



Universidad Nacional de Rafaela

“Aportes al estudio de la base genética del carácter dehiscencia en la forrajera *Panicum coloratum*”

Estudiante: Luisina Cravero.

Directora de tesis: Dra. María Florencia Eberhardt.

Co- Directora: Dra. Marina Díaz.

Lugar de trabajo: Instituto de investigaciones de la Cadena Láctea (IDICaL, INTA-CONICET).

“Tesina para optar al título de
Licenciada en Bioinformática”

Rafaela, Santa Fe, Argentina

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de Rafaela, por haber sido mi casa de estudios y el espacio de mis primeros acercamientos al mundo laboral. Gracias por brindarme las herramientas necesarias para mi desarrollo profesional y personal durante estos cinco años, y por abrirme las puertas a los desafíos que hoy forman mi carrera.

A mis directoras, Florencia y Marina. Gracias por su guía constante, su paciencia y por compartir su conocimiento conmigo con tanta generosidad. Un agradecimiento especial a Florencia, Gonzalo y a todo el cuerpo docente de la carrera; más que profesores, han sido mi "familia en la ciencia", formándome con rigor, ética y pasión desde el primer día.

Al Instituto de investigaciones de la Cadena Láctea (IDICaL, INTA-CONICET) de Rafaela, por abrirme sus puertas, permitirme el uso de sus instalaciones y laboratorios, y por brindarme el espacio institucional y humano necesario para llevar a cabo este trabajo de investigación.

A mi familia y a mi pareja, por ser mi sostén incondicional, por la paciencia infinita en los momentos de mayor exigencia y por alentarme siempre a perseguir mis objetivos. Sin su amor y compañía, este trayecto habría sido mucho más difícil.

A mis compañeros y amigos, Valentina, Gianella, Priscila y Dardo. Gracias por las charlas interminables, por los mates compartidos y por aquellas jornadas de videollamadas y debates frente a PowerPoints, TPs y estudio. Estos cinco años no habrían sido los mismos sin su compañía; gracias por la amistad incondicional y por haber sido el soporte fundamental en cada paso de este camino.

Finalmente, a la música, mi psicóloga no oficial y fiel compañera. Gracias por ser el combustible que me mantuvo el ánimo cuando el café ya no hacía efecto, y por ponerle el ritmo necesario a las largas horas de estudio, laboratorios y cada desafío que presentaba esta hermosa carrera.

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN	Pág. 5
INTRODUCCIÓN	Pág. 7
OBJETIVOS	Pág. 12
Objetivo general	Pág. 12
Objetivos específicos	Pág. 12
MATERIALES Y MÉTODOS	Pág. 13
Relevamiento y análisis crítico de la literatura científica	Pág. 13
Identificación y obtención de secuencias de genes candidatos en bases de datos públicas	Pág. 13
Búsqueda de genes homólogos en genomas de referencia	Pág. 14
Diseño de cebadores para genes candidatos	Pág. 15
Material vegetal	Pág. 15
Extracción de ADN genómico	Pág. 16
Cuantificación y control de calidad del ADN	Pág. 17
Amplificación de genes candidatos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	Pág. 17
Purificación de los productos de PCR	Pág. 18
Cuantificación del ADN purificado	Pág. 18
Preparación de bibliotecas y secuenciación	Pág. 18
Análisis bioinformático e identificación de variantes alélicas	Pág. 19
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	Pág. 20
Relevamiento y análisis crítico de determinantes genéticos de la dehiscencia	Pág. 20
Identificación y análisis comparativo de genes candidatos asociados a la dehiscencia	Pág. 23
Análisis del gen <i>SvLes1</i>	Pág. 24
Análisis del gen <i>Sh1</i>	Pág. 26
Extracción de ADN vegetal y amplificación por PCR de genes candidatos en dos poblaciones de <i>P. coloratum</i>	Pág. 31
Secuenciación de los productos de PCR	Pág. 34
Análisis de haplotipos y ploidía	Pág. 37
Comparación entre poblaciones y visualización de resultados	Pág. 40
CONCLUSIONES	Pág. 44
BIBLIOGRAFÍA	Pág. 45
SUPLEMENTARIOS	Pág. 49
1. HAPLOTIPOS	Pág. 49
2. FRECUENCIAS DE POLIMORFISMOS (%) A NIVEL ADN Y AA	Pág. 51

RESUMEN

En especies silvestres, el desprendimiento espontáneo del grano, o dehiscencia, constituye un proceso de abscisión altamente regulado que asegura la dispersión de las semillas, la descendencia y la persistencia poblacional en los ecosistemas de origen. Sin embargo, en sistemas agrícolas mecanizados, se traduce en un bajo rendimiento y representa uno de los principales desafíos para el mejoramiento genético vegetal.

Diversos estudios en cereales han demostrado que la modificación o pérdida funcional de la zona de abscisión permitió la retención del grano hasta la cosecha y la consecuente estabilización del rendimiento productivo. No obstante, esta fijación genética no se ha consolidado de manera homogénea en todas las gramíneas de interés agronómico, persistiendo como un carácter silvestre en especies forrajeras cuya mejora es aún incipiente.

Dentro de este grupo se encuentra el género *Panicum* (*Poaceae*, *Panicoideae*), que reúne especies de importancia productiva y ecológica. Particularmente, *Panicum coloratum* L. (mijo perenne) se ha consolidado como un recurso estratégico para regiones semiáridas debido a su notable plasticidad fenotípica, que le permite prosperar bajo condiciones ambientales adversas y diversos tipos de suelos. A pesar de su potencial y persistencia, la adopción de *P. coloratum* a gran escala se encuentra condicionada por la interacción entre una marcada dehiscencia y una maduración desuniforme de la panoja. Estudios anatómicos demostraron que la especie presenta un sistema de abscisión estructuralmente complejo, que favorece la separación temprana de las semillas y reduce la eficiencia de cosecha, obteniéndose granos de menor peso y bajo vigor germinativo.

La manifestación de este rasgo está intrínsecamente ligada a la arquitectura genética de la especie; su naturaleza predominantemente alógama y su condición tetraploide ($4n$) sustentan una vasta variabilidad poblacional que, si bien es ventajosa para la adaptación ambiental, dificulta la estabilización de caracteres de retención de semilla mediante métodos de selección convencionales.

Frente a esta limitante, el estudio de la base molecular de la dehiscencia constituye una alternativa valiosa para avanzar en la comprensión y manejo de este carácter. En gramíneas emparentadas se han identificado genes clave tales como *SvLes* y *Sh1*, que codifican para factores de transcripción que regulan la formación y activación de la zona de abscisión, cuyas mutaciones fueron determinantes para anular la dehiscencia.

En el presente trabajo se realizó una investigación en la literatura disponible para conocer los genes que en gramíneas han sido encontrados asociados con el carácter dehiscencia, luego exploraron los genomas de *Panicum* en busca de homólogos, y finalmente se diseñaron cebadores específicos que permitieron amplificar exitosamente estos genes en dos poblaciones con diferentes porcentajes de retención de semillas de la especie en estudio *P. coloratum*. Los amplicones de cada individuo fueron secuenciados con la tecnología de Oxford Nanopore que permitió identificar variantes presentes en cada una de las muestras. El análisis de estas secuencias génicas permitió definir haplotipos asociados a cada población estudiada y patrones de mutación característicos de la especie.

Estos resultados aportan información estratégica que, se espera, pueda dar lugar al desarrollo de nuevas variedades con la intención de transformar un recurso forrajero resiliente en un cultivo de alta eficiencia productiva, capaz de responder a las demandas de los sistemas agropecuarios nacionales.

INTRODUCCIÓN

La dehiscencia o abscisión se define como el proceso biológico predecible y altamente regulado mediante el cual las plantas desprenden órganos maduros, como semillas, frutos u hojas (Burson et al., 1983). En el grupo de las gramíneas, este fenómeno constituye un rasgo adaptativo clave en especies silvestres, ya que favorece la dispersión de la progenie a través de sus semillas, y la colonización de nuevos ambientes (Hodge & Kellogg, 2016; Lin et al., 2012).

Este proceso depende de una zona de abscisión (ZA) específica, conformada por células pequeñas con citoplasma denso, generada previa a la separación física de los tejidos. Se activa como respuesta a una compleja red de señales que implica la alteración en el balance hormonal (Lifschitz et al., 2022; Thurber et al., 2011), específicamente, la reducción en los niveles de auxina, que inhibe la diferenciación celular en la ZA, y un aumento subsecuente en la producción de etileno, que desencadena la actividad de enzimas hidrolíticas encargadas de degradar la lámina media y descomponer las paredes celulares, y la consecuente liberación de la semilla (Burson et al., 1983; Hodge & Kellogg, 2016)(Lifschitz et al., 2022).

Desde la perspectiva agronómica, la dehiscencia representa una de las principales barreras para la domesticación. Retener semillas de cultivares de alto valor es económicamente relevante para que los cultivos sean viables de comercializar (Lin et al., 2012)) (Liu et al., 2022). La historia de los cereales cultivados muestra que la selección artificial favorece mutaciones que inhiben este mecanismo, permitiendo que las semillas permanezcan unidas al raquis hasta la cosecha, evento que fue determinante en la evolución de cultivos como arroz, trigo, maíz y sorgo (Doebley, 2006).

Diversos estudios en cereales han demostrado que la modificación o pérdida funcional de la ZA permitió la retención del grano hasta la cosecha y la consecuente estabilización del rendimiento productivo (Doebley, 2006) (Lin et al., 2012)) (Liu et al., 2022) (Konishi et al., 2006). No obstante, esta fijación genética no se ha consolidado de manera homogénea en todas las gramíneas de interés agronómico, persistiendo como un carácter silvestre en especies forrajeras cuya mejora es aún incipiente.

Dentro de este grupo destaca el género *Panicum* (Poaceae, Panicoideae), que es uno de los más diversos y complejos entre las gramíneas. Sus especies presentan

adaptaciones evolutivas críticas para colonizar ambientes marginales, destacando el metabolismo fotosintético C4. Gracias a esta especialización fisiológica, la planta logra una eficiencia hídrica y térmica superior, lo que le permite mantener una alta tasa de producción de biomasa en condiciones de alta radiación y sequía donde otras especies verían limitado su crecimiento (Cardamone et al., 2018).

Morfológicamente, se caracteriza por presentar inflorescencias en panojas compuestas por espiguillas que protegen una flor superior hermafrodita y fértil, arquitectura que define el contexto anatómico donde se desarrolla la zona de abscisión (Burson et al., 1983; Hodge & Kellogg, 2016).

Particularmente, la especie *Panicum coloratum* L. (mijo perenne o pasto Klein), se destaca como una gramínea forrajera estival originaria de África con una elevada plasticidad fenotípica (Petruzzi et al., 2003). Su introducción en Argentina respondió a la necesidad de incorporar alternativas capaces de sostener la productividad ganadera que se ve trasladada a suelos con escasez edáfica, debido al avance de la agricultura en las mejores tierras del país. En este contexto, el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Estación Experimental Agropecuaria (INTA EEA) de Rafaela, estudia a *P. coloratum* como una solución tecnológica fundamental, debido a su capacidad para producir forraje de calidad en ambientes degradados (Tomás et al., 2016).

Pese a sus virtudes, la dehiscencia, es un problema crítico que causa pérdidas masivas; se estima que en cosechas de una sola pasada solo se recupera el 6% del total de semillas producidas por la planta (Young 1993). Además, su maduración es indeterminada, lo que complica la obtención de semillas de alta calidad. Diversos estudios informan que el principal causante podría ser un sistema de "doble cerrojo", es decir, dos capas de abscisión funcionalmente diferenciadas que actúan en momentos distintos del desarrollo (Burson et al., 1983; Hodge & Kellogg, 2016); Petruzzi et al., 2003):

✚ Capa Primaria (causante del 81% de las pérdidas): Se ubica en la base de la espiguilla. Su activación es química; las células empiezan a desintegrarse apenas 8 días después de la floración, mucho antes de que la semilla madure.

✚ Capa Secundaria (causante del 19% restante de las pérdidas): Se ubica en el tallo interno (raquilla). Aquí el desprendimiento es mecánico: el tejido se vuelve rígido y quebradizo entre los días 12 y 15, provocando que la semilla se rompa y caiga sola.

Este desprendimiento temprano y desperejo va en detrimento de una cosecha uniforme y eficiente (Burson et al., 1983; Hodge & Kellogg, 2016); Petruzzi et al., 2003; Tomás et al., 2016; Young, 1993).

La ineficiencia de la selección tradicional en *P. coloratum* radica en su complejidad genética. Diversos estudios citogenéticos hacen referencia a un número variable de cromosomas y una constitución genómica de la especie no del todo establecida. Al comparar la citología y el modo reproductivo de *P. coloratum* con especies afines, Hutchison y Bashaw (A Summary of Current Program and Preliminary Report of Progress: Grain and Forage Crops Research of the United States Department of Agriculture and Related Work of the State Agricultural Experiment Stations, 1967) hallaron que ciertas accesiones tetraploides poseían un origen alotetraploide, evidenciado por la disparidad en el tamaño de sus cromosomas. En contraste, otras accesiones (var. makarikariense) presentaron cromosomas de tamaño homogéneo, característica vinculada a un origen autotetraploide. Por su parte, Pritchard y De Lacy (Pritchard & Lacy, 1974) identificaron una variación cromosómica de $2n = 18, 36, 45$ y 54 . Sus ensayos de hibridación indicaron una estrecha relación entre estos niveles de ploidía, sugiriendo que se trata de aloploiploides o autoploiploides compatiblemente diploidizados.

En un estudio realizado con materiales de la colección de la var. makarikariense del INTA Rafaela, se reportó un número cromosómico de $2n = 36$ para la totalidad de las plantas evaluadas (Armando et al., 2014). Asimismo, la segregación de alelos mediante microsatélites (SSR) sugirió una naturaleza autotetraploide, aunque se requieren investigaciones adicionales para profundizar en este aspecto (Almada, 2018).

La coexistencia de diversos niveles de ploidía y la limitada información sobre sus relaciones genéticas han dificultado la clasificación taxonómica de *P. coloratum*, resultando su división en diferentes subgrupos. *P. coloratum* es una especie altamente polimórfica en términos morfológicos y de hábito de crecimiento, por lo que se la define como un "complejo taxonómico" (Hutchison et al., 1964, Tischler & Ocumpaugh, 2004). Su condición de planta tetraploide y alógama deriva en una elevada variabilidad que obstaculiza la fijación de caracteres de interés agronómico, tal como la retención de semillas (Armando et al., 2017; Tomás et al., 2016).

El estudio de gramíneas de la subfamilia Panicoideae ha permitido identificar genes reguladores conservados que codifican factores de transcripción. Estas proteínas

controlan la expresión de genes estructurales responsables de formar y activar la ZA (Hodge & Kellogg, 2016). Dentro de este marco, emergen, como candidatos de gran relevancia, los siguientes genes

✚ Sh1: Es un factor de transcripción de la familia YABBY, esencial para la diferenciación de los meristemas en la base de la espiguilla. Su función es coordinar la formación de la capa de abscisión; mutaciones en este gen inhiben la formación de dicha capa en sorgo, arroz y *Setaria italica* (Lin et al., 2012, Liu et al., 2022). Mutantes de *S. bicolor* en el gen Sh1 noqueado pierden el carácter dehiscencia (Yu et al., 2023). Representa el principal candidato para desentrañar la base genética de la capa de abscisión primaria en *P. coloratum*.

✚ SvLes1: Caracterizado en *Setaria viridis*, este gen regula la lignificación de los tejidos de unión. A diferencia de los genes que suprimen la ZA, el SvLes1, que codifica un factor de transcripción de la familia MYB con dos dominios de unión al ADN, aporta resistencia mecánica a la raquilla mediante un refuerzo de las paredes celulares, vinculándose posiblemente a la dinámica de la capa de abscisión secundaria (Mamidi et al., 2020). En su versión domesticada (*S. italica*), este gen se encuentra interrumpido por la inserción de un retrotransposón (copia38), que anula su función y reduce el desgrane (Mamidi et al., 2020).

✚ qSH1: Factor de transcripción del tipo homeobox, esencial para la diferenciación celular de la ZA en arroz (Konishi et al., 2006).

✚ GL4: Factor de transcripción que regula la proliferación celular en dicha zona (Chow et al., 2023).

Como parte del presente trabajo, se realizó una evaluación bioinformática de estos candidatos mediante la descarga de secuencias de referencia y su posterior alineamiento con genomas disponibles de *Panicum*. Sin embargo, no se hallaron regiones conservadas ni ortólogos claros para qSH1 y GL4 dentro del género. Por consiguiente, aunque dichos factores participan en el proceso en otras gramíneas, este estudio prioriza a Sh1 y SvLes1 como los ejes principales de las dos estrategias biológicas de retención investigadas.

Dada la ausencia de una caracterización previa en *P. coloratum*, la disponibilidad de genomas de referencia de especies estrechamente emparentadas como *P. miliaceum* (Wang et al., 2024), *P. virgatum* y *P. hallii* ofrece una oportunidad estratégica. El uso de estos tres genomas permite realizar un análisis comparativo de ortología más robusto,

facilitando la identificación de los genes mencionados, el estudio de sus regiones promotoras y la detección de polimorfismos.

El presente trabajo, plantea un análisis bioinformático para estudiar genes relacionados con el carácter dehiscencia. El mismo fue validado mediante la amplificación por PCR y la secuenciación de genotipos con diferentes valores de retención de semillas. El estudio se centró en dos poblaciones representativas: SR (TEM-SR1) y EM (El Mirador) (Young, 1993). La población SR, desarrollada en Texas mediante dos ciclos de selección recurrente para resistencia al desgrane, presenta una retención superior del 26% a los 42 días tras la antesis (Young, 1993; Petruzzi et al., 2003). En contrapartida, la población EM exhibe una alta dehiscencia, reteniendo únicamente el 14% de sus semillas en el mismo periodo (Burgos et al., 2018). La identificación de variantes genéticas en estas poblaciones, permitirá avanzar hacia el conocimiento de este carácter, lo cual puede dar lugar al desarrollo de programas de mejoramiento de pasturas.

OBJETIVOS

Objetivo general

Identificar y caracterizar la base genética asociada al control de la dehiscencia de semillas en la gramínea forrajera perenne *P. coloratum*, mediante el análisis de genes candidatos y su variabilidad en genotipos contrastantes.

Objetivos específicos

1. Realizar un relevamiento y análisis crítico de la bibliografía disponible sobre el carácter dehiscencia en *P. coloratum* y en especies de gramíneas filogenéticamente relacionadas.
2. Identificar en bases de datos públicas, genes homólogos a los asociados al control de la dehiscencia de semillas en especies modelo y cultivadas.
3. Analizar la presencia, el número de copias y la organización genómica de los genes candidatos en los genomas de referencia de *Panicum*, así como explorar sus regiones promotoras y la existencia de polimorfismos en comparación con otras especies.
4. Amplificar mediante la técnica de PCR los genes candidatos en genotipos de *P. coloratum* contrastantes en relación con el carácter de dehiscencia.
5. Secuenciar los productos de PCR y evaluar la variabilidad alélica presente en los individuos analizados, y su posible asociación con el carácter de retención de semillas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Relevamiento y análisis crítico de la literatura científica

Se realizó una búsqueda exhaustiva en bases de datos científicas de referencia (*PubMed*, *Scopus*, *Web of Science* y *Google Scholar*). Se utilizaron ecuaciones de búsqueda con operadores booleanos, empleando términos en español e inglés como: “seed shattering”, “abscission zone development”, “transcription factors”, “*Panicum*”, y el nombre de los genes candidatos reportados en la subfamilia Panicoideae (“*Sh1*”, “*SvLes1*”, “*qSH1*” y “*GL4*”).

Se priorizaron artículos originales y revisiones bibliográficas publicadas en los últimos 20 años. El análisis se centró en estudios de genómica funcional y comparativa realizados en especies filogenéticamente relacionadas, tales como *Setaria Viridis*, *Sorghum bicolor*, *Oryza sativa* y *glaberrima* y, el género *Panicum*, con el fin de identificar mecanismos moleculares conservados.

La información fue procesada considerando los modelos de domesticación descritos en cereales y la particularidad anatómica del sistema de “doble cerrojo” de *P. coloratum*.

Identificación y obtención de secuencias de genes candidatos en bases de datos públicas

A partir de los hallazgos del relevamiento bibliográfico, se realizó la búsqueda e identificación de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de los genes candidatos, así como también la de los genomas de referencia, seleccionando aquellas de genes ortólogos con funcionalidad validada en especies de la subfamilia *Panicoideae* y otras gramíneas modelo filogenéticamente cercanas a la especie, tales como *Sorghum bicolor* para el gen *Sh1* (Gen ID: SORBI_3010G072300), *Setaria viridis* para el gen *SvLes1* (Gen ID: 117855643), *Oryza sativa* para el gen *qSH1* (Gen ID: 4324855) y *Oryza glaberrima* para *GL4* (Gen ID: 127769585).

La obtención de las secuencias se realizó mediante el acceso a repositorios públicos curados. Se utilizó principalmente la plataforma *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), consultando las bases de datos GenBank y RefSeq para obtener secuencias genómicas completas, ARNm y proteínas, y la base de datos Phytozome. Al mismo tiempo se verificaron las anotaciones genómicas y la estructura de exones e intrones de los genes seleccionados en especies modelo.

Finalmente, las secuencias obtenidas fueron almacenadas en formato FASTA para su posterior procesamiento.

Este listado de secuencias de referencia sirvió como base para la búsqueda de homología y el análisis del número de copias en los genomas de *P. miliaceum* (NCBI Taxonomy ID: 4540, GenBank: GCA_038442765.1), *P. virgatum* (NCBI Taxonomy ID: 38727, GenBank: JABWAI000000000.1) y *P. hallii* (NCBI Taxonomy ID: 206008, GenBank: NCQW000000000.2).

Búsqueda de genes homólogos en genomas de referencia

Una vez obtenidas las secuencias de referencia, se procedió al análisis de los genomas del género *Panicum* mediante herramientas bioinformáticas estructurales y comparativas.

Para estimar el número de copias y la presencia de variantes parálogas se realizaron búsquedas de tipo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) utilizando los algoritmos BLASTn (nucleótidos) y BLASTp (proteínas), en los genomas de referencia de *P. miliaceum* (Wang et al., 2024), *P. virgatum* y *P. hallii*. Estableciendo como criterio de filtrado un E-value $< 1e^{10}$ y porcentaje de identidad $> 80\%$.

Posteriormente, se realizó la caracterización molecular de los genes identificados (número y tamaño de exones e intrones) interrogando las bases Phytozome y NCBI. Se comparó la estructura de los genes candidatos entre las especies de *Panicum* para evaluar la conservación de la estructura génica.

Por último, para cada gen candidato identificado, se extrajeron las secuencias flanqueantes de 1500 pares de bases (pb) río arriba y 100 pb río abajo, considerando como punto de referencia el sitio de inicio de la traducción y el codón de stop, respectivamente. La primera región fue analizada para identificar elementos reguladores en cis y sitios de unión a factores de transcripción. Asimismo, se realizaron alineamientos múltiples de secuencias (MSA) utilizando los softwares Aliview, BioEdit y MAFFT. Este último tiene salidas visuales de gráficas tipo *dot plot*. Este análisis comparativo permitió detectar polimorfismos, específicamente SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) e Indels (insertions/deletions), identificar bloques de secuencias altamente conservadas entre los genomas de referencia estudiados y diseñar cebadores específicos para el posterior análisis *in vitro*.

Diseño de cebadores para genes candidatos

El diseño de cebadores, para la amplificación de los genes candidatos en *P. coloratum*, se realizó utilizando como referencia las regiones de los genomas anteriormente mencionados que presentaban homología con los genes de las especies relacionadas, *S. viridis* y *S. bicolor*. Para esto se identificaron las regiones conservadas mediante alineamientos múltiples y se diseñaron los cebadores listados en la Tabla 1, empleando la herramienta Primer3Plus, siguiendo criterios estándar de longitud, temperatura de *melting* (T_m), contenido de GC y ausencia de estructuras secundarias. Finalmente, la especificidad de los mismos fue evaluada *in silico* mediante Primer-BLAST antes de su validación experimental.

Tabla 1. Cebadores utilizados.

CEBADORES	NOMBRE	SECUENCIA (5' → 3')	T _m (°C)	TAMAÑO DEL PRODUCTO (pb)
gen <i>SvLes1</i>	<i>SvLes1</i> Fw	TCTTTGCTTACTCCCCAGGG	63,1	2397
	<i>SvLes1</i> Rev	TCTAGATTCCTCCTCCCCACT	63,3	
gen <i>Sh1</i>	<i>Sh1</i> Fw	ATAAACCTAATGCTA K TCTTTCGTTAT*	53,3	4940
	<i>Sh1</i> Rev	TAAGGTAGTTTT S YTTTCTAAAATTAC **	51,5	

K**: G o T, *S**: C o G, **Y**: C o T.

Material vegetal

Se utilizaron dos poblaciones de *P. coloratum* con diferente grado de retención de semillas a los 42 días post-antésis: 9 individuos de EM con 14 % de retención (Burgos et al., 2018) y 10 individuos de SR con 26% de retención (Young, 1993). Se recolectaron hojas jóvenes para la extracción de ADN genómico. El material vegetal fue conservado a -80° hasta su procesamiento para minimizar la degradación del ADN.

Extracción de ADN genómico

Se utilizó el protocolo descrito en Kang et al., 2023 (Kang et al., 2023). Se pesaron 1000 mg de tejido vegetal joven de cada individuo señalado en la Figura 1 de cada población. Se limpió cada hoja con alcohol y se homogeneizó en nitrógeno líquido. Posteriormente se resuspendió en 10 ml de buffer de aislamiento de núcleos (IB), compuesto por 15 mM Tris-HCl pH 9.5, 10 mM EDTA, 130 mM KCl, 20 mM NaCl y 8% polivinilpirrolidona (PVP)-40. Luego de mezclar el tejido vegetal homogeneizado con el buffer IB, se agregaron 0.1% y 7.5% de Triton X-100 y β -mercaptoetanol, respectivamente para facilitar la lisis de las membranas celulares y de los orgánulos, manteniendo intacta la membrana nuclear. Las muestras se incubaron en hielo por 10 minutos.



Figura 1. Selección de genotipos de *P. coloratum* para el análisis de dehiscencia. Se muestra la selección de 10 individuos de la población más resistente al desgrane (SR) y 9 individuos de la población menos resistente (EM), provenientes del germoplasma conservado en la EEA INTA Rafaela. Los individuos seleccionados para la extracción de ADN se encuentran nombrados y señalados en rojo.

La suspensión se filtró empleando filtros de papel de 40 μ m para eliminar los detritos celulares. El resultante se colectó en tubos de 10 ml y se le agregaron 100 μ l de Triton X-100 para obtener la suspensión nuclear. Este proceso lisa las células y membranas de organelas pero no la membrana nuclear (Peterson et al., 1997). Los núcleos se separaron mediante centrifugación a $3000 \times g$ durante 10 minutos a 4°C, descartando el sobrenadante. El pellet nuclear se resuspendió en 2.5 ml buffer de lisis Carlson (Carlson et al., 1991), compuesto por 2% CTAB, 100 mM Tris-HCl pH 9.5, 20 mM EDTA, 1.4M NaCl y 1.2% PEG 4000.

A la mezcla se le agregaron 6.25 μ l de β -mercaptoetanol para desnaturalizar proteínas globulares (Jadhav et al., 2015). Para garantizar una resuspensión completa y eficiente, la mezcla se incubó a 65°C por un periodo de 90 minutos. Se agregó un volumen igual, 2.5 ml de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1 v/v), lo cual permitió la partición de

lípidos, proteínas no polares y restos celulares hacia la fase orgánica. Tras una nueva centrifugación a $3000 \times g$ durante 10 minutos a 4°C , se transfirió la fase acuosa superior a un tubo nuevo.

La precipitación del ADN se llevó a cabo añadiendo una décima parte del volumen de acetato de sodio (NaOAc) 3 M y un volumen equivalente de isopropanol a temperatura ambiente. Esto último es una condición crítica para evitar la coprecipitación de polisacáridos junto con el ácido nucleico. La precipitación se incubó una noche a -20°C .

Finalmente, el ADN precipitado se separó mediante centrifugación, durante 10 minutos a $3000 \times g$. El pellet se lavó dos veces con etanol frío al 70%, se centrifugó y descartó el sobrenadante. El pellet se secó a temperatura ambiente antes de su resuspensión final en $50 \mu\text{L}$ de agua libre de nucleasas.

Cuantificación y control de calidad del ADN

La pureza y concentración de las extracciones genómicas de ADN se evaluaron mediante espectrofotometría en NanoDrop. Para el análisis de calidad, se utilizó un criterio basado en ratios A260/280 y A260/230 mayor o igual 1,5; donde el primer indicador asegura una baja presencia de proteínas y el segundo la eliminación de carbohidratos o solventes orgánicos durante el proceso de purificación.

Amplificación de genes candidatos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

En el caso de los genes en estudio, *SvLes1* y *Sh1*, las reacciones de amplificación se llevaron a cabo utilizando la polimerasa de alta fidelidad Q5® High-Fidelity Master Mix, Master Mix (New England Biolabs). Para cada reacción de $25 \mu\text{L}$, se utilizaron $12,5 \mu\text{L}$ de la master mix, $0,5 \mu\text{M}$ de cada cebador y $4 \mu\text{L}$ de ADN molde.

Los protocolos de amplificación fueron optimizados para cada gen con el fin de aumentar la especificidad y abundancia de los productos. Para el gen *SvLes1* el protocolo de amplificación consistió en: precalentamiento a 98°C durante 5 min; 35 ciclos de 98°C durante 10 segundos, 50°C durante 15 segundos y 72°C durante 2.5 minutos; con una extensión final a 72°C durante 5 minutos. En el caso del gen *Sh1* el tiempo de extensión se aumentó hasta 4 minutos.

Los productos de amplificación fueron resueltos por electroforesis en soporte horizontal de geles de agarosa al 0,8% para los amplicones de *SvLes1* y *Sh1*. La corrida

se realizó a 100 Volts constante en Buffer TAE 1X por 60 minutos. La tinción se realizó con Gel Red. En cada gel de agarosa se sembraron 2 μL de los productos de amplificación, y 3 μL de marcador de peso molecular 1 Kb (Inbio Highway).

Purificación de los productos de PCR

Los amplicones fueron purificados utilizando *beads* magnéticas AMPure XP Beads (Beckman Coulter) en una proporción 1X para eliminar dímeros de cebadores y reactivos residuales antes de su procesamiento posterior. Las *beads* y cada una de las muestras se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente en agitación. Luego cada tubo se posicionó en el rack magnético hasta alcanzar la clarificación total, y se removió el sobrenadante. Con el tubo en el rack, se lavaron las *beads* agregando 200 μL de etanol 80% y se removió el sobrenadante. Este lavado se repitió dos veces. El pellet de *beads* se dejó secar 30 segundos, se agregaron 12 μL de agua libre de nucleasas y se incubó 2 minutos a temperatura ambiente. El tubo se ubicó en el rack magnético y se tomó el sobrenadante donde se encuentra el ADN eluido.

Cuantificación del ADN purificado

La concentración de los productos de PCR purificados fue realizada mediante espectroscopia de fluorescencia (fluorómetro Denovix) utilizando el kit Broad range (Denovix) que permite determinar concentraciones de ADN doble hebra en el rango de concentraciones entre 0,1 – 2000 $\text{ng}/\mu\text{L}$. Para ello, en un tubo de 0,5 ml de capa delgada se mezcló 1 μL de ADN con 200 μL de reactivo de trabajo (196 μL de buffer, 2 μL de sonda, 2 μL de *enhancer*) y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. La concentración se determinó en fluorómetro Denovix con el programa de lectura de ADN doble hebra.

Preparación de bibliotecas y secuenciación

La secuenciación de los productos de PCR se realizó mediante tecnología de lectura larga de Oxford Nanopore Technologies (ONT). La preparación de las bibliotecas se llevó a cabo siguiendo el protocolo de *Ligation Sequencing Amplicons - Native Barcoding Kit 24 V14 (SQK-NBD114.24) (NBA_9168_v114_revT_02, 2025)*. El procedimiento se inició con la cuantificación de los amplicones purificados, estandarizando una cantidad inicial de 100 fmoles por muestra para asegurar una carga óptima en la *flow cell*.

A cada muestra se le realizó la reparación de extremos y adenilación (*End-prep*) utilizando el sistema enzimático NEBNext® Ultra™ II (New England Biolabs), incubando a 20°C durante 5 minutos y 65°C durante otros 5 minutos. Cada muestra reparada fue purificada con 1X de AMPure XP Beads y eluida en 10 µL y 1 µL fue cuantificado con Nanodrop. La reacción de ligación con *barcode* nativos específicos (NB01-24) se llevó a cabo con la enzima Blunt/TA Ligase. Este paso permite el multiplexado de las muestras en una única corrida. Tras la ligación individual, las muestras se combinaron en un pool y se purificaron con 0.4X AMPure XP Beads, eluyendo en un volumen final de 30 µL.

Sobre este *pool*, se procedió a la ligación de los adaptadores de secuenciación (NA) empleando Quick T4 DNA Ligase. La biblioteca final fue purificada con 0.4X AMPure XP, utilizando buffer de lavado específicos (SFB) para optimizar la recuperación de los fragmentos largos. Finalmente, alrededor de 1461,15 fmoles de la biblioteca con los buffers accesorios adecuados fueron cargados en una *flow cell* R10.4.1 previamente acondicionada. Se monitoreo la corrida en tiempo real mediante el software MinKNOW para asegurar la generación de datos suficientes para el análisis.

Análisis bioinformático e identificación de variantes alélicas

Los datos crudos generados por la secuenciación ONT fueron utilizados como input de la herramienta *dorado* (Dorado, 2026) para realizar el *basecalling* y el *demultiplexado*. Lo obtenido, se procesó con FASTQ, aplicando un filtro de calidad de q mayor o igual a 15 y una longitud de lecturas entre 2000 y 4000 pb. Se utilizó el algoritmo minimap2 (Li, 2018), para el mapeo de estas lecturas, especificando que se realice para secuencias de ONT. Como estrategia para aumentar la precisión del alineamiento, dada la cercanía taxonómica con *P. coloratum*, se utilizaron como referencias las secuencias de los genes candidatos identificadas previamente en el genoma de *P. miliaceum*.

Para la identificación de variantes alélicas (SNPs e InDels), se empleó SAMtools (Li et al., 2009), generando archivos en formato VCF (*Variant Call Format*), que contienen la información detallada de cada posición genómica donde se observan diferencias (SNPs, inserciones o deleciones) entre las muestras y la referencia. Posteriormente se realizaron consensos para cada *barcode*.

El análisis bioinformático subsiguiente fue diseñado para identificar el perfil mutacional de *P. coloratum* en ambas poblaciones estudiadas. El procesamiento posterior

se realizó mediante *scripts* utilizando Biopython, ejecutados en el entorno de Google Colab. Primeramente, se realizó un filtrado de las variantes detectadas en los VCF, se aplicó un filtro dirigido exclusivamente a las posiciones genómicas que presentaron discrepancias respecto a la secuencia de referencia. A partir de la información contenida en el campo AD (profundidad alélica) de los archivos VCF, se calculó la proporción entre las variantes detectadas para cada muestra. Se seleccionaron únicamente aquellas posiciones donde dicha proporción se situó en el rango [0.1, 10], descartando artefactos técnicos. Posteriormente, se realizó un proceso de agrupación de mutaciones específicas por individuo, permitiendo reconstruir los alelos y variantes presentes en cada genotipo. Para asegurar la robustez biológica de los resultados, se analizó la frecuencia de aparición de cada combinación, seleccionando únicamente los cuatro haplotipos más abundantes, permitiendo diferenciar las variantes genéticas reales de posibles artefactos de PCR o errores estocásticos de secuenciación, garantizando que solo las secuencias con mayor representatividad poblacional avancen a las etapas de generación de consenso y traducción.

A través de la tabulación de estas variantes, se estructuró una matriz de datos que registra la frecuencia de mutación en cada posición para cada población. Al normalizar estos datos considerando el tamaño de cada grupo, fue posible categorizar las mutaciones según su tipo y su ubicación funcional (exones, intrones o regiones reguladoras). Este enfoque permitió definir con precisión el perfil genético de cada individuo. Para contrastar el perfil mutacional entre las poblaciones, se realizó un análisis comparativo que permitió determinar tanto las posiciones genómicas conservadas como aquellas que presentan una alta tasa de divergencia. Para ello, se generaron perfiles gráficos que mapean la densidad y el tipo de variantes a lo largo de cada gen.

El flujo concluyó con un análisis comparativo de ADN y aminoácidos mediante alineamientos múltiples, permitiendo evaluar la homología y divergencia entre diferentes poblaciones y especies.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Relevamiento y análisis de determinantes genéticos de la dehiscencia

El estudio de *P. coloratum* cobra una relevancia fundamental en el escenario actual de cambio climático, debido a su excepcional capacidad de adaptación a ambientes marginales. Como gramínea C4 de ciclo estival, se destaca por su resiliencia ante el estrés hídrico, la salinidad y el anegamiento, lo que la posiciona como un recurso forrajero clave para la diversificación de sistemas productivos (Pittaro, M., 2017; Cardamone, L., 2018). No obstante, el éxito de su adopción se encuentra limitado por rasgos propios de su naturaleza silvestre, específicamente la dehiscencia natural de sus semillas y una maduración desuniforme, factores que reducen drásticamente la eficiencia de cosecha (Tomás, M., 2016).

Esta especie se caracteriza por una notable complejidad genética y morfológica. Como planta predominantemente alógama, genera una progenie con alta heterocigosis, lo que se traduce en una gran variabilidad fenotípica (Armando, L., 2017). A nivel taxonómico, esta diversidad se organiza en dos variedades con nichos ecológicos contrastantes: la *var. makarikariense*, adaptada a suelos arcillosos y periodos de inundación, y la *var. coloratum*, con mayor tolerancia al frío y aptitud para suelos arenosos (Burgos, E., 2018; Lifschitz, M., 2022). Esta heterogeneidad se refleja también en su citogenética, presentando diversos niveles de ploidía ($2n = 18, 36, 45, 49, 63$), aunque el estado tetraploide ($2n=4x=36$) es el más frecuente (Armando, L., 2017; Pritchard, A., 1974).

Dada la carencia de un genoma de referencia propio y el relativo desconocimiento molecular de la especie en comparación con otros cereales (Burgos, E., 2018), la caracterización de *P. coloratum* en este trabajo requirió un enfoque de genómica comparativa. Para ello, se seleccionaron tres especies cercanas como pilares de referencia: *P. miliaceum*, *P. virgatum* y *P. hallii* (Mamidi et al., 2020; Wang, H., 2024; Valdés-Reyna et al., 2009). El género *Panicum*, perteneciente a la subfamilia *Panicoideae*, constituye un mosaico de estrategias adaptativas. *P. virgatum* (switchgrass) aporta un modelo sólido de resiliencia y producción de biomasa, mientras que *P. hallii* sirve como un sistema simplificado para estudiar las respuestas al estrés hídrico (Valdés-Reyna et al., 2009). Con respecto a la dehiscencia, especies como *P. maximum* (pasto Guinea) representan el extremo de la inestabilidad con una dehiscencia sumamente activa apenas 10 días tras la

antes de la domesticación (Valdés-Reyna et al., 2009), mientras que *P. miliaceum* (mijo escoba) es el modelo de éxito en la domesticación, habiendo fijado la retención de semillas (Wang, H., 2024).

Además, *P. miliaceum* constituye la herramienta maestra en este diseño metodológico ya que recientemente se ha logrado un ensamblaje genómico de telómero a telómero (T2T) y sin huecos (*gaps*), lo cual ofrece una precisión sin precedentes para la identificación de genes candidatos (Wang, H., 2024). Esta comparación es especialmente valiosa para abordar el fenómeno de la dehiscencia.

Poder contrastar las secuencias de *P. coloratum* con las de sus parientes domesticados y silvestres permite identificar las divergencias nucleotídicas y estructurales que subyacen a este rasgo agronómico crítico.

El desgrane de semillas (dehiscencia) es un factor crítico que reduce drásticamente el rendimiento de semillas realizado en las gramíneas forrajeras, llegando a provocar pérdidas de hasta el 54% de las semillas maduras en el raigrás (*Lolium spp.*) (Kiesbauer, J., 2023). Desde una perspectiva de rentabilidad, retrasar la cosecha solo unos días puede reducir el rendimiento en un 40%, mientras que una cosecha anticipada para evitar estas pérdidas incrementa los costos de secado y compromete la calidad de la semilla, resultando en un bajo vigor de las plántulas (Kiesbauer, J., 2023).

A nivel genético y molecular, el control del desgrane no depende de genes aislados, sino de una red compleja de vías génicas y factores de transcripción que regulan el desarrollo de la ZA (Kiesbauer, J., 2023). Entre ellas se distinguen vías de regulación superiores (APETALA2), factores de transcripción del tipo homeobox (qSH1 y SH5, Konishi et al 2006) que inhiben la síntesis de lignina debilitando la unión de la semilla, factores de transcripción tipo MYB (SvLes, Sh4 y SHAT, Wu et al., 2017) que controlan la diferenciación celular, factores de transcripción de la familia YABBY (*Sh1*, Lin et al., 2012) identificados como responsables de la pérdida de la ZA en sorgo, arroz y maíz y finalmente señalización hormonal.

Las evidencias sugieren que los genes que controlan el desgrane han estado bajo selección paralela en múltiples cereales (Pickersgill 2018). Esto significa que sus ortólogos en *P. coloratum* son candidatos ideales para ser estudiados y/o editados genéticamente.

Identificación y análisis comparativo de genes candidatos a dehiscencia

Con el objetivo de identificar y caracterizar genes candidatos asociados al carácter de dehiscencia en *P. coloratum*, se realizó un análisis comparativo *in silico*, mediante *BLASTn*, a partir de genes previamente descritos en gramíneas modelo: *SvLes1*, *Sh1*, *qSH1* y *GL4* (Tabla 2). Dado que, para la selección de los mejores candidatos, se aplicó un criterio de filtrado basado en un E-value $< 1e^{10}$ y un porcentaje de identidad $> 80\%$ y que se consideró únicamente aquellos alineamientos cuya extensión fuera cercana al tamaño total de los genes de referencia (cobertura de consulta $> 90\%$), los genes *qSH1* y *GL4* fueron desestimados para este trabajo. El primero por una cobertura de consulta $< 90\%$ y el segundo por falta de secuencias significativamente similares. En contraparte, los genes *SvLes1* y *Sh1* mostraron una notable conservación respecto de la referencia, lo que permitió profundizar en su estudio.

Tabla 2. Identificación de Ortólogos de Dehiscencia en el linaje Panicum

Gen Candidato (Especie Modelo)	Especie de <i>Panicum</i>	Cromosoma	Longitud de Coincidencia (pb)	Identidad de Secuencia (%)
<i>SvLes1</i> (<i>Setaria viridis</i>)	<i>P. miliaceum</i>	Cr 5B	1301	86.44
	<i>P. miliaceum</i>	Cr 5A	948	86.62
	<i>P. virgatum</i>	Cr 5K	1343	86.56
	<i>P. virgatum</i>	Cr 5N	1319	86.00
	<i>P. hallii</i>	Cr 5	1296	86.83
<i>Sh1</i> (<i>Sorghum bicolor</i>)	<i>P. miliaceum</i>	Cr 9B	6970	81.16
	<i>P. miliaceum</i>	Cr 9A	5816	81.00
	<i>P. virgatum</i>	Cr 9K	5792	79.62
	<i>P. virgatum</i>	Cr 9N	6026	80.90
	<i>P. hallii</i>	Cr 9	6028	81.41
<i>qSH1</i> (<i>Oryza sativa</i>)	<i>P. miliaceum</i>	Cr 5B	163	84.66
	<i>P. miliaceum</i>	Cr 5A	163	82.21
	<i>P. virgatum</i>	Cr 5K	870	77.42

	<i>P. virgatum</i>	Cr 5N	621	80.42
	<i>P. hallii</i>	Cr 5	878	77.40
<i>GL4 (Oryza glaberrima)</i>	<i>P. miliaceum</i>	Cr 7B	1958	78.74
	<i>P. miliaceum</i>	Cr 7A	1927	79.89
	<i>P. virgatum</i>	Cr 7K	2744	83.48
	<i>P. virgatum</i>	Cr 7N	No se halló homología significativa	
	<i>P. hallii</i>	Cr 7	No se halló homología significativa	

Análisis del gen *SvLes1*

Utilizando la secuencia del gen *SvLes1* de *S. viridis* como referencia en análisis de *BLASTn*, se identificaron regiones homólogas en los genomas de *Panicum* analizados. En el genoma de *P. miliaceum*, se detectaron copias en la hebra complementaria en los cromosomas 5A y 5B (Figura 2A). De igual manera, en *P. hallii* se identificó un único locus en el cromosoma 5, también en la hebra complementaria (Figura 2C). Por el contrario, en *P. virgatum* las regiones homólogas identificadas en los cromosomas 5K y 5N presentaron un sentido directo (Figura 2B). Estos resultados evidencian la conservación del locus *SvLes1* dentro del grupo de las *paníceas*, aunque con variaciones en su orientación relativa.

En cuanto a la extensión de los alineamientos:

✚ *P. miliaceum*: En el cromosoma 5A, el alineamiento más largo abarcó desde la posición 364 hasta 1352 de *Setaria* (coordenadas cromosómicas 43.111.205 a 43.110.260), es decir abarca un 73,08% del gen. En el cromosoma 5B, el alineamiento se extendió desde la posición 3 hasta 1352 de la referencia (coordenadas 47.622.984 a 47.621.684), un 99,78% de coincidencias.

✚ *P. virgatum*: Los alineamientos más extensos abarcaron desde la posición 3 hasta 1352 de *Setaria*. En el cromosoma 5N, se localizaron entre las posiciones 9.758.191 y 9.759.509, mientras que en el cromosoma 5K se ubicaron entre 8.790.414 y 8.791.756. Es decir, abarcó 99,78% del gen para ambas secuencias.

✚ *P. hallii*: El alineamiento abarcó desde la posición 3 hasta 1352 de *Setaria*, entre las coordenadas genómicas 54.178.724 y 54.177.429 (99,78% del gen).

En todos los genomas se observaron alineamientos principales extensos junto a fragmentos adicionales de menor longitud, lo que sugiere la presencia de regiones conservadas distribuidas a lo largo del *locus*.

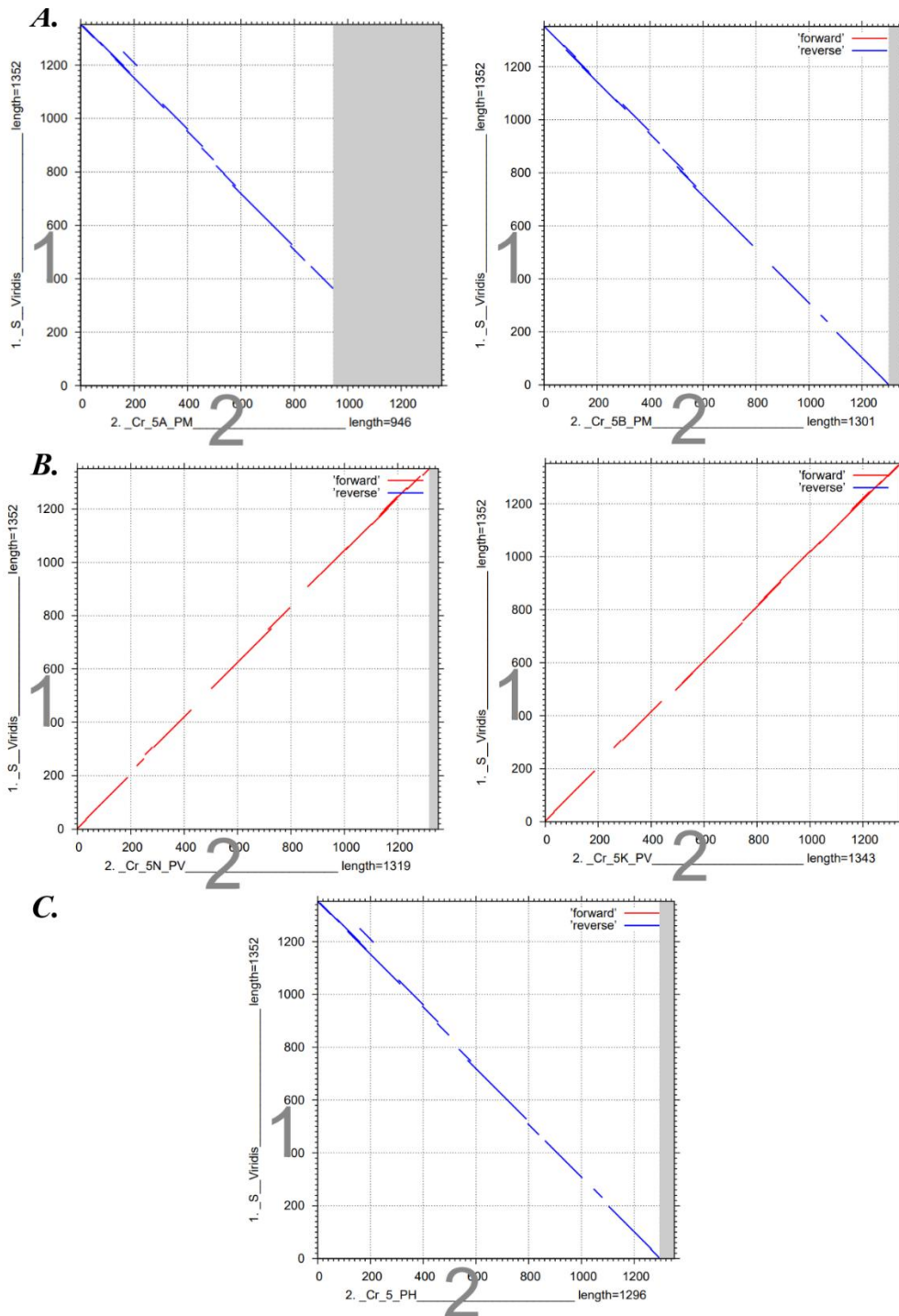


Figura 2. Gráficas de Dot plot comparativas entre *Panicum* y *S. Viridis*. Se evidencian las principales regiones de homología entre *SvLes1* y los cromosomas 5 de *Panicum*. **A.** Cromosoma 5A y 5B de *P. milliaceum*. **B.** Cromosomas 5N y 5K de *P. virgatum*. **C.** Cromosoma 5 de *P. hallii*. En rojo se indican alineamientos en el mismo sentido y en azul en sentido opuesto. El eje X representa la secuencia genómica de *P. miliaceum* (A), *virgatum* (B) y *hallii* (C) y el eje Y la secuencia de referencia de *S.viridis*.

Las regiones homólogas completas del gen *SvLes1* fueron extraídas de los cromosomas 5 de *P. miliaceum* (5A y 5B), *P. hallii* (locus único) y *P. virgatum* (5K y 5N), considerando tanto la región codificante como segmentos flanqueantes.

El análisis BLAST realizado entre las copias génicas de los diferentes genomas dentro de un mismo genotipo reveló altos niveles de conservación: un 94 % de identidad entre las secuencias candidatas de *SvLes1* en cada cromosoma de *P. miliaceum* (Figura 3A), y un 92 % de identidad entre los cromosomas de *P. virgatum* (Figura 3B).

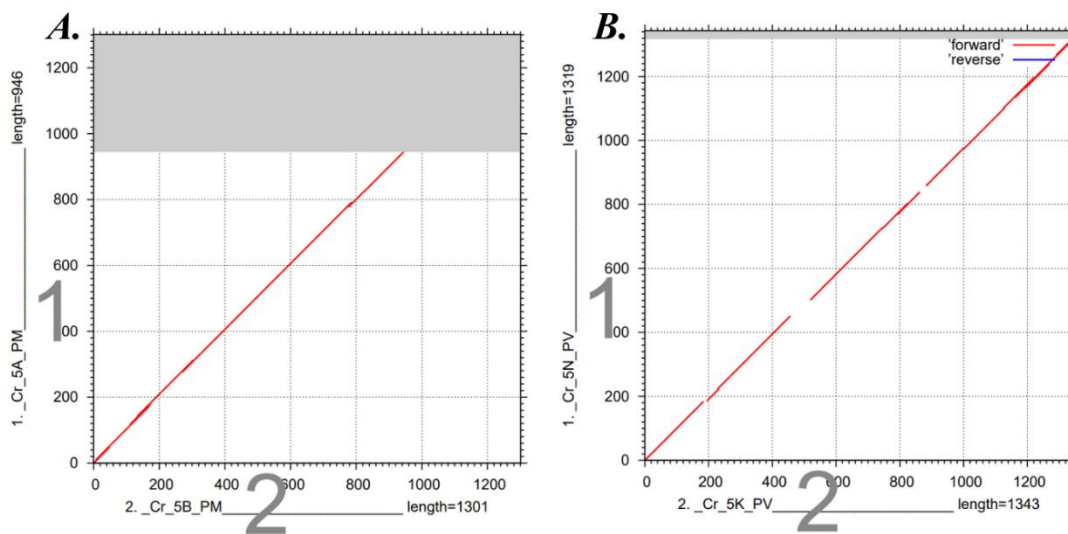


Figura 3. Comparación de los loci homólogos del gen *SvLes1*. **A.** Dot plot entre los cromosomas 5A y 5B de *P. miliaceum* (94% de identidad). **B.** Dot plot entre los cromosomas 5N y 5K de *P. virgatum* (92% de identidad). La diagonal principal representa un alineamiento directo, indicando que ambas secuencias conservan la misma dirección.

Análisis del gen *Sh1*

La secuencia del gen *Sh1* de *S. bicolor* fue utilizada como sonda en análisis *BLASTn* contra los genomas de *P. hallii*, *P. miliaceum* y *P. virgatum*. En todas las especies analizadas, se detectaron coincidencias significativas exclusivamente en los cromosomas del grupo 9. La distribución de los loci fue consistente con la ploidía de cada especie: se identificó un único alelo en *P. hallii*, mientras que en las especies poliploides (*P. miliaceum* y *P. virgatum*) se detectaron los homólogos de ambos genomas.

En cada caso, los análisis de *dot plot* (Figura 4) evidenciaron patrones diagonales inversos, sugiriendo que estos loci se presentaron en la hebra complementaria respecto a la secuencia de referencia de *S. bicolor*.

Detalles de los alineamientos genómicos:

✚ En *P. miliaceum*: Se identificaron dos copias homólogas en los cromosomas 9A y 9B (Figura 3A). El alineamiento más extenso en el cromosoma 9A cubrió desde la posición 2159 a 4863 (77,70% del gen) de *S. bicolor* (coordenadas 8.582.185 a 8.579.539 pb). En el 9B, el fragmento de mayor longitud abarcó de la posición 5348 a 7536 de la referencia (62,87% del gen) (coordenadas 9.983.797 a 9.981.595 pb).

✚ En *P. virgatum*: Las regiones homólogas se localizaron en los cromosomas 9K y 9N (Figura 3B). El alineamiento en el cromosoma 9N se extendió desde la posición 3216 a 4875 de *Sorghum* (47,67%) (coordenadas 14.914.113 a 14.912.445 pb), mientras que en el cromosoma 9K se registró desde la posición 2159 a 4839 (77,01% del gen) (coordenadas 13.889.620 a 13.886.919 pb).

✚ En *P. hallii*: Se identificó una única región homóloga en el cromosoma 9, abarcando desde la posición 2159 a 4863 de la referencia (77,70% del gen) (coordenadas 9.191.311 a 9.188.619 pb).

Esta arquitectura genómica, caracterizada por la duplicación en especies poliploides y la orientación opuesta respecto a *S. bicolor*, sugiere una trayectoria evolutiva conservada para el locus *Sh1* en el género *Panicum*.

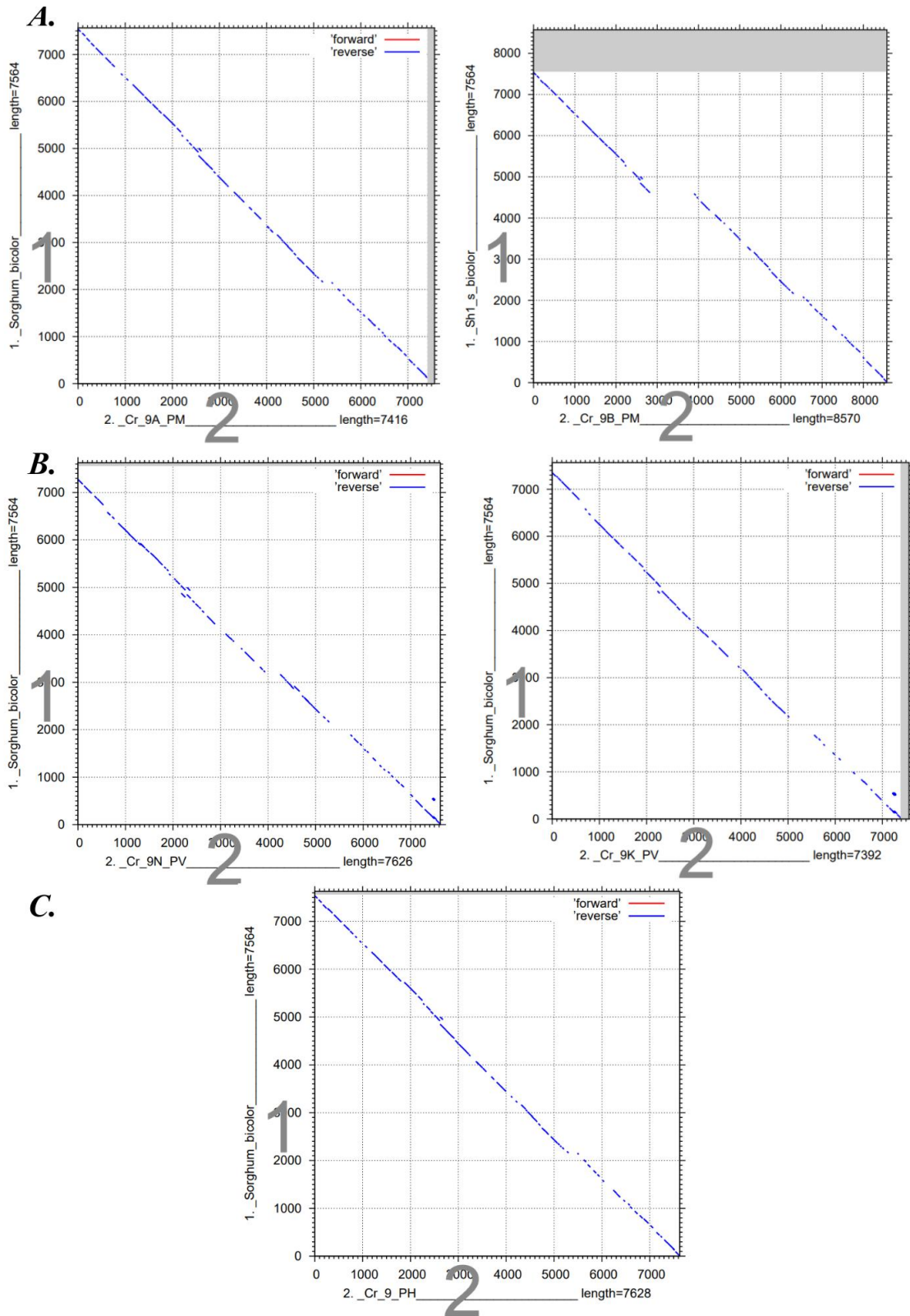


Figura 4. Gráficas de Dot plot comparativas entre *Panicum* y *Sorghum bicolor*. Se evidencian las principales regiones de homología entre *Sh1* y los cromosomas 9 de los diferentes *Panicum*. **A. Cromosoma 9A y 9B de *P. milliaceum* vs *S. bicolor*. **B.** Cromosomas 9K y 9N de *P. virgatum* vs *S. bicolor*. **C.** Cromosoma 9 de *P. halli* vs *S. bicolor*. En azul se indica la orientación opuesta de los alineamientos. El**

eje X representa la secuencia genómica de *P. miliaceum* (A), *virgatum* (B) y *halii* (C) y el eje Y la secuencia de referencia de *S. bicolor*.

Para evaluar la divergencia entre los *loci* homólogos, se extrajeron las regiones homólogas completas del gen *Sh1*, incluyendo sus segmentos flanqueantes, de los cromosomas 9 de *P. miliaceum* (9A y 9B) y *P. virgatum* (9K y 9N).

El análisis de *BLAST* realizado entre las secuencias candidatas de *Sh1* en cada cromosoma mostró una identidad del 88,99 % para *P. miliaceum* (Figura 5A) y 86,05 % para *P. virgatum* (Figura 5B). Estos resultados confirman que, al igual que en *SvLes1*, los alelos del gen *Sh1* en las especies poliploides se encuentran altamente conservados.

La comparación mediante *dot plot* ratificó la colinealidad entre estos pares de *loci*, evidenciando patrones diagonales directos, lo que confirma que las copias duplicadas mantienen una orientación estructural idéntica dentro de cada genoma.

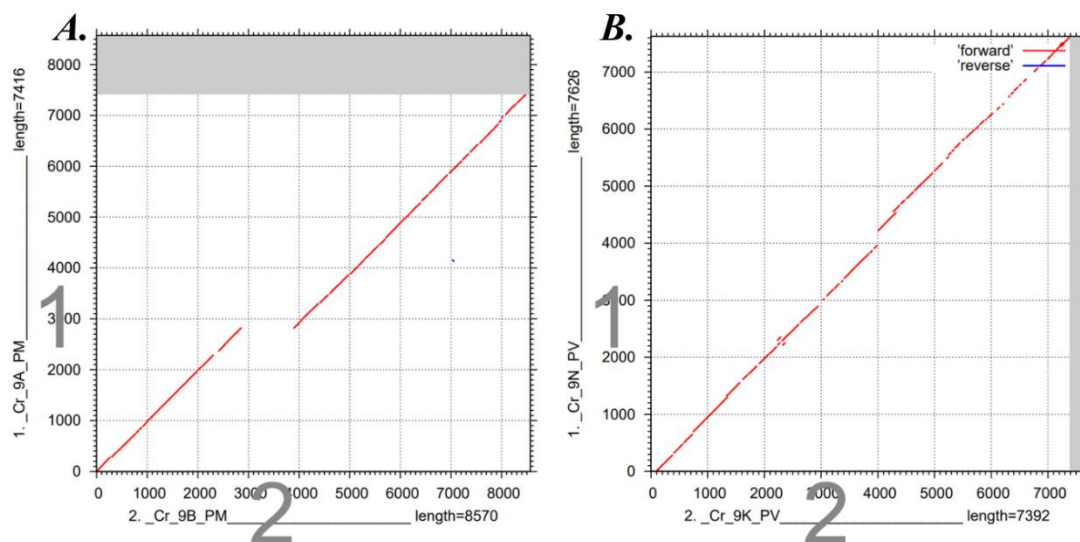


Figura 5. Comparación de los loci homólogos del gen *Sh1*. A. Dot plot entre los cromosomas 9A y 9B de *P. miliaceum* (88,99 % de identidad). B. Dot plot entre los cromosomas 9N y 9K de *P. virgatum* (86,05% de identidad). La diagonal principal representa una orientación directa, indicando que ambas secuencias conservan la misma dirección.

Los genes *SvLes1* y *Sh1* presentaron una alta conservación genómica en todas las especies analizadas, lo que respalda su conservación evolutiva dentro del grupo de las *paníceas*.

En el caso de *SvLes1*, los elevados porcentajes de identidad observados entre cromosomas homólogos en especies poliploides (94% en *P. miliaceum* y 92% en *P.*

virgatum) indican no sólo conservación de secuencia, sino también una marcada estabilidad estructural de estos *loci* tras eventos de duplicación genómica. De manera análoga, *Sh1* presentó niveles de identidad también elevados (aproximadamente 89% y 86%, respectivamente), lo que sugiere que ambos genes han estado sometidos a presiones selectivas que favorecen el mantenimiento de su función.

Un aspecto relevante a destacar es que, en varios casos, las coincidencias fueron detectadas *in silico* en sentido inverso respecto a las secuencias de referencia. Este patrón fue consistente, por ejemplo, en *P. miliaceum* y *P. hallii* para *SvLes1*, así como en todas las especies analizadas para *Sh1*, donde los *dot plots* evidenciaron alineamientos con orientación opuesta. Dado que las secuencias se obtuvieron realizando *BLASTn*, este resultado puede interpretarse considerando que dichas secuencias homólogas podrían estar ubicadas en la hebra complementaria del ADN. En este sentido, la orientación inversa no necesariamente implica una reorganización estructural compleja, sino que podría responder a la forma en que las secuencias están anotadas en las bases de datos genómicas.

Posteriormente, partiendo de los *loci*, se extrajeron las secuencias codificantes incluyendo sus regiones flanqueantes (1500 pb *upstream* y 100 pb *downstream*) para capturar la región promotora y evaluar su arquitectura reguladora.

Asimismo, se exploró la existencia de polimorfismos mediante alineamientos múltiples de secuencias (*MSA*), lo que permitió identificar variaciones en regiones codificantes y promotoras entre los genomas de *Panicum* y las especies de referencia.

A partir de los alineamientos, se construyeron dos representaciones gráficas de la conservación de las secuencias (Figura 6). En estas, las letras de mayor altura representan posiciones conservadas, en cambio las variaciones nucleotídicas en la misma posición se escalan de acuerdo a su frecuencia. En función de las ilustraciones, se seleccionaron las regiones más conservadas (encuadradas en naranja) para diseñar los cebadores. Se diseñó un par para cada gen (Tabla 1). Para *SvLes1*, los cebadores hibridan amplificando un fragmento de 2397 pb, contemplando las regiones promotora, codificante y no codificante, mientras que para el gen *Sh1*, la región amplificada no involucra el promotor, y se extiende hasta 3480 pb.

Los cebadores se ensayaron en Primer BLAST (Primer Designing Tool) contra la base de datos de los genomas de las tres especies de *Panicum* disponibles, a fin de descartar amplificaciones inespecíficas.

Para la Figura 6A, el gráfico de *logo* evidenció una alta conservación nucleotídica en los extremos 5' y 3' del gen *SvLes1*. La homogeneidad de la secuencia en todas las especies de *Panicum* analizadas confirmó la ausencia de polimorfismos críticos en las regiones de interés, permitiendo el diseño de cebadores específicos, ideales para estudios de expresión génica y amplificación del gen completo.

En contraparte, el gen *Sh1* (Figura 6B), presentó una marcada variabilidad en las zonas de diseño. La menor altura total de las pilas de nucleótidos (*bits*) y la presencia de múltiples variantes en posiciones contiguas confirmaron una alta tasa de polimorfismos. Esta variabilidad observada *in silico* justificó el diseño de cebadores con algunas posiciones con bases degeneradas, destinados a capturar la diversidad alélica presente en la población de *P. coloratum*.

Esta decisión técnica permitió asegurar que la amplificación en las poblaciones de *P. coloratum* capturara la diversidad alélica real, superando los sesgos de información, la alta tasa de polimorfismos o los posibles errores de secuencia presentes en los genomas de referencia disponibles.

A.



B.



Figura 6. Diseño de herramientas moleculares para *SvLes1* y *Sh1* basado en el análisis *in silico*.

A. Logo para *SvLes1*. B. Logo para *Sh1*.

Extracción de ADN vegetal y amplificación por PCR de genes candidatos en dos poblaciones de *P. coloratum*

Se realizó la extracción de ADN genómico de 10 individuos de la población SR y 9 de EM, según el protocolo de Kang et al., 2023. El mismo se basa en el aislamiento inicial de núcleos celulares seguido de una extracción mediante bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB). Este enfoque combinado permitió maximizar tanto la

longitud de los fragmentos como la pureza del producto final, reduciendo simultáneamente la proporción de genomas de orgánulos en la muestra. El resultado de la extracción se resume en la Tabla 3. Las extracciones de ADN genómico arrojaron rangos de concentración que oscilaron entre 4,1 y 27 ng/μl para la población SR, y entre 4,9 y 39,3 ng/μl para la población EM. Las cantidades fueron más bajas que las esperadas, en función de los registros de extracciones previos (Burgos et al. 2018) que rondaban los 100-300 ng/ul.

El siguiente paso fue amplificar los genes candidatos en cada población. Los ensayos de PCR permitieron validar de manera exitosa la amplificación de los genes candidatos en las poblaciones de *P. coloratum* evaluadas. Este resultado confirma que la estrategia de genómica comparativa y el uso de genomas de referencia de otras especies de *Panicum* fueron efectivos para el diseño de herramientas moleculares aplicables a poblaciones locales. Se obtuvieron resultados variables entre las poblaciones, mostrados en la Tabla 3 y en la Figura 7. En la población SR, se logró la amplificación del gen *SvLes1* en 6 de los 10 individuos evaluados, mientras que el gen *Sh1* se amplificó en 4 individuos. Por su parte, en la población EM, se obtuvo una amplificación exitosa de *SvLes1* en 5 de los 9 individuos y una mayor eficiencia para el gen *Sh1*, el cual se amplificó en 7 individuos.

A pesar de que los productos se obtuvieron en bajas concentraciones, lo que explica la presencia de bandas tenues observadas en los geles de electroforesis (Figura 7), la detección de las bandas esperadas para ambos genes demuestra la especificidad de los cebadores diseñados. Particularmente, en el caso del gen *Sh1*, los perfiles revelaron la presencia de una banda adicional a la esperada. La detección de este fragmento de mayor tamaño sugiere la posible amplificación de variantes alélicas con inserciones, la presencia de homólogos estructuralmente divergentes o, incluso, la captura de regiones intrónicas no previstas en los modelos de referencia. En conjunto, estos resultados no solo validan la metodología de amplificación y la utilidad de los cebadores (específicos para *SvLes1* y degenerados para *Sh1*), sino que permiten avanzar en la detección de polimorfismos y sientan las bases para la caracterización molecular del carácter de retención de semillas en *P. coloratum*.

Tabla 3. Concentraciones de las extracciones de ADN de cada individuo. Amplificación de cada gen específico.

MUESTRA	CONCENTRACION (ng/ul)	AMPLIFICA <i>SyLes1</i>	AMPLIFICA <i>Sh1</i>
SR 1	12,6	NO	SI
SR 2	4,1	NO	NO
SR 3	5,3	SI	NO
SR 4	19,9	SI	NO
SR 5	13,1	NO	NO
SR 6	13,2	SI	SI
SR 7	27,0	SI	NO
SR 8	8,4	SI	NO
SR 9	10,3	SI	SI
SR 10	12,3	NO	SI
EM 1	6,4	NO	SI
EM 2	10,9	NO	NO
EM 3	33,6	SI	SI
EM 4	4,9	NO	SI
EM 5	9,3	SI	SI
EM 6	11,5	SI	SI
EM 7	8,1	NO	NO
EM 8	39,3	SI	SI
EM 9	35,2	SI	SI

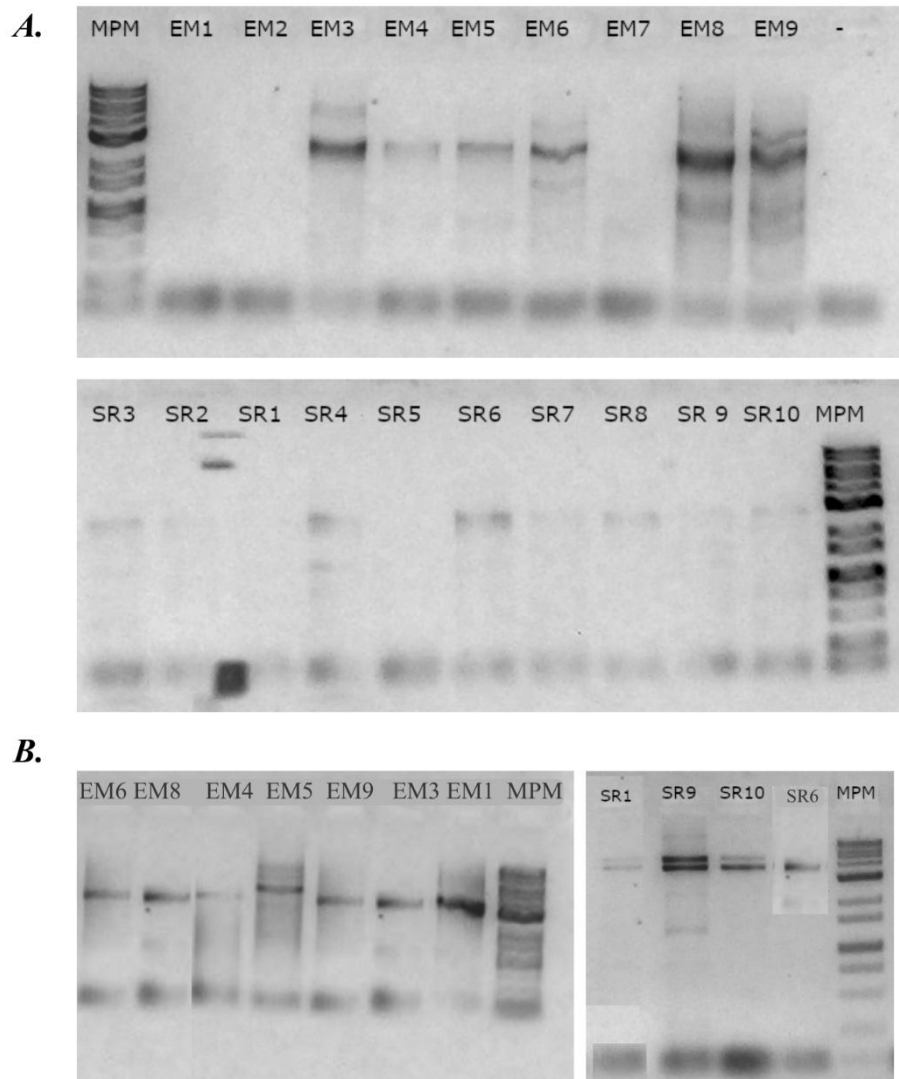


Figura 7. Amplificaciones de los genes *SvLes* y *Sh1*. Productos de amplificación resueltos por electroforesis en soporte horizontal de geles de agarosa al 0,8%. **A.** Muestras amplificadas del gen *SvLes1*. **B.** Muestras amplificadas del gen *Sh1*.

Secuenciación de los productos de PCR

Tras la secuenciación en una flow cell R10.4.1, las lecturas obtenidas fueron procesadas en tiempo real, durante 90 minutos, hasta alcanzar al menos 10000 lecturas de moléculas únicas por cada muestra.

Dada la tasa de error intrínseca de la tecnología de Oxford Nanopore (ONT) para la identificación de variantes de un solo nucleótido, que ronda el 1%, el filtrado por calidad resultó crítico para garantizar la confiabilidad de los resultados moleculares (Edge

& Bansal, 2019). Se aplicó un umbral de calidad $Q \geq 15$ con el fin de establecer un equilibrio óptimo entre la fidelidad de las bases y la profundidad de cobertura. Un filtrado excesivamente riguroso habría reducido el volumen de datos por debajo del nivel necesario para el análisis de haplotipos. El límite seleccionado permitió mantener un número de lecturas lo suficientemente robusto para lograr la reconstrucción de los cuatro haplotipos de cada gen en las muestras, considerando el nivel de ploidía tetraploide reportado para *P. coloratum* (Armando et al., 2017). Este procedimiento aseguró un conjunto de datos limpio y preciso, minimizando los falsos positivos derivados del ruido secuencial característico de la secuenciación de molécula única.

En la tabla 4 se detallan los valores de las lecturas obtenidas antes y después del proceso de filtrado.

Tabla 4. Cantidad de lecturas para 15 muestras de ADN de *P. coloratum*, en cada etapa de filtrado.

MUESTRA	CANTIDAD DE LECTURAS SECUENCIADAS	CANTIDAD DE LECTURAS LUEGO DEL FILTRADO POR CALIDAD	PORCENTAJE DE LECTURAS CONSERVADAS LUEGO DEL FILTRADO	CANTIDAD DE LECTURAS MAPEADAS PARA EL GEN <i>SvLes1</i>	CANTIDAD DE LECTURAS MAPEADAS PARA EL GEN <i>Sh1</i>
EM 9	54032	14916	27,60%	321	5816
EM 8	50924	21284	41,80%	971	4479
EM 6	35872	11060	30,83%	1284	1469
EM 5	40584	3540	8,72%	110	54
EM 4	127192	2684	2,11%	-	462
EM 3	45392	4420	9,74%	719	31
EM 1	69224	38348	55,40%	-	9799
SR 10	14632	6292	43,00%	-	1545
SR 9	26624	7460	28,02%	284	1484
SR 8	13612	1668	12,25%	352	-

SR 7	56152	8684	15,46%	2131	-
SR 6	119116	20400	17,13%	594	4335
SR 4	30872	4428	14,34%	994	-
SR 3	11884	468	3,94%	83	-
SR 1	15836	5764	36,40%	-	1434

Las secuencias filtradas se alinearon contra el genoma de referencia de *P. miliaceum* empleando el algoritmo *minimap2*, indicando secuencias de ONT. Esto permitió localizar los *loci* de los genes y determinar la ubicación precisa de cada lectura dentro de la estructura génica.

Como puede observarse en la Tabla 4, las lecturas filtradas que finalmente logran mapear con alguno de los genes son un porcentaje bajo de las mismas. Esto puede deberse a varios factores, entre ellos podemos destacar la presencia de ADN molde, amplificaciones inespecíficas y/o amplicones extremadamente diferentes de la secuencia con respecto a la referencia.

Complementariamente, se realizó un análisis de identidad con las lecturas que mapearon para identificar las posiciones que permanecen invariables respecto a la referencia (Tabla 5). Este procedimiento permitió mapear con precisión las bases conservadas, funcionando como un control interno de la integridad de la secuencia y proporcionando el contexto necesario para diferenciar las zonas de alta plasticidad mutacional de aquellas regiones del genoma que mantienen una estricta conservación evolutiva.

Tabla 5. Análisis comparativo del perfil mutacional y conservación nucleotídica entre las poblaciones EM y SR de *P. coloratum* para los genes *Sh1* y *SvLes1*.

Gen	Población	Mutaciones Totales	Mutaciones Compartidas	Bases Conservadas	Bases Conservadas Compartidas
	EM	24		36	

<i>SvLes1</i>	SR	78	23	32	31
<i>Sh1</i>	EM	9	2	141	63
	SR	19		135	

Como puede observarse en la Tabla 5, en el caso del gen *SvLes1*, casi todas las mutaciones encontradas en la población EM se comparten con la población SR (23 de 24), esta característica podría indicar un patrón de variación especie específica con respecto a *P. milliaceum*. Adicionalmente, casi la totalidad de las bases conservadas, de ambas poblaciones, son compartidas, lo cual refuerza el concepto anterior. La distinción podría localizarse en las 54 mutaciones propias de la población SR para el gen *SvLes1*.

Para el gen *Sh1*, esta característica no se repite, solo dos mutaciones son compartidas entre poblaciones. Lo que podemos remarcar en ambos casos es que la población SR acumula más variaciones que la población EM con respecto a la referencia.

Análisis de haplotipos y ploidía

En esta fase, los datos del VCF se procesaron para cuantificar la carga mutacional y reconstruir las variantes consenso. Estas, definidas como haplotipos, actúan como un perfil genético simplificado de cada individuo. Es preciso aclarar que estos haplotipos (S1) no representan una secuencia genómica continua, sino un conjunto de polimorfismos observados en fase, es decir, todos observados en una misma molécula secuenciada.

Al analizar la abundancia de los haplotipos reconstruidos para cada gen (Figuras 8 y 9), se detectaron niveles de representatividad diversos entre las distintas variantes, sin observar una proporción predominante que sugiera la prevalencia de un componente genético sobre otro. Por lo tanto, se optó por considerar una organización genómica tetraploide, en concordancia con lo descrito para *P. coloratum* var. *Makarikariense* y *P. miliaceum* (utilizada como referencia en este estudio). Bajo este criterio, se conservaron los cuatro haplotipos más abundantes para cada muestra, asumiendo que esta configuración de cuatro juegos cromosómicos representa de manera más fidedigna la complejidad estructural de la especie y permite diferenciar la variabilidad biológica real de posibles ruidos técnicos del proceso de secuenciación.

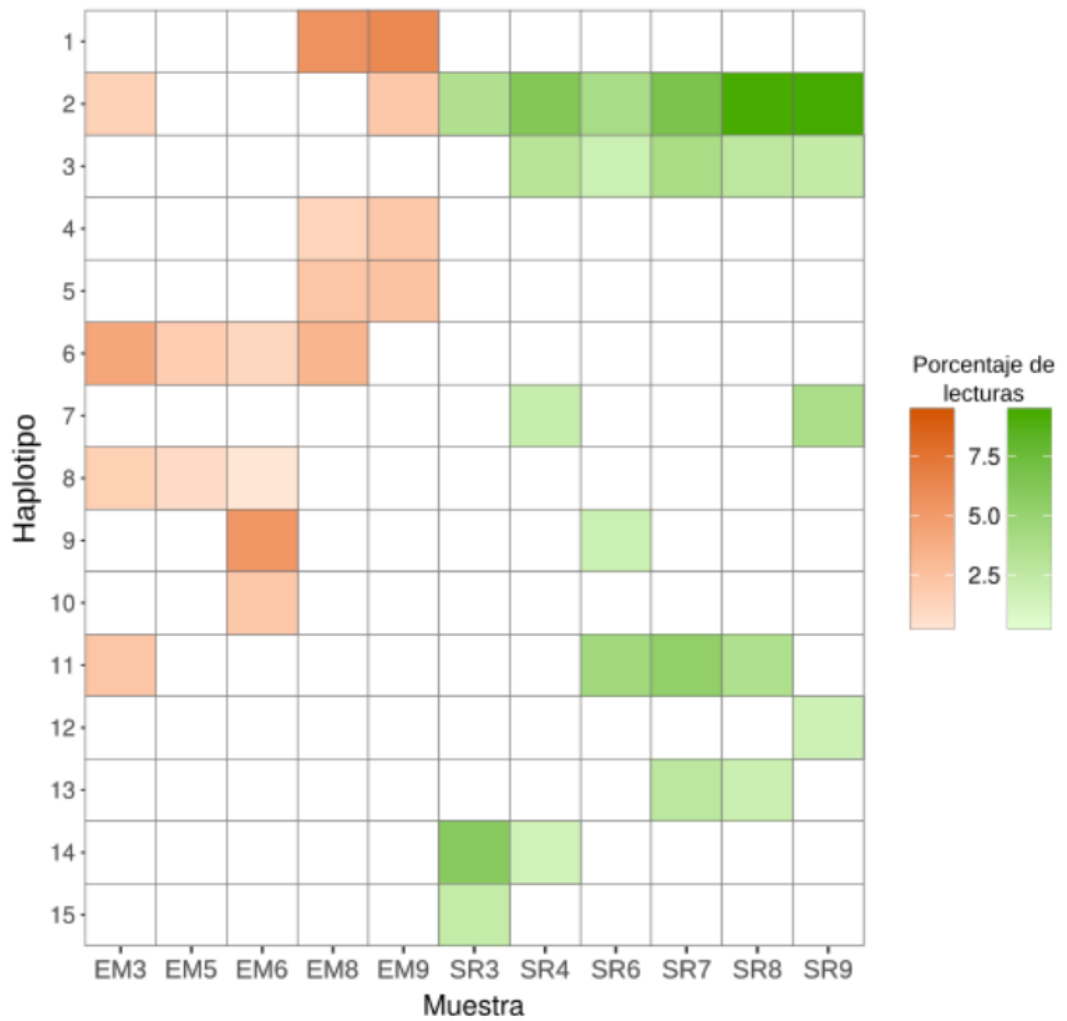


Figura 8. Heatmap de haplotipos SvLes1. En el eje X se encuentran las muestras que amplificaron SvLes1 y en el eje Y se enumeran los haplotipos encontrados para el mismo gen. En naranja se observan los 4 haplotipos más abundantes definidos para cada muestra en la población EM y en verde los definidos para la población SR.

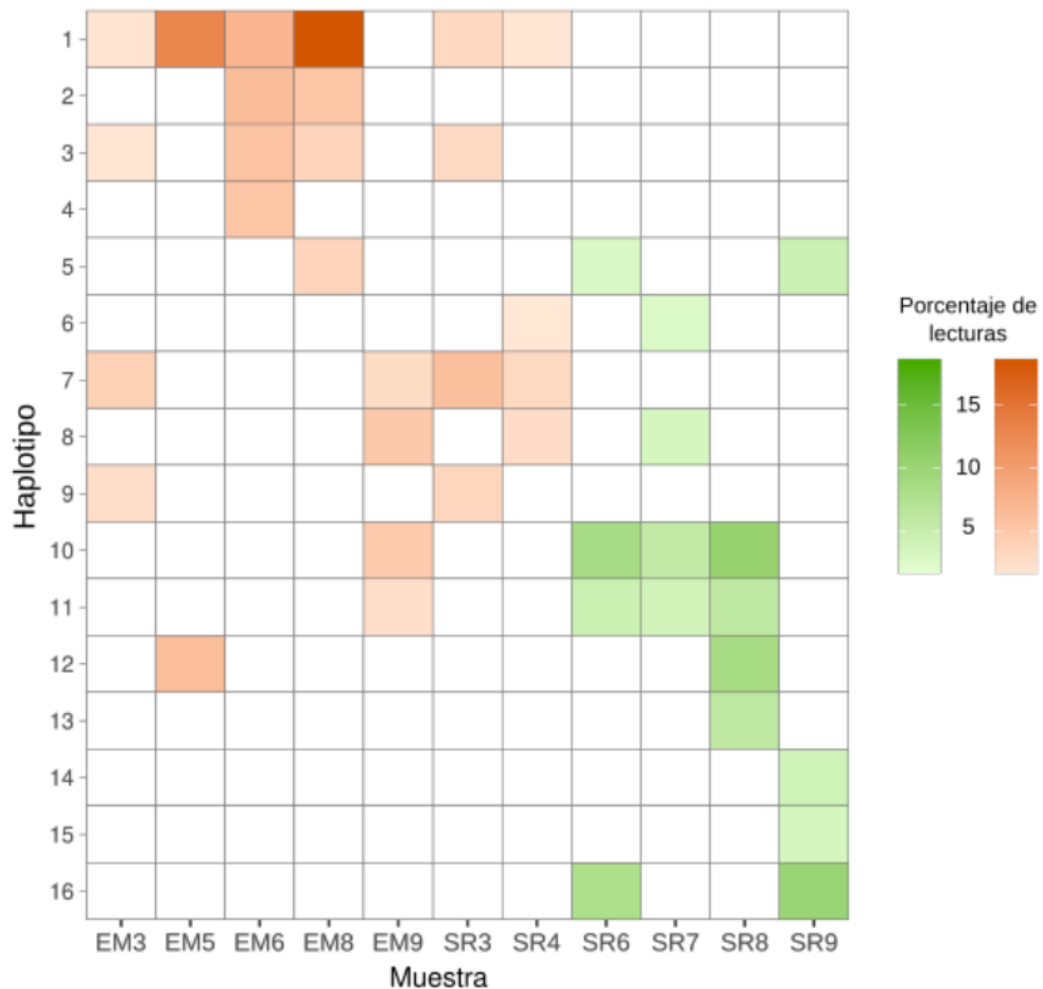


Figura 9. Heatmap para haplotipos *Sh1*. En el eje X se encuentran las muestras que amplificaron para *Sh1* y en el eje Y se enumeran los haplotipos encontrados para el mismo gen. En naranja se observan los 4 haplotipos más abundantes definidos para cada muestra en la población EM y en verde los definidos para la población SR.

El análisis de los datos permitió identificar un total de 15 haplotipos para el gen *SvLes1* y 16 haplotipos para el gen *Sh1*. En cuanto a su distribución, se observaron patrones que permiten diferenciar a ambas poblaciones.

Para *SvLes1* (Figura 8) el haplotipo 6 se encontró en casi todos los individuos de la población EM y está ausente en todos los individuos de la población SR. Los haplotipos 1, 4, 5, 6, 8 y 10 se encontraron únicamente en individuos de la población EM, aunque en menor proporción que el haplotipo 6.

Por el contrario, el haplotipo 3 resultó ser el más frecuente y exclusivo de la población SR. Los haplotipos 7, 12, 13, 14 y 15 también resultaron exclusivos de la población SR, aunque con menor prevalencia poblacional.

En el caso de *ShI* (Figura 9), los haplotipos 1, 3 y 7 se encontraron en la mayoría de los individuos EM. Los haplotipos 2, 4 y 9 también son únicos de la población EM, pero están presentes en menos individuos.

En el caso de la población SR se caracterizó por la presencia del haplotipo 16 en 2 de las 4 muestras, mientras que el 13, 14 y 15 sólo se observó en uno de los 4 individuos que amplificaron *ShI*.

Comparación entre poblaciones y visualización de resultados

Para comprender las diferencias genéticas entre las poblaciones estudiadas, se analizó la variabilidad de las secuencias mediante un flujo de trabajo computacional. Este proceso permitió identificar las discrepancias entre los individuos y la secuencia de referencia, clasificándolas según su naturaleza: polimorfismos de nucleótido único (SNP), inserciones (Ins) y deleciones (Del).

En la Figura 10A se observa la distribución de las mutaciones a lo largo de la secuencia génica del gen *SvLesI*. En la parte superior de la gráfica (naranja) se agrupan las frecuencias de mutaciones de la población EM con respecto a la referencia, el gen identificado en *P. milluaceum*. La parte inferior de la gráfica (verde) agrupa las frecuencias de mutaciones de la población SR con respecto a la misma referencia. El análisis revela un patrón distintivo: mientras que la región promotora muestra una carga mutacional similar en ambas poblaciones, existen diferencias marcadas en los exones. Por ejemplo, la población SR presenta una mayor proporción de SNPs en el Exón 1 (75.5%) en comparación con la población EM (56.1%).

Con el objetivo de determinar si las mutaciones identificadas inducen cambios en la estructura primaria de las proteínas, y, por tanto, si son potencialmente deletéreas o sinónimas, se realizó la traducción de las secuencias exónicas de *SvLesI*. Este análisis permite discriminar entre variaciones neutras y aquellas que modifican la composición aminoacídica, ofreciendo una perspectiva más precisa sobre el impacto biológico de la variabilidad alélica.

Los resultados (Figura 10B) indican que, las mutaciones se localizan predominantemente en el exón 1, siendo los SNPs las variantes más abundantes, con un 57,3% para EM y un 56,1% para SR en el exón 1 y, un 56,4% para el primero y 59,5% para el segundo en el exón 2, seguidos en frecuencia por las deleciones (S2). La distribución

porcentual muestra una estabilidad notable en el tipo de mutaciones entre las poblaciones EM y SR, sugiriendo que, a pesar de la divergencia genética, existe una presión selectiva conservadora sobre las regiones codificantes para mantener la funcionalidad proteica.

Para el gen *Sh1*, la Figura 11 muestra la distribución de las mutaciones a lo largo de la secuencia génica. En la parte superior de la gráfica (naranja) se agrupan las frecuencias de mutaciones de la población EM con respecto a la referencia. La parte inferior de la gráfica (verde) agrupa las frecuencias de mutaciones de la población SR con respecto a la misma referencia.

En este caso es posible ver una gran deleción con respecto a la referencia conservada en todos los individuos de ambas poblaciones, aproximadamente a los 1500 pb, que se extiende hasta los 2000 pb. Esta discrepancia respecto a la referencia es apoyada por la doble banda observada en los geles (Figura 7). Esto puede indicar una variación especie específica propia de *P. coloratum*. Tal observación resulta consistente con las divergencias detectadas al comparar las secuencias homólogas de *P. miliaceum*, *P. virgatum* y *P. hallii*. Como se muestra en los alineamientos, la identidad nucleotídica parcial entre estas especies y respecto a su referencia en *S. bicolor*, obligó el diseño de cebadores degenerados (Figura 5) para asegurar una amplificación efectiva. De este modo, la Figura 11 permite visualizar claramente esta divergencia, evidenciando que la deleción identificada constituye un rasgo distintivo de *P. coloratum* frente a las secuencias de referencia utilizadas.

Pese a que se identificaron secuencias nucleotídicas con variaciones conservadas que definimos como haplotipos, la determinación de intrones y exones del gen *Sh1* no fue posible con los datos actualmente disponibles. Esta es la razón por la cual no se realizó la traducción a la secuencia aminoacídica.

La gran deleción identificada y la imposibilidad de determinar la secuencia codificante sugiere que es necesario realizar modelos más avanzados que permitan llegar a consensos de estas variantes génicas sin la utilización de referencias. No obstante, dada su estructura y ubicación, no se descarta que estas secuencias puedan desempeñar roles regulatorios, actuando potencialmente como factores de transcripción, como los del tipo YABBY.

A.



B.

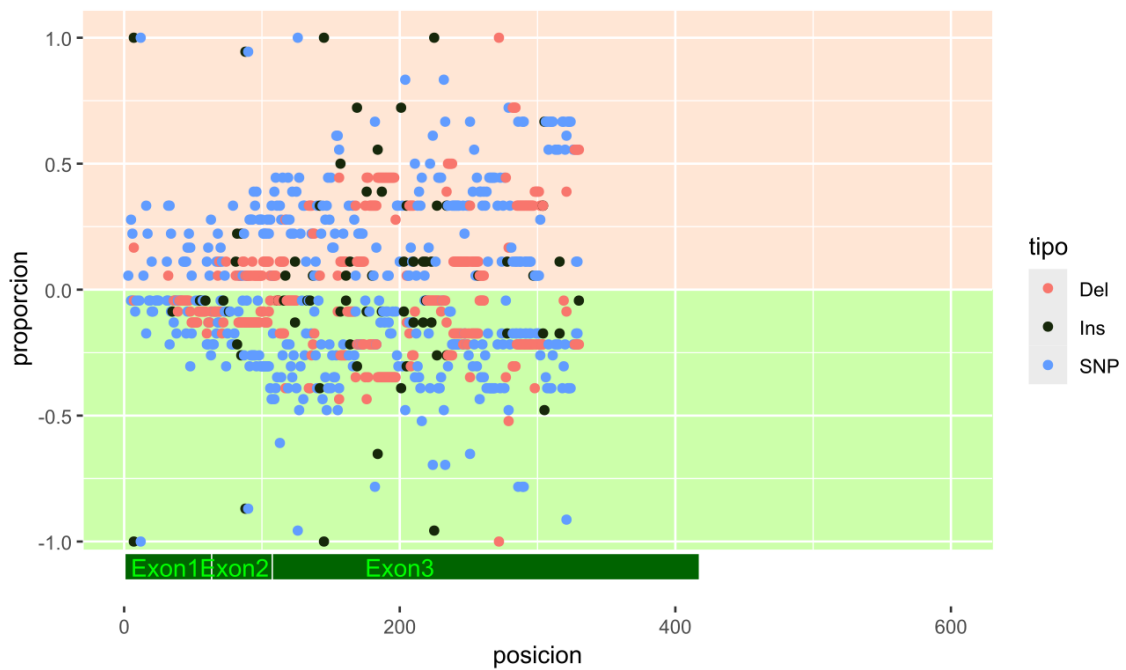


Figura 10. Análisis de variabilidad en el gen SvLes1. A. Distribución de variantes a nivel nucleotídico en toda la estructura génica (promotor; intrones y exones) para las poblaciones EM (superior y en naranja) y SR (inferior y verde). **B.** Caracterización de las mutaciones a nivel aminoacídico.

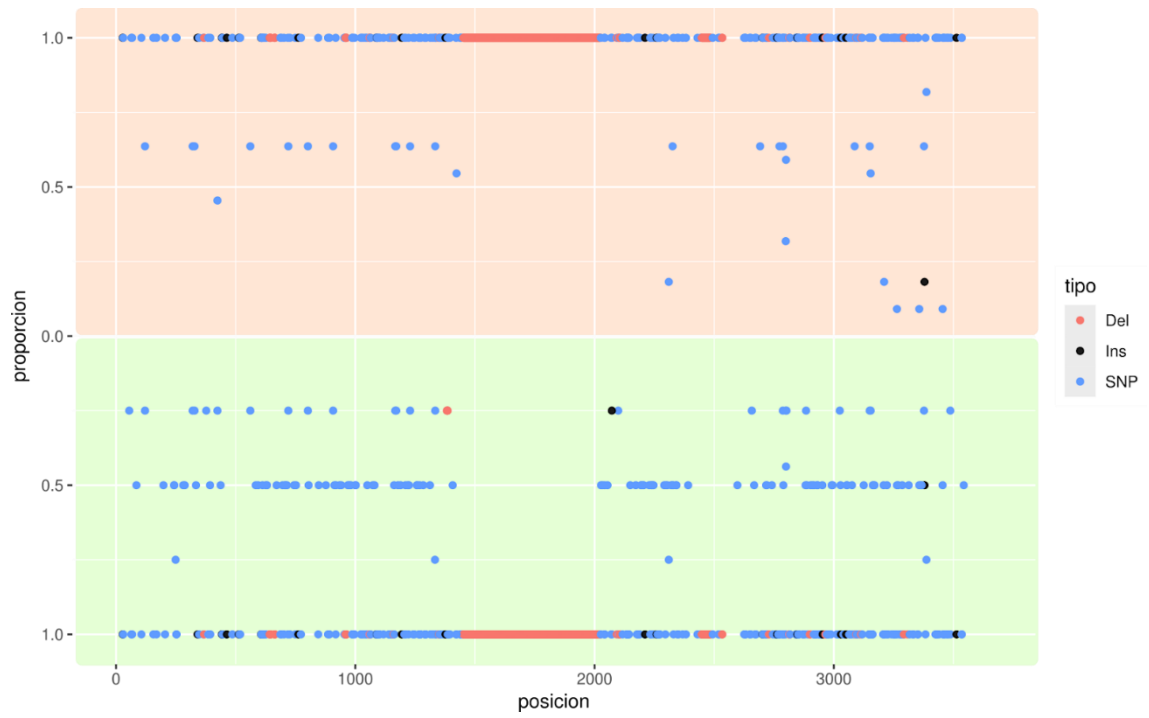


Figura 11. Análisis de variabilidad en el gen Sh1. Distribución de variantes a nivel nucleotídico a lo largo de la estructura génica en las poblaciones EM (superior y naranja) y SR (inferior y verde).

CONCLUSIONES

La validación exitosa de la amplificación de los genes *SvLes1* y *Sh1* en las poblaciones locales de *P. coloratum* constituye un hito para la mejora genética de la especie. Este estudio representa el primer reporte de las secuencias de los genes mencionados en la especie, realizando una contribución fundamental a la anotación génica de un cultivo que, hasta el momento, carecía de este nivel de caracterización molecular. La obtención de las bandas esperadas ratifica que la estrategia utilizada fue exitosa y que las herramientas diseñadas son aptas para el estudio de poblaciones con variabilidad fenotípica en la retención de semillas.

Más allá de la validación, el hallazgo de una banda adicional en el locus *Sh1* revela una complejidad estructural inédita, sugiriendo la presencia de polimorfismos o reordenamientos que no habían sido documentados en otras especies del género. Por lo tanto, este trabajo transforma el conocimiento teórico sobre la dehiscencia en gramíneas en una herramienta aplicada, sentando las bases definitivas para estabilizar la producción de semillas en *P. coloratum*.

Si bien existe una elevada variabilidad dentro de cada individuo, lo cual es esperable debido al nivel de ploidía tetraploide (4x) y su sistema de reproducción predominantemente alógamo, se han logrado identificar haplotipos específicos que podrían ser representativos de cada población contrastante.

Como resultado del presente trabajo se establecieron herramientas que permitirán consolidar estudios de asociación entre las variantes alélicas y diversos fenotipos con respecto a la dehiscencia en grandes poblaciones, proporcionando una base sólida para futuros estudios de mejoramiento genético.

BIBLIOGRAFÍA

Almada, P. S. (2018). Caracterización genética de *Panicum coloratum* variedades coloratum y Makarikariense mediante marcadores ISSRs (tesina para optar al título de Licenciada en Biotecnología). *Universidad Nacional del Litoral. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Estación Experimental Agropecuaria Rafaela del INTA*, 5-39.

Armando, L. (2014). Caracterización morfológica y molecular de *Panicum coloratum* var. makarikariense Goossens. (*Tesis doctoral*) Departamento de Agronomía, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca.

Armando, L. V., Tomás, M. A., Garayalde, A. F., & Carrera, A. D. (2017, septiembre 30). Effect of pollination mode on progeny of *Panicum coloratum* var. makarikariense: Implications for conservation and breeding. *Tropical Grasslands-Forrajés Tropicales*, 5(3), 117-128. [https://doi.org/10.17138/tgft\(5\)117-128](https://doi.org/10.17138/tgft(5)117-128)

Bayón, Á. (2024, febrero 23). Rubisco: la proteína de la que depende toda la vida del planeta. *Muy Interesante*.

Burgos, E., Thompson, C., Giordano, M., & Tomas, M. A. (2018, mayo 31). Pre-breeding studies in *Panicum coloratum* var. coloratum: Characterization using agromorphological traits and molecular markers. *Tropical Grasslands-Forrajés Tropicales*, 6(2), 82-92. [https://doi.org/10.17138/tgft\(6\)82-92](https://doi.org/10.17138/tgft(6)82-92)

Burson, B. L., Correa, J., & Potts, H. C. (1983, julio 1). Anatomical Basis for Seed Shattering in Kleingrass and Guineagrass. *Crop Science*, 23(4), 747-751. <https://doi.org/10.2135/cropsci1983.0011183X002300040035x>

Cardamone, L., Cuatrín, A., Grunberg, K., & Tomas, M. A. (2018, junio 07). Variability for salt tolerance in a collection of *Panicum coloratum* var. makarikariense during early growth stages. *Tropical Grasslands-Forrajés Tropicales*, 6(3), 134-147. [https://doi.org/10.17138/tgft\(6\)134-147](https://doi.org/10.17138/tgft(6)134-147)

Carlson, J. E., L. K. Tulsieram, J. C. Glaubitz, V. W. K. Luk, C. Kauffeldt, and R. Rutledge. 1991. Segregation of random amplified DNA markers in F1 progeny of conifers. *Theoretical and Applied Genetics* 83: 194–200.

Chow, C.-N., Yang, C.-W., Wu, N.-Y., Wang, H.-T., Tseng, K.-C., Chiu, Y.-H., Lee, T.-Y., & Chang, W.-C. (2023, octubre 28). PlantPAN 4.0: updated database for

identifying conserved non-coding sequences and exploring dynamic transcriptional regulation in plant promoters. *Oxford Academic - Nucleic Acid Research*, 52(1), 1569-1578. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad945>

Doebley, J. F., Gaut, B. S., & Smith, B. D. (2006, Diciembre 29). The Molecular Genetics of Crop Domestication. *Cell*, 127(7), 1309-1321.

Dorado. (2026, febrero 19). Oxford Nanopore Technologies. Retrieved febrero 20, 2026, from <https://nanoporetech.com/software/other/dorado>

Ecoinventos. (2025, Julio 16). Mejora eficiencia de Rubisco, la enzima clave de la fotosíntesis. *AgronoTIPS*.

Edge, P., & Bansal, V. (2019, octubre 11). Longshot enables accurate variant calling in diploid genomes from single-molecule long-read sequencing. *Nature Communications*, 10, 4660. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12493-y>

Hodge, J. G., & Kellogg, E. A. (2016, junio). Abscission zone development in *Setaria viridis* and its domesticated relative, *Setaria italica*. *AMERICAN JOURNAL OF BOTANY*, 103(6), 998-1005. <https://doi.org/10.3732/ajb.1500499>

Hutchison, D. J., & Bashaw, E. C. (1964, marzo 1). Cytology and Reproduction of *Panicum coloratum* and Related Species. *Crop Science*, 4(2), 151-153. 10.2135/cropsci1964.0011183X000400020008x

Jadhav, K. P., R.V. Ranjani, and N. Senthil. 2015. Chemistry of plant genomic DNA extraction protocol. *Bioinfolet* 12: 543–548.

Kang, M., Chanderbali, A., Lee, S., Soltis, D. E., Soltis, P. S., & Kim, S. (2023, mayo 4). High-molecular-weight DNA extraction for long-read sequencing of plant genomes: An optimization of standard methods. *Applications in plant Sciences*. 10.1002/aps3.11528

Kiesbauer, J., Grieder, C., Studer, B., & Kölliker, R. (2023, diciembre 11). Perspectives for reducing seed shattering in ryegrasses. *Grass and Forage Science*, 78(4), 425-437. <https://doi.org/10.1111/gfs.12635>

Konishi, S., Izawa, T., Lin, S. Y., Ebana, K., Fukuta, Y., Sasaki, T., & Yano, M. (2006, junio 2). An SNP Caused Loss of Seed Shattering During Rice Domestication. *Science*, 312(5778), 1392-1396. DOI: 10.1126/science.1126410

LI, H. (2018, mayo 10). Minimap2: alineación por pares para secuencias de nucleótidos. *Oxford Academic - Bioinformatics*, 34(18), 3094–3100. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty191>

Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennel, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., & Durbin, R. (2009, Junio 08). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Oxford Academic - Bioinformatics*, 25(16), 2078–2079.

Lifschitz, M., Tommasino, E., Zabala, J. M., Grunberg, K., Ramos, J. C., & Tomás, M. A. (2021, septiembre 28). Combined effect of salinity and hypoxia in seedlings of two varieties of *Panicum coloratum*: Morphology, root system architecture, oxidative damage and antioxidant response. *Association of Applied Biologists*, 180(2), 283–293. <https://doi.org/10.1111/aab.12733>

Ligation sequencing amplicons - Native Barcoding Kit 24 V14 (SQK-NBD114.24) (NBA_9168_v114_revT_02Oct2025). (n.d.). Oxford Nanopore Technologies. Retrieved febrero 12, 2026, from <https://nanoporetech.com/document/ligation-sequencing-amplicons-native-barcoding-v14-sqk-nbd114-24>

Lin, Z., Griffith, M. E., Li, X., Zhu, Z., Tan, L., Fu, Y., Zhang, W., Wang, X., Xie, D., & Sun, C. (2007, enero 10). Origin of seed shattering in rice (*Oryza sativa* L.). *Springer-Verlag*, 226, 11–20. 10.1007/s00425-006-0460-4

Lin, Z., Li, X., Shannon, L. M., Yeh, C.-T., Wang, M. L., Bai, G., Peng, Z., Li, J., Trick, H. N., Clemente, T. E., Doebley, J., Schnable, P. S., Tuinstra, M. R., Tesso, T. T., White, F., & Yu, J. (2012, mayo 13). Parallel domestication of the *Shattering1* genes in cereals. *Nature Genetics*, 44, 720–724. <https://doi.org/10.1038/ng.2281>

Liu, H., Fang, X., Zhou, L., Li, Y., Zhu, C., Liu, J., Song, Y., Jian, X., Xu, M., Dong, L., & Lin, Z. (2022, abril 07). Transposon Insertion Drove the Loss of Natural Seed Shattering during Foxtail Millet Domestication. *Molecular Biology and Evolution*, 39(6). <https://doi.org/10.1093/molbev/msac078>

Mamidi, S., Healey, A., Huang, P., Grimwood, J., Jenkins, J., Barry, K., Sreedasyam, A., Shu, S., Lovell, J. T., Feldman, M., Wu, J., Yu, Y., Chen, C., Johnson, J., Sakakibara, H., Kiba, T., Sakurai, T., Tavares, R., Nusinow, D. A., ... Kellogg, E. A. (2020, octubre 05). A genome resource for green millet *Setaria viridis* enables discovery

of agronomically valuable loci. *Nature Biotechnology*, 38, 1203-1210. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0681-2>

Peterson, D. G., K. S. Boehm, and S. M. Stack. 1997. Isolation of milligram quantities of DNA from tomato (*Lycopersicon esculentum*), a plant containing high levels of polyphenolic compounds. *Plant Molecular Biology Reporter* 15: 148–153.

Petruzzi, H. J., Stritzler, N. P., Adema, E. O., Ferri, C. M., & Pagella, J. H. (2003, octubre). *MIJO PERENNE - Panicum coloratum*.

Pickersgill, B. (2018, mayo 07). Parallel Versus Convergent Evolution In Domestication and Diversification of Crops in The Americas. *frontiers*, 6. <https://doi.org/10.3389/fevo.2018.00056>

Pittaro, G. (2017, noviembre). Caracterización de germoplasma de *Panicum coloratum* L. VAR. *coloratum* para la tolerancia a la salinidad, alcalinidad y al frío. In *INTA Digital Repositorio Institucional*

Pritchard, A. J., & De Lacy, I. H. (1974, marzo 1). The Cytology, Breeding System and Flowering Behaviour of *Panicum coloratum*. *Australian journal of botany*, 22(1), 57-66. <https://doi.org/10.1071/BT9740057>

Thurber, C. S., Hepler, P. K., & Caicedo, A. L. (2011, enero 14). Timing is everything: early degradation of abscission layer is associated with increased seed shattering in US weedy rice. *BMC plant biology*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-14>

Tomás, M. A., Giordano, M. C., Cardamone, L., Pilatti, V., & Armando, L. (2016, noviembre). Mejoramiento genético de *Panicum coloratum* var. *makarikariense*. *Información técnica de producción animal*, 111-117.

Wang, H., Wang, J., Chen, C., Chen, L., Li, M., Qin, H., Tian, X., Hou, S., Yang, X., Jian, J., Gao, P., Wang, L., Qiao, Z., & Mu, Z. (2024, junio 21). A complete reference genome of broomcorn millet. *Scientific Data*, 11(657). <https://doi.org/10.1038/s41597-024-03489-5>

Young, B. A. (1993, noviembre). Registration of TEM-SR1 Kleingrass Germplasm. *CROP REGISTRATIONS*, 1423.

SUPLEMENTARIOS

1. HAPLOTIPOS

Lista de las posiciones donde se hallaron mutaciones del gen SvLes1 con respecto a la referencia:

64, 73, 92, 106, 150, 165, 170, 175, 177, 179, 194, 199, 201, 225, 229, 248, 275, 296, 346, 350, 369, 370, 395, 474, 475, 481, 500, 527, 547, 553, 559, 763, 778, 818, 972, 976, 984, 1132, 1146, 1152, 1211, 1247, 1298, 1337, 1340, 1341, 1383, 1390, 1437, 1540, 1563, 1567, 1600, 1601, 1602, 1630, 1631, 1632, 1658, 1682, 1715, 1837, 1841, 1842, 1853, 1866, 1867, 1883, 1886, 1925, 1952, 1967, 1970, 2016, 2101, 2166, 2172, 2296, 2305.

Haplotipos para el gen SvLes1 que responden a las posiciones de las mutaciones halladas:

1. C,A,GCA,C,G,C,C,G,A,T,C,A,G,A,G,A,T,T,A,C,T,A,A,G,A,-,-
,A,T,G,T,GC,A,C,T,T,C,T,G,G,G,A,T,G,G,A,A,G,C,G,T,C,T,G,C,A,C,A,T,G,G,C,T,C,ACAC,G,C,C,TAAC,G,C,G,
G,G,G,G,T,G
2. T,G,A,T,A,T,T,A,G,C,T,T,A,G,A,T,G,C,G,G,C,C,C,T,T,G,T,G,G,T,T,C,G,A,T,C,G,G,A,C,C,G,C,C,T,C,G,T,
T,C,G,T,C,A,T,G,T,G,A,T,C,T,C,A,G,A,T,A,T,C,C,G,C,A,C,A,T,A,A
3. T,G,A,T,A,T,T,A,G,C,T,T,A,G,A,T,G,C,G,G,C,C,C,T,T,G,T,G,G,T,T,C,G,A,T,C,G,CAG,A,C,C,G,C,C,T,C,
G,T,T,C,G,T,C,A,T,G,T,G,A,T,C,T,C,A,G,A,T,A,T,C,C,G,C,A,C,A,T,A,A
4. C,A,AGCAGG,C,G,C,C,G,A,T,C,A,G,A,G,A,T,T,A,-,T,A,A,G,A,-,-
,A,T,G,T,CCGG,A,C,T,T,C,T,G,G,G,A,T,G,G,A,-
,G,C,G,T,C,T,G,C,A,C,A,T,G,G,C,T,C,A,G,C,C,C,T,G,C,G,G,G,G,T,G
5. ,,,,C,C,G,A,T,C,A,G,A,G,A,T,T,A,-,T,A,A,G,A,-,-,A,T,G,T,CCGG,A,C,T,T,C,T,G,G,G,A,T,G,G,A,-
,G,C,G,T,C,T,G,C,A,C,A,T,G,G,C,T,C,A,G,C,C,C,T,G,C,G,G,G,G,T,G
6. C,G,A,T,A,T,T,A,G,C,T,T,A,G,A,T,G,C,G,G,C,C,C,T,T,G,T,G,G,T,T,C,G,A,T,C,G,G,A,C,C,G,C,C,T,C,G,T,
,T,C,G,T,C,T,T,G,T,G,A,T,C,T,C,A,G,A,T,A,T,C,C,G,C,A,C,A,T,A,A
7. C,A,GCA,C,G,C,C,G,A,T,C,A,G,A,G,A,T,T,A,C,T,A,A,G,A,A,G,A,T,G,T,GC,A,G,C,T,C,T,G,G,G,A,T,G,
G,A,A,G,C,G,T,C,T,G,C,A,C,A,T,G,G,C,T,C,ACAC,G,C,C,TAAC,G,C,G,G,G,G,T,G
8. C,G,A,T,A,T,T,A,G,C,T,T,A,G,A,T,G,C,G,G,C,C,C,T,T,G,T,G,G,T,T,C,G,A,T,C,G,CAG,A,C,C,G,C,C,T,C,
G,T,T,C,G,T,C,T,T,G,T,G,A,T,C,T,C,A,G,A,T,A,T,C,C,G,C,A,C,A,T,A,A
9. T,G,A,T,A,T,T,A,G,C,T,T,A,G,A,T,G,C,G,G,C,C,C,T,T,G,T,G,G,T,T,C,G,A,T,C,G,G,A,C,C,G,C,C,T,C,G,T,
T,C,G,T,C,A,T,G,T,G,A,T,C,T,C,AC,G,C,C,C,C,C,G,C,A,T,A,A

10. T,G,A,T,A,T,T,A,G,C,T,T,A,G,A,T,G,C,G,G,C,C,C,T,T,G,T,G,G,T,T,C,G,A,T,C,G,CAG,A,C,C,G,C,C,T,C,
G,T,T,C,G,T,C,A,T,G,T,G,A,T,C,T,C,C,GCA,G,C,C,C,C,C,G,G,C,A,T,A,A
11. C,A,GCA,C,G,C,C,G,A,T,C,A,G,A,G,A,T,T,A,C,T,A,A,G,A,A,G,A,T,G,CTGC,A,G,C,T,C,T,G,G,G,A,T,G
,G,A,A,G,C,G,T,C,T,G,C,A,C,A,T,G,G,C,T,C,ACAC,G,C,C,C,TAAC,G,C,G,G,G,G,T,G
12. C,A,AGCAGG,C,G,C,C,G,A,T,C,A,G,A,G,A,T,T,A,-
,T,A,A,G,A,A,G,A,T,G,T,G,A,G,C,T,C,T,G,G,G,A,T,G,G,A,-
,G,C,G,T,C,T,G,C,A,C,A,T,G,G,C,T,C,A,G,C,C,C,T,G,C,G,G,G,G,T,G
13. C,A,AGCAGG,C,G,C,C,G,A,T,C,A,G,A,G,A,T,T,A,-
,T,A,A,G,A,A,G,A,T,G,C,CCGG,A,G,C,T,C,T,G,G,G,A,T,G,G,A,-
,G,C,G,T,C,T,G,C,A,C,A,T,G,G,C,T,C,A,G,C,C,C,T,G,C,G,G,G,G,T,G
14. C,A,GCA,C,G,C,C,G,A,T,C,A,G,A,G,A,T,T,A,C,T,A,A,G,A,-,-
,A,T,G,T,GC,A,C,C,T,C,T,G,G,G,A,T,G,G,ATTTC,A,G,C,G,T,C,T,G,C,A,C,A,T,G,G,C,T,C,A,G,T,C,C,TAAC,G,C,G
,G,G,G,G,T,G
15. C,A,AGCAGG,C,G,C,C,G,A,T,C,A,G,A,G,A,T,T,A,-,T,A,A,G,A,-,-
,A,T,G,T,CCGG,A,C,C,T,C,T,G,G,G,A,T,G,G,A,A,G,C,G,T,C,T,G,C,A,C,A,T,G,G,C,T,C,A,G,T,C,C,T,G,C,G,G,G,G,
G,T,G

Lista de las posiciones donde se hallaron mutaciones del gen Sh1 con respecto a la referencia:

2251, 3094, 3104, 3335, 4101, 4886, 5116, 5163, 5560.

Haplotipos para el gen Sh1 que responden a las posiciones de las mutaciones halladas:

- | | |
|------------------------------|-------------------------------|
| 1. A, T, A, G, A, C, -, T, A | 9. A, T, C, G, G, T, T, G, |
| 2. G, T, A, G, A, C, -, T, G | 10. A, T, C, A, G, T, T, G, T |
| 3. A, T, A, G, A, C, -, T, | 11. A, T, A, A, T, T, -, T, A |
| 4. G, CTT, T, A, T, T, T, G | 12. A, T, A, A, T, T, -, T, G |
| 5. G, T, A, A, T, T, -, T, A | 13. A, T, A, A, T, T, T, T, G |
| 6. G, T, A, G, A, C, -, T, A | 14. G, C, T, G, T, T, T, G, A |
| 7. A, T, C, G, G, T, T, G, T | 15. G, T, C, A, T, T, T, G, |
| 8. T, T, C, G, G, T, T, G, T | 16. G, T, C, A, T, T, T, G, T |

2. FRECUENCIAS DE POLIMORFISMOS (%) A NIVEL ADN

Y AA

Tabla de frecuencias relativas (%) de polimorfismos (SNP, deleciones e inserciones) identificados en las secuencias nucleotídicas (ADN) de los genes candidatos *SvLes1* y *Sh1* y aminoacídicas (AA) para *SvLes1*, para las poblaciones EM y SR de *P. coloratum*.

Gen	Región	Tipo	ADN (EM %)	ADN (SR %)	AA (EM %)	AA (SR %)
<i>SvLes1</i>	Exón 1	SNP	56.1	75.5	57.3	56.1
	Exón 1	Del	39.6	17.3	31.3	34.3
	Exón 1	Ins	4.3	7.2	11.4	9.6
	Exón 2	SNP	96.6	94.0	56.4	59.5
	Exón 2	Del	-	-	37.7	33.6
	Exón 2	Ins	3.4	6.0	5.9	6.9
<i>Sh1</i>	Exón 1	SNP	7.1	5.2	-	-
	Exón 1	Del	92.5	94.4	-	-
	Exón 1	Ins	0.4	0.4	-	-