 variables cualitativas evaluadas (Cuadro 7), donde en base a los tres primeros componentes se explicó el 70.31% de la variación de los híbridos (Cuadro 8); el primer componente contribuyó con el 37.39%, el segundo con el 18.05% y el tercero con el 14.87%.



Cuadro 8. Valores característicos y proporción de la varianza total explicada por cada uno de los componentes principales con base en ocho variables cualitativas, en híbridos de diez cruzas del género *Brachiaria*.

Componente principal	Valor Característico	Proporción de varianza global explicada (%)	Proporción de varianza acumulada (%)
1	8.98	37.39	37.39
2	4.33	18.05	55.44
3	3.57	14.87	70.31
4	2.35	9.77	80.08
5	1.99	8.31	88.39
6	1.60	6.67	95.06
7	0.56	2.32	97.39
8	0.47	1.97	99.35
9	0.16	0.65	100.00

En cuanto a la correlación de los componentes principales con las variables de mayor importancia, se realizó un análisis de frecuencia de los conceptos de cada una de las ocho variables (Cuadro 9), por lo cual se analizaron 24 frecuencias y el resultado mostró que en el componente uno las variables que más contribuyeron en la variación de los resultados, fueron en orden de importancia, lámina foliar sin pubescencia (PLF-AU), baja calificación de planta (CAL-B), ausencia de estolones (EST-AU), vaina sin pubescencia (PEV-AU), color de planta verde amarillento (CDP-VA), hábito de crecimiento erecto (HDC-E) y vaina con pubescencia media (PEV-M); en el segundo componente las variables que dieron mayores porcentajes de variación, fueron, color de planta verde oscura (CDP-VO), hábito de crecimiento postrado o rastrero (HDC-P), y planta sin floración (FLOR-SF); en el tercer componente la variable de mayor peso en la variación fue estolones medios (EST-M); este resultado indica que 10 de las 24 variables contribuyeron a explicar gran parte de la variación total observada.



Cuadro 9. Vectores característicos de las variables de mayor valor descriptivo de cada variable original con respecto a su componente principal de ocho variables cualitativas.

Variables	Vectores característicos		
	CP1	CP2	CP3
HDC-E	<u>0.188</u>	0.032	-0.361
HDC-D	-0.047	-0.394	-0.030
HDC-P	-0.083	<u>0.342</u>	0.244
PLF-A	-0.279	0.063	-0.145
PLF-M	-0.180	0.012	-0.055
PLF-AU	<u>0.295</u>	-0.060	0.144
PEV-A	-0.258	-0.026	0.219
PEV-M	<u>0.234</u>	0.027	-0.234
PEV-AU	<u>0.274</u>	0.022	-0.176
EST-A	-0.250	0.159	-0.093
EST-M	0.018	-0.285	<u>0.290</u>
EST-AU	<u>0.281</u>	0.037	-0.119
CDP-VO	-0.114	<u>0.411</u>	0.147
CDP-VI	-0.144	-0.388	-0.011
CDP-VA	<u>0.266</u>	0.082	-0.117
FLOR-T	-0.046	-0.256	0.198
FLOR-N	0.046	0.147	-0.283
FLOR-SF	-0.002	<u>0.296</u>	0.249
VIG-B	0.107	-0.019	0.205
VIG-M	0.208	0.158	0.282
VIG-A	-0.226	-0.140	-0.325
CAL-B	<u>0.283</u>	0.083	-0.065
CAL-M	0.206	-0.198	0.224
CAL-A	-0.287	0.131	-0.160

HDC: Hábito de crecimiento= E: Erecto; D: Decumbente; P: Postrado; PLF: Pubescencia en Lámina foliar; PEV: Pubescencia en vaina; EST: Estolones = A: Abundante; M: Medio; AU: Ausente; CDP: Color de planta; VO: Verde oscuro; Verde intenso, VA: Verde amarillento; FLOR: Floración = T: Temprana, N: Normal, SF: Sin floración; VIG: Vigor = B: Bajo, M: Medio, A: Alto; CAL: Calificación de planta= B: Bajo; M: Medio; A: Alto.

En el análisis de correlación de cada variable con los componentes principales 1 y 2, presentaron relación positiva en el eje X (Componente 1; Figura 3) y en los cuadrantes I y IV, lámina foliar sin pubescencia, baja calificación de planta, ausencia de estolones, vaina sin pubescencia, color de planta verde amarillento, vaina con pubescencia media y hábito de crecimiento erecto, todas estas variables presentaron los valores más bajos, por lo cual las plantas F_1 que presentaron estas características se diferenciaron visiblemente de las demás; en el eje Y (Componente 2; Figura 3) y cuadrante II, se relacionaron tres variables, color de planta verde oscura, hábito de crecimiento postrado o rastrero, y planta sin floración, las tres obtuvieron frecuencias menores en las plantas F_1 en que se presentaron,



por lo cual se relacionaron positivamente; otras variables que se relacionaron en forma negativa en el eje X fueron, vaina con pubescencia alta, lámina foliar con pubescencia alta y estolones abundantes, vigor y calificación altos y lámina foliar con pubescencia media, por lo tanto, fueron la contraparte de las primeras variables ya que presentaron los porcentajes más altos de frecuencia en las variables afines; en el eje Y se relacionaron en forma negativa en el cuadrante III, las variables estolones medios, vigor medio, floración temprana y floración normal, estas variables tuvieron valores medios y altos en las frecuencias; en lo que respecta a la floración en general las especies de *Brachiaria* tienen bien definidas las épocas en que se presenta, por lo tanto, este resultado concuerda con lo reportado por Diulgheroff *et al.* (1990) donde este periodo se circunscribe a un promedio entre 15 y 18 días.

Se realizó un análisis de conglomerados a las 24 frecuencias de las variables cualitativas que presentaron los híbridos de las diez cruzas (Figura 4), y se formaron cuatro grupos; dentro del primer grupo se relacionaron significativamente los híbridos de las cruzas 4118 y 143A18 que resultaron morfológicamente iguales, ya que, tuvieron valores semejantes en todas las variables, asimismo se agruparon híbridos de la cruz 10018, los que tuvieron valores parecidos a los dos anteriores en casi todas las variables únicamente se diferenciaron en que presentaron la característica postrada o rastrera en mayor frecuencia (Cuadro 7), lo cual, es una característica que estos híbridos heredaron del progenitor femenino 100, asimismo en la variable floración temprana característica del progenitor femenino HBS10002 (Peralta, A. M., Comunicación personal); en lo que respecta a las demás variables, estos caracteres se heredaron del progenitor masculino Mulato 18, el cual, presenta estas mismas características (Guiot y Meléndez, 2002); en el grupo II se relacionaron de forma cercana los híbridos de las cruzas 143A94 y 11094, y en menor escala con los híbridos de la cruz 4194, en los dos primeros sus frecuencias fueron semejantes y el tercero obtuvo resultados parecidos menos en las variables de estolones, esta relación se debe al progenitor masculino 94, el cual es un apomítico que heredo sus características principales a esta progenie, sobre todo la estolonífera, una característica del progenitor masculino 94, el cual heredo de *Brachiaria brizantha* (Peralta, 1990), híbridos de la cruz 10071 se integraron en este grupo ya que, en algunas variables tienen valores parecidos; el grupo III lo formaron híbridos de la cruz 4171 que se diferenciaron del resto de los demás genotipos, resaltando el predominio del hábito de crecimiento postrado; el grupo IV se conformó con los híbridos de las cruzas 2918 y 2971 donde, la relación de



estos, se debió en parte al progenitor femenino 29 porque, fueron los que presentaron los mayores porcentajes en la variable modo de crecimiento erecto, una característica de su progenitor femenino, igual que la característica glabra de la lámina foliar.

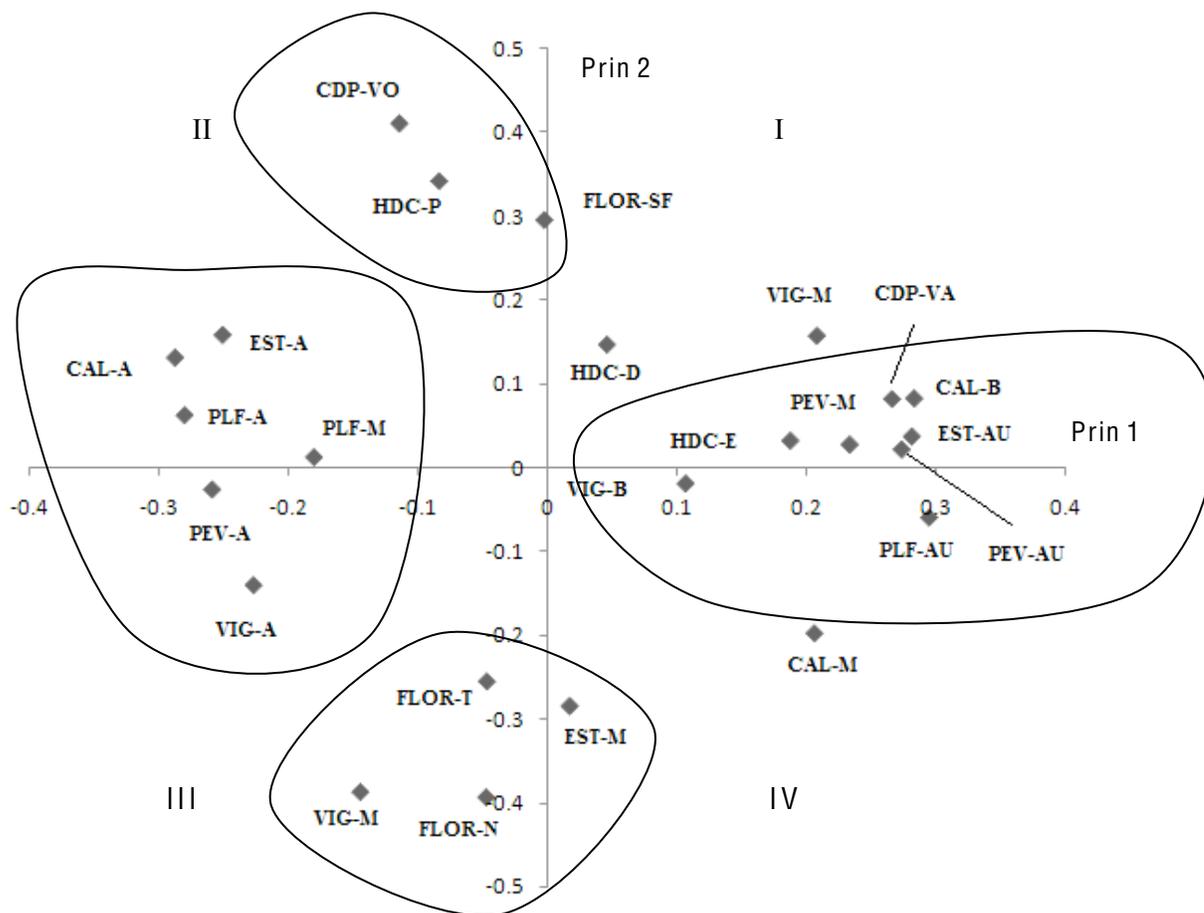


Figura 3. Correlaciones de cada variable original con los componentes principales.

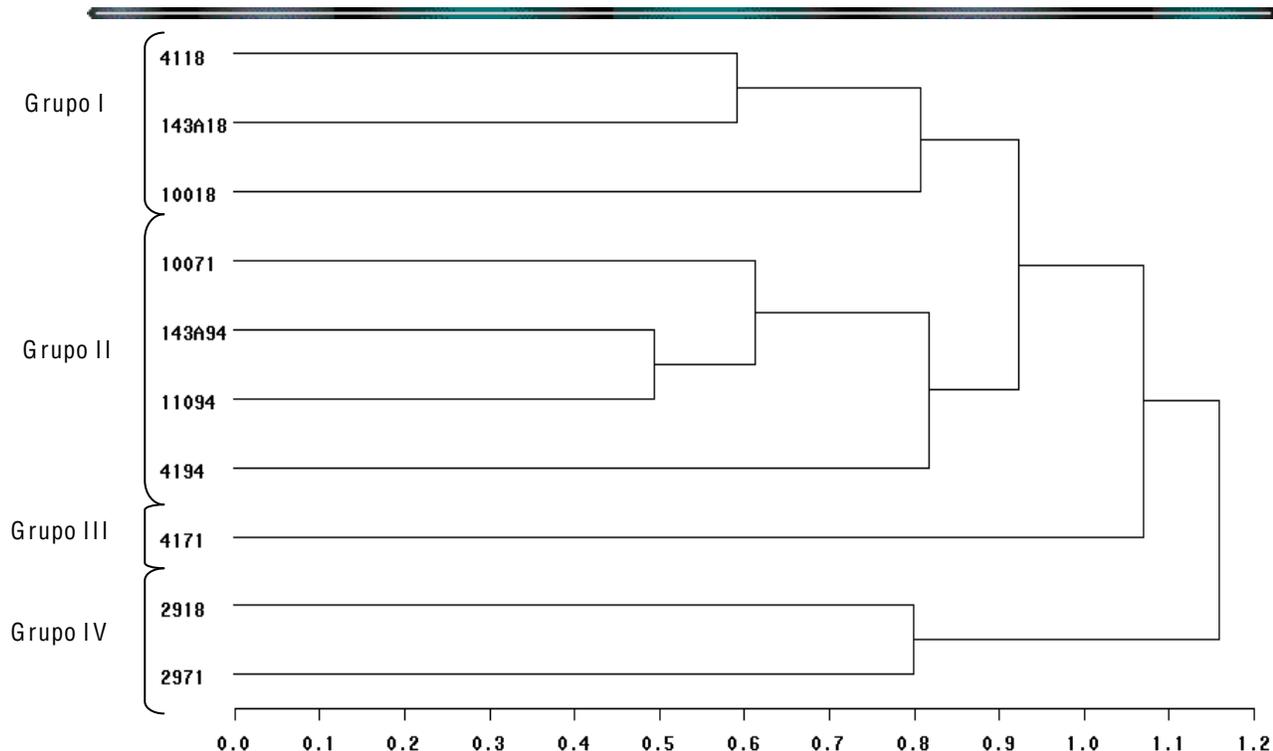


Figura 4. Dendrograma con distancia euclidiana de 24 variables cualitativas de híbridos de diez cruzas interespecíficas de *Brachiaria*

3.3.1.3. Prueba citoembriológica

Esta prueba se realizó con 200 híbridos y los resultados fueron: apomícticos 95, sexuales 83, sin identificar 22 (Cuadro 10); la hipótesis formulada fue que los materiales F₁ segregaron en una proporción de 1:1, por lo que al realizar la prueba de χ^2 (ji cuadrada), esta mostró que no hubo diferencias significativas en el tipo reproductivo de acuerdo al valor de la probabilidad (Cuadro 11). Este resultado concuerda con lo reportado por Valle (1997) y Valle y Miles (2001) quienes encontraron una herencia tetrasómica sencilla en cruza interespecíficas con plantas de este género; además Savidan (1981) indica que el gen de la apomíxis, es dominante y tetraploide (Aaaa), y al cruzarlo con un tetraploide sexual (aaaa) los materiales F₁ segregaron al 50%.

En lo que respecta al modo reproductivo (Cuadro 10), se observa que los híbridos de las cruza 143A18, y 2918, tienen los valores más altos en el modo apomíctico, lo cual se debe al progenitor macho Mulato18, el cual es un apomíctico dominante; los híbridos de las cruza 2971 y 11094, mostraron los más altos índices de sexualidad.



3.3.1.4. Análisis de correlación

Se realizaron pruebas de contraste entre las variables morfológicas y agronómicas cualitativas, con el modo reproductivo, mediante la prueba de regresión logística ordinal (Cuadro 12), mostrando que hubo correlación significativa con hábito de crecimiento (HDC) y altamente significativa con pubescencia de lámina foliar (PLF) y floración (FLOR); lo que indica que estas tres variables podrían utilizarse como indicadores confiables para identificar híbridos con características reproductivas específicas como la de la apomixis; en cuanto a la pubescencia de lámina foliar es una característica que poseen los materiales apomícticos sobre todo el mulato18, y que también indica hibridación; referente a la variable floración (FLOR) esta fue utilizada por Miles y Valle (1997), para evaluar híbridos elite en el programa de mejoramiento del CIAT, lo cual coincide con lo observado en este trabajo, en lo referente a que es un carácter agronómico con posibilidades para utilizarse en la selección de apomícticos potenciales. Las restantes variables no tuvieron efectos significativos en la correlación.

Cuadro 10. Proporción de individuos apomícticos, sexuales y sin definir producidos en la F₁ identificados en la prueba citoembriológica practicada en Montecillo, México.

Híbridos F ₁	Apomícticos %	Sexuales %	Sin definir %
HB4118	9 (45)	9 (45)	2 (10)
HB2918	11 (55)	9 (45)	0 (0)
HB10018	10 (50)	7 (35)	3 (15)
HB143A18	14 (70)	4 (20)	2 (10)
HB4171	9 (45)	7 (35)	4 (20)
HB2971	6 (30)	11 (55)	3 (15)
HB10071	10 (50)	9 (45)	1 (5)
HB143A94	10 (50)	7 (35)	3 (15)
HB4194	8 (40)	11 (55)	1 (5)
HB11094	8 (40)	9 (45)	3 (15)
Total:	95 (47.5)	83 (41.5)	22 (11)

1: El tamaño de muestra fue de 200 genotipos.



Cuadro 11. Segregación por modo reproductivo en la prueba citoembriológica de híbridos interespecíficos de *Brachiaria spp.* (prueba de ji cuadrada)

Cruza	Proporción	χ^2	g.l.	Nivel de significado estimado
Sexual x Apomítico (aaaa x Aaaa)	1:1	15.276	18	0.643 ns

ns: No significativo

Cuadro 12. Prueba de regresión ordinal entre las variables morfológicas y agronómicas y el modo reproductivo de *Brachiaria spp.*

Indicador	Coficiente	Error estándar	Nivel de significado estimado
Hábito de crecimiento	0.734147	0.394421	0.063*
Pubescencia de lámina			
Foliar	-0.827874	0.294679	0.005**
Floración	1.73876	0.632894	0.006**

*Significativo

** Altamente significativo



3.4. CONCLUSIONES

Las variables cuantitativas producción de semilla, diámetro de macollo y longitud de lámina foliar, fueron las más importantes en la variación de los híbridos de las cruzas.

En el análisis de conglomerados de variables cuantitativas mostró que el agrupamiento fue influenciado por los progenitores masculinos 18, 94 y 71.

Las variables cualitativas que mostraron importancia para diferenciar genotipos fueron en general las que presentaron las menores frecuencias.

Los grupos formados mediante el análisis de conglomerados de las variables cualitativas fueron determinados por los progenitores masculinos 18 y 94; y el progenitor femenino 29.

La prueba citoembriológica definió el modo reproductivo de los híbridos y puede ser utilizada en la identificación de genotipos a nivel de laboratorio.

Las variables hábito de crecimiento, floración y pubescencia en lámina foliar tienen correlación con el modo reproductivo, por lo cual pueden tomarse como indicadores para identificar plantas apomícticas.



3.5. LITERATURA CITADA

- Argel, P. J. y G. Pérez. 2003. Pasto Mulato. Una Nueva Opción Forrajera para la Ganadería. Revista Oficial de la Escuela Centroamericana de Ganadería (ECAG). Edición No. 26. Octubre-Diciembre 2003. p. 22-25.
- _____. 1986. Pasturas mejoradas y la contribución de las semillas forrajeras en América Central. Programa de pastos tropicales del CIAT para México, Centroamérica y el Caribe. 12 p.
- Barrón, A. M. 1991. Multiplicación de semilla forrajera experimental en Balancan, Tabasco. IV Reunión Científica, Forestal y Agropecuaria del CIFAP, Villahermosa, Tabasco. p 55.
- Bhat, V., K. K. Dwivedi, J. P. Khurana, and S. K. Sopory. 2005. Apomixis: An enigma with potential applications. Current Science. 89(11): 1879-1893.
- Diulgheroff, S., E. A. Pizarro, J. E. Ferguson, y P. J. Argel. 1990. Multiplicación de especies forrajeras tropicales en Costa Rica. Pasturas Tropicales. 12(2): 15-23.
- Guiot G. J. D., y N. F. Meléndez. 2002. Comparación morfológica de *Brachiaria* híbrido cv. Mulato y *Brachiaria brizantha* cv Insurgente. XV Reunión Científica Tecnológica Forestal y Agropecuaria. Tabasco 2002.
- Johnson V.E. and J. H. Albert. 1999. Statistics for social science and public policy. Advisors S. E. Fienberg, D. Lievesley, and J. Rolph. Ed. Springer-Verlag. 258 p.
- Little, T. M., and F. J. Hills. 1981. Métodos estadísticos para la investigación en la agricultura. Editorial. Trillas. 270 p.
- Manly, B. F. J. 1986. Multivariate Statistical Methods. Third Edition. Ed Chapman & Hall/CRC. 159 p.
- Miles, J. W., C. B. do Valle, I. M. Rao, and V. P. B. Euclides. 2004. Brachiaria grasses. In: Sollenberger, L.E.; Moser, L.; Burson, B. (eds.). Warm-season (C4) grasses. Agron. Monogr. 45. ASA, CSSA, SSSA, Madison, WI, USA. p. 745-783.
- _____. 1999. Nuevos híbridos de *Brachiaria*. Pasturas Tropicales. 21 (2):78.
- _____ and C. B. do Valle. 1997. Avances en el mejoramiento de *Brachiaria* en América tropical. Pasturas tropicales. 19(2): 50-52.



-
- Peralta, A.M. 1990. Pasto insurgente *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) Stapf. Para incrementar la producción de carne y leche en el trópico de México. INIFAP. Folleto técnico No. 3. p 20.
- Savidan Y. H. 1981. Genetics and utilization of apomixis for the improvement of Guineagrass (*Panicum maximum* Jaq). Proceedings XV International Grassland Congress, Lexington, Kentucky, USA. pp 182-184.
- SEMARNAP. 1998. Informe anual estadístico de hidrometría. Departamento de Hidrometría de Iguala, Gro., SEMARNAP.
- Valle C. B. do and J. W. Miles. 2001. Breeding of Apomictic Species. *In*: Savidan, Y., J. G. Carman, and T. Dresselhaus (eds). The Flowering of Apomixis: From Mechanism to Genetic Engineering. México, D.F.: Cimmyt, IRD, European Commission DG VI (FAIR). 243 p.
- _____. 1997. Selection of interspecific hybrids of *Brachiaria* a tropical forage grass. *In*: International Grassland Congress, 18. Proceedings. Alberta, Canada. pp 103-104.
- _____ and Y. H. Savidan. 1996. Genetics, cytogenetics and reproductive biology of *Brachiaria*. *In*: *Brachiaria: Biology, Agronomy, and Improvement*. pp.147-163. CIAT Publication N° 259. Cali:CIAT.
- _____ and C. Glienke. 1991. New sexual accessions in *Brachiaria*. Apomixis Newsletter. 3: 11-13.
- Young, B. A., R. T. Sherwood, and E. C. Bashaw. 1979. Cleared pistil and thick-sectioning techniques for detecting aposporous apomixis in grasses. Canadian Journal Botany. 57: 1668–167.



RESUMEN

Se realizaron acciones de cruzamiento para producir híbridos del género *Brachiaria spp.* por lo cual, se establecieron 129 progenies de 10 cruzas de dos especies, donde hubo tres progenitores masculinos apomícticos 18, 94 y 71; y cinco progenitores femeninos sexuales 41, 29, 100, 110 y 143A; se sembraron parcelas con un mínimo de 5 plantas y un máximo de 20 de cada material. La caracterización se realizó a 44 progenies apomícticas que se seleccionaron; se midieron 13 variables cuantitativas y 12 cualitativas, algunas cruzas produjeron más progenies apomícticas la 41 x 18 (9), la 100 x 18 (8), la 143A x 18 (6), la 143A x 2094 (6), y por último la 110 x 94 (9); por lo cual el progenitor masculino 71, podría ser apomíctico facultativo. Se realizó un análisis de componentes principales a las trece variables cuantitativas y doce cualitativas, de las cuales, las siguientes tuvieron más peso en la variación total observada: longitud del eje de la inflorescencia, altura de la planta, longitud del primer racimo, longitud de lámina foliar, longitud de vaina de hoja bandera, las relacionadas con la pubescencia, la presencia, textura y longitud, además de estolones, porte de lámina foliar y modo de crecimiento. Se realizó un análisis de conglomerados jerárquico a las variables cuantitativas en donde se determinó la formación de ocho grupos; los grupos I y III se conformaron con híbridos del progenitor masculino 18, que es un material que influyó genéticamente en la progenie de este grupo adicionándole su carácter apomíctico, además estos híbridos tuvieron características en común como altura de planta y longitud de lámina foliar; el grupo II estuvo formado en su mayoría por progenie del apomíctico masculino 94, hubo algunos híbridos del progenitor masculino 18 los cuales no se relacionaron cercanamente con los descendientes del progenitor masculino 94; los demás grupos fueron pequeños, formados por dos o un híbrido que no se relacionaron con la mayoría de los híbridos. En el análisis de conglomerados jerárquicos de variables cualitativas, se formaron cuatro grupos, en el primero 14 híbridos fueron descendientes del progenitor 18; en el segundo grupo igualmente proliferó descendencia del progenitor masculino 18, (10 híbridos de 13); en el tercero se agruparon cinco híbridos disímbolos; mientras en el cuarto grupo los ocho híbridos fueron progenie del progenitor masculino 94. Se concluye que la caracterización fue de utilidad para determinar que los progenitores masculinos influyen en mayor medida en la relación de su progenie.

Palabras clave: Progenie, caracterización, progenitor, *Brachiaria*, apomíctico.



4.1. INTRODUCCIÓN

Plantas pertenecientes al género *Brachiaria* de gran valor comercial actualmente, fueron de los últimos importantes forrajes introducidos en los trópicos de América (Parsons, 1972). Estos pastos probablemente en la actualidad cubren más superficie que otras especies de pastos que se cultivan en la región tropical de América (Miles *et al.*, 2004). De los pastos de *Brachiaria* que se cultivan comercialmente la mayoría son apomícticos, únicamente el diploide *Brachiaria ruziziensis* se reproduce sexualmente y recombinándolo con genotipos apomícticos se pueden obtener híbridos que podrían tener características deseables para su liberación comercial. La apomixis que presentan especies de este género, da como resultado que una parte de la progenie de una planta apomíctica es genéticamente idéntica a la planta madre (Nogler, 1984). La apomixis tiene gran interés para la agricultura debido a que su posible introducción en las especies de importancia económica como el maíz, sorgo, girasol, etc., permitiría mantener, por tiempo indeterminado y por medio de verdaderas semillas, la estabilidad genética de híbridos y de variedades superiores (Hanna y Bashaw 1987; Savidan y Dujardin 1992; Koltunow 1993; Vielle-Calzada, *et al.*, 1996).

Después de evaluar la colección de *Brachiaria* en diferentes agroecosistemas de América tropical se llegó a la conclusión de que existía variabilidad natural en atributos agronómicos importantes (producción de biomasa, calidad nutritiva, tolerancia a sequía y suelos mal drenados, rendimientos de semilla; Lascano, 2002). Dado lo anterior, fue necesario iniciar acciones de cruzamiento para producir híbridos de *Brachiaria* con resistencia a salivazo, pero que además estuviesen adaptados a suelos ácidos con altos niveles de Al (aluminio), que fuesen resistentes a *Rhizoctonia* (roya), que tuviesen alta producción de semilla de buena calidad y forraje de alta digestibilidad (Cardona *et al.*, 1999). En pastos forrajeros es básica la información cuando se realiza mejoramiento, los aspectos más importantes son el modo reproductivo, morfología, plagas y enfermedades que la atacan, así como también, características agronómicas como producción de semilla, respuesta a fertilización, y otras (Jank, *et al.*, 1997). Por otro lado Miles y Escandón (1997) proponen que los métodos de fitomejoramiento para *Brachiaria* deben ser orientados hacia la explotación de las propiedades especiales de la apomixis con base en el desarrollo de cultivares apomícticos, los métodos utilizados se desarrollan en muchos casos de manera empírica, y argumentan que poblaciones sexuales tetraploides de base genética amplia pueden ser mejoradas por métodos convencionales de selección, luego, a través de



hibridación con un apomítico apropiado, será posible encontrar segregantes apomíticos de características deseables.

Debido a la necesidad que existe de investigación sobre mejoramiento de plantas de este género se plantearon los siguientes objetivos:

4.1.1. Objetivos específicos

Realizar una prueba de progenie, a 129 materiales F_1 de diez cruces entre genotipos de 5 hembras sexuales y 3 machos apomíticos.

Caracterización morfológica y física de los híbridos apomíticos interespecíficos de *Brachiaria*, que resulten de la prueba anterior.

4.1.2. Hipótesis

La progenie resultante segregará en proporción 1:1 de genotipos apomíticos (facultativos y obligados) y sexuales.

Los genotipos apomíticos tendrán fenotípicamente características mayoritarias del progenitor masculino.



4.2. MATERIALES Y MÉTODOS.

4.2.1. Localización del sitio experimental en campo

Esta fase experimental se llevó a cabo en Iguala, Guerrero, en el campo experimental del C. Ing. Armando Peralta Martínez, localizado en la parte norte del Estado de Guerrero, ubicado entre los paralelos 18°13' y 18°27' de latitud norte y entre los 99°29' y 99°42' de longitud oeste, respecto del meridiano de Greenwich.

Se encuentra asentado en los comienzos de la representación de la cuenca del río Balsas. Colinda al norte con Buena Vista de Cuellar y Taxco; al este con Huitzucó, Tepecoacuilco y Cocula; al oeste con Teloloapan; Iguala de la Independencia se encuentra situada a 731 metros sobre el nivel del mar.

4.2.2. Material genético.

Se utilizaron 129 progenies de materiales F_1 evaluadas el año anterior. El arreglo de la parcela fue establecer un mínimo de 5 y un máximo de 20 plantas por cada progenie (Savidan, 2000), dependiendo de la cantidad de plantas que se pudieron establecer en el almacigo, ya que, no fue posible uniformizar todas las progenies por problemas con la semilla, entre las cuales destacan: semilla vana, semilla latente y poca cantidad de la misma.

4.2.3. Desarrollo del trabajo

Esta segunda etapa de campo se realizó durante el año 2005, y consistió de la siembra de 129 híbridos (Cuadro 13) que fueron preseleccionados durante la primera etapa del trabajo, en junio la siembra se hizo de forma manual, depositando 2 semillas en cada pozo de la charola germinadora. Se utilizó como sustrato limo y arena y se regaron las charolas diariamente y un mes después las plántulas se trasplantaron en la parcela experimental, de acuerdo al orden mostrado en el Cuadro 13.

Las plantas se establecieron después de sobrevivir al exceso de lluvia; esta etapa previa de establecimiento es una de las de mayor importancia en el desarrollo de los pastos, ya que en etapas posteriores las plantas son más resistentes a los factores del medioambiente,



la planta se mantuvo libre de maleza durante los primeros 40 días, por medio de deshierbes los cuales fueron en forma manual.

En cuanto a la fertilización, se aplicó el tratamiento 80-40-0, donde se utilizó la fórmula 20-20-0 y 20.5; la primera aplicación (40-40-0) se realizó a los 30 días después del trasplante y fue en forma manual depositando en cada planta 20 g de fertilizante, cubriéndolo después con una capa de tierra para evitar volatilización; la segunda aplicación fue a los 60 días después del trasplante y se aplicó la fórmula 40-0-0, utilizando sulfato de amonio (20.5), depositando 20 g por planta cubriéndolo con tierra.

En el mes de noviembre se realizó la cosecha en forma manual, la semilla recolectada se depositó en costales de polipropileno y luego se sometió al proceso de sudado, con la finalidad de que perdiera humedad; después de esta práctica se limpió y se colocó en un lugar fresco y seco para evitar proliferación de enfermedades fungosas.

Para la caracterización, la toma de datos se realizó a partir del mes de octubre, cuando inició la floración y se terminó hasta la cosecha en noviembre; se tomaron tres plantas por progenie, de la parte central con competencia para evitar sesgos; los descriptores morfológicos y agronómicos que se utilizaron se describen en el Cuadro 14.

4.2.4. Análisis estadístico

Se utilizó el programa SAS, para realizar un análisis de conglomerados (Manly, 1976), y una prueba de componentes principales, esta última es una técnica matemática que no requiere un modelo estadístico para explicar la estructura probabilística de los errores. Sin embargo, se requiere que la población muestreada tenga una distribución multinormal. Mediante la prueba de componentes principales se generan nuevas variables que expresen información contenida en el conjunto original de datos y así reducir la dimensionalidad del problema que se está estudiando como paso previo para futuros análisis y poder eliminar cuando sea posible algunas variables originales que aportan poca información.

Una vez determinadas las variables de mayor valor descriptivo, se procedió a realizar un análisis de conglomerados jerárquico mediante el método de ligamiento promedio (UPGMA) a partir de la matriz de correlación, con lo cual se construyó un dendrograma. El análisis de similitud genética se realizó a partir del cálculo de similitud numérica



usando la distancia euclidiana. En términos generales la distancia euclidiana se define como la longitud de la hipotenusa de un triángulo rectángulo, la cual es utilizada en medidas específicas tales como las distancias simples entre objetos (Hair, *et al.*, 2000) y se calcula con la siguiente fórmula:

$$ED = \sqrt{(X_2 - X_1)^2 + (Y_2 - Y_1)^2}$$

Donde cada X y Y son las coordenadas que representan los puntos de longitud de las dimensiones geométricas respectivas; este concepto es fácilmente aplicable cuando se utilizan más de dos variables.

Finalmente se realizó un análisis de varianza utilizando el criterio de clasificación por variable para establecer el grado de significancia de éstas.

Cuadro No. 13. Progenies establecidas en la parcela de investigación.

Cruzas	41 x 18	29 x 18	100 x 18	143A x 18	41 x 71	29 x 71	100 x 71	143A x 94	41 x 94	110 x 2094
	4118-3	2918-2	10018-1	143A18-3	4171-1	2971-6	10071-1	143A94-3	4194-2	11094-1
	4118-5	2918-4	10018-2	143A18-5	4171-5	2971-9	10071-2	143A94-4	4194-7	11094-4
	4118-6	2918-6	10018-3	143A18-6	4171-6	2971-11	10071-3	143A94-5	4194-8	11094-6
	4118-7	2918-7	10018-5	143A18-7	4171-9	2971-12	10071-6	143A94-6	4194-9	11094-7
	4118-8	2918-8	10018-6	143A18-9	4171-14	2971-13	10071-8	143A94-8	4194-10	11094-8
	4118-9	2918-10	10018-7	143A18-11	4171-15	2971-15	10071-10	143A94-9	4194-12	11094-9
	4118-10	2918-17	10018-8	143A18-14	4171-21	2971-16	10071-14	143A94-10	4194-15	11094-11
Progenies	4118-11	2918-19	10018-10	143A18-15	4171-24	2971-18	10071-16	143A94-11	4194-19	11094-12
	4118-12	2918-22	10018-11	143A18-16	4171-25	2971-19	10071-17	143A94-15	4194-20	11094-13
	4118-13		10018-12	143A18-17			10071-19	143A94-16	4194-24	11094-14
	4118-14		10018-13	143A18-18			10071-20	143A94-17		11094-15
	4118-15		10018-15	143A18-21			10071-22	143A94-18		11094-16
	4118-16		10018-16	143A18-23			10071-25			11094-18
	4118-17		10018-17	143A18-24						11094-19
	4118-18		10018-18							11094-21
	4118-19		10018-20							11094-22
	4118-21		10018-21							
	4118-22		10018-22							
			10018-24							
Totales:	18	9	19	14	9	9	13	12	10	16



Cuadro 14. Lista de descriptores morfológicos y agronómicos evaluados en las progenies de *Brachiaria spp.*

CODIGO	VARIABLES	UNIDAD	DESCRITORES		
			Clases		
ADP	Altura de planta	cm			
LLF	Longitud de Lámina Foliar	cm			
LVL	Longitud de Vaina de Lámina Foliar	cm			
ALF	Ancho de Lámina Foliar	cm			
DDT	Diámetro de Tallos	cm			
LEI	Longitud del Eje de la Inflorescencia	cm			
DNTS	Diámetro del Nudo Terminal Superior	cm			
LVHB	Longitud de Vaina de la Hoja	cm			
ALHB	Bandera	cm			
RPI	Ancho de la Lámina de la Hoja	cm			
LPR	Bandera	No.			
EPR	Racimos por Inflorescencia	cm			
PCS	Longitud del Primer Racimo	No.			
MDC	Espiguillas del Primer Racimo	g			
FLO	Peso de 100 Semillas		Erecto (E)	Postrado (P)	Rastrero (R)
PLF	Modo de crecimiento		Temprana (T)	Intermedia (I)	Tardía (TA)
CLF	Floración		Erecta (E)	Arqueada (A)	Genicu. (G)
EST	Porte de Lámina Foliar		V. Amar. (VA)	V. Seco (VS)	V. Os. (VO)
CDE	Color de Lámina Foliar		Ausentes (AU)	Intermedios (I)	Abunda (A)
CDA	Estolones		Morado (M)	Café (C)	Blancas (B)
PDE	Color de los Estigmas		Amarillo (A)	Café (C)	Naranja (N)
PEI	Color de las Anteras		Ausente (A)	Intermedia (I)	Abund. (A)
PULF	Pubescencia de Espiguillas		Ausente (A)	Intermedia (I)	Abund. (A)
LDP	Pubescencia en el Eje de la Inflorescencia		Ausente (A)	Corta (C)	Larga (L)
TDP	Pubescencia de la Lámina Foliar		Ausente (A)	Dura (D)	Suave (S)



4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1. Análisis de progenies en campo

Se realizaron varios recorridos para observar el comportamiento fisiológico de las diferentes progenies producidas por los híbridos de las diez cruzas. Se fueron seleccionando los materiales que presentaban características apomícticas (Cuadro 15), para lo cual se utilizaron los siguientes caracteres: pubescencia de lámina foliar, hábito de crecimiento, vigor de planta, uniformidad de progenie y floración, tal como lo indican las pruebas realizadas por Miles y Valle (1991).

Cuadro 15. Progenies con comportamiento apomíctico. Iguala, Gro. 2005.

CRUZA	41 x 18	29 x 18	100 x 18	143A x 18	41 x 71	100 x 71	143A x 94	41 x 94	110 x 94
	4118-5	2918-4	10018-1	143A18-3	4171-9	10071-8	143A94-3	4194-2	11094-1
	4118-6	2918-19	10018-5	143A18-6	4171-25	10071-14	143A94-4	4194-8	11094-4
	4118-7		10018-7	143A18-14		10071-25	143A94-9	4194-19	11094-7
	4118-12		10018-12	143A18-16			143A94-11	4194-20	11094-12
	4118-15		10018-13	143A18-21			143A94-15	4194-24	11094-13
	4118-17		10018-20	143A18-23			143A94-18		11094-15
	4118-18		10018-22						11094-16
	4118-21		10018-24						11094-19
	4118-22								11094-22
TOTALES:	9	2	8	6	2	3	6	5	9

Los resultados del Cuadro 15, indican que hubo 50 híbridos apomícticos y que algunas cruzas produjeron más progenies apomícticas que otras; por ejemplo la 41 x 18 (9), la 100 x 18 (8), la 143A x 18 (6), la 143A x 2094 (6), y por último la 110 x 94 (9); esto nos indica que el progenitor masculino 71, podría ser apomíctico facultativo, y que no es un buen progenitor; en lo que respecta a la comparación con la prueba de clareamiento de sacos embrionarios realizada a estos mismos materiales y en donde se identificaron 95 apomícticos, existe una alta posibilidad de que las restantes 45 progenies sean apomícticas facultativas tal y como lo señalan Miles y Valle (1991), pues presentaron variación en algunas progenies que se identificaron por análisis del saco embrionario como apomícticas, y en la prueba de progenies se comportaron como sexuales; se considera que un apomíctico facultativo que tiene del 50 al 70% de sexualidad es común que presente plantas fuera de tipo.



4.3.2. Análisis de variables cuantitativas

Debido a que 6 progenies no presentaron floración, y en consecuencia no se pudo recabar datos inherentes a morfología de inflorescencia y floración, no se incluyeron en el análisis estadístico.

Se realizó un análisis de componentes principales con base a la matriz de correlaciones de 13 variables cuantitativas evaluadas (Cuadro 14). Con los tres primeros componentes se explicó el 49.12% (Cuadro 16); el primer componente contribuyó con el 20.97%, el segundo con el 15.43% y el tercero con el 12.73%, lo que muestra la gran variabilidad en los materiales que se caracterizaron.

Cuadro 16. Valores característicos y proporción de la varianza total explicada por cada uno de los componentes principales con base en 13 variables cuantitativas, en 44 híbridos del género *Brachiaria*.

Componente Principal	Valor característico	Proporción de varianza global explicada (%)	Proporción de varianza acumulada (%)
1	2.73	<u>20.97</u>	20.97
2	2.01	<u>15.43</u>	36.39
3	1.65	<u>12.73</u>	<u>49.12</u>
4	1.28	09.88	59.00
5	1.10	08.46	67.46
6	1.08	08.31	75.77
7	0.74	05.66	81.43
8	0.60	04.60	86.03
9	0.54	04.18	90.21
10	0.40	03.10	93.31
11	0.34	02.64	95.95
12	0.30	02.32	98.27
13	0.23	01.73	100

Las variables de mayor importancia en el componente uno fueron en orden descendente LEI, ADP, LPR, LLF y LVHB; en el componente dos fueron ALF, DDT, y PCS; mientras en el tercer componente fue EPR. Este resultado indica que nueve de las trece variables contribuyeron a explicar gran parte de la variación total observada, en tanto que LPR, DNTS, ALHB, y RPI, mostraron menores contribuciones y el menor grado de determinación (Cuadro 17), lo anterior significa que la altura de la planta (ADP), esta relacionada con variables de la inflorescencia, como longitud del eje de la inflorescencia (LEI), y longitud del primer racimo (LPR), además de variables importantes como longitud de lámina foliar (LLF). En el segundo componente se relacionaron el diámetro de tallo



(DDT) y ancho de lámina foliar (ALF), lo que se esperaba pues se trata de una planta forrajera, la cual depende de tallos anchos y fuertes para que se presenten láminas foliares grandes; en este mismo componente se correlacionó el peso de 100 semillas que fue mayor en plantas que no tuvieron mucha altura y que corrobora, que una planta vigorosa o con mayor altura, no necesariamente tendrá que ser buena productora de semilla.

Cuadro 17. Vectores característicos de las variables de mayor valor descriptivo de cada variable original con respecto a su componente principal de 13 variables cuantitativas.

Variables	Vectores característicos		
	CP1	CP2	CP3
ADP	0.397	-0.082	-0.102
LLF	0.311	-0.114	-0.293
LVLf	0.229	-0.263	0.224
ALF	0.070	0.565	-0.216
DDT	0.008	0.481	-0.049
LEI	0.401	0.109	0.025
DNTS	0.235	0.227	0.239
LVHB	0.310	-0.005	-0.336
ALBH	-0.236	-0.147	0.165
RPI	0.226	0.267	-0.084
LPR	0.376	-0.045	0.29
EPR	0.259	0.009	0.623
PCS	-0.213	0.446	0.354

ADP = Altura de planta, LLF = Longitud de lámina foliar, LVLf = Longitud de vaina de lámina foliar, ALF = Ancho de lámina foliar, DDT = Diámetro de tallo, LEI = Longitud del eje de la inflorescencia, DNTS = Diámetro del nudo terminal superior, LVHB= Longitud de vaina de hoja bandera, ALBH = Ancho de lámina de hoja bandera, RPI = Número de racimos por inflorescencia, LPR = Longitud de primer racimo, EPR = No. de espiguillas del primer racimo, PCS = Peso de cien semillas.

Finalmente en el tercer componente se correlacionaron las variables espiguillas del primer racimo (EPR), longitud del primer racimo (LPR), y de nueva cuenta peso de cien semillas (PCS), lo que significa que en este componente se concentra asociación entre las tres variables relacionadas con la inflorescencia, pues las tres se relacionan con la producción de semilla.

La correlación de cada variable de acuerdo con los componentes principales, dio como resultado una relación positiva en el primer cuadrante y segundo cuadrante del eje X (Componente principal 1) nueve variables (Figura 5), racimos por inflorescencia (RPI), diámetro de nudo terminal superior (DNTS), longitud del eje de la inflorescencia (LEI), longitud de vaina de hoja bandera (LVHB), espiguillas del primer racimo (EPR) y longitud



del primer racimo (LPR), todas estas variables tienen relación con la inflorescencia de este forraje, esto da una respuesta lógica a la interacción que presentan estas variables en la producción de semilla, otras variables fueron, longitud de vaina de lámina foliar (LVLF), longitud de lámina foliar (LLF) y altura de planta (ADP), las dos primeras componen la lámina foliar, por lo cual, es lógica su relación, asimismo la altura de planta tuvo relación con estas dos variables.

Por otra parte en el cuadrante I con una relación positiva y dentro del rango del componente principal 2, se colocaron las variables ancho de lámina foliar (ALF), y diámetro de tallo (DDT), lo que muestra la relación que tienen estas dos variables, en cuanto a que una lámina foliar ancha, por lo regular se acompaña de tallos gruesos; la variable peso de cien semillas (PCS), se colocó en el segundo cuadrante por lo cual, no se correlacionó con ninguna otra.

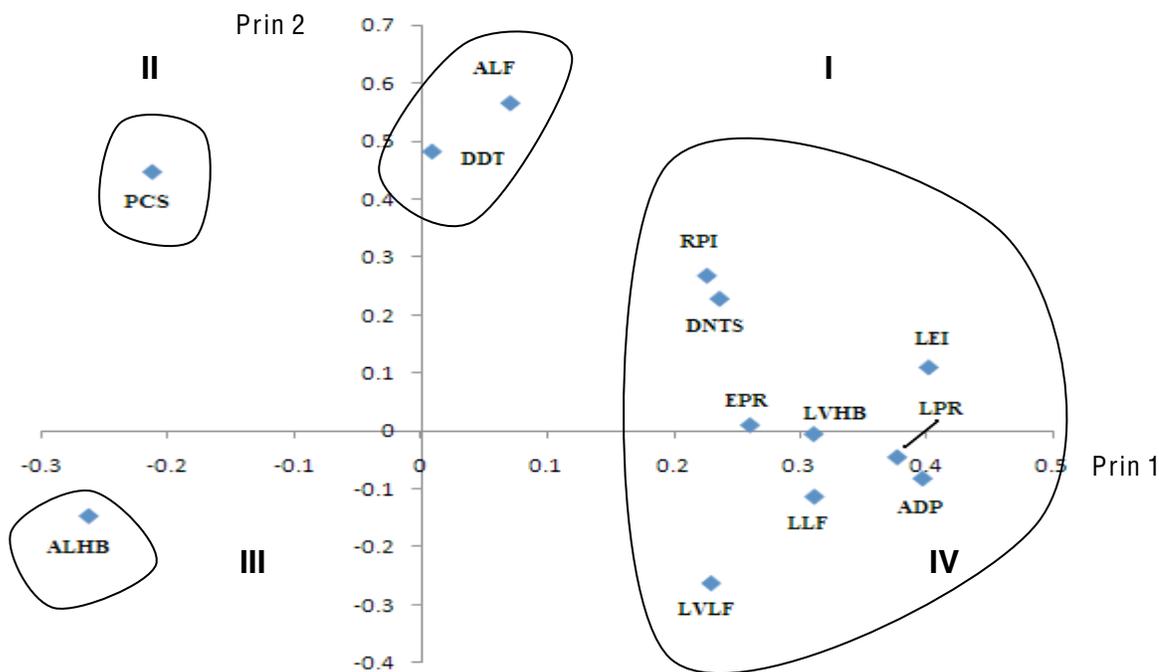


Figura 5. Correlaciones de cada variable original con los componentes principales.

En el tercer cuadrante está la variable ancho de lámina de hoja bandera (ALHB), que también no tuvo relación en su morfología con ninguna otra.

En cuanto a la distribución de las poblaciones con base en el primer y segundo componente principal (Figura 6) se observa que la mayoría de híbridos de la cruce 4118 y 4194 se correlacionaron positivamente en el cuadrante I y IV y negativamente en el cuadrante II, estos se agrupan formando una franja que se forma a lo largo del eje x, esto



indica que a pesar de tener diferencias en algunas variables, tienen también variables en común como pubescencia de lámina foliar (PLF), y altura de planta (ADP); los híbridos 143A94 se correlacionaron positivamente en los cuadrantes I y IV, básicamente por influencia paterna, ya que, sus medios hermanos los híbridos 143A18 lo hicieron en el cuadrante II, esto aclara la diferencia genética de los progenitores apomícticos masculinos 18 y 94; lo mismo sucede con los híbridos de la cruza 10018, y 2918 que se correlacionaron positivamente en el cuadrante IV, y los híbridos de las cruza 11094, 10071 y 4171, lo hicieron en los cuadrante III; estos resultados muestran que los progenitores masculinos tuvieron una influencia determinante en la variación de los híbridos caracterizados, ya que el 50% de los genes son aportados a su descendencia. Además, se observó como los progenitores femeninos no tuvieron una influencia en el patrón de agrupamiento de sus híbridos, porque algunos como el 41 se dispersaron en los cuatro cuadrantes.

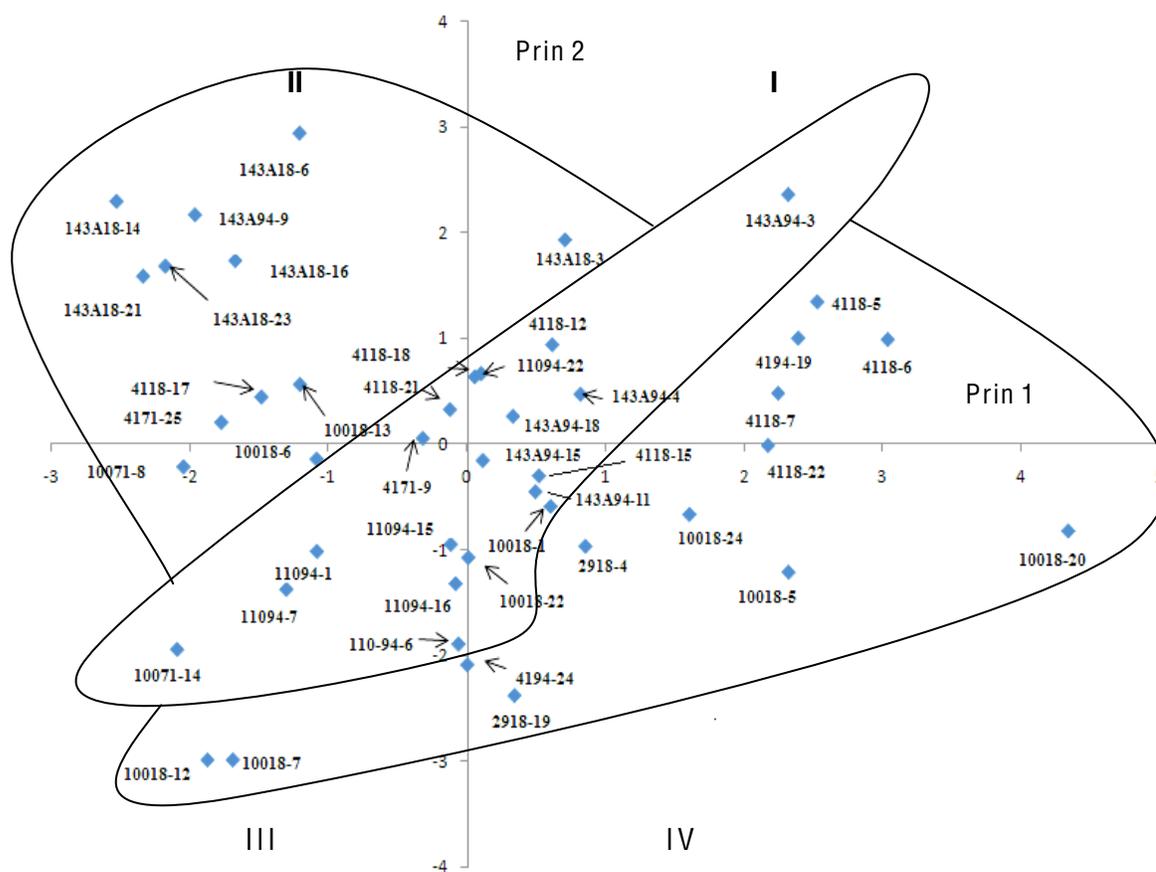


Figura 6. Distribución de 44 híbridos del género *Brachiaria* en función de los componentes principales, obtenidos con la matriz de correlaciones de 13 variables cuantitativas.



En lo que respecta a la distribución de los híbridos de las cruzas en base a los componentes principales I y II (Figura 7), se observó que cuatro de ellas se relacionaron positivamente en el cuadrante I, (4118, 4194, 10018, y 143A94) aunque la primera más orientada en el eje Y (Prin 2), lo que muestra una relación entre los progenitores femeninos 100 y 41 con el progenitor masculino 18, esto mismo sucedió en la distribución a nivel de híbrido; también se presentó una relación positiva en el eje X (Prin 1) de los progenitores femeninos 41 y 143A, con el progenitor masculino 94, porque hubo variables en las que obtuvieron valores semejantes; en el cuadrante II se relacionaron negativamente las cruzas 143A18 y la 4171, las cuales no tienen ninguna relación cercana; finalmente, en los cuadrantes III y IV se agruparon las restantes cruzas 10071, 11094 y 2918, que tampoco están relacionadas.

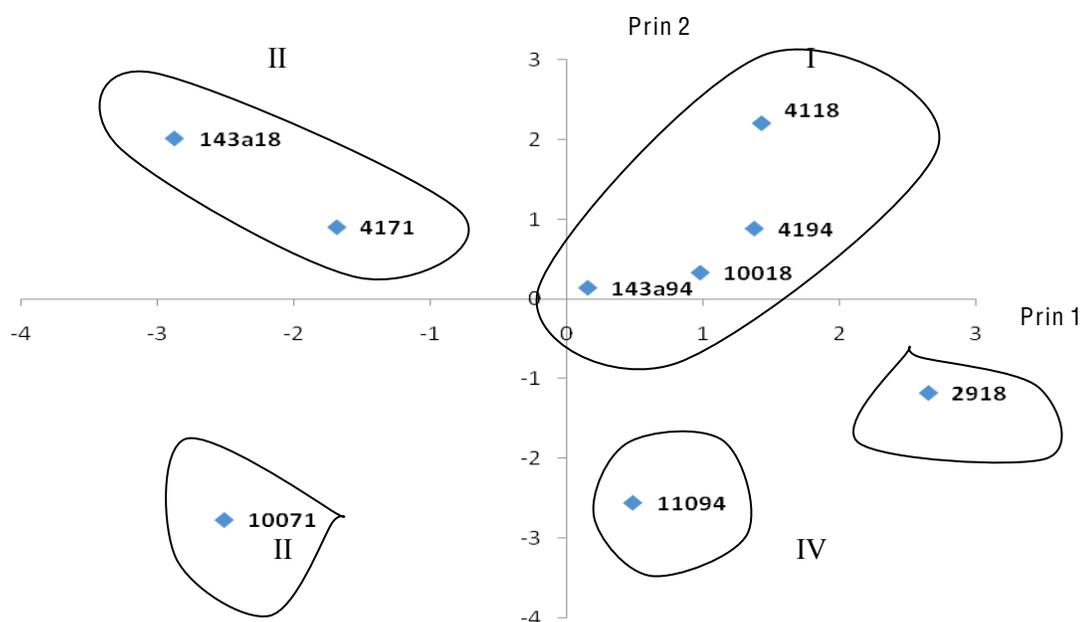


Figura 7. Distribución de 9 cruzas de genotipos del género *Brachiaria* en función de los componentes principales I y II, obtenidos con la matriz de correlaciones de 13 variables cuantitativas.

Se clasificó a las diferentes cruzas por medio de un dendrograma, obteniéndose dos grupos (Figura 8); el primero muestra una distribución similar a la obtenida en la prueba de componentes principales en donde están relacionadas estrechamente los híbridos de las cruzas 4118 y 10018, indicando que el progenitor masculino 18 fue la principal causa de dicha relación ya que influyó genéticamente; también se relacionaron aunque no tan cerca



los híbridos de las cruzas 4194 y 143A94; en este mismo grupo se asemejaron morfológicamente los híbridos de las cruzas 10071 y 11094, en donde se puede decir que los progenitores femeninos incidieron en esta relación; por último un poco menos relacionado con los demás integrantes se colocaron híbridos de la crusa 2918, que fue muy diferente en campo a cualquier otra, por lo que no se relacionó en el análisis y finalmente el grupo IV lo formaron los híbridos de la crusa 143A18 y 4171 que no tienen relación por sus progenitores.

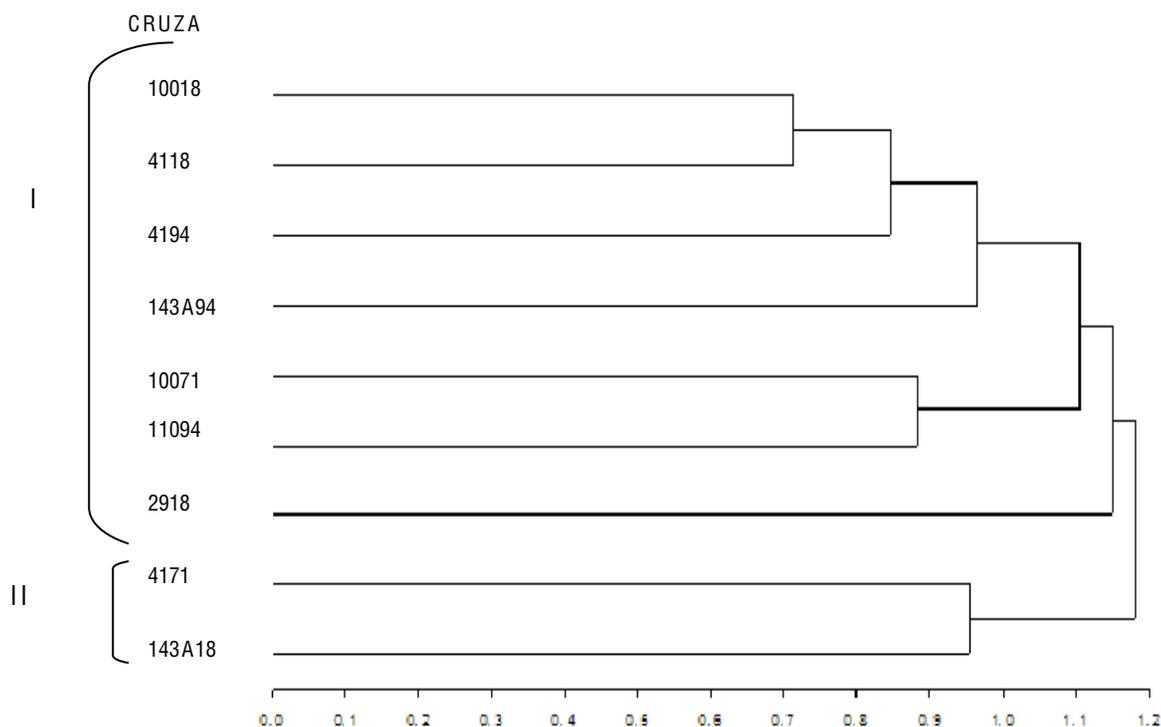


Figura 8. Dendrograma de clasificación de nueve cruzas entre genotipos del género *Brachiaria*, con base en 13 variables cuantitativas

En el análisis de varianza (Cuadro 18), hubo algunas variables que mostraron significancia ($\alpha \leq 0.05$) y alta significancia ($\alpha \leq 0.01$); entre las variables que mostraron significancia están altura de planta (ADP), longitud del eje de la inflorescencia (LEI), diámetro del nudo terminal superior (DNST), ancho de lámina de hoja bandera (ALHB), número de espiguillas del primer racimo, y con alta significancia en la variación se encuentra peso de cien semillas (PCS). Esta lectura indica que estas variables pueden servir en estudios posteriores para caracterizar morfológicamente plantas del género *Brachiaria*.



Los mayores coeficientes de variación los tuvieron las variables ALHB (62.60), ADP (20.70), DNTS (26.0), y RPI (21.30).

Para la clasificación de los grupos funcionales, primeramente, a partir de la información obtenida de la medida de los 13 parámetros seleccionados, se realizó un análisis de los cuatro componentes principales con el objetivo de eliminar información repetitiva encontrada en los datos iniciales. Los resultados muestran, que los parámetros que más contribuyen al agrupamiento de las especies son: LEI, ADP, LPR, LLF, LVHB, ALF, DDT, PCS, EPR; se efectuó el análisis de conglomerados jerárquico en donde se determinó la formación de ocho grupos (Figura 9). El grupo I se conformó con cuatro híbridos 4118 (41 progenitor femenino, y 18 progenitor masculino); tres híbridos 10018 (100 progenitor femenino, y 18 progenitor masculino); un híbrido de la cruce 2918 (29 progenitor femenino, y 18 progenitor masculino); esto indica que el progenitor masculino 18, es un material que influyó genéticamente en la progenie de este grupo adicionándole su carácter apomíctico, además estos híbridos tuvieron características en común como altura de planta (ADP) y longitud de lámina foliar (Cuadro 37 anexos); hubo un híbrido 4194, que conformó este grupo, por sus características en las variables antes mencionadas, sobresaliendo porque fue el que presentó la mayor altura de todos los híbridos analizados (1.30 cm), una característica que su progenitor masculino (94), adquirió del genotipo *Brachiaria brizantha* (Valle *et al.*, 1993a); el grupo II está formado por gran cantidad de híbridos, provenientes del progenitor masculino 94, cuatro 143A94, cuatro 11094, y un 4194, lo cual indica que hubo dominancia de este progenitor, además hubo algunos híbridos del progenitor masculino 18 tres 10018, un 2918 y uno 4118, los cuales a pesar de pertenecer a este grupo no se relacionaron cercanamente con los descendientes del progenitor masculino 94; el grupo III estuvo dominado por el progenitor masculino 18 con cuatro híbridos 4118, dos híbridos de la cruce 10018 y dos 143A18, (progenitores femeninos 41, 100 y 143A y 18 progenitor masculino), además se relacionaron también tres híbridos diferentes un 143A94, un 10071 y un 4171, esto muestra que los progenitores femeninos 41, 100 y 143A se agruparon o relacionaron genéticamente, porque tuvieron valores medios en longitud de lámina foliar (LLF) y también lo obtuvieron en espiguillas por racimo (EPR; Cuadro 36 anexos); el cuarto grupo lo formó el híbrido 4171-9, que no se relacionó con otro, debido al carácter facultativo del progenitor masculino apomíctico 71; el grupo V se formó con tres híbridos 143A18, los cuales se relacionaron cercanamente, hubo tres variables que influyeron en esta relación, ya que, fueron de altura



corta, tallo ancho y longitud de racimo corto; el grupo VI se conformó con dos híbridos 143A18 143A94, aquí se relacionaron en altura de planta, longitud y ancho de lámina foliar, y número de espiguillas del primer racimo (ADP, LLF, ALF, EPR), esta última podría ser a causa del progenitor femenino 143, ya que, *Brachiaria ruzizensis* la planta de origen, tiene la característica de producir gran cantidad de espiguillas (Valle *et al.*, 1993a).

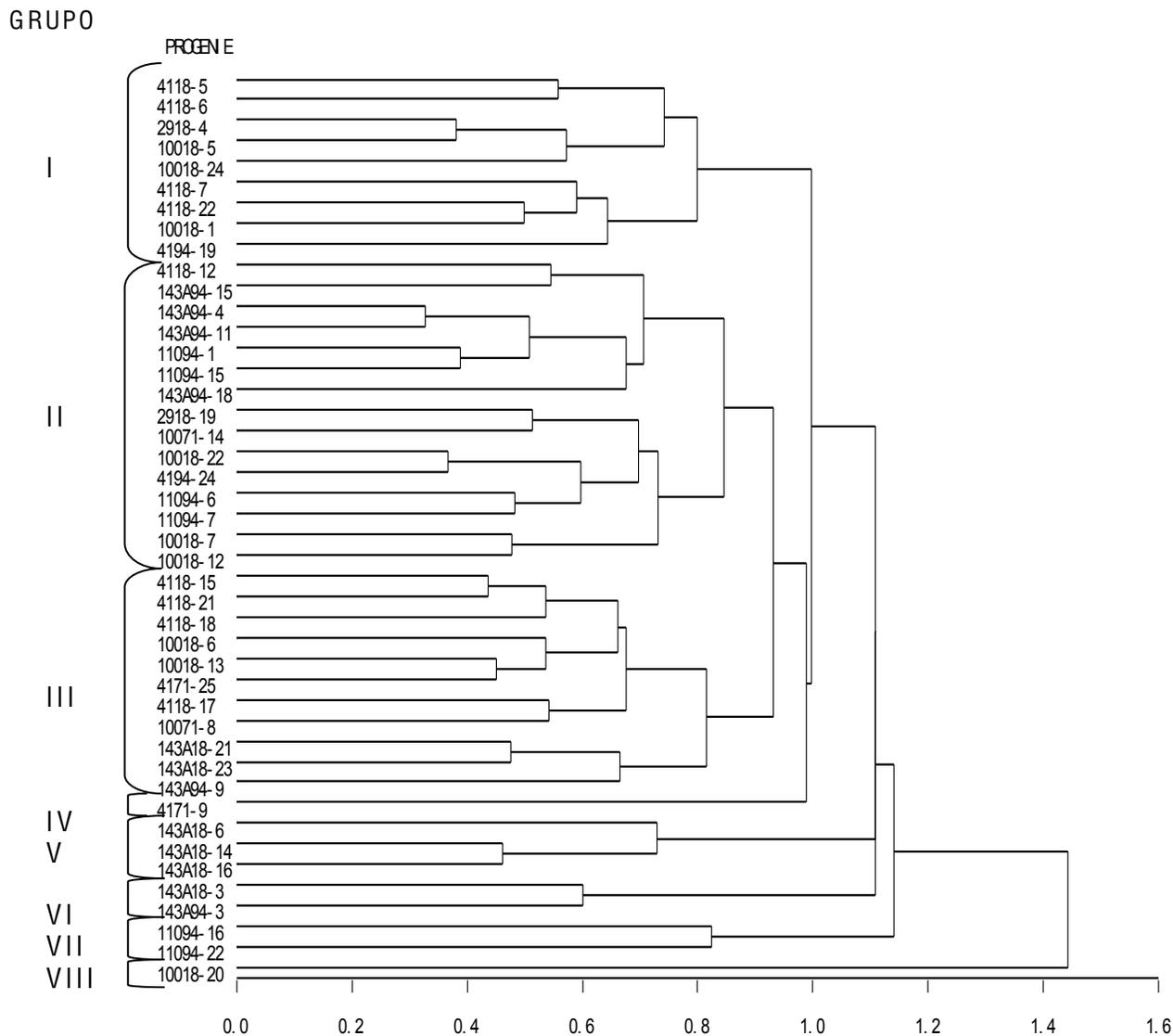


Figura 9. Dendrograma de 44 híbridos interespecíficos del género *Brachiaria* en base a nueve variables cuantitativas.

El grupo VI lo formaron dos híbridos 11094, que se relacionaron cercanamente, por altura de planta, longitud de lámina foliar, ancho de lámina foliar, y número de espiguillas; por ultimo el grupo VIII lo formó el híbrido 10018-20, que se comportó atípicamente, el motivo fue que alcanzó valores altos en la mayoría de variables por lo cual no se relacionó con los demás genotipos.



Hanna (1999), recomienda que en un programa de mejoramiento genético, las plantas apomícticas obligadas deben de utilizarse únicamente como progenitores masculinos; además para considerar a una planta con esta característica se necesitan varias pruebas de progenie; en este caso queda claro que los progenitores masculinos 18 y 94, son apomícticos obligados, por la dominancia que ejercieron en las plantas F_1 , algunos investigadores asocian esta dominancia a un simple factor mendeliano (Valle and Glienke 1993b; Valle y Miles, 1994; Miles and Escandón 1997). En lo que respecta al progenitor masculino 71, todo parece indicar que es un apomíctico facultativo con una fuerte residualidad sexual (Miles, 1999) que no tuvo las suficientes pruebas, para que se considerara un potencial progenitor masculino. Además lo anterior corrobora lo encontrado por Lazcano (2002), quién después de evaluar *Brachiaria* en diferentes agroecosistemas de América tropical, llegó a la conclusión de que existía variabilidad natural en atributos agronómicos importantes (producción de biomasa o láminas foliares, calidad nutritiva, tolerancia a sequía y suelos mal drenados, rendimientos de semilla).

En este análisis de caracterización fenotípica y física de híbridos del género *Brachiaria* sobresalen los aspectos siguientes:

Amplitud de la progenie. Se consideró suficiente la cantidad de progenie estudiada ya que permitió caracterizar en forma efectiva los híbridos que escaparon de los problemas de manejo y medio ambiente. Además permitió seleccionar en forma exitosa el carácter apomíctico de dicha progenie.

Variación. Los mayores valores de variación estuvieron ligados a componentes o variables asociados con la producción de semilla y en menor grado con fenología; esto habla de la importancia que tiene en este género dicha productividad, ya que es bien sabido que por ser un género semi-silvestre se presentan problemas con la relación productividad forrajera-producción de semilla, lo anterior indica que es menester encaminar esfuerzos en el mejoramiento tendientes a armonizar la anterior relación.

Agrupamientos. Aún cuando se observó amplia variación fenotípica, los análisis, tanto de componentes principales como de conglomerados, mostraron dos agrupamientos principales, uno formado por híbridos descendientes del progenitor masculino 18 y el otro de híbridos descendientes de este mismo progenitor y del progenitor masculino 94; lo cual indica la gran influencia de estos materiales apomícticos en la progenie resultante, sobre los progenitores femeninos; en cuanto a las variables, se observó en forma general, que la altura de la planta (ADP), estuvo ligada a variables relacionadas con la productividad como



longitud del primer racimo (LPR) y número de espiguillas del primer racimo, (EPR), y que el peso de cien semillas es básico para explicar la variación existente entre esta progenie.

Cabe mencionar que esta prueba de progenie no es una prueba concluyente para la liberación de materiales en el mercado, ya que se tendrían que realizar otro tipo de estudios a estos híbridos, pero es una herramienta indispensable para realizar una selección seria de genotipos prometedores.

Cuadro 18. Significancia entre los grupos formados en el análisis de conglomerados

Variables	Cuadrados medios entre cruzas	Significancia de F	Coefficiente de Variación
ADP	967.46	2.64*	20.70
LLF	20.21	0.65 ^{NS}	15.30
LVLf	2.08	1.10 ^{NS}	10.70
ALF	0.09	1.80 ^{NS}	10.40
DDT	1.03	2.07 ^{NS}	19.70
LEI	14.11	2.32*	19.10
DNTS	0.69	2.46*	26.00
LVHB	30.52	1.98 ^{NS}	15.60
ALHB	3.99	2.12*	62.60
RPI	3.15	1.68 ^{NS}	21.30
LPR	4.24	1.66 ^{NS}	16.00
EPR	97.54	2.41*	13.60
PCS	0.01	31.42**	8.02

^{NS} = No significativo al 0.05; *, ** significativo al 0.05 y 0.01 respectivamente.

ADP = Altura de planta, LLF = Longitud de lámina foliar, LVLf = Longitud de vaina de lámina foliar, ALF = Ancho de lámina foliar, DDT = Diámetro de tallo, LEI = Longitud del eje de la inflorescencia, DNTS = Diámetro del nudo terminal superior, Longitud de vaina de hoja bandera, ALBH = Ancho de lámina de hoja bandera, RPI = Número de racimos por inflorescencia, LPR = Longitud de primer racimo, EPR = Número de espiguillas del primer racimo, PCS = Peso de cien semillas.

4.3.3. Análisis de variables cualitativas

Las características morfológicas cuyas escalas se miden en función de clases determinadas principalmente por observación, se presentan de manera gráfica (Cuadro 19), con la frecuencia de cada clase indicada dentro de cada categoría.

En este cuadro (19) se observa que modo de crecimiento (MDC), se presentó en mayor escala en forma decumbente y erecta, y hubo muy pocos híbridos rastreros; esta variable es muy importante, ya que, de ella depende el establecimiento de praderas, porque no es recomendable hacerlo con genotipos rastreros, por cuestiones de pastoreo, además el hábito decumbente contribuye a disminuir malezas y prevenir la erosión (Lazcano, 2002); el progenitor femenino 143A dio origen a la mayoría de estos genotipos. La Floración (FLO) fue una variable en donde la clase intermedia fue la más usual, la cruce 10018



produjo híbridos de floración temprana, que es una característica del progenitor femenino 100, dando lugar a que este genotipo se use en lugares donde llueve poco; mientras la floración tardía se presentó más en progenie derivada del progenitor femenino 143A; en la variable porte de lámina foliar (PLF), sólo hubo de tipo erecta y arqueada y no hubo un patrón bien definido ya que las clases se distribuyeron entre todas las cruzas; esto mismo ocurrió en la variable color de lámina foliar (CLF), donde el verde seco y oscuro predominó entre los híbridos; en la variable estolones (EST), la mayor parte de los genotipos presentaron el tipo intermedio lo que significa que una proporción normal los presentaron en su mayoría los híbridos del progenitor masculino 18, y abundantes por lo regular fue la progenie del progenitor masculino 94; esta tendencia es muy importante ya que permite establecer praderas en menor tiempo, pues los estolones son de gran utilidad para cubrir espacios en un menor tiempo; en la variable color de estigmas (CDE), hubo una gran cantidad de híbridos que presentaron el color morado por lo cual esta variable nos podría servir para diferenciar híbridos en forma general; en la variable color de anteras (CDA), únicamente se presentaron las clases amarillas y cafés casi en la misma proporción distinguiéndose las cruzas 4118 con antera amarilla y las 10018 y 143A18 con antera café, lo que da una indicación muy valiosa para diferenciar genotipos en campo; la variable pubescencia de espiguillas (PDE) ubicó híbridos en los tres niveles, distinguiéndose la cruz 10018 por presentar algunos genotipos con pubescencia ausente al igual que la 143A18; pubescencia en el eje de la inflorescencia (PEI) se distinguió principalmente por presentarse en forma intermedia con la mayoría de los híbridos del progenitor masculino 18, en tanto la categoría de abundante se presentó en varios híbridos del progenitor masculino 94, otra diferencia más observada; la variable pubescencia de lámina foliar (PULF), presentó las clases intermedia y abundante repartiéndose por igual en los diferentes híbridos, mientras que la clase ausente se presentó de nueva cuenta en las cruzas 11094 y en la 143A94; las últimas dos variables longitud de pubescencia (LDP), que fue básicamente corta y textura de pubescencia (TDP), predominando la textura suave en los genotipos.

Cuadro 19. Frecuencia por clase de variables cualitativas evaluadas en 44 híbridos del género *Brachiaria*

Variable	CLASES		
	0	1	2
MDC	Erecto (14)	Decumbente (25)	Rastrero (5)
FLO	Temprana (7)	Intermedia (25)	Tardía (12)
PLF	Erecta (18)	Arqueada (26)	Geniculada (0)
CLF	V. Amarillo (4)	V. Seco (28)	V. Oscuro (12)
EST	Ausentes (0)	Intermedios (33)	Abundantes (11)
CDE	Naranja (2)	Cáfe (4)	Morado (38)
CDA	Blanca (0)	Amarilla (23)	Cáfe (21)
PDE	Ausente (10)	Intermedia (31)	Abundantes (3)
PEI	Ausente (3)	Intermedia (35)	Abundante (6)
PULF	Ausente (6)	Intermedia (14)	Abundante (24)
LDP	Ausente (6)	Corta (24)	Larga (14)
TDP	Ausente (6)	Dura (15)	Suave (23)

MDC= Modo de crecimiento; FLO= Floración; PLF= Porte de lámina foliar; CLF= Color de lámina foliar; EST= Estolones; CDE= Color de estigmas; CDA= Color de anteras; PDE= Pubescencia de espiguillas; PEI= Pubescencia en el eje de la inflorescencia; PULF= Pubescencia en lámina foliar; LDP= Longitud de pubescencia; TDP= Textura de pubescencia.

Se realizó un análisis de componentes principales (Cuadro 20), el cual muestra que las variables de mayor importancia en el componente uno fueron en orden descendente TDP, PULF, y LDP; en el componente dos fueron EST, PLF, y MDC; mientras que en el tercer componente fueron PEI, PDE, y CDA. Lo anterior indica que 9 de las doce variables contribuyeron a explicar gran parte de la variación total observada, en tanto que FLO, CLF, y CDE, mostraron menores contribuciones y el menor grado de determinación.

Este comportamiento indica que las variables pubescencia de lámina foliar (PULF), textura de pubescencia (TDP), y longitud de pubescencia (LDP), están estrechamente relacionadas, ya que las tres son parte de lámina foliar; mientras que estolones (EST), porte de lámina foliar (PLF), y modo de crecimiento (MDC), se relacionaron en el componente dos; se podría decir que el modo de crecimiento está relacionado con la cantidad de estolones que tiene la planta y que se comprueba en campo; en el tercer componente, resultaron con valores altos, la pubescencia del eje de la inflorescencia (PEI), pubescencia de espiguillas (PDE) y color de anteras (CDA), no son variables relacionadas, y tampoco fueron decisivas en la explicación de la variación; las demás variables son también importantes para describir o caracterizar un genotipo, sobre todo floración (FLO), que está



bien definida en algunos genotipos híbridos y que es una herramienta invaluable para realizar la descripción en campo.

Cuadro 20. Vectores característicos de las variables de mayor valor descriptivo de cada variable original con respecto a su componente principal de 12 variables cualitativas.

Variables	Vectores característicos		
	CP1	CP2	CP3
MDC	0.153	<u>0.498</u>	-0.296
FLO	0.307	0.064	0.108
PLF	0.029	<u>0.513</u>	0.274
CLF	0.334	0.189	-0.155
EST	-0.07	<u>0.533</u>	0.006
CDE	0.245	-0.273	-0.034
CDA	0.026	0.199	<u>-0.456</u>
PDE	0.061	0.138	<u>0.534</u>
PEI	0.214	0.025	<u>0.540</u>
PULF	<u>0.470</u>	-0.065	-0.059
LDP	<u>0.452</u>	-0.155	-0.104
TDP	<u>0.478</u>	0.025	0.007

MDC= Modo de crecimiento; FLO= Floración; PLF= Porte de lámina foliar; CLF= Color de lámina foliar; EST= Estolones; CDE= Color de estigmas; CDA= Color de anteras; PDE= Pubescencia de espiguillas; PEI= Pubescencia en el eje de la inflorescencia; PULF= Pubescencia en lámina foliar; LDP= Longitud de pubescencia; TDP= Textura de pubescencia.

En cuanto a la distribución de los híbridos por cuadrante (Figura 10), en función de los componentes I y II, se observa que estos se distribuyeron más uniformemente de acuerdo a los diferentes progenitores, ya que en el cuadrante I, III y IV se agruparon todos los híbridos descendientes del progenitor masculino 18; mientras que los híbridos descendientes del progenitor masculino 94 estuvieron en su mayoría en el cuadrante II, aunque unos pocos se ubicaron en los cuadrantes I y III; finalmente, la progenie del progenitor masculino 71, estuvo ubicada en los cuadrantes I y II; a pesar de esta distribución se diferenciaron mejor las progenies, con respecto a la que mostraron las variables cuantitativas. Se observa también que la distribución de la progenie de los progenitores masculinos 18 y 94 se colocan en diferentes lados de la figura, lo cual nos explica la diferencia entre estos, y por lo tanto la variación obtenida en los cruces.

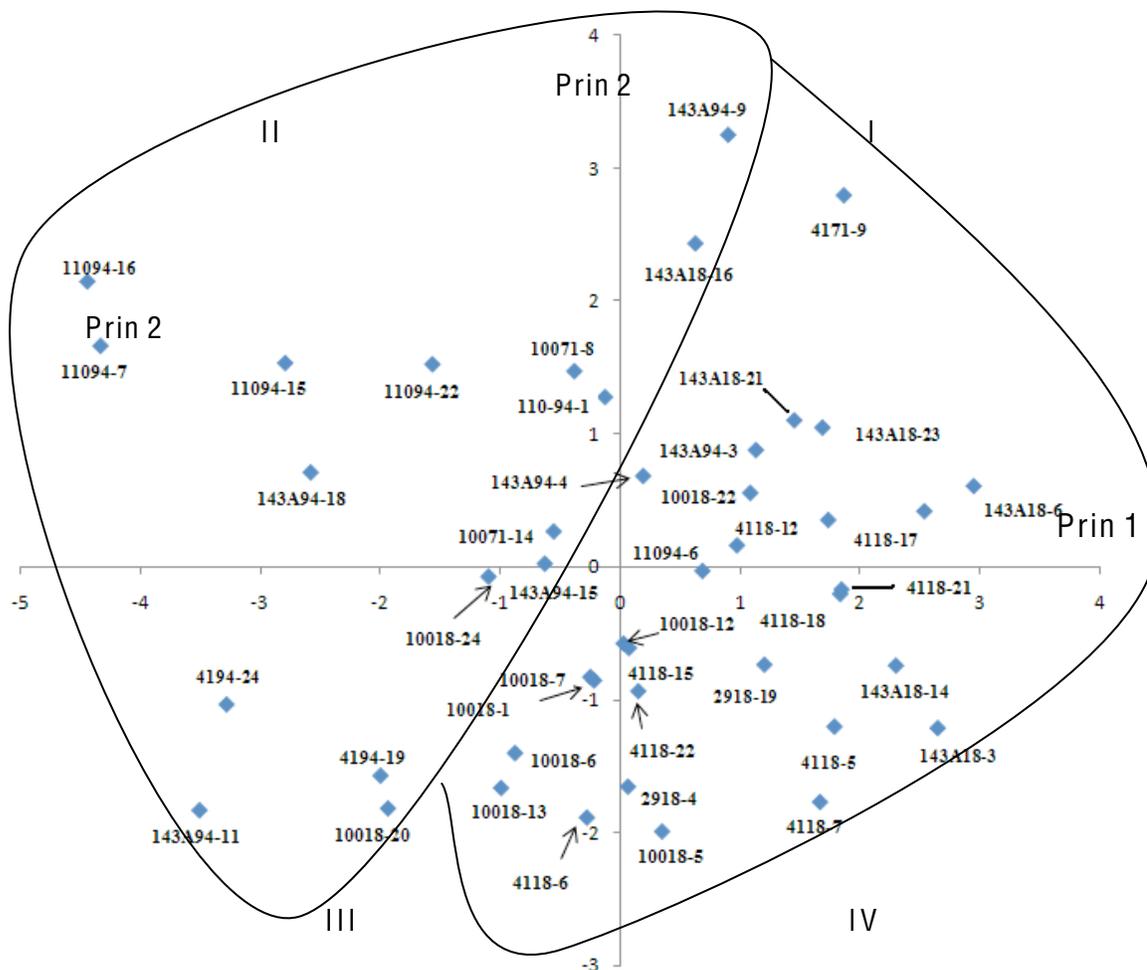


Figura 10. Distribución de 44 híbridos del género *Brachiaria* en función de los componentes principales I y II, obtenidos con la matriz de correlaciones de 12 variables cualitativas.

El dendrograma derivado del análisis de conglomerados con base en 12 variables cualitativas de gran valor descriptivo, identificadas en el análisis de correspondencia, permitió la identificación de cuatro grupos tomando como base la distancia euclidiana de 0.06 (Figura 11).

En el primer grupo se ubicaron ocho híbridos de la cruz 4118 (progenitor masculino 18, y progenitor femenino 41), tres híbridos de la cruz 10018 (progenitor femenino 100, progenitor masculino 18), tres de la cruz 143A18 (progenitor femenino 143A, progenitor masculino 18), dos de la cruz 11094 (progenitor femenino 110, progenitor masculino 94; y un híbrido de las cruces 143A94, y 4171, las dos primeras cruces muestran una tendencia igual que en el dendrograma de variables cuantitativas, estos híbridos presentaron en



común una abundante pubescencia de lámina foliar, ya que, el progenitor masculino 18 presenta las hojas lanceoladas con alta pubescencia (Guiot y Meléndez, 2003).

En el segundo grupo se ubicaron seis híbridos de la cruce 10018, dos de la 2918, un híbrido de la cruce 4118 y uno de la 143A18, y dos de la 143A94, las variables comunes en general estolones y pubescencia del eje de la inflorescencia, para el progenitor masculino 18, una de las características más destacables es su buen macollamiento o capacidad estolonífera (hasta 30 macollas 2.4 meses después de establecida), lo cual se inicia pocas semanas después de la emergencia y le da ventajas durante el establecimiento, sobre todo en sitios con alta incidencia de malezas (Pinzón y Santamaría, 2005).

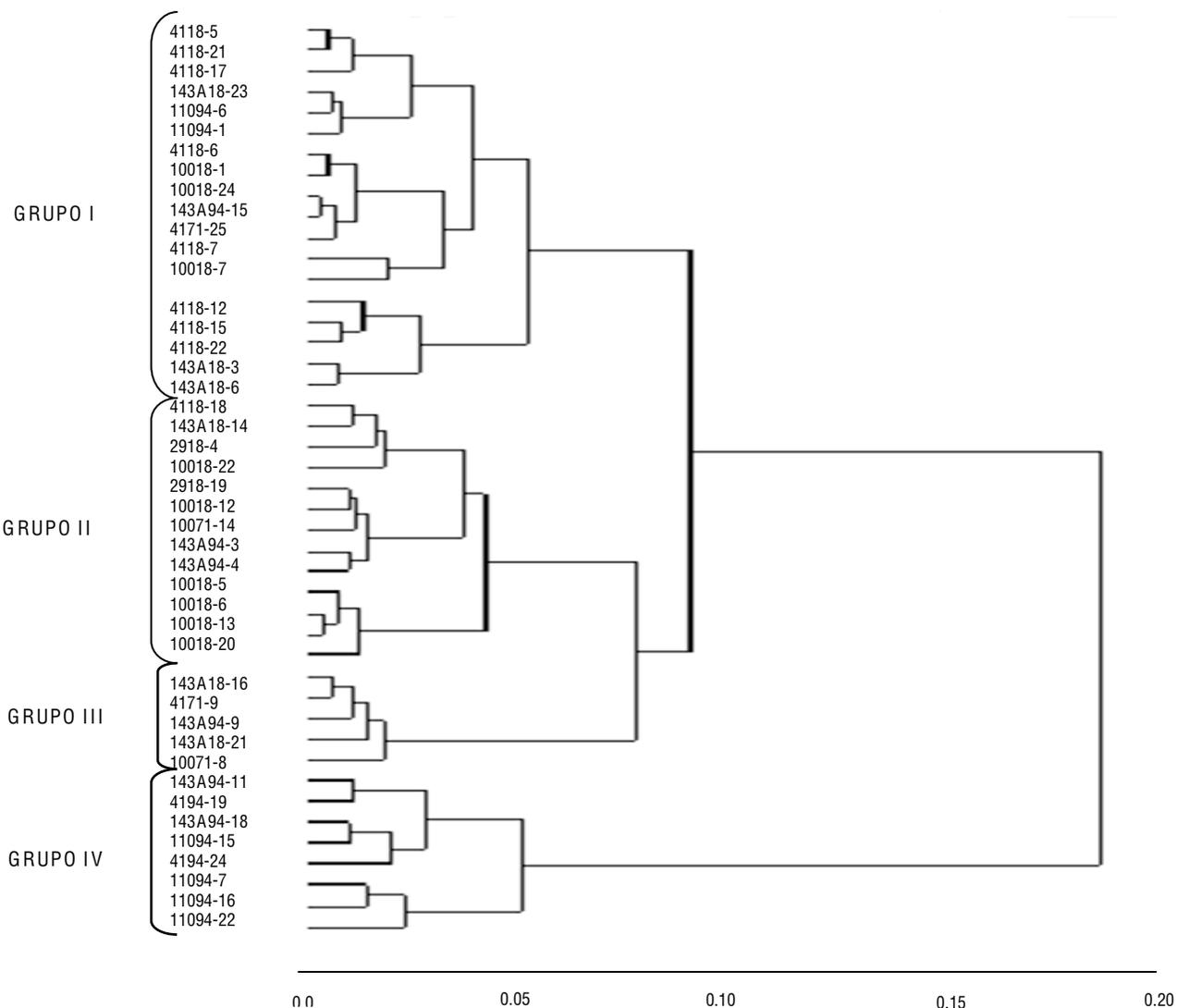


Figura 11. Dendrograma de 44 híbridos interespecíficos del género *Brachiaria* en base a 12 variables cualitativas.



4.4. CONCLUSIONES

La prueba de progenie es importante para la caracterización e identificación fenotípica de genotipos del género *Brachiaria* emparentados genéticamente.

La prueba de progenies permite diferenciar los genotipos apomícticos de los sexuales en alto porcentaje.

Mediante el uso del análisis de componentes principales se pudo comprobar que las variables cuantitativas con mayor importancia son longitud del eje de la inflorescencia (LEI), altura de planta (ADP), y longitud del primer racimo (LPR).

Las variables cualitativas que tuvieron más importancia en el análisis de componentes principales fueron textura de pubescencia, pubescencia de lámina foliar y la longitud de pubescencia.

Los dos tipos de variables agruparon en forma diferenciada la progenie híbrida, sobre todo hubo mayor influencia de los progenitores masculinos.

Las cruzas que produjeron más híbridos apomícticos fueron la 10018, 4118 y 11094.



4.5. LITERATURA CITADA.

- Cardona, C., J. W. Miles, and G. Sotelo. 1999. An improved methodology for massive screening of *Brachiaria* spp. Genotypes for resistance to *Aenomolia varia* (Homoptera: Cercopidae). *Journal Economic Entomology*. 92(2): 490-496.
- Guiot, J. D. y F. Meléndez. 2003. Pasto Mulato. *Brachiaria* híbrido (CIAT 36061). Excelente alternativa para producción de carne y leche en zonas tropicales. Publicación del Estado de Tabasco, Semillas Papalotla e ISPROTAB. Villahermosa, Tabasco (México). 23 p.
- Hanna, W. W. 1999. Use of apomixis in cultivar development. *Advances in Agronomy*. 54: 333-350.
- _____ and E.C. Bashaw. 1987. Apomixis: its identification and use in plant breeding. *Crop Science*. 27: 1136-1139.
- Hair J. F., R. E. Anderson., R. L. Tatham and W. C. Black. 2000. Análisis Multivariante. Prentice Hall. Madrid. p 504.
- Jank, L., S. Calixto, J. C. G. Costa, Y. H. Savidan and J. B. E. Curvo. 1997. Catálogo de caracterização e avaliação de germoplasma de *Panicum maximum*: descrição morfológica e comportamento agrônomo. Campo Grande, EMBRAPA-CNPGC, (EMBRAPACNPGC, Documentos 68). 53p.
- Koltunow A. M. 1993. Apomixis: embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. *Plant Cell*. 5: 1425:1437.
- Lascano, C. E. 2002. Caracterización de las pasturas para maximizar producción animal. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*. 10(2): 126-132.
- Manly, B. F. J. 1986. *Multivariate Statistical Methods*. Third Edition. Ed Chapman & Hall/CRC. 159 p.
- Miles, J. W., Valle, C. B. do, Rao, I. M. and Euclides.V. P. D. 2004. *Brachiaria* grasses. *In*: L.E. Moser et al. (ed.) *Warm-season*. 4: 745–783.
- _____. 1999. Nuevos híbridos de *Brachiaria*. *Pasturas Tropicales*. 21 (2):78.
- _____ and M. L. Escandon. 1997. Further evidence on the inheritance of reproductive mode in *Brachiaria*. *Canadian Journal Plant Science*. 77: 105-107.
- _____ and C. B. do Valle. 1991. Assesment of reproductive behavior of interespecific *Brachiaria* híbridos. *Apomixis Newsletter*. 3: 9-10.
- Nogler, G. A. 1984. Gametophytic apomixis. *In*: Johri BM (ed.). *Embryology of angiosperms*. Springer-Verlag, Berlin. pp 475-518.



-
- Parsons, J. J. 1972. Spread of African pasture grasses to the American Tropics. *J. Range Manage.* 25:12–17.
- Pinzón, B, y Santamaría, E. 2005. Valoración del comportamiento agronómico de nuevos híbridos y variedades de *Brachiaria*. Instituto Panameño de Investigación Agropecuaria (IDIAP). Informe Mimeografiado. 5 p.
- Savidan, Y. 2000. Apomixis: Genetics and Breeding. *Plant Breeding Reviews*, Volume 18:13-85.
- _____ y M. Dujardin. 1992. Apomixie: la prochaine révolution verte? *La Recherche.* 241: 326-334.
- Valle y J. W. Miles. 1994. Melhoramento de gramíneas do gênero *Brachiaria*. *En: Peixto, A. M.; Moura, J. C. de; y Faria, V. P. de (eds.). [Memorias del] XI simposio sobre manejo de pastagem. Fundação de Estudos Agrários “Luiz de Queiroz” (FEALQ), Piracicaba, SP, Brasil. p. 1-23.*
- _____, C. Glienke, and G. O. C. Leguizamon. 1993a. Breeding of apomictic *Brachiaria* through interspecific hybridisation. In: *International Grassland Congress*, 17. Palmerston North, New Zealand. p. 427-428.
- _____, and C. Glienke. 1993b. Towards defining the inheritance of apomixis in *Brachiaria*. *Apomixis Newsletter.* 6: 24-25.
- Vielle-Calzada, J. P., C. F. Crane, and D. M., Stelly. 1996. Apomixis: The asexual revolution. *Science.* 274: 1322-1323.



RESUMEN

Avances realizados en los últimos años han ofrecido interesantes alternativas a los programas de mejoramiento de plantas, dentro de estos, las técnicas de marcadores moleculares son de utilidad para identificar plantas. En base a esto se realizó un análisis con los marcadores moleculares AFLPs y CAPS, a ocho progenitores y 22 híbridos de *Brachiaria spp.* Hojas jóvenes y sanas fueron sometidas al proceso de extracción de ADN mediante la metodología del CTAB, en el análisis de AFLPs se encontraron 4 combinaciones de iniciadores que generaron un total de 171 fragmentos de ADN amplificados, de los cuales 154 fueron polimórficos (90.05%). Un dendrograma mostró dos grupos principales: el primero integrado mayoritariamente por híbridos derivados del progenitor masculino 94, y en menor cantidad de los progenitores masculinos 18 y 71; y los femeninos 29 y 110; en el segundo grupo hubo híbridos de los progenitores femeninos 41, 100 y 143A; los tres progenitores masculinos se relacionaron en un mismo grupo, donde tuvieron progeñe, el 18 (5), el 71 (3), y el 94 (8). En el análisis de CAPS 4 bases amplificaron bien, estas generaron un total de 84 fragmentos de ADN, de los cuales 67 fueron polimórficos (79.76 %). En el análisis de conglomerados se formaron dos grupos, siendo el grupo I el más grande con 27 genotipos, en este grupo se formaron cinco subgrupos, en el primero se colocó el progenitor masculino 94 con su progeñe (77%) en este subgrupo se relacionaron dos híbridos 10071; en el segundo se relacionaron cuatro progenitores femeninos 100, 110, 143A, y el 41; en el tercero y cuarto se agruparon siete híbridos del progenitor masculino 18, mostrando la fuerte influencia genética de este progenitor; en el quinto subgrupo, se alinearon los progenitores masculinos 18 y 71, con el femenino 29; en el segundo grupo hubo tres progeñes del progenitor femenino 41. En el análisis factorial de correspondencia simple de AFLPs se obtuvo información de asociación entre el progenitor masculino 18 con la banda AF8-14, mientras los progenitores femeninos 29 y 110 se relacionaron con la banda AF8-10, y el progenitor femenino 41 se asoció con la banda AF3-34. En la prueba de CAPS, el progenitor masculino 18 se relacionó con la banda C6-26, el progenitor femenino 143A con la banda C15-20, y todos los progenitores femeninos con la banda C15-8, lo cual puede indicar que esta puede estar asociada con la sexualidad o con algún gen de *Brachiaria ruziziensis*.

Palabras clave: AFLPs, CAPS, banda, ADN, polimórfico, marcador molecular.



5.1. INTRODUCCIÓN

Existen dos clases de marcadores genéticos: los morfológicos y los moleculares (Tanksley, 1993). Primeramente la caracterización e identificación tradicional de variedades se ha basado en el empleo de caracteres morfológicos y/o agronómicos (Rallo *et al.* 2002). No obstante, el uso de marcadores morfológicos en las plantas tiene muchas limitantes, pues su expresión puede estar sujeta a factores ambientales o fenológicos, con frecuencia estos marcadores solo es posible evaluarlos a nivel de toda la planta y cuando ésta llega a su estado adulto.

Por otro lado, gracias a los avances en la biología molecular se han desarrollado métodos de identificación y caracterización basados en el uso de marcadores moleculares que superan, en la gran mayoría de los casos, las limitaciones de los métodos tradicionales (Azoifeifa-Delgado, 2006).

Estos marcadores moleculares son fenotípicamente neutros, presentan mayor polimorfismo que los morfológicos, pueden ser evaluados desde los primeros estados de desarrollo de las plántulas, son aplicables a cualquier tipo de material vegetal, son independientes de la época del año en que se realiza el análisis, permiten la identificación correcta de la variedad sin necesidad de muchos caracteres y están libres de los efectos epistáticos (Tanksley, 1983; Powell, 1992).

Estas nuevas herramientas biotecnológicas han permitido complementar y brindar interesantes alternativas a los programas de mejoramiento de plantas, integrando técnicas moleculares que posibilitarán el tratamiento de caracteres considerados difíciles y el desarrollo de plantas forrajeras “diseñadas” que mejorarán la producción animal.

Dentro de las técnicas de marcadores moleculares existen algunas que ayudan a la caracterización de los genotipos que se comparan; por ejemplo el análisis por AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), que es esencialmente la combinación de una digestión con enzimas de restricción y de amplificación por PCR (reacción de polimerización en cadena), presenta un grado de reproducibilidad mucho mayor, también es un marcador de tipo dominante y su nivel de complejidad técnica es más alto que otros marcadores, lo que representa una desventaja para estos (Vos *et al.*, 1995). Pessino *et al.*, (1998) probó los AFLPs, en la generación de datos que combinados con otros obtenidos antes con RFLP, ayudaron en la construcción de un mapa genético de la región apospórica de *Brachiaria*.



También se cuenta con otra técnica molecular reciente llamada CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) que consiste en la obtención de un perfil de fragmentos por PCR y su posterior fragmentación con una endonucleasa de restricción particular, con la finalidad de detectar secuencias de reconocimiento internas por parte de la enzima y lograr la diferenciación de los perfiles obtenidos de la misma forma procedentes de organismos relacionados (Konieczny y Ausubel, 1993). Los marcadores moleculares son complementos útiles en la identificación y caracterización de plantas por lo cual es importante su utilización en genotipos que sean factibles de liberar comercialmente, ya que, esto daría la certeza en el reconocimiento de cada uno de ellos.

Por lo anterior y en base a la necesidad de probar nuevas técnicas en la caracterización de plantas se plantearon los siguientes objetivos:

5.1.2. Objetivos específicos

Identificar por su perfil treinta genotipos compuestos por progenitores e híbridos apomícticos de *Brachiaria spp.* con dos tipos de marcadores moleculares.

Comprobar la eficacia de los dos tipos de marcadores moleculares en la diferenciación de genotipos de *Brachiaria spp.*

5.1.3. Hipótesis

Los análisis moleculares con los AFLPs y CAPS permitirán diferenciar el perfil de los genotipos.

La diferenciación de los genotipos permitirá saber cual de los marcadores moleculares tiene mayor precisión.



5.2. MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1. Análisis moleculares

Los análisis moleculares se llevaron a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Fitotecnia, de la Universidad Autónoma Chapingo.

5.2.1.1. Material vegetal

El material empleado para el trabajo con marcadores moleculares estuvo constituido de 30 materiales, que incluyó ocho progenitores y 22 híbridos (Cuadro 21), de la progenie resultante de diez cruces realizadas en el año 2003. El material vegetal tanto de los progenitores y su progenie fue colectado en los campos de investigación propiedad del Ing. Armando Peralta Martínez en Iguala, Gro., como parte de un procedimiento que se lleva a cabo para realizar mejoramiento genético en este tipo de materiales.

El material se seleccionó y colectó en campo, tomando hojas jóvenes que se transportaron en termos con hielo para su mejor conservación.

5.2.1.2. Extracción de ADN

Las hojas de cada uno de los genotipos, fueron colocadas en un refrigerador a -15°C durante 24 horas, después se liofilizaron en condiciones de 10 mercurios y a -50 grados centígrados, durante 72 horas, en las instalaciones del CIMMYT, en el Batán, Estado de México. Las muestras fueron finamente molidas utilizando un molino marca Braun y depositadas en frascos herméticos previamente identificados. La extracción de ADN se realizó con el método CTAB (Dellaporta *et al.* 1983), en donde el tejido fue incubado en el amortiguador respectivo durante 60 minutos a temperatura de 60°C agitando (cada 10 minutos). Luego de mezclar las muestras con cloroformo:alcohol-isoamílico (24:1 v/v), se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos (a temperatura ambiente), se tomó el sobrenadante y se transfirió a un tubo nuevo, cuidando de no romper la interface. Se agregaron $10\ \mu\text{L}$ de RNasa a cada muestra (30) y se colocaron en incubadora a 37°C por una hora, luego se le adicionó 0.60 vol de cloroformo, se mezclaron por inversión y se centrifugaron a 12,000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. La fase superior se



transfirió a un tubo nuevo y se le agregó 0.54 vol de isopropanol a 4 °C dejándolo toda la noche a -20°C para precipitar el ADN.

Cuadro 21. Genotipos y claves del material de *Brachiaria* utilizado en la caracterización con marcadores moleculares.

No.	Genotipo	Clave
1	Progenitor masculino ♂	71
2	Progenitor masculino ♂	94
3	Progenitor masculino ♂	18
4	Progenitor femenino ♀	29
5	Progenitor femenino ♀	110
6	Progenitor femenino ♀	41
7	Progenitor femenino ♀	100
8	Progenitor femenino ♀	143A
9	Híbrido	4118-6
10	Híbrido	4118-10
11	Híbrido	4118-12
12	Híbrido	2918-14
13	Híbrido	2918-18
14	Híbrido	10018-1
15	Híbrido	10018-6
16	Híbrido	10018-16
17	Híbrido	143A18-3
18	Híbrido	143A18-23
19	Híbrido	4171-9
20	Híbrido	4171-20
21	Híbrido	10071-4
22	Híbrido	10071-8
23	Híbrido	4194-19
24	Híbrido	4194-24
25	Híbrido	143A94-3
26	Híbrido	143A94-4
27	Híbrido	143A94-11
28	Híbrido	11094-1
29	Híbrido	11094-7
30	Híbrido	11094-16

Después de 12 horas se volvió a centrifugar a 12,000 rpm durante 20 minutos; se retiró el sobrenadante y se lavó con etanol al 70%. Acto seguido se volvió a centrifugar a 12,000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente, se decantó el etanol y se colocaron los tubos invertidos para secarlos y colocarlos en un termoblock durante media hora a temperatura ambiente; una vez seca la pastilla se le añadió 100 µL de TE.



5.2.1.3. Cuantificación de ADN

La cuantificación del ADN se realizó por medio de espectrofotometría ultravioleta para determinar la concentración de cada muestra procesada. (Jentoft, 2004). Se hizo una dilución de 1:40 para lo cual se tomaron 3 μL del stock de ADN y se diluyeron con 117 μL de agua destilada estéril, resultando un volumen total de 120 μL , mismo que se colocó en la celda apropiada para el espectrofotómetro. La cuantificación se hizo con el espectrofotómetro Perkin Elmer UV/VIS Lambda BioTM, asumiendo una equivalencia de 1 OD (260 nm) = 50 μg .

Con los resultados obtenidos se uniformizaron las concentraciones de ADN que se diluyeron en un stock de 20 ng μL^{-1} ; esta dilución fue con la que se trabajó finalmente en las diferentes técnicas utilizadas en la investigación.

5.2.1.4. Calidad del ADN

Paralelamente se realizó una verificación de la integridad de ADN extraído, colocando 5 μL en un gel de 1% en TAE 1X; esto se realizó en una cámara horizontal GIBCO BRL®, durante una hora a 110 volts. El teñido se realizó con Bromuro de Etidio (EtBr) a 0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de *Molecular SIGMA Biology* por 5 minutos (Sambrook *et al.*, 1989), posteriormente se lavó en agua para eliminar el exceso de bromuro de etidio y se documentó utilizando un trasiluminador Dual Intensity UVP de luz ultravioleta modelo TS-20 y el programa *Kodak Digital Science ID V.20.3*.

Todo este proceso sirvió para garantizar que el ADN estuviera en perfectas condiciones y listo para hacer los análisis AFLPs y CAPS. Una vez cuantificados todas las muestras de ADN se llevaron a una concentración de 300 ng mL^{-1} .

5.2.2. CAPS (Secuencia polimórfica amplificada y cortada).

5.2.2.1. Reacciones de amplificaciones con PCR

Para los análisis de CAPS se hicieron diluciones del ADN a una concentración de 20 ng mL^{-1} del ADN digerido. Las amplificaciones con los respectivos iniciadores fueron



llevadas a cabo en un termociclador marca *BIOMETRA, UNO-Termoblock*, de acuerdo a la metodología de Williams *et al.* (1990) con algunas modificaciones.

La técnica CAPS fue modificada en el presente trabajo con fines de mayor manipulación en el laboratorio y reproducibilidad de los perfiles de ADN. La modificación consistió en que el ADN fue digerido con la enzima de restricción *Eco RI* previo a la amplificación con PCR en lugar de utilizar el ADN completo (Cuadro 22). La digestión se realizó en un volumen de 20 μL y usando 300 ng de ADN.

Cuadro 22. Orden y volumen de reactivos para la digestión de ADN usados en las muestras analizadas con CAPS.

Reactivo	Volumen en μL
H ₂ O destilada	16.3 μL
Amortiguador 10X	2.0 μL
BSA	0.2 μL
ADN (300 ng μL^{-1})	1.0 μL
<i>EcoRI</i>	0.5 μL
Total:	20.0 μL

Las muestras se dejaron en digestión durante dos horas a 37 °C, y posteriormente se incubaron a 70 °C para inactivar la enzima.

Las amplificaciones se realizaron en un termociclador modelo *9700 Applied Biosystems®* utilizando las concentraciones de reactivos indicadas en el Cuadro 23. Los iniciadores aleatorios que se utilizaron fueron de la marca ROTH: C-06, C-08, C-15 y C-19; los ciclos de la PCR consistieron de 1 minuto a 94 °C para la predesnaturalización del ADN; 38 ciclos (94 °C durante 20 segundos para la desnaturalización del ADN; 40 °C, 15 segundos para el alineamiento de los iniciadores; 72 °C, un minuto para la extensión) y un último paso de extensión final 2 minutos a 72 °C, para producir fragmentos completos de ADN de doble cadena.

5.2.2.2. Geles de acrilamida

Los productos de amplificación fueron separados por electroforesis en geles de acrilamida (29:1) de doble capa (*sataking gel*). El gel de corriente se hizo al 16%, utilizando Tris-Glicina 1X (40 V/cm; 4 h) en una cámara vertical C.B.S. Scientific CO[®], modelo MVG-216-33 y una fuente de poder E-C Apparatus Corporation[®], modelo EC-105.



Los geles se tiñeron con Nitrato de Plata (AgNO_3) al 2% y luego se visualizaron con un transiluminador de luz blanca y fotografiados con una cámara Polaroid.

Cuadro 23. Reactivos, concentración del stock y volumen utilizado para la amplificación de las muestras de genotipos de *Brachiaria spp* analizados con CAPS.

Reactivo	Stock ¹	μL ²	Total ³	Final ⁴
H ₂ O destilada			15.3 μl	
Amortiguador Taq	10X	2.5 μl	25X	1X
Oligonucleotidos dNTPs (2 Mm)	250 μM μL^{-1}	2.5 μl	2500 μM	100 μM μL^{-1}
MgCl ₂ 25 mM	25 mM μL^{-1}	1.0 μl	35.5 mM	
Iniciador 20 pMol μL^{-1}		1.5 μl		
Polimerasa Taq (unidades μL^{-1})		0.2 μl		
ADN 10 ng μL^{-1}		2.0 μl		
Total:		25.0 μl		

¹ Concentración del Stock de cada uno de los reactivos empleados. ² Volumen tomado del stock para cada reactivo. ³ Total de cada reactivo presente en 25 μL de la mezcla de reacción. ⁴ Concentración final de los reactivos.

5.2.3. AFLPs (Polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados)

Los análisis se llevaron a cabo siguiendo las recomendaciones indicadas el kit de GIBCO-BRL Life Technologies AFLP™ (Invitrogen, Carlsbad, Cal.).

5.2.3.1. Digestión para AFLPs

Para la digestión del ADN se mezcló en un volumen total de 25 μL (Cuadro 24), 0.2 μg de ADN genómico con 2.0 Unidades de *EcoRI* y 2.0 Unidades de *MseI* (New England Biolabs, Maryland, EE.UU.), 5.0 μL de amortiguador de digestión 5X (NaCl 250 mM, Tris-HCl 50 mM [pH 7,9], MgCl₂ 50 mM, DTT 10 mM), y 3.0 μL de agua bidestilada a 37°C por 2 h.



Cuadro 24. Orden y volumen de reactivos usados en la digestión de ADN de cada muestra de genotipos de *Brachiaria spp* caracterizados por AFLPs.

Reactivo	Volumen en μL
Agua bidiestilada	3.0 μL
Amortiguador de digestión	5.0 μL
DNA (20 ng μL^{-1})	15.0 (total 300 ng)
Enzimas <i>EcoRI/MseI</i>	2.0 μL
Total:	25 μL

5.2.3.2. Ligación de adaptadores

A cada tubo con el ADN previamente digerido se le agregaron los reactivos indicados en el Cuadro (25). Para ello se calculó el volumen de cada componente de acuerdo a las 30 muestras analizadas. Se dejó en ligación toda la noche a temperatura ambiente.

Cuadro 25. Orden de medición y volumen de los componentes de ligación que se le agregó a cada tubo con ADN de pastos previamente digerido.

Reactivo	Volumen en μL
Solución de ligación	24.0
Ligasa DNA T4	1.0
Volumen total por muestra:	25.0

Nota. Esta mezcla fue de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

5.2.3.3. Reacción de preamplificación

Para la reacción de preamplificación se midieron los componentes de acuerdo a las 30 muestras a evaluar, mezclándolos y repartiéndolos, según el volumen indicado (Cuadro 26), posteriormente a cada tubo se le agregó la dilución de ADN, (1:10) previamente ligado. A cada tubo se le agregó 25 μl de aceite mineral y se centrifugaron por 15 segundos antes de colocarlos en el termociclador. El procedimiento en el termociclador fue el siguiente: 20 ciclos a 94 °C por 30 segundos; a 56 °C por 60 segundos, y a 72 °C por 60 segundos.



Del total del volumen de la preamplificación, se hizo una dilución 1:10, la cual se utilizó para la amplificación selectiva.

Cuadro 26. Volumen de cada componente para la reacción de preamplificación de ADN de los pastos evaluados.

Componentes	Volumen en μL
DNA (1:10, de ligación).	5.0
Mezcla de primer de pre-amplificación	40.0
Buffer de PCR 10X con Mg	5.0
Taq DNA polimerasa ($5 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$)	1.0
Volumen total:	51.0

5.2.3.4. Amplificación selectiva

Para la amplificación selectiva previamente se realizó una evaluación con las diferentes combinaciones de iniciadores del Kit de AFLPs (Cuadro 27), considerando aquellas que produjeran diferencias claras con el patrón de bandeo, entre los diferentes progenitores e híbridos de *Brachiaria spp.* considerados en el estudio.

Cuadro 27. Combinaciones de iniciadores de AFLPs evaluados en las muestras de ADN de *Brachiaria spp.*

No. de combinación	Combinaciones de iniciadores
1	E AAC + M CAC*
2	E AAC + M CTG
3	E ACC + M CAC*
4	E ACC + M CTG
5	E AGG + M CTC
6	E AGG + M CTA
7	E ACT + M CTC*
8	E ACT + M CTA*

* Combinaciones que revelaron claras diferencias.

La reacción de amplificación selectiva se realizó siguiendo las indicaciones del manual de AFLPs (Cuadro 28). Las mezclas se prepararon en dos tubos llamados mezcla 1 y mezcla 2. Posteriormente cada mezcla se dividió entre las 30 muestras que se analizarían, a cada muestra se le agregó el ADN diluido y preamplificado (1:10), y se le adicionó a cada uno, 25 μL de aceite mineral, se mezclaron y se colocaron en el termociclador. Para la



reacción de amplificación selectiva se utilizó el siguiente programa: 14 ciclos a 94 °C por 30 segundos, 65 °C por 30 segundos, 72 °C por 1 minuto, y 23 ciclos a 94 °C por 30 segundos, 72 °C por 1 minuto. Por último, se conservaron las muestras a 4 °C.

5.2.3.5. Electroforesis

Los fragmentos obtenidos en la amplificación selectiva se separaron en un gel desnaturante de poliacrilamida al 6% (19:1) de acrilamida:besacrilamida, urea a 7.5 M, y el amortiguador TBE 1X, en una cámara vertical de secuenciación BioRAD® y una fuente de poder E-C Apparatus Corporation®, modelo 3000PW. Después de armar la cámara de electroforesis, se selló perfectamente para que no dejara escapar mezcla de acrilamida, se procedió a medir 55 mL de la poliacrilamida al 6%, a esta se le agregó 55 µL de TEMED (N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine) SIGMA® y 67 µL al 25% de Persulfato de Amonio (p/v) SIGMA®; se agitó por dos segundos y se procedió a llenar la cámara, cuidando que no se formaran burbujas de aire; acto seguido se colocó un peine por la parte superior a una profundidad de 4 mm, después se dejó polimerizar el gel por 1 hora aproximadamente (Cuadro 29).

Cuadro 28. Composición de las mezclas utilizadas para la amplificación selectiva de ADN.

Mezcla	Componente	Volumen en µL
Mezcla 1	Primer EcoR1	5.0
	Primer Mse1 (con dNTPs)	45.0
	Volumen total:	50.0
Mezcla 2	Agua destilada H2O	7.9
	Amortiguador para PCR 10X con Mg	2.0
	Taq polimerasa (5U µL-1)	0.1
	Volumen total:	10.0
Final	ADN molde (Preamplificación 1:10)	5.0
	Mezcla 1	5.00
	Mezcla 2	10.0
	Volumen total:	20.0



Cuadro 29. Soluciones utilizadas en el gel desnaturalizante

Stock	Concentración final
5M NaOH	10 Mm
Formamida	95%
Azul de Bromofenol	2 mg mL ⁻¹
Cianol xileno	2mg mL ⁻¹

A las muestras se les agregó un amortiguador de corrida TBE 1X, previamente calentado a 65 °C, además se le aplicó al gel una pre-electroforesis, durante 30 minutos, para incrementar la temperatura del amortiguador TBE 1X, evitando que sobrepasara los 55 °C; se quitó el peine del gel y se cargaron 10 µl de las muestras amplificadas y desnaturalizadas. Las muestras se corrieron a un voltaje constante de 80W (1000 voltios), por aproximadamente 3 horas.

5.2.3.6. Tinción y lavado del gel

Terminada la electroforesis se le eliminó el amortiguador TBE 1X de la cámara y se separaron los vidrios quedando adherido el gel en uno de ellos, este se sumergió en un recipiente con ácido acético glacial al 10% y se agitó por 25 minutos. Se retiró de esta solución y se sumergió en agua destilada agitándolo por 8 minutos, se quitó el agua y se agregó la solución de tinción (1 g de nitrato de plata AgNO₃, 1.5 mL de formaldehído en 1 litro de agua destilada) por 30 minutos. Después de este tiempo se retiró la solución y se lavó con agua destilada por 5 segundos.

5.2.3.7. Revelado del gel

Se aplicó una solución reveladora (60 g de carbonato de sodio (Na₂CO₃) en 2 L de agua destilada). La temperatura se mantuvo en 6 °C, y antes de usarse se le agregó 3 mL al 37% de formaldehído y 400 µL a 10 mg mL⁻¹ de tiosulfato de sodio. Se aplicó en dos fases la primera cuando aparecieron las primeras bandas (aproximadamente 4 minutos), se desechó la solución y se le aplicó la restante, para continuar con el revelado otros 15 minutos aproximadamente.

Por último, los geles fueron fotodocumentados en una cámara Kodak Digital Science 1D V.2.0.3 y un transiluminador de luz blanca.



5.2.4. Análisis estadístico

Los productos de amplificación de los progenitores e híbridos se codificaron en una matriz de datos, en donde la presencia o ausencia de las respectivas bandas, fueron consideradas como presente (1) o (0) ausente en cada muestra, y las semejanzas genéticas fueron calculadas mediante el coeficiente de Dice:

$$S_{D_{i,j}} = 2N_{ij}/[N_i + N_j],$$

Dónde N_{ij} es el número total de fragmentos comunes de las accesiones i y j , y N_i y N_j son el número total de fragmentos presentes en i y j , respectivamente (Dice, 1945). La similitud de Dice, S_D , es equivalente al coeficiente de Nei y Li (Nei y Li, 1979). Las similitudes genéticas y filogramas de Neighbor-joining, fueron generadas usando el programa FreeTree v 0.9 y 1.50.



5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.3.1. Análisis de CAPS (Amplificación de secuencias cortadas polimórficas)

De 25 iniciadores evaluados, 21 fueron descartados debido a la poca información detectada. Los cuatro iniciadores restantes proporcionaron información apropiada y los datos fueron usados para calcular la semejanza genética amplificada entre los materiales. Los cuatro iniciadores detectaron un total 84 fragmentos de ADN amplificados (amplicones), de las cuales 67 fueron polimórficos (79.76 %; Cuadro 30). El cálculo de este índice de polimorfismo permitió detectar la capacidad informativa de los iniciadores utilizados. El porcentaje de polimorfismo fue alto. En promedio, se identificaron 21 bandas y 16.75 bandas polimórficas por cada iniciador utilizado para CAPS. En valores absolutos, los cuatro iniciadores proporcionaron una cantidad mínima del 73.91 % de polimorfismos, aunque solo el iniciador C-06 alcanzó un máximo de 85.18 % de polimorfismos. Los niveles de polimorfismo asociados a cada combinación de partidores variaron en un rango entre 73 y 85%.

Mediante el método de Neighbor-Joining, con los datos de CAPS elaboró 379 árboles diferentes de 1000 que se analizaron.

Cuadro 30. Iniciadores aleatorios utilizados para los perfiles CAPS y total de bandas polimórficas de progenitores y progenie del género *Brachiaria*.

No.	Combinaciones de iniciadores	Total de bandas (No.)	Bandas polimórficas (No)	Porcentaje de polimorfismo %
1	C-06	27	23	85.18
2	C-08	15	12	80.00
3	C-15	23	17	73.91
4	C-19	19	15	78.95
Totales:		84	67	79.76

Con los polimorfismos detectados con CAPS permitieron la conformación de dos grupos (Figura 12), siendo el grupo I el más grande con 27 genotipos, mientras que el segundo agrupo los tres restantes; en el primero se formaron cinco subgrupos, en el primer subgrupo se colocó el progenitor masculino tetraploide 94 muy cercano genéticamente a su progenie: 143A94-11, 143A94-3, 143A94-4, 11094-7, 11094-1 y 11094-16, (98%, de las



combinaciones de los árboles se agruparon en esta última) y con una distancia euclidiana de menos del 0.1, además de los híbridos 10071-8 y 10071-4; en el segundo subgrupo y muy cerca las cuatro hembras diploides 100, 143A, 110 y 41, debido a que como se sabe todas provienen de *Brachiaria ruziziensis*, lo cual queda confirmado por este agrupamiento; el tercer subgrupo lo formaron dos híbridos descendientes del progenitor masculino 18 y la hembra 100, el 10018-6 y 10018-16 estos con un 99% del total de combinaciones de agrupamiento; en otro subgrupo se relacionaron la progenie del progenitor masculino tetraploide 18, los genotipos 2918-18, 10018-1, 2918-14, el 143A18-23 y el 143A18-3, con un promedio del 99.5% del total de combinaciones de agrupamiento y menos del 0.1% de distancia euclidiana, mostrando la fuerte influencia genética del progenitor masculino 18; por otro lado en este mismo subgrupo, se alinearon los híbridos 4171-9 y 4171-20, con una distancia euclidiana del 0.1, por lo que se demuestra su cercanía, ya que son, hermanos completos; el ultimo subgrupo lo conformaron los progenitores masculinos tetraploides 18 y 71 y el progenitor femenino diploide 29, se observa cierta cercanía genética (0.1 distancia euclidiana) entre la hembra 29 y el macho 18 debido en parte a su mismo género, pero sus características morfológicas son totalmente diferentes, mientras el otro progenitor masculino se relaciona estrechamente con el híbrido 4118-6 con el cual genéticamente no debiera tener relación. En lo que respecta al otro grupo II más pequeño se ubicaron el híbrido 4118-12, y los híbridos 4194-19 y el 4194-24, el primero relacionándose por su origen materno con los otros dos que son hermanos completos, aunque lejos genéticamente ambos de sus progenitores.

En general los resultados del análisis nos indican que las especies diploides en su mayoría son distintas a los poliploides, se nota que genéticamente la progenie es influenciada mayormente por los progenitores masculinos específicamente el 18 y el 94, y en escala muy pequeña el 71, el número pequeño de bandas analizadas podía haber influido en el resultado. En este estudio se encontró que los marcadores CAPS son útiles para tasar la variabilidad genética aunque este emparentada. Obviamente el próximo paso sería confirmar la aplicación de este marcador en genotipos con relaciones genéticas estrechas.

Algunos investigadores (Park *et al.*, 2002; Mohring, *et al.*, 2004) sugieren que los análisis CAPS, no son muy informativos con algunas características genéticas en especies como *Brassica oleracea* y *Brassica napus*, pero puede ser de utilidad en programas de mejoramiento para caracterizar/clasificar genotipos prometedores.

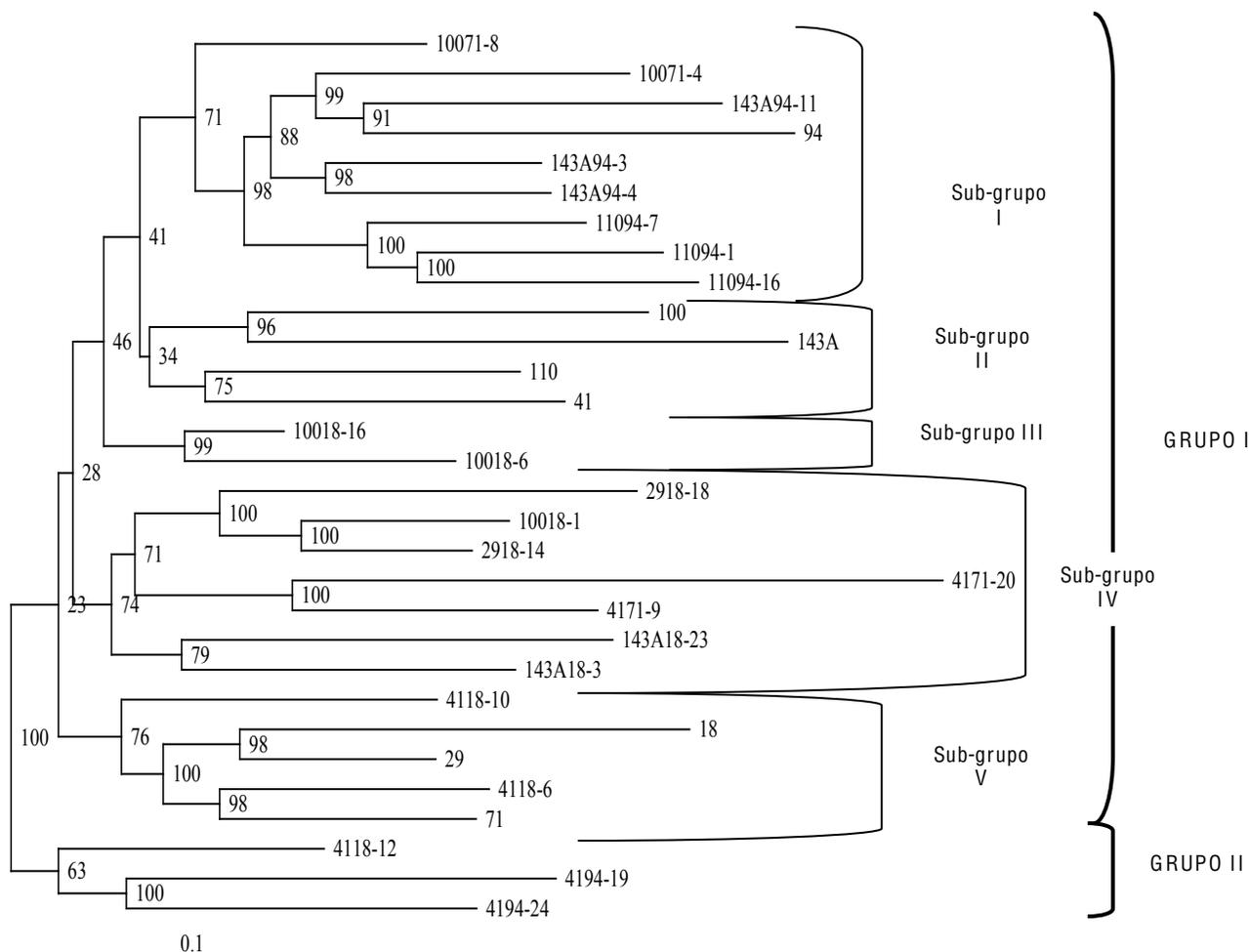


Figura 12. Árbol de relación genética de progenitores y progenie de *Brachiaria* utilizando marcadores CAPS.

5.3.2. Análisis de AFLPs (Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados)

La diversidad genética (DG) encontrada en la muestra de 30 genotipos evaluados mediante análisis de AFLP fue amplia (Cuadro 31). Las cuatro combinaciones de iniciadores generaron un total de 171 fragmentos de ADN amplificados (amplicones), de las cuales 154 fueron polimórficos (90.05 %). En promedio, se identificaron 42.75 bandas en total y 38.5 bandas polimórficas por cada reacción de AFLP. En valores absolutos, las cuatro combinaciones coincidieron con una cantidad mínima del 87% de polimorfismos, mientras que la combinación (E ACC+M CAC) alcanzó un máximo de 93.02% de polimorfismos. Los niveles de polimorfismo asociados a cada combinación de iniciadores variaron en un rango entre 87 y 93%.



Mediante el método de Neighbor-Joining, con los datos de AFLPs elaboró 681 árboles diferentes, de 1000 que se analizaron.

Un dendrograma (gráfica de agrupamiento) construido a partir de los valores de similitud genética determinados entre todos los genotipos (Figura 13) sugirió que existen dos grupos principales: el primero y más numeroso está integrado por tres subgrupos el primero con los híbridos 11094-7, 143A94-11, 11094-16, 11094-1, 4171-9, 143A94-3, 143A94-4, 143A18-23, y 143A18-3, aquí se observó la relación que tuvieron los híbridos descendientes del progenitor 94, donde se relacionaron genéticamente los provenientes de los progenitores femeninos 143A y 110. Por otro lado los dos provenientes de los progenitores masculino 18 y femenino 143A que mostraron una distancia euclidiana del 0.1 por lo que son muy cercanos genéticamente; en el segundo subgrupo se ubicaron los híbridos 10071-8, 10071-4, ligados cercanamente (menos del 0.1 de distancia euclidiana), los híbridos 4194-19, 4194-24, básicamente iguales genéticamente, y los progenitores masculinos 94 y 18 que se relacionaron con una distancia euclidiana del 0.1, lo cual se debe al progenitor de los mismos *Brachiaria brizantha*. En cuanto al progenitor 18 (mulato) es un híbrido apomíctico del género *Brachiaria* (lo que significa que aunque híbrido, es genéticamente estable y por lo tanto no segrega de una generación a otra). Este híbrido se originó a partir de cruces iniciados en 1988 en el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) en Cali, Colombia, entre el clon sexual 44-6 de *Brachiaria ruziziensis* y la especie tetraploide apomíctica *B. brizantha* CIAT 6294 (= CIAT 6780), que corresponde al cultivar Diamantes 1 en Costa Rica, al cultivar Marandú en Brasil y al cultivar Insurgente en México. (Miles, 1999); en el tercer subgrupo se relacionaron cercanamente los híbridos 4118-12, 4118-10, 4118-6, por un lado y por otro el progenitor masculino 71, y los femeninos 29 y 110, estos por su origen común de *Brachiaria ruziziensis* y el 71 quizá por su carácter facultativo, ya que, en los dos dendrogramas (AFLPs y CAPS) no se relacionó cercanamente con los otros dos progenitores masculinos. El segundo grupo lo integran los híbridos 4171-20, 10018-1, 10018-16, 10018-6, 2918-14, 2918-18, con una influencia genética del progenitor masculino 18, y los progenitores femeninos 41, 100 y 143A, esto muestra que tienen influencia genética de su ancestro el *Brachiaria ruziziensis*.

La utilización de esta técnica ha sido amplia por el tipo de información que proporciona. Para el caso de forrajes, Cavagnaro *et al.* (2006) la emplearon en la especie *Trichloris crinita*, su estudio abarcó variedades donde se midieron características como



producción de biomasa y hábito de crecimiento y se obtuvo gran variabilidad en los análisis a pesar de haberlo realizado intraespecíficamente.

Para el caso de los materiales en estudio, sería interesante detectar más polimorfismos de tipo AFLP o probar más genotipos sexuales para verificar la cuantía de la diferencia entre estos grupos, así como también ver si las diferencias detectadas corresponden a valores significativos.

Otro factor que se consideró en este tipo de análisis fue la reproducibilidad de los amplicones polimórficos entre diferentes muestras de un mismo genotipo. Una discusión exhaustiva sobre este aspecto es presentada por Heckenberger *et al.* (2003), quienes analizaron líneas puras y dobles haploides de maíces europeos (*Zea mays* L.), concluyendo que es muy difícil evitar un porcentaje mínimo variable de errores experimentales, cuya cuantificación resulta determinante a la hora de aplicar esta metodología en un caso de identificación de cultivares, líneas esencialmente derivadas, u otros materiales silvestres o derivados del mejoramiento genético. Por ello, la aplicación definitiva de estas metodologías para la identificación de cultivares requiere reducir la casuística y verificar los resultados bajo diversas condiciones experimentales, cambiando no sólo la fuente de la muestra, sino también controlando factores como el protocolo de extracción de ADN, el termociclador empleado en la reacción de PCR, y los reactivos utilizados en esa misma reacción, entre otros.

Finalmente, en la medida en que se ha demostrado que estos híbridos y selecciones, tienen un fondo genético estrecho (escasa DG), cobra mayor importancia disponer de herramientas de análisis que tengan la mayor capacidad discriminante posible. Aunque en este trabajo se ha demostrado que los marcadores AFLPs cumplen con este requisito, y fueron capaces de diferenciar todos los genotipos con sólo cuatro combinaciones de iniciadores.



Cuadro 31. Iniciadores aleatorios utilizados para los perfiles AFLPs y total de bandas polimórficas de progenitores y progenie del género *Brachiaria*.

No.	Combinaciones de iniciadores	Total de bandas	Bandas polimórficas	Porcentaje de polimorfismo (%)
1	E AAC + M CAC	54	47	87.04
3	E ACC + M CAC	43	40	93.02
7	E ACT + M CTC	39	35	89.74
8	E ACT + M CTA	35	32	91.42
Totales:		171	154	90.05

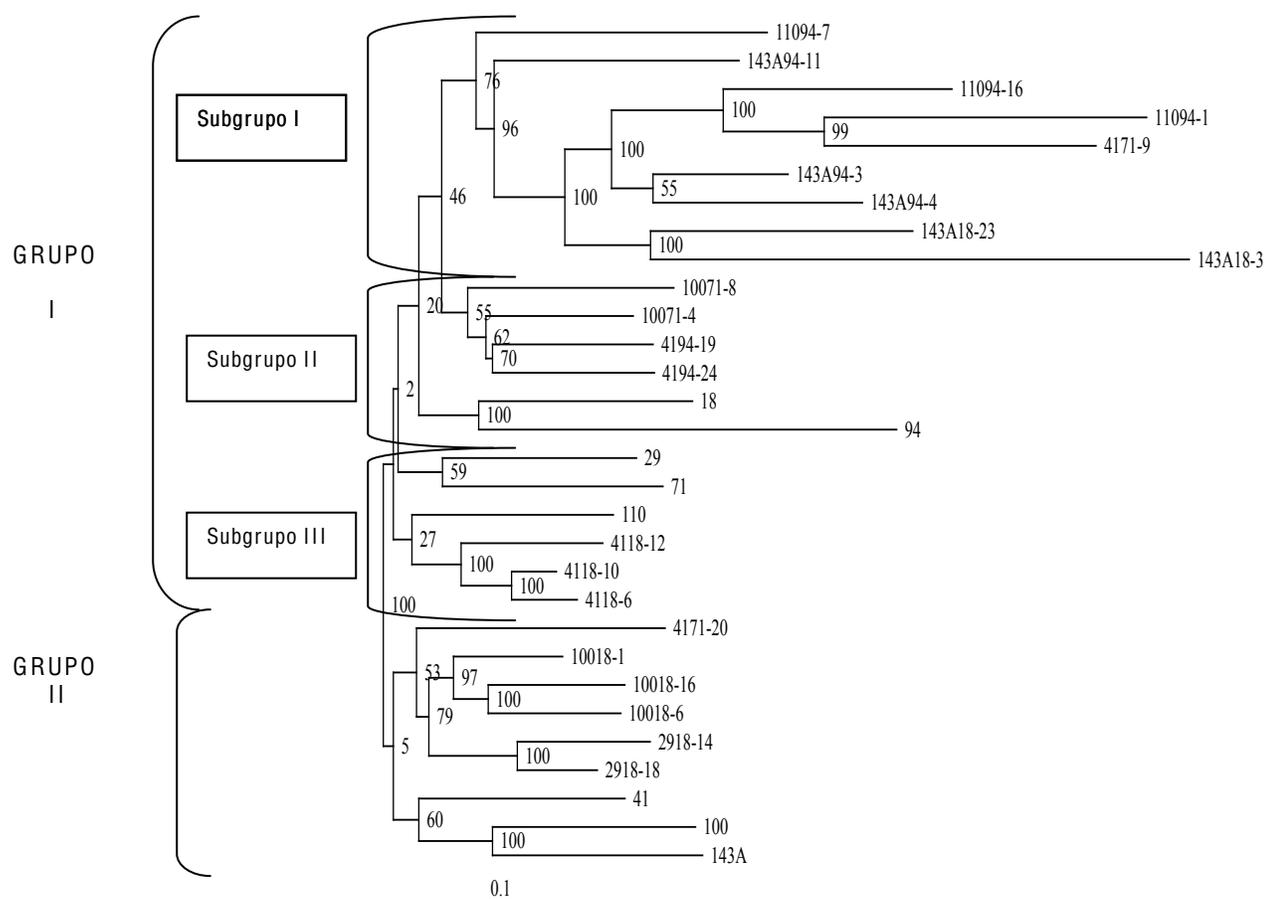


Figura 13. Árbol de relación genética de progenitores y progenie de *Brachiaria* utilizando AFLPs.



5.3.3. Comparación de análisis CAPS y AFLPs

El porcentaje de bandas y polimorfismos fue mayor utilizando AFLPs, ya que, se obtuvieron en promedio un 51% más de bandas y un 10.29% más de polimorfismos comparado a la técnica CAPS. En términos generales los dos marcadores agruparon en forma similar los genotipos. Los futuros estudios deben incluir a progenie sexual emparentada a la progenie híbrida para saber como se agruparían estos genotipos, más estrechamente ligados a su progenitor femenino como es de esperarse o si también el progenitor masculino puede tener influencia genética en estos.

5.3.4. Análisis factorial por correspondencia simple de AFLPs

Los datos obtenidos se sometieron a un análisis multivariable utilizando la técnica estadística del Análisis Factorial por Correspondencia Simple, que permitió agrupar todas las bandas obtenidas de cada genotipo estudiado, con los iniciadores que amplificaron las bandas; este método generó espacios factoriales en función de la información tanto en las filas como en las columnas, mediante relaciones matemáticas, obteniéndose de esta manera “*la mejor representación simultánea*” entre las modalidades que conforman las diferentes variables en estudio (Dore y Ojasso, 2001). En el cuadro (32) se observa que los primeros cinco componentes principales explicaron el 50.28% de la variación total, por lo cual estos componentes fueron más importantes que los restantes 24, que solo explicaron el restante 49.72%. Conforme se acumulan los componentes, se observa una disminución en el porcentaje de varianza menor de 1 en los últimos 9 componentes, esto indica su escasa contribución a la variabilidad de los genotipos.

En el cuadro 33 se observa la relación de frecuencia y distancia χ^2 (chi cuadrada), esta prueba confirma si las frecuencias observadas están próximas a las esperadas a la H_0 (hipótesis nula; Deville y Saporta, 1983); de cada genotipo estudiado (30) al origen de los mismos.

En las Figuras 14 y 15 se aprecia la información de un conjunto de vectores propios para las bandas asociadas con cada genotipo estudiado. Este conjunto de vectores correlacionados indican la asociación que existe en los 30 genotipos estudiados, y las bandas resultantes (Figuras 16 y 17); en donde el progenitor masculino 18 se relacionó con la banda AF8-14, mientras los progenitores femeninos 29 y 110 se relacionaron con la



banda AF8-10, el progenitor femenino 41 se asoció con la banda AF3-34, el híbrido 4171-9, con la banda AF3-42, el híbrido 143A18-23 con la banda AF8-6; y el progenitor 143A se separó de los demás genotipos y se asoció con la banda AF8-2, lo cual demuestra que es diferente en muchos aspectos a todos los progenitores y progenie; cabe hacer mención que dichas bandas citadas anteriormente son las que proporcionaron la mayor variabilidad como se observa en las figuras 16 y 17, ya que se separan visiblemente de la mayoría de bandas, las cuales nos indican la poca variación que presentan estas últimas.

Cuadro 32. Valores propios de genotipos del género *Brachiaria* producto del análisis factorial por correspondencia simple de AFLPs.

Componente Principal	Valor Propio	Varianza Explicada en (%)	Varianza Acumulada en (%)
1	0.074	13.55	13.55
2	0.0627	11.47	25.02
3	0.0602	11.02	36.03
4	0.0396	7.25	43.29
5	0.0382	7.00	50.28
6	0.0338	6.18	56.47
7	0.0301	5.51	61.98
8	0.0259	4.74	66.72
9	0.0231	4.24	70.95
10	0.0206	3.77	74.72
11	0.0195	3.56	78.29
12	0.0156	2.86	81.15
13	0.0142	2.61	83.75
14	0.0128	2.34	86.09
15	0.0108	1.98	88.08
16	0.0090	1.66	89.73
17	0.0078	1.42	91.15
18	0.0076	1.38	92.53
19	0.0071	1.31	93.84
20	0.0059	1.08	94.93
21	0.0053	0.96	95.89
22	0.0050	0.91	96.8
23	0.0041	0.75	97.55
24	0.0037	0.67	98.22
25	0.0032	0.59	98.81
26	0.0025	0.46	99.27
27	0.0015	0.27	99.54
28	0.0014	0.25	99.8
29	0.0011	0.20	100.00



En el cuadro 38 (Anexos) se muestran todos los vectores propios que corresponden a los iniciadores AF3, y AF8, los cuales indican el número total de variables o bandas generadas con ellos; además también se señalan las que se asocian con determinado genotipo; lo anterior indica que estadísticamente el iniciador AF3 proporcionó mayor número de bandas (43), en comparación del AF8, el cual mostró 35 bandas cuantificables; aunque este último asoció más bandas a determinados genotipos (4), por sólo dos del AF3. También un aspecto importante es que la calidad del ADN y las concentraciones adecuadas permitieron obtener geles con gran calidad.

Cabe hacer mención que no hubo bandas específicas que estuvieran asociadas a la presencia de alguna región genómica asociada a la apomixis, en todos los genotipos apomícticos de *Brachiaria* analizados, como otros investigadores la han encontrado en el género *Paspalum* ((Martínez *et al.*, 1999; Lombarda *et al.*, 2002), en *Pennisetum* (Ozias-Akins *et al.*, 1998), en *Hieriacium* (Catanach, *et al.*, 2006); Noyes y Rieseberg (2000), profundizan más y argumentan que dos locus controlan la apomixis en un estudio que realizaron con plantas de *Erigeron annuus*. En el análisis anterior los progenitores femeninos o sexuales 29 y 110, estuvieron asociados a una banda de ADN, lo cual pudiera asociarse con esa región del genoma; sin embargo es necesario comprobarlo con otras técnicas. Por otro lado, se sugiere también explicando esta relación, que existe una herencia univalente de la región que produce la diplosporía (Noyes y Rieseberg, 2000), la cual la presentan todos los genotipos maternos o sexuales. Como únicamente se presentó este resultado en el perfil de dos iniciadores empleados en el estudio, se tendría que realizar otro con un número mayor de estos, lo cual permitiría diferenciar la región apospórica ya que algunos investigadores utilizaron más combinaciones de iniciadores (Pessino, *et al.* 1998), que les permitió diferenciar esta región.

Las figuras 14 y 15 muestran una representación tridimensional de los organismos estudiados, producto de la información obtenida del análisis factorial de correspondencia simple, esto fue de gran utilidad porque permitió resumir toda la información generada con cada uno de los iniciadores anteriormente mencionados en un conjunto original de variables. En esta representación tridimensional se puede observar toda la variabilidad explicada entre los 29 componentes principales que arrojó el estudio.

Por lo anteriormente descrito, se puede decir que la información obtenida del análisis factorial por correspondencia simple, aplicada a los datos obtenidos de los resultados del



análisis molecular con AFLPs, ayudó a discutir, la diferenciación de las bandas, que están asociadas a los genotipos.

Cuadro 33. Relación de frecuencia y la distancia χ^2 del punto de cada genotipo estudiado al origen de la gráfica de AFLPs.

Genotipos	Relación de Frecuencia	Distancia χ^2 (Chi cuadrada)
71	0.03311	0.58880
94	0.02781	0.70376
18	0.03245	0.73021
29	0.03576	0.50972
110	0.03775	0.29251
41	0.03576	0.59270
100	0.03377	1.51066
143 ^a	0.03245	0.55266
41186	0.03907	0.21807
411810	0.03907	0.22169
411812	0.03510	0.29943
291814	0.03510	0.62352
291818	0.04040	0.58187
100181	0.03841	0.20826
100186	0.03974	0.27218
1001816	0.03642	0.34378
143A183	0.03046	1.01365
143A1823	0.02848	0.75258
41719	0.02450	1.42672
417120	0.03444	0.34079
100714	0.03510	0.38200
100718	0.03311	0.46886
419419	0.03576	0.31737
419424	0.03642	0.34636
143A943	0.03179	0.48877
143A944	0.02715	0.64789
143A9411	0.02914	0.52908
110941	0.02185	1.06193
110947	0.03377	0.43977
1109416	0.02583	0.82578



Genotipos

M	71	94	18	29	110	41	100	A	6	0	2	4	8	1	1	6	6	3	3	9	0	4	8	9	4	3	4	1	1	7	6	M	
									4	4	4	2	2	1	1	1	1	1	1	4	4	1	1	4	4	1	1	1	1	1	1	1	
									1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
									3	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	
									1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
									0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
									1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
									4	4	4	2	2	1	1	1	1	1	1	4	4	1	1	4	4	1	1	1	1	1	1	1	
									3	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	3	3	9	0	4	8	9	4	3	4	1	1	1	
									6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	

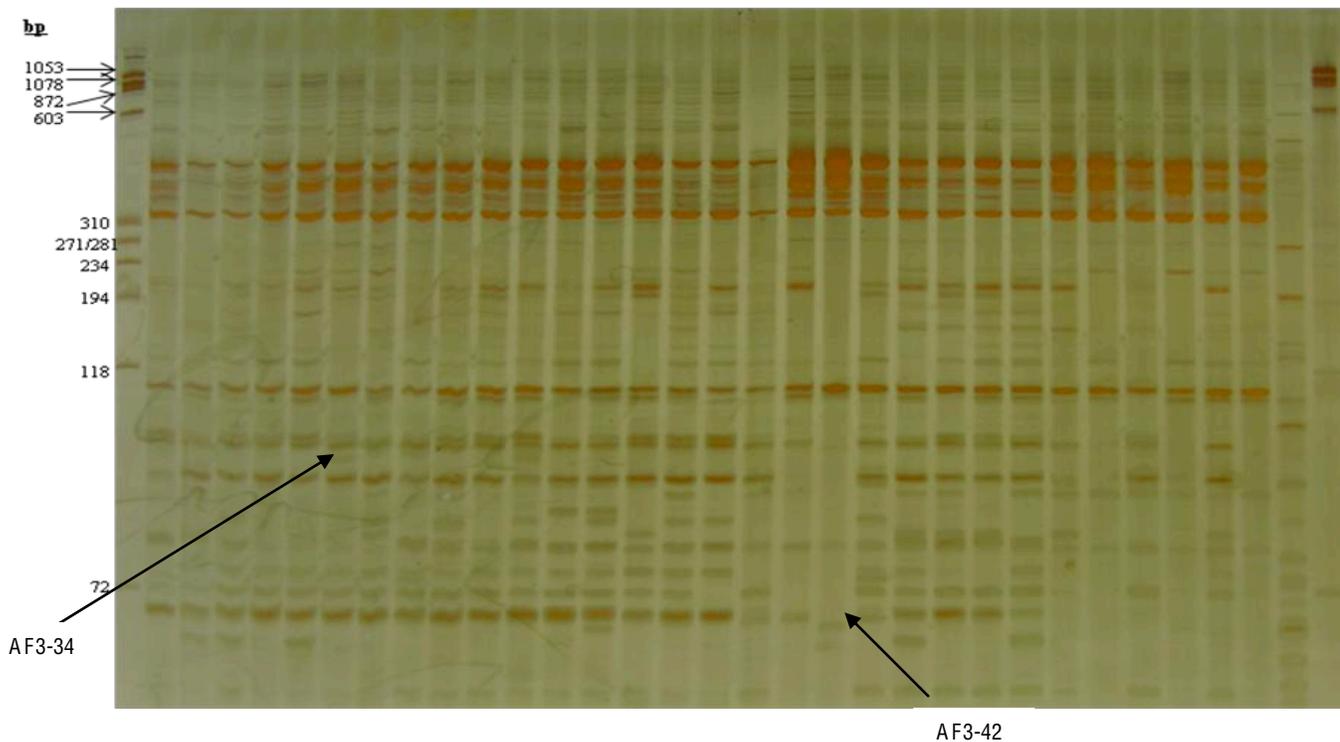


Figura 16. Perfiles AFLPs de los productos de amplificación del iniciador E ACC + M CAC, donde el progenitor femenino 41 se asoció con la banda AF3-34, y el híbrido 4171-9, con la banda AF3-42.



5.3.5. Análisis factorial por correspondencia simple de CAPS.

Los datos obtenidos en este trabajo se sometieron también a un análisis multivariado utilizando la técnica estadística del Análisis Factorial por Correspondencia Simple, que permitió agrupar todas las bandas obtenidas de cada genotipo estudiado del género *Brachiaria* que fueron estudiados, con los iniciadores que amplificaron las bandas.

En el cuadro 34 se observa que los primeros seis componentes principales explicaron el 54.27% de la variación total, por lo que estos componentes fueron más importantes que los restantes 23, que explicaron el 45.73%. Conforme se acumulan los componentes, se observa una disminución en el porcentaje de varianza menor de 1 en los últimos 8 componentes, esto explica su escasa contribución a la variabilidad de los genotipos.

En el cuadro 35 se analizó la relación de frecuencia y distancia χ^2 (chi cuadrada), en donde se observa que esta prueba confirma las frecuencias observadas que están próximas a las esperadas a la H_0 (hipótesis nula) (Deville y Saporta, 1983); de cada genotipo estudiado (30) al origen de los mismos, pero en algunos casos esto no sucede, lo cual indica que en la segregación de la progenie en algunas ocasiones la variación es altamente significativa como sucedió en un estudio de plantas del género *Schizachyrium scoparium* (Yong-Bi, 2004).

En las figuras 18 y 19 se aprecia la información de un conjunto de vectores propios para las bandas asociadas con cada genotipo estudiado. Este conjunto de vectores en las gráficas, correlacionándolos indican la asociación que existe en los 30 genotipos estudiados y las bandas resultantes (Figuras 20 y 21); en donde el progenitor masculino 18 se relacionó con la banda C6-26, mientras el progenitor femenino 143A se relacionó con la banda C15-20, todos los progenitores femeninos o sexuales se asociaron con la banda C15-8, lo que puede indicar que ésta puede estar asociada con la sexualidad o con algún gen otorgado por *Brachiaria ruziziensis*; el híbrido 4194-19, se asoció con la banda C6-21, y el híbrido 10018-1 con la banda C15-4; cabe hacer mención que dichas bandas citadas anteriormente son las que proporcionaron la mayor variabilidad como se observa en las figuras anteriormente citadas y en el cuadro 39 (Anexos), ya que se separan visiblemente de la mayoría de las otras bandas y que indican la poca variación que presentan estas últimas. Lo anterior también demuestra que únicamente los iniciadores C-06, y C-15, proporcionaron relaciones de bandas y progenies específicas, y que el iniciador C-08, únicamente proporcionó relaciones generales, debido a su escaso número de bandas (15),



por lo cual es recomendable utilizar para un estudio o análisis de este tipo a los dos primeros iniciadores.

Cuadro 34. Valores propios de genotipos del género *Brachiaria spp* producto del análisis factorial por correspondencia simple de CAPS.

Componente Principal	Valor Propio	Varianza explicada en (%)	Varianza acumulada en (%)
1	0.0654	12.86	12.86
2	0.0628	12.36	25.22
3	0.0441	8.67	33.89
4	0.0366	7.2	41.08
5	0.0346	6.81	47.9
6	0.0324	6.37	54.27
7	0.024	4.72	58.99
8	0.0226	4.45	63.44
9	0.0215	4.23	67.67
10	0.0196	3.86	71.53
11	0.0189	3.72	75.25
12	0.0173	3.41	78.66
13	0.0153	3.02	81.68
14	0.0143	2.81	84.48
15	0.0121	2.37	86.85
16	0.0102	2	88.85
17	0.0096	1.89	90.74
18	0.0082	1.61	92.35
19	0.0063	1.23	93.58
20	0.0055	1.09	94.68
21	0.0052	1.03	95.71
22	0.0048	0.94	96.65
23	0.0041	0.8	97.45
24	0.0032	0.62	98.07
25	0.0028	0.55	98.62
26	0.0025	0.49	99.1
27	0.0019	0.37	99.48
28	0.0016	0.31	99.79
29	0.0011	0.21	100



Cuadro 35. Relación de frecuencia y la distancia χ^2 del punto de cada genotipo estudiado al origen de la gráfica de CAPS.

Genotipo	Relación de frecuencia	Distancia χ^2 (Chi cuadrada)
71	0.03643	0.45169
94	0.03333	0.73594
18	0.03256	0.85637
29	0.03721	0.33823
110	0.03643	0.49851
41	0.03488	0.52341
100	0.02868	0.5495
143A	0.03101	0.88339
41186	0.03101	0.46434
411810	0.03566	0.59275
411812	0.03488	0.47065
291814	0.03333	0.35175
291818	0.03178	0.56166
100181	0.03256	0.50570
100186	0.03566	0.35000
1001816	0.04031	0.17393
143A183	0.03333	0.42008
143A1823	0.03101	0.63086
41719	0.02946	0.54335
417120	0.02171	1.12195
100714	0.03333	0.45648
100718	0.03876	0.27537
419419	0.02946	0.74134
419424	0.03488	0.53132
143A943	0.03876	0.35439
143A944	0.03566	0.34341
143A9411	0.03023	0.68406
110941	0.03256	0.44973
110947	0.03411	0.38459
1109416	0.03101	0.49426

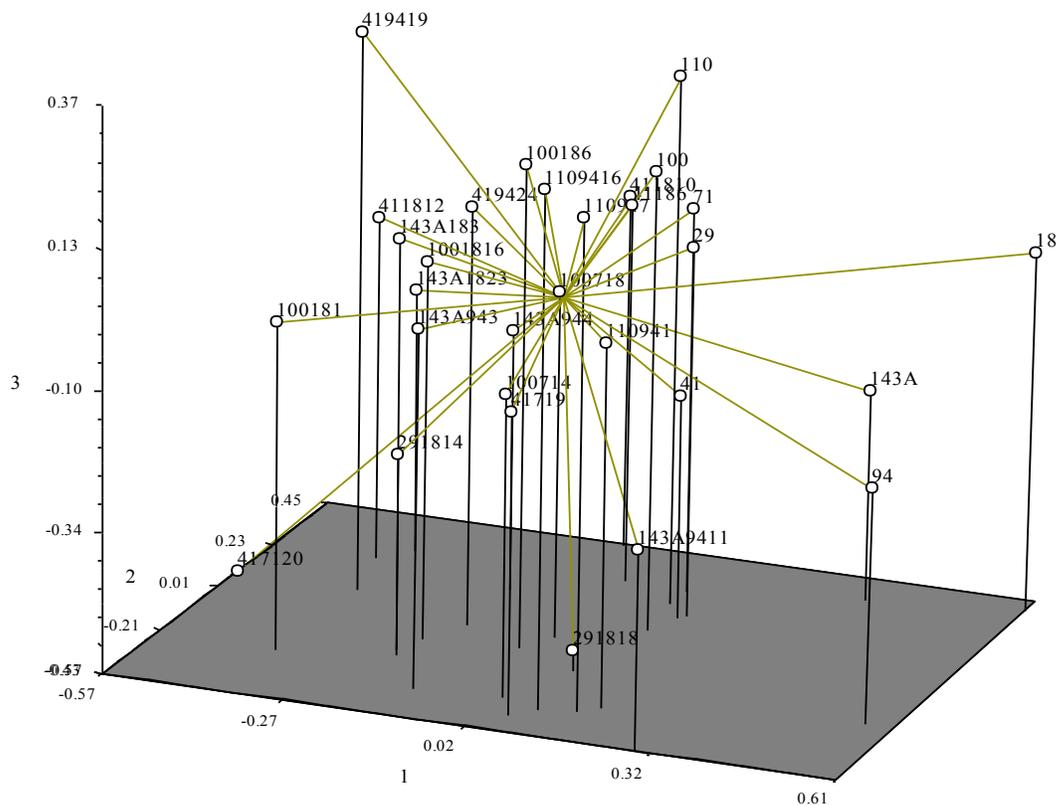


Figura 18. Representación tridimensional del conjunto de vectores propios para los genotipos asociados, producto del análisis factorial por correspondencia simple.

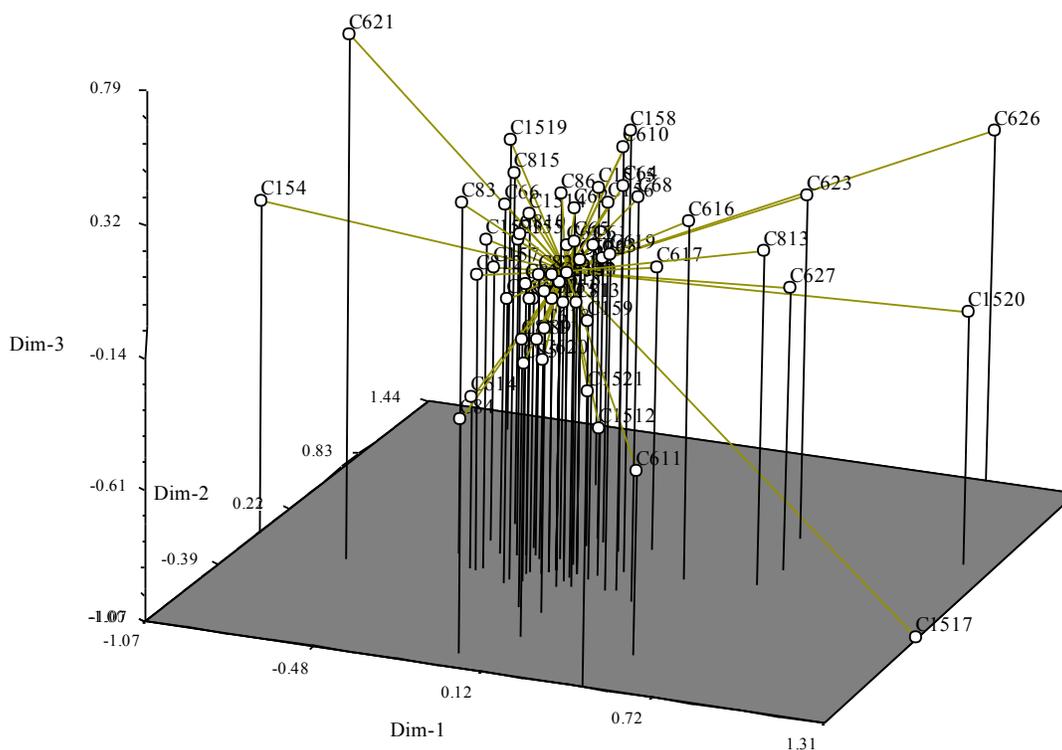


Figura 19. Representación tridimensional del conjunto de vectores propios para las bandas asociadas, producto del análisis factorial por correspondencia simple.



5.4. CONCLUSIONES.

Los AFLPs proporcionaron mayor información y fueron más precisos para caracterizar los diferentes genotipos.

Con la utilización de los CAPS se obtuvieron altos niveles de polimorfismos, a pesar de que los materiales están altamente emparentados.

El progenitor masculino 71 no se observó que tuviera influencia en su progenie, posiblemente por su carácter apomítico facultativo.

En este estudio se mostró que los marcadores AFLPs y CAPS, son útiles para identificar la variabilidad genética de progenies estrechamente emparentadas.

Se lograron correlacionar bandas con genotipos en especial la C15-8 que está asociada con los progenitores femeninos.

Debido a los altos costos de los AFLPs, se recomienda utilizar los CAPS, en estudios para identificaciones preliminares de materiales emparentados, ya que su costo es mucho más bajo.



5.5. LITERATURA CITADA.

- Azofeifa-Delgado, A. 2006. Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en el trópico. *Agronomía Mesoamericana*. 17(2): 221-242.
- Catanach, A. S., S. K. Erasmuson, E. Podivinsky, B. R. Jordan, and R. Bicknell. 2006. Deletion mapping of genetic regions associated with apomixis in *Hieracium*. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0605588103.
- Cavagnaro, P. F., J. B. Cavagnaro, J. L. Lemes, Masuell, R. W., and C. B. Passera. 2006. Genetic diversity among varieties of the native forage grass *Trichloris crinita* based on AFLP markers, morphological characters, and quantitative agronomic traits. *Genome* 49: 906-918.
- Dellaporta, S. L., J. Wood and J. B. Hicks. 1983. A plant DNA miniprep: Versión II. *Plant Molecular Biology Reporter*. 1 (4): 19-21.
- Deville, J. C., y G. Saporta. 1983. Correspondence analysis, with an extension towards nominal time series. *Journal of Econometrics* 22: 169-189.
- Dice, L. R. 1945. Measures of the amount of ecological association between species. *Ecology*. 26: 297-302.
- Heckenberger, M., J. Rouppe van der Voort, A.E. Melchinger, J. Peleman, and M. Bohn. 2003. Variation of DNA fingerprinting among accessions within maize inbred lines and implications for identification of essentially derived varieties: II. Genetic and technical sources of variation in AFLP data and comparison with SSR data. *Molecular Breeding* 12:97-106.
- Jentoft, F. C. 2004. Diffuse Reflectance IR and UV-vis Spectroscopy. (http://w3.rzberlin.mpg.de/~jentoft/lehre/jentoft_diffusereflectance_101204.pdf)
- Jentoft, F. C. 2004. Diffuse Reflectance IR and UV-vis Spectroscopy (http://w3.rzberlin.mpg.de/~jentoft/lehre/jentoft_diffusereflectance_101204.pdf)
- Konieczny, A., and F. Ausubel. 1993: A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using codominant ecotype specific PCR based markers. *Plant Journal*. 4: 403-410.
- Labombarda, P., A. Busti, M. A. Caceres, F. Pupilli, and S. Arcioni. 2002. An AFLP marker tightly linked to apomixis reveals hemizygoty in a portion of the apomixis controlling locus in *Paspalum simplex*. *Genome* 45: 513-519.
- Martínez, E.J., J.P.A. Ortíz, H.E. Hopp y C.L. Quarín. 1999. Identificación de marcadores moleculares ligados a la apomixis en *Paspalum notatum*. XXIX Congreso Argentino de Genética. Rosario, 5 al 8 de septiembre de 1999.



- Möhring, S., V. Horstmann and E. Esch. 2005. Development of a molecular CAPS marker for the self-incompatibility locus in *Brassica napus* and identification of different S alleles. *Plant Breeding* 124: 105-110.
- Nei M and Li W. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *The Proceedings of National Academy of Sciences. USA.* 76: 5269–5273.
- Noyes, R. D., and L. H. Rieseberg. 2000. Two Independent Loci Control Agamospermy (Apomixis) in the Triploid Flowering Plant *Erigeron annuus*. *Genetics.* 155: 379–390.
- Ozias-Akins, P., D. Roche, and 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. *The Proceedings of National Academy of Science. USA.* 95: 5127-5132.
- Park, J. I., S. S. Lee, M. Watanabe, Y. Takahata and I. S. Nou. 2002. Identification of S-alleles using polymerase chain reaction-cleaved amplified polymorphic sequence of the S-locus receptor kinase in inbreeding lines of *Brassica oleracea*. *Plant Breeding*, 121: 192-197.
- Pessino, S. C., C. Evans, J. P. A. Ortiz, I. Armstead, C. B. Do Valle and 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.
- Powell, W. 1992. Plant genomes, gene markers, and linkage maps. *In*: Moss, J. P. ed. *Biotechnology and crop improvement in Asia.* Patancheru, India. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics. p. 297-322.
- Rallo, P., A. Belaj, R. De La Rosa, e I. Trujillo. 2002. Marcadores moleculares (en línea). Córdoba, España. Consultado 1 ago. 2002. Disponible en http://www.extremadura21.com/caudal/hemeroteca/mayojuenio_2000/almazara/almazara1.htm
- Sagahai-Marroof, M.A., Soliman K.M., Jorgensen R.A., Allard R.W. 1984. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *PNAS* 81:8014-8018.
- Sambrook, D. J., E. F. Frisch and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Tanksley, S. 1993. Mapping polygenes. *Annual Review of Genetics* 27: 205-233.
- Tanksley, S. 1983. Molecular markers in plant breeding. *Plant Molecular Biology Reporter* 1: 3-8.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., and Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research.* 23: 4407-4414.



Williams, J.G.K., Kubelik A.R., Livak D.L., Rafalski J.A., and Tingey S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18:6531-6536.

Yong-Bi F., A. T. Phan, B. Coulman, and K. W. Richards, 2004. Genetic Diversity in Natural Populations and Corresponding Seed Collections of Little Bluestem as Revealed by AFLP Markers. *Crop Science.* 44:2254–2260.



6.1. ANÁLISIS GENERAL

El proceso de la apomíxis ha sido observado en al menos 300 especies de 35 diferentes familias en donde las más comunes son las *Gramineae*, *Compositae*, *Rosaceae*, y *Rutaceae* (Richards, 1986; Hanna and Bashaw, 1987). Un aspecto importante de esta condición es que la progenie de estas plantas tiene las mismas características que la planta madre, lo que es benéfico en agricultura, por lo que si la apomíxis puede ser introducida en nuevos cultivares, se podrían perpetuar los genotipos, perseverando caracteres heteróticos a través de sucesivas generaciones (Hanna and Bashaw, 1987). Czapik (1994) habló de los parámetros sobre cómo detectar apomíxis en angiospermas, uno de ellos se refiere a la observación citológica y embriológica, otra en campo, la observación de la no segregación de las características fenotípicas maternas es una señal de apomíxis.

Estudios genéticos demuestran que la apospória en el género *Brachiaria* es heredada como un carácter dominante y es controlado por un factor solo factor Mendeliano (Valle y Glienke, 1993; Valle *et al.*, 1994; Miles y Escandón 1997). En la actualidad pruebas con técnicas moleculares indican una fuerte evidencia sobre la herencia de un solo gene en el modo reproductivo (Tohme *et al.*, 1996). Aunque esto no ha sido concluyente porque se han realizado estudios para identificar el área relacionada con la apomíxis (Pessino *et al.*, 1997), con la finalidad de identificar molecularmente progenies apomícticas.

Con este propósito, se estudiaron características morfológicas, agronómicas, citológicas y moleculares de híbridos interespecíficos del género *Brachiaria*, obtenidos a partir de 10 cruzas entre cinco híbridos elite sexuales provenientes de *B. ruziziensis*, y tres híbridos apomícticos originados de *B. brizantha*. Se realizaron tres pruebas para determinar que grado de importancia tiene cada una de ellas: en campo hubo dos etapas; en la primera, se caracterizaron 200 híbridos F₁, el resultado indicó que las variables cuantitativas altura y vigor de planta fueron importantes para identificar plantas con reproducción apomíctica; como variable cualitativa, el hábito de crecimiento fue la más importante. En laboratorio, se realizó un estudio de sacos embrionarios por medio del clareamiento, para determinar su modo reproductivo. En otra etapa del trabajo, se caracterizaron morfológicamente 135 progenies de 10 cruzas de *Brachiaria*, donde hubo tres progenitores masculinos 18, 94 y 71; y cinco progenitores femeninos 41, 29, 100, 110 y 143A, las progenies apomícticas se



identificaron en base a características morfológicas como floración, vigor, uniformidad, y las que obtuvieron un mayor número de progenies de este tipo fueron la 41 x 18 (9), la 100 x 18 (8), la 143A x 18 (6), la 143A x 2094 (6), y por último la 110 x 94 (9); en donde se detectó que el progenitor apomíctico 71, podría ser facultativo. En el análisis de conglomerados de variables cuantitativas y cualitativas se agruparon en forma general la progenie de los progenitores masculinos, por lo cual, se puede decir que influyeron genéticamente en la progenie adicionándole su carácter apomíctico.

En laboratorio, se realizaron dos pruebas: la primera se refirió al análisis citoembriológico de los sacos embrionarios, ésta se realizó a 200 genotipos, los resultados fueron: apomícticos 95, sexuales 83, sin identificar 22; la hipótesis formulada fue que los materiales F_1 segregaron en una tasa de 1:1; además, se realizó un análisis con los marcadores moleculares AFLPs y CAPS, se utilizaron 30 materiales, ocho progenitores y 22 híbridos. La diversidad genética (DG) encontrada en la muestra de 30 genotipos evaluados mediante los dos tipos de análisis fue amplia, en el análisis de conglomerados se observó que se agruparon las progenies de acuerdo a los progenitores por un lado las provenientes de progenitor masculino 94 y, por otro, de los progenitores masculinos 18 y 71; por otra parte, las progenies femeninas también influyeron en la agrupación. Además los progenitores tuvieron una tendencia a relacionarse, los masculinos 94 y 18, y los femeninos, 110, 100, 29, 41 y 143A. Se obtuvo también, información sobre un conjunto de vectores propios para las bandas asociadas con cada genotipo estudiado, las bandas resultantes en donde el progenitor masculino 18 se relacionó con la banda AF8-14, mientras los progenitores femeninos 29 y 110 se relacionaron con la banda AF8-10, el progenitor femenino 41 se asoció con la banda AF3-34. También el progenitor masculino 18 se relacionó con la banda C6-26, mientras el progenitor femenino 143A se relacionó con la banda C15-20, todos los progenitores femeninos o sexuales se asociaron con la banda C15-8, lo cual puede indicar que esta puede estar asociada con la sexualidad o con algún gen otorgado por *Brachiaria ruziziensis*; el híbrido 4194-19, se asocio con la banda C6-21, y el híbrido 10018-1 con la banda C15-4.

Lo anterior demuestra que todas las pruebas pueden ser de utilidad en la identificación de genotipos con características apomícticas, lo más importante, en la decisión de utilizar alguna de ellas, es valorar el tiempo, costo y sencillez de cada una con el propósito que se quiera alcanzar.



6.2. CONCLUSIONES GENERALES

Muchos trabajos están tratando de desarrollar nuevas plantas mejoradas de semillas, muchas de las nuevas variedades son híbridas. Producir plantas con atributos idénticos a los progenitores es una buena herramienta ya que con esto se elimina la segregación en la progenie. Esta práctica puede estar disponible como consecuencia de los avances en la investigación de la apomixis. Incluir genes para apomixis también puede contribuir en desarrollar nuevos cultivares de variedades que son adaptadas a nivel local, incrementando la diversidad de plantas. Este trabajo pretendió a proporcionar algunas formas de identificar la apomixis, mediante la caracterización de plantas sexuales apomícticas y sexuales con las diferentes pruebas que se realizaron. Aunque todavía existen numerosas preguntas sobre este modo reproductivo, existe un guión prometedor para un futuro cercano. El conocimiento de las bases moleculares de la apomixis ha aumentado en los últimos años, respaldado por el desarrollo de tecnologías de biología molecular y el interés mostrado por instituciones de investigación y científicos de diferentes lugares. Muchos de los resultados obtenidos hasta ahora ya han contribuido a la reproducción de especies apomícticas, y se espera que éste signifique una pequeña contribución en el difícil quehacer de la investigación.



6.3. LITERATURA CITADA

- Czapik R. 1994. How to detect apomixis in Angiospermae. Polish Botanical Studies. 8: 13-21.
- Hanna, W.W., and Bashaw, E.C. 1987. Apomixis: Its identification and use in plant breeding. Crop Science. 27: 1136-1139.
- Miles J. W. and M. L. Escandon. 1997. Further evidence on the inheritance of reproductive mode in *Brachiaria*. Canadian Journal Plant Science. 77: 105-107.
- Pessino, S. C, J. P. A. Ortiz, O. Leblanc, C. B. do Valle and M. D. Hayward. 1997. Identification of a maize linkage group related to apomixis in *Brachiaria*. Theoretical and Applied Genetics. 94: 439-444.
- Richards, A. J. 1986. Plant Breeding Systems. (London: George Allen and Unwin).
- Thome, J., D., O. González, S. Bebee, and M. C. Duque. 1996. AFLP analysis of gene pools of a wild bean core collection. Crop Science. 36:1375-1384.
- Valle C. B. do, C. Glienke and G. O. C. Leguizamon. 1994. Inheritance of apomixis in *Brachiaria*, a tropical forage grass. Apomixis Newsletter. 7: 42-43.
- _____ and C. Glienke, 1993. Towards defining the inheritance of apomixis in *Brachiaria*. Apomixis Newsletter. 6: 24-25.



ANEXOS

Cuadro 36. Vectores característicos de las variables de mayor valor descriptivo de cada variable original con respecto a su componente principal de seis variables cuantitativas.

Variables	Vectores característicos		
	CP1	CP2	CP3
ADP	-0.359097	0.577561	0.07227
DDM	0.357874	-0.142695	0.662478
ALF	0.378835	-0.127835	-0.675385
LLF	0.405853	0.562959	-0.214865
DDT	0.424763	0.494597	0.217939
PDS	0.504301	-0.261093	0.078046

Cuadro 37. Datos de variables cuantitativas de 44 híbridos del género *Brachiaria*.

PROGENIE	ADP	LLF	LVLf	ALF	DDT	LEI	DNTS	LVHB	ALHB	RPI	LPR	EPR	PCS
4118-5	85	12.5	12.5	2.28	3.8	18	2	31.0	1.4	9	13	55	0.2843
4118-6	120	11.5	11.5	2.26	4.2	15.0	2	30.0	1.0	9	13.5	54	0.2299
4118-7	118	14.0	14.0	2.23	3.5	19.0	2	27.0	1.5	8	11.0	51	0.266
4118-12	80	13.3	13.3	2.23	3.2	14.0	2	27.0	1.4	10	11.0	48	0.2775
4118-15	117	13.0	13.0	2.13	3.6	13.5	2	24.5	1.3	6	9.5	44	0.2443
4118-17	82	12.0	12.0	2.20	4.3	10.0	1.5	25.0	1.2	5	9.5	40	0.2783
4118-18	90	12.8	12.8	2.23	3.6	15.0	2	29.5	1.0	7	7.0	42	0.2712
4118-21	105	12.6	12.6	2.30	3.3	14.0	2	25.5	1.0	7	8.5	38	0.2341
4118-22	120	14.3	14.3	2.20	4.0	19.0	2	22.5	1.8	8	9.0	50	0.2018
2918-4	100	12.6	12.6	2.26	3.5	13.0	1	29.0	1.0	5	11.0	52	0.194
2918-19	95	14.5	14.5	2.00	3.0	10.0	1	26.0	1.0	5	12.5	47	0.1872
10018-1	110	13.5	13.5	2.36	3.7	20.0	1	22.0	2.0	5	9.5	42	0.1987
10018-5	125	14.2	14.2	2.23	3.0	12.5	2	30.0	0.5	7	10.5	48	0.1695
10018-6	100	11.7	11.7	2.40	3.7	10.0	2	26.0	2.0	5	9.0	30	0.1872
10018-7	80	10.7	10.7	1.76	3.0	9.5	1	27.0	3.0	5	8.0	41	0.1825
10018-12	80	14.5	14.5	1.73	3.0	9.0	1	26.5	3.0	5	8.0	40	0.1916
10018-13	90	11.0	11.0	2.53	3.0	13.0	2	22.0	3.0	8	8.0	35	0.1821
10018-20	120	13.8	13.8	2.20	3.0	17.0	3	36.0	1.0	8	11.0	40	0.169
10018-22	65	13.3	13.3	1.90	3.0	13.0	2	28.0	3.0	9	9.5	46	0.1925
10018-24	80	14.3	14.3	2.20	3.0	14.5	3	27.0	1.3	6	11.0	56	0.1822
143A18-3	95	15.5	15.5	2.50	6.0	12.0	2	27.5	1.1	5	10.0	52	0.3044
143A18-6	50	13.5	13.5	2.40	6.0	12.0	2	25.0	1.4	7	9.0	51	0.3214
143A18-14	70	10.3	10.3	2.30	4.0	12.5	2	23.0	3.0	8	8.0	44	0.3322
143A18-16	50	11.0	11.0	2.17	4.0	14.0	2	26.0	1.2	6	9.0	50	0.3395
143A18-21	70	10.0	10.0	2.50	3.0	10.0	2	22.0	3.0	7	8.0	38	0.3099
143A18-23	90	11.6	11.6	2.43	4.0	9.0	2	18.0	1.0	6	7.0	40	0.3376
4171-9	50	11.2	11.2	2.20	4.0	13.0	2	28.0	1.7	5	13.0	38	0.2075
4171-25	75	12.0	12.0	2.26	3.0	11.0	2	23.0	3.0	8	8.0	35	0.2436
10071-8	90	11.5	11.5	2.03	4.0	9.5	2	20.0	3.0	6	7.0	43	0.2345
10071-14	70	13.3	13.3	2.00	3.0	8.0	2	21.0	5.0	4	11.5	46	0.217

Continuación...



143A94-3	122	12.3	12.3	2.50	5.0	11.0	3	31.0	1.4	8	12.0	50	0.2664
143A94-4	115	13.0	13.0	2.20	3.0	11.0	3.7	19.0	1.2	7	10.5	51	0.267
143A94-9	70	12.0	12.0	2.73	4.3	11.5	2	23.5	3.0	5	9.0	41	0.3124
143A94-11	123	13.0	13.0	2.06	3.0	11.5	2.5	20.0	1.8	5	11.5	54	0.2987
143A94-15	110	12.0	12.0	2.20	3.0	13.5	2	32.0	5.0	5	11.0	56	0.315
143A94-18	115	11.0	11.0	1.93	4.0	13.0	3	25.0	5.0	6	13.0	44	0.3012
4194-19	130	12.0	12.0	2.56	4.0	16.0	3	27.0	1.5	6	11.0	52	0.177
4194-24	75	16.0	16.0	1.70	3.0	13.0	2	26.0	1.0	7	9.0	46	0.1964
11094-1	85	14.0	14.0	2.00	3.0	12.0	2	24.5	7.0	7	10.0	52	0.2863
11094-6	110	14.0	14.0	1.73	3.0	13.0	2	23.0	1.1	5	10.0	46	0.2341
11094-7	95	13.0	13.0	1.77	4.0	13.0	1	25.0	6.0	6	10.0	45	0.277
11094-15	100	12.5	12.5	1.98	3.0	13.5	2	23.0	4.0	5	10.5	57	0.29
11094-16	75	12.5	12.5	1.86	2.0	12.0	3	16.0	1.0	5	10.5	64	0.2655
11094-22	70	15.0	15.0	2.30	4.0	14.5	2	14.0	1.5	7	11.0	58	0.2764

ADP = Altura de planta, LLF = Longitud de lámina foliar, LVLf = Longitud de vaina de lámina foliar, ALF = Ancho de lámina foliar, DDT = Diámetro de tallo, LEI = Longitud del eje de la inflorescencia, DNTS = Diámetro del nudo terminal superior, Longitud de vaina de hoja bandera, ALBH = Ancho de lámina de hoja bandera, RPI = Número de racimos por inflorescencia, LPR = Longitud de primer racimo, EPR = Número de espiguillas del primer racimo, PCS = Peso de cien semillas.

Cuadro 38. Vectores propios de las bandas asociadas con los 30 genotipos analizados con AFLPs.

No. de Iniciador	No. de Banda	C1	C2	C3
AF3	1	0.129	0.004	-0.058
AF3	2	0.235	0.032	0.019
AF3	3	0.189	-0.012	0.093
AF3	4	0.131	-0.04	-0.073
AF3	5	0.101	0.002	-0.005
AF3	6	0.183	-0.114	-0.265
AF3	7	0.257	0.128	0.009
AF3	8	0.171	-0.011	-0.019
AF3	9	0.114	-0.1	0.039
AF3	10	0.056	-0.228	0.108
AF3	11	0.11	-0.049	-0.032
AF3	12	0.223	-0.207	-0.112
AF3	13	0.113	-0.074	0.091
AF3	14	0.035	-0.017	-0.027
AF3	15	0.143	0.009	-0.067
AF3	16	0.141	0.089	-0.062
AF3	17	0.014	0.105	0.03
AF3	18	0.11	-0.049	-0.032
AF3	19	-0.036	0.512	-0.324
AF3	20	-1.62	-0.854	-1.999
AF3	21	0.224	-0.008	-0.144
AF3	22	-1.106	0.147	-2.867

Continuación...



AF3	23	0.074	-0.453	-0.135
AF3	24	-0.273	-0.117	0.114
AF3	25	-0.375	0.002	-0.084
AF3	26	-0.32	0.521	0.23
AF3	27	-0.185	-0.858	0.312
AF3	28	-0.446	0.572	0.167
AF3	29	0.319	0.184	0.087
AF3	30	0.11	-0.049	-0.032
AF3	31	0.234	-0.219	0.079
AF3	32	0.233	0.008	0.108
AF3	33	0.172	-0.176	0.048
AF3	34	-0.368	0.017	0.039
AF3	35	-0.24	0.534	0.301
AF3	36	0.497	2.01	0.662
AF3	37	-0.619	0.455	-0.141
AF3	38	0.782	0.046	0.043
AF3	39	-0.45	0.127	0.12
AF3	40	-0.31	-0.055	0.027
AF3	41	-0.448	0.031	0.168
AF3	42	0.985	1.385	0.487
AF3	43	-0.164	-0.43	0.849
AF8	1	0.313	0.169	0.024
AF8	2	1.073	0.262	-1.049
AF8	3	0.118	-0.224	-0.006
AF8	4	0.26	0.088	0.011
AF8	5	1.398	-0.625	-0.0093
AF8	6	1.032	0.34	-0.52
AF8	7	0.156	0.688	-0.166
AF8	8	-0.468	-0.487	0.55
AF8	9	-0.099	0.031	-0.011
AF8	10	-0.356	0.513	0.589
AF8	11	0.266	-0.184	0.125
AF8	12	-0.018	0.078	-0.108
AF8	13	0.116	-0.659	0.41
AF8	14	-0.592	-0.659	1.272
AF8	15	-0.35	0.539	-0.079
AF8	16	0.059	0.316	-0.244
AF8	17	-0.034	-0.092	0.014
AF8	18	-0.224	1.122	0.12
AF8	19	-0.23	-0.123	0.108
AF8	20	0.11	-0.049	-0.032
AF8	21	-0.355	-0.008	0.054
AF8	22	-2.189	-1.117	-3.648
AF8	23	-0.302	-0.049	-0.016

Continuación...



AF8	24	-0.303	0.085	-1.184
AF8	25	0.048	-0.067	-0.086
AF8	26	0.11	-0.049	-0.032
AF8	27	-0.214	0.012	0.044
AF8	28	-0.136	-0.071	0.002
AF8	29	-0.063	-0.047	-0.04
AF8	30	-0.26	0.083	-0.067
AF8	31	0.398	0.087	434
AF8	32	-0.241	-0.007	0.048
AF8	33	-0.319	0.07	-0.094
AF8	34	-0.682	-1.104	-0.318
AF8	35	-0.277	0.04	-0.008

Cuadro 39. Vectores propios de las bandas asociadas con los 30 genotipos analizados con CAPS.

No. de Iniciador	No. de Banda	C1	C2	C3
C06	1	0.112	-0.017	0.118
C06	2	0.048	-0.047	0.24
C06	3	0.123	0.021	0.055
C06	4	0.239	-0.105	0.359
C06	5	0.086	-0.132	0.156
C06	6	-0.251	0.084	0.172
C06	7	0.056	-0.005	0.046
C06	8	0.325	-0.183	0.358
C06	9	0.056	-0.005	0.046
C06	10	0.103	0.253	0.373
C06	11	0.517	-0.653	-0.428
C06	12	0.046	-0.091	0.024
C06	13	-0.096	-0.072	-0.092
C06	14	-0.289	-0.093	-0.464
C06	15	-0.02	0.008	-0.047
C06	16	0.4	0.1	0.199
C06	17	0.212	0.316	-0.061
C06	18	0.084	-0.394	-0.068
C06	19	0.205	-0.116	0.12
C06	20	-0.109	0.081	-0.357
C06	21	-0.704	-0.175	0.786
C06	22	0.056	-0.005	0.046
C06	23	0.615	0.628	0.161
C06	24	0.056	-0.005	0.046
C06	25	0.006	0.003	0.09
C06	26	0.988	1.43	0.195
C06	27	0.673	0.319	-0.071

Continuación...



C08	1	0.012	0.085	-0.141
C08	2	-0.143	0.121	-0.076
C08	3	-0.38	0.024	0.179
C08	4	0.015	-0.871	-0.253
C08	5	0.115	-0.642	-0.11
C08	6	0.037	-0.141	0.316
C08	7	-0.086	-0.131	-0.019
C08	8	-0.134	-0.179	-0.064
C08	9	-0.168	0.176	-0.327
C08	10	-0.196	0.088	0.075
C08	11	0.002	-0.381	-0.127
C08	12	-0.272	-0.096	-0.024
C08	13	0.647	0.136	0.114
C08	14	-0.02	0.008	-0.047
C08	15	-0.133	-0.133	0.363
C15	1	-0.034	-0.022	-0.101
C15	2	-0.098	-0.04	-0.099
C15	3	-0.02	0.008	-0.047
C15	4	-1.073	-0.048	0.112
C15	5	-0.323	0.384	-0.052
C15	6	0.024	0.318	0.146
C15	7	-0.332	0.189	-0.093
C15	8	0.92	0.081	0.496
C15	9	0.973	-0.999	0.196
C15	10	-0.02	0.008	-0.047
C15	11	-0.02	0.008	-0.047
C15	12	-0.007	0.35	-0.676
C15	13	-0.051	0.121	-0.159
C15	14	-0.166	0.094	0.151
C15	15	-0.216	0.858	0.005
C15	16	-0.039	-0.014	-0.016
C15	17	1.311	-0.134	-1.072
C15	18	-0.054	-0.046	-0.071
C15	19	-0.701	1.265	-0.01
C15	20	1.203	0.612	-0.172
C15	21	-0.021	0.274	-0.521
C15	22	-0.02	0.088	-0.047
C15	23	-0.25	-0.083	0.099
