



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTORADO EN AGRONOMÍA

**Contribución al conocimiento de la taxonomía y del modo
reproductivo del pasto llorón
Eragrostis curvula (Schrad.) Nees**

Diego Carlos Zappacosta

BAHIA BLANCA

ARGENTINA

2009

Prefacio

Esta tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Agronomía, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal, dependiente del Centro de Recursos Naturales Renovables de la Zona Semiárida (CONICET) y en el Laboratorio de Genética del Departamento de Agronomía de la Universidad Nacional del Sur, durante el período comprendido entre marzo de 2005 y diciembre de 2008, bajo la dirección de la Dra. Viviana Echenique, Profesora Titular D.E. de las Cátedras de Genética Formal y Molecular y Biotecnología Agrícola del Departamento de Agronomía de la Universidad Nacional del Sur.

Diego Carlos Zappacosta

2 de Marzo de 2009

DEPARTAMENTO DE AGRONOMÍA
UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

Agradecimientos

Todos los que pasaron por una tesis o un trabajo similar sabrán que no es el producto de sólo una persona, sino de un grupo, que en este caso es bastante numeroso. Al querer mencionarlos seguro cometeré omisiones, pero no quiere dejar de manifestar mi más profundo agradecimiento a ellos que sin su apoyo no hubiera llegado a estas instancias.

Gracias Viviana por darme esta oportunidad, enseñarme a trabajar de una forma distinta, ordenar mis ideas cuando estaban en un mar de confusión y llegar a este fin.

Muchas personas aportaron su trabajo y colaboración en forma desinteresada y sin ellas nunca hubiera terminado. Muchas gracias Mauro, Juan, Gerardo, Silvina, Alicia, Rubén, Susana, Ana, Gabriela... Sepan que cuentan conmigo.

Por supuesto este trabajo de varios años no se hace sólo de 'trabajo' sino también de compartir ideas, discusiones, cafés, salidas, deportes, etc., momentos tan importantes como la formación profesional que uno adquiere. Muchas gracias a esas personas con las que compartí horas dentro y fuera del laboratorio.

A mis amigos, que siempre están, estuvieron y seguirán estando, brindándome cariño y soporte.

A mi familia porque ahí se generó mi curiosidad y asombro hacia la naturaleza que me ha llevado hasta estas instancias.

A Eugenia que seguro le tocó la peor parte, no sólo mis malos humores sino también la famosa frase: "No puedo, tengo que trabajar en la tesis". Gracias por bancarme tanto.

Muchas gracias a todos los que menciono y a los que saben de mi reconocimiento hacia ellos.

Índice

Prefacio	ii
Agradecimientos	iii
Índice	iv
Resumen	vii
Abstract	xi
Introducción	1
Pasto llorón.....	2
Apomixis.....	9
Mecanismos de apomixis	12
Contexto donde se expresa	15
Apomixis en el pasto llorón	19
Herencia y genética de la apomixis	21
Relevancia del tema	24
Marcadores moleculares	28
Mapeo genético	30
Antecedentes de aplicación de técnicas biotecnológicas para el mejoramiento del pasto llorón	33
Hipótesis	36
Objetivo	37
Desarrollo del trabajo	37
Capítulo 1 - Desarrollo y aplicación de marcadores moleculares para estudiar la variabilidad y taxonomía en el complejo <i>Eragrostis curvula</i>	39
Situación taxonómica dentro de la especie	40
Caracterización de genotipos	43
Uso de marcadores moleculares para la caracterización de genotipos	43
Hipótesis	44
Objetivos	45
Materiales y Métodos	45
Material vegetal	45
Extracción de ADN	46
Desarrollo de microsatélites y aplicación a la diferenciación de cultivares	47
Amplificación y revelado de RAPDs	48
Amplificación y revelado de AFLPs	48
Análisis de datos	49
Resultados y Discusión	51
Desarrollo de microsatélites	51
Evaluación de homogeneidad intracultivar	53
Diferenciación de cultivares	55

Conclusiones	61
Capítulo 2 - Métodos para la caracterización del modo reproductivo	62
Introducción	63
Hipótesis	67
Objetivos	67
Materiales y Métodos	67
Material vegetal	67
Citometría de flujo	68
Estudios citoembriológicos	68
Coloración con azul de anilina y observación al microscopio de fluorescencia	68
Coloración con safranina-fast green	69
Pruebas de progenie utilizando marcadores moleculares	69
Resultados y Discusión	70
Citometría de flujo	70
Prueba de deposición de calosa	70
Pruebas de progenie	78
Conclusiones	79
Capítulo 3 - Estudios preliminares tendientes a la obtención de una población de mapeo para la región determinante de la apomixis en <i>Eragrostis curvula</i>	81
Ventajas y particularidades del modelo <i>Eragrostis</i> en relación al control de la apomixis	82
Herencia de la apomixis en pasto llorón	83
Hipótesis	87
Objetivos	87
Materiales y Métodos	88
Material vegetal	88
Extracción de ADN de la F1	88
Caracterización genética de la F1: primers y condiciones de PCR	89
Análisis citoembriológicos en los posibles progenitores femeninos	89
Resultados y Discusión	89
Cruzamientos	89
Análisis genético de la F1	90
Herencia del carácter apomixis en pasto llorón	94
Conclusiones	95
Capítulo 4 - Estudios del potencial de plasticidad genómica en plantas apomícticas facultativas	97
Antecedentes	98
Estrés y variabilidad	104
Elementos transponibles o transposones	107
Apomixis y epigenética	109
Apomixis y ambiente	110

Hipótesis	112
Objetivos	113
Materiales y Métodos	113
Material vegetal	113
Pruebas de progenie con RAPDs	114
Amplificación de polimorfismos sensibles a metilación (MSAP)	114
Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados – AFLPs	116
Aislamiento y clonación de los fragmentos de ADN	117
Análisis de los datos de secuenciación	118
Análisis de representación de retrotransposones en las bibliotecas de ESTs	118
Resultados.....	119
Análisis de la variación en la expresión de la apomixis en un somaclón tetraploide de <i>E. curvula</i>	119
Análisis de la variación genética y epigenética ocurrido en las plantas colchíploides en cuatro años (2003-2007)	120
Secuenciación de las bandas diferenciales	127
Retrotransposones en genotecas de ADNc de pasto llorón	133
Otros resultados del grupo de trabajo	134
Nueva hipótesis	134
Conclusiones	135
Bibliografía	136
Anexo	152
Publicaciones generadas a partir de este trabajo	158
Presentaciones a congresos	158
Publicaciones	159

Resumen

El pasto llorón, *Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees, es una gramínea perenne de origen sudafricano que se ha convertido en una de las más importantes fuentes de alimentación del ganado en las áreas subhúmedas y semiáridas de nuestro país. Constituye un grupo botánico muy polimórfico por lo que en numerosas oportunidades se hace referencia a esta especie como el complejo *E. curvula*. Este complejo es morfológicamente diverso, pobremente conocido y no bien circunscrito. Si bien existen diferencias morfológicas marcadas entre las variedades de esta gramínea, la existencia de formas o ecotipos con características intermedias entre ellas dificulta la clasificación. *E. curvula* incluye genotipos de diferente ploidía. Los diploides ($2n=2x=20$) son raros en la naturaleza, se reproducen sexualmente y son autoincompatibles, mientras que los poliploides ($2n=6x=60$ a $2n=8x=80$) se reproducen por apomixis y son autocompatibles. También existen unos pocos facultativos.

El término apomixis hace referencia a una forma de reproducción asexual a través de semillas que origina plantas genéticamente idénticas a la planta madre (clones). Estas semillas se forman a partir de tejidos maternos del óvulo, evitando los procesos de meiosis y fertilización. El pasto llorón presenta apomixis diplospórica y la polinización es necesaria para la formación de la semilla (pseudogamia).

En el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del CERZOS-CONICET-UNS se obtuvo por cultivo *in vitro* de inflorescencias de pasto llorón una planta diploide (UNST1122). Semillas de esta planta fueron tratadas con colchicina y se obtuvieron dos plantas tetraploides (colchiploides) con alto grado de sexualidad (UNST1112 y UNST1131). Esta serie de plantas permite estudiar tanto variaciones producidas por cambio de ploidía como por cambios en el modo reproductivo. Por otro lado, la disponibilidad de plantas tetraploides sexuales posibilita el cruzamiento de las mismas, como madres, con polinizadores apomícticos, de manera de obtener poblaciones de mapeo que segreguen para el carácter y de esta forma realizar un mapa genético y ubicar regiones genómicas asociadas al modo reproductivo.

Por lo tanto los objetivos de la presente tesis fueron: 1) analizar la variabilidad existente en el germoplasma nacional de pasto llorón, a fin de seleccionar los genotipos apropiados para desarrollar una población segregante para la apomixis; 2) estudiar el modo reproductivo de la especie; 3) construir un mapa genético a nivel tetraploide utilizando una población segregante para el modo reproductivo y 4) localizar regiones genómicas asociadas a la apomixis.

Se utilizó una colección de germoplasma (ocho cultivares comerciales) proveniente del INTA (EEA Anguil, La Pampa) que representan los más difundidos en Argentina y algunos desarrollados en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal (CERZOS, UNS). Se utilizaron marcadores RAPDs y AFLPs y se desarrollaron marcadores SSRs a partir de genotecas de ADNc de *E. curvula*. La información obtenida permite concluir que los datos aportados por marcadores moleculares se ajustan a los datos previos citológicos y quimiosistemáticos y el agrupamiento de los distintos materiales corresponde a los distintos tipos agronómicos. Los donantes de polen más adecuados para la obtención de una población de mapeo serían los cvs. Morpa, Ermelo y Don Arturo.

Para la evaluación del modo reproductivo se analizaron diferentes técnicas, de manera de contar con un test rápido y preciso para la caracterización de la población de mapeo. Se realizaron estudios citoembriológicos de sacos embrionarios (con distintas tinciones), pruebas de progenie con marcadores moleculares y análisis de ploidía en semillas con citometría de flujo. Las pruebas de progenie utilizando marcadores RAPDs y el patrón de deposición de calosa simplifican el análisis y agilizan el proceso de caracterización fenotípica. Con citometría de flujo se confirmó que la relación de ploidías entre embrión/endosperma en la semilla no se modifica en los procesos apomícticos con respecto a los sexuales, por lo que esta técnica no serviría para la caracterización del modo reproductivo. Esto hace al sistema *Eragrostis* atractivo para la transferencia de la apomixis a los cereales, que son sumamente sensibles a los cambios en la relación de ploidía embrión/endosperma. La observación de calosa en la megasporogénesis de plantas apomícticas cuestiona observaciones realizadas previamente.

Se realizaron cruzamientos entre los colchiploides y los cvs. tetraploides apomícticos Morpa y Ermelo, cuatro años luego de la poliploidización de los colchiploides. Al analizar la segregación de marcadores en la progenie se observó que esta presentaba una alta homología con el progenitor femenino, característica de la reproducción apomíctica. Por tal razón se realizaron test de deposición de calosa y pruebas de progenie en las plantas UNST1131 y UNST1112, demostrando que actualmente presentan un 10-20% de reproducción sexual, en lugar del 100% hallado en los estudios realizados en el año 2003.

La siguiente etapa del trabajo de tesis tuvo como objetivo comprobar si durante el periodo 2003-2007 se produjeron alteraciones de tipo genético (análisis de AFLPs) y/o epigenético (análisis de MSAP) en las plantas UNST1131 y UNST1112, a fin de explicar la reducción en la expresión de la sexualidad. Estos análisis revelaron cambios genéticos y epigenéticos en el tiempo en estas plantas, indicando cierta plasticidad genómica. Se secuenciaron bandas polimórficas, algunas de las cuales mostraron homología con secuencias repetitivas y con marcadores de apomixis. También se estudió la actividad de retrotransposones en las genotecas de *E. curvula* disponibles para estimar la posibilidad de mutaciones y reestructuraciones epigenéticas dirigidas por estos elementos. Los resultados de este análisis indican que en la genoteca de inflorescencias de la planta Tanganyika (tetraploide apomíctica) existe un porcentaje menor de secuencias similares a retrotransposones transcripcionalmente activos en comparación con las genotecas de inflorescencias de las plantas UNST1122 (diploide sexual) y UNST1131 (tetraploide altamente sexual, ya que las genotecas se realizaron en el año 2003). La mayor actividad de retrotransposones observada en las plantas sexuales podría deberse a las situaciones de estrés por las que pasaron durante el cultivo *in vitro* y posterior tratamiento de poliploidización.

De todo lo expuesto se concluyó que las plantas diploides de *E. curvula* son completamente sexuales. Las plantas de mayor nivel de ploidía son, en general altamente apomícticas. Algunas plantas tetraploides pueden presentar sexualidad en alto grado, como las colchiploides recientes. Otras son completamente sexuales, como el material PI 574506 del USDA. Estas evidencias indicarían la existencia de una región (o

dos) determinantes del carácter apomixis. Esta/s región/es estaría/n ausente/s en las tetraploides completamente sexuales. Las plantas apomícticas pueden desreprimir la sexualidad ante situaciones que provoquen choques genómicos, indicando un control epigenético del carácter. La/s región/nes también estarían presentes en la planta diploide de la serie euploide, pero no se expresa. Una hipótesis para explicar este fenómeno podría basarse en los mecanismos de silenciamiento que existen en las plantas dependientes del número de copias de ciertos genes.

Abstract

Weeping lovegrass, *Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees is a perennial grass native from Southern Africa that has become one of the most important forage crops in the subhumid and semiarid areas of Argentina. It constitutes a highly polymorphic group so many times referred as the *E. curvula* complex. This complex is morphologically diverse, poorly understood and not very well circumscribed. *E. curvula* includes genotypes with different ploidy. Diploids ($2n = 2x = 20$) are rare in nature, reproducing sexually and are self-incompatible, while the polyploids ($2n = 6x = 60$ to $2n = 8x = 80$) are self-compatible and reproduce by apomixis. There are also a few facultative cytotypes.

The term apomixis refers to a form of asexual reproduction through seeds that give origin to plants genetically identical to the mother plants (clones). These seeds are formed from maternal tissues of the ovule, preventing the meiosis and fertilization process. Weeping lovegrass presents diplosporous apomixis and pollination is necessary for seed formation (pseudogamia).

In the Plant Biotechnology Laboratory CERZOS-CONICET-UNS a diploid plant of weeping lovegrass (UNST1122) was obtained by *in vitro* culture of inflorescences. Seeds of this plant were treated with colchicine and two tetraploid plants (colchiploid plants) were obtained with a high degree of sexuality (UNST1112 and UNST1131). This series allowed the study of variations produced by changes of ploidy and/or by the reproductive mode. Moreover, the availability of sexual tetraploid plants enables the crossing of them, as mothers, with apomictic pollinators to obtain mapping populations segregating for the reproductive mode. This make possible the construction of a genetic map where to locate genomic regions associated with apomixis.

Therefore the objectives of this thesis were: 1) to analyze the variability in the weeping lovegrass local germplasm in order to select genotypes for a mapping population segregating for apomixis; 2) to study the reproductive mode of the species; 3) to

construct a genetic map at tetraploid level and 4) to identify genomic regions associated with apomixis.

A collection of germplasm (eight cultivars) from INTA (EEA Anguil, La Pampa) was used, which represent the most widespread cultivars used in Argentina and some developed in the Plant Biotechnology Laboratory (CERZOS, UNS). AFLPs and RAPDs markers were used and SSRs markers were developed from cDNA libraries of *E. curvula*. The information obtained suggests that the data provided by molecular markers is consistent with previous classifications based on cytological, chemosystematics and agronomic data. Pollen donors suitable for obtaining the mapping population would be the cvs. Morpa, Ermelo or Don Arturo.

The reproductive mode was analyzed using different techniques, looking for a quick and accurate test for the characterization of the mapping population. Cytoembryological studies of embryo sacs (with different staining techniques), progeny tests with molecular marker and flow cytometry seed screen were performed. The progeny tests using RAPDs markers and callose deposition simplify and expedite the phenotypic characterization. Flow cytometry confirmed that the ploidy relationship between embryo/endosperm in the seed is not modified in apomictic with regard to sexual processes, so this technique is not useful for the characterization of the reproductive mode. This fact makes the system very attractive in the light of future transfer of the trait to cereals, that are very sensitive to changes in the embryo/endosperm ploidy relations. Callose was observed in apomictic plants, questioned previous results of other authors.

Crosses were made between the colchiploid plants and the apomictic tetraploid cvs. Morpa and Ermelo. These crosses were done four years after obtaining the colchiploid plants. A preliminary progeny test showed a high homology with the mother plant, characteristic of apomictic reproduction. For this reason colchiploid plants were analyzed using callose and progeny tests. These studies showed 10-20% of sexual reproduction, instead of the 100% found in previous studies conducted immediately after polyploidization.

The next stage of the thesis aimed to verify whether during the 2003-2007 period there were genetic (AFLPs analysis) and/or epigenetic alterations (MSAP analysis) in the colchiploid plants and the original one, from cv. Tanganyika. These studies had the objective to explain the reduction in the expression of sexual reproduction. These analyses revealed genetic and epigenetic changes over time, indicating some genomic plasticity. Polymorphic bands were sequenced, and some of them showed homology with repetitive elements and apomixis markers. Studies of retrotransposons activity in the *E. curvula* libraries were performed to estimate the possibility of mutations and epigenetic restructuring directed by these elements. Results indicate that the library from inflorescences of Tanganyika (apomictic tetraploid) have the lowest percentage of sequences similar to retrotransposons compared to the libraries of UNST1122 (sexual diploid) and UNST1131 (highly sexual tetraploid, since the library was performed in 2003). The increased activity of retrotransposons observed in sexual plants could be due to stressful situations occurred during *in vitro* culture and subsequent colchicine treatment.

From the foregoing it was concluded that the diploid plants of *E. curvula* are fully sexual. Plants of higher ploidy are generally highly apomictic. Tetraploid plants can be highly sexual, such as UNST1131 and UNST1112 (colchiploids) immediately after polyploidization. Others are completely sexual such as PI 574506 cytotype from USDA. These evidences indicate the existence of one or two regions controlling apomixis (based on previous results). This region is absent in fully sexual tetraploids. Apomictic plants can un-repress sexuality under genomic stress situations, indicating an epigenetic control of the trait. The apomicts region/s is/are also present in the diploid plant UNST1122, but is not expressed. One hypothesis to explain this phenomenon could be based on silencing mechanisms dependent on the number of copies of certain genes.

Introducción general

Pasto llorón

Eragrostis Wolf, es el género más representado en las Eragrostideae, una tribu compuesta por 80 géneros y alrededor de 1000 especies distribuidas principalmente en regiones tropicales y templado-cálidas de todo el mundo. El género *Eragrostis*, consta de más de 350 especies, especialmente en África, lo cual sugiere que ha tenido su origen en dicho continente. La tribu no posee una agrupación natural sino que fue armada por conveniencia y *Eragrostis* en sí mismo es un grupo polifilético. La naturaleza polifilética de *Eragrostis* fue confirmada por análisis de secuencias conservadas, ITS y trnL-F (Roodt-Wilding y Spies, 2006). La característica del género es una panoja con numerosas espiguillas con lemas enteras y glabras. Todas las especies de *Eragrostis*, excepto *E. walteri* (Voigt *et al.*, 2004), poseen anatomía tipo C4 que es característica de varias especies de plantas herbáceas tropicales que les permite una mayor eficiencia de fotosíntesis en condiciones de alta temperatura. La mayor concentración de especies se produce en Sudáfrica, de donde proviene el pasto llorón (Figura I.1). Existen varias especies de interés económico, entre las que sobresale *E. curvula* (forrajera), *E. tef* (alimentación humana y forraje) y algunas que integran pastizales como *E. chloromelas* y *E. lehmanniana*, estas últimas difíciles de separar de *E. curvula* debido a la existencia de híbridos con características intermedias.

La posición taxonómica del pasto llorón de acuerdo a la clasificación de Cronquist (1981) es la siguiente (Departamento de Agronomía de los Estados Unidos (<http://www.usda.gov>):

Reino	Plantae (plantas)
Subreino	Tracheobionta (plantas vasculares)
Superdivisión	Spermatophyta (plantas con semilla)
Filo	Magnoliophyta (plantas con flor)
Clase	Liliopsida (monocotiledóneas)
Subclase	Commelinidae
Orden	Cyperales
Familia	Poaceae
Subfamilia	Chloridoideae
Tribu	Eragrostideae
Género	<i>Eragrostis</i> von Wolf
Especie	<i>Eragrostis curvula</i> (Schrader) Nees (weeping lovegrass)

En Argentina se utiliza la clasificación de Engler y Diels (1936), donde la posición taxonómica del pasto llorón es la siguiente:

División	Spermatophyta
Subdivisión	Angiospermae
Clase	Monocotyledonae
Orden	Glumiflorales
Familia	Poaceae (Gramineae)
Tribu	Eragrostideae
Género	<i>Eragrostis</i> von Wolf
Especie	<i>Eragrostis curvula</i> (Schrader) Nees (pasto llorón)

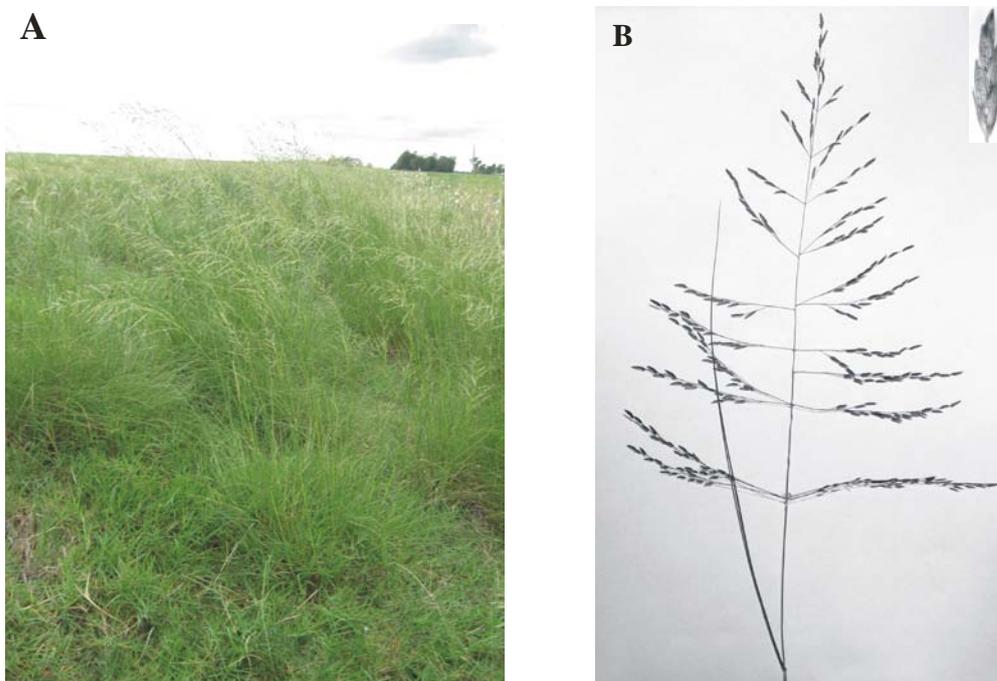


Figura I.1. A) Planta de pasto llorón y B) detalle de la panoja y espiguilla

El pasto llorón es una de las más importantes fuentes de alimentación del ganado en las áreas subhúmedas y semiáridas de nuestro país (Fernández *et al.*, 1991). Las principales cualidades de esta gramínea son su extraordinaria rusticidad, su capacidad para prosperar en suelos pobres en fertilidad y su aptitud para consolidar suelos erosionables de textura suelta. Se ha demostrado que incorpora considerable cantidad de materia orgánica y mejora la estructura del suelo. En poco más de un cuarto de siglo, el pasto llorón ha pasado a ser de un cultivo en pequeñas parcelas experimentales a formar extensos pastizales, cubriendo en la actualidad una superficie que abarca alrededor de 500.000 has, principalmente en la región semiárida pampeana (Tabla I.1). En

consecuencia, es la gramínea perenne más extensamente cultivada en Argentina, con la perspectiva de que en el futuro la superficie sembrada se extienda considerablemente, ya que puede calcularse en más de 5.000.000 has la extensión de nuestro país apta para el cultivo de esta planta, en muchos casos en forma excluyente (Covas y Cairnie, 1985). Tanto *E. lehmanniana* como *E. chloromelas* se han ensayado en nuestro país, pero han demostrado poseer menores aptitudes como plantas forrajeras o consolidadoras de suelos erosionables que *E. curvula*. En Sudáfrica, el pasto llorón es considerado una especie pionera, mientras que en varias partes del mundo es considerado una maleza de difícil control, como por ejemplo en Australia (Lazarides, 1997).

Tabla I.1 Superficie implantada con forrajeras perennes, discriminada por cultivo, en provincias de la Región Pampeana. INDEC (2002).

Provincia	Superficie implantada							
	Achicoria	Agropiro	Alfalfa	Festuca	Lotus	Pasto llorón	Trébol	Alfalfa consociada
Total	18,6	357,6	1.749,8	75,6	36,5	476,4	49,9	3.232,0
Buenos Aires	4,0	245,7	113,6	61,2	19,9	133,8	19,8	1.909,1
Córdoba	8,4	89,8	1.015,6	7,7	0,1	66,4	13,4	315,9
Entre Ríos	3,6	--	54,2	1,6	15,2	--	0,7	97,2
La Pampa	1,9	18,2	221,9	3,9	1,2	276,2	11,7	431,0
Santa Fe	0,7	3,9	344,5	1,2	0,2	--	4,4	478,8

Es esencialmente estival y crece vigorosamente en forma cespitosa, aún con escasa humedad, debido a su eficiente uso del agua. Su capacidad para rebrotar temprano en primavera y producir forraje verde en otoño hasta más tarde que otras especies, ha llevado a su incorporación en los sistemas de producción ganadera. Soporta muy bien el pastoreo, habiendo demostrado su valor no sólo para vacas de cría sino también para recría e invernada. Presenta un buen valor nutritivo durante el rebrote y una receptividad alta comparada con la de campos naturales de la región semiárida pampeana. Su gran agresividad le permite competir y controlar importantes malezas. Entre las principales limitaciones del pasto llorón se encuentran su inaptitud como fuente de forraje invernal y su mediana calidad forrajera. Aún así sus variedades se destacan por su resistencia al frío (Fernández *et al.*, 1991).

Se trata de una especie muy variable, pero con las siguientes características morfológicas (Covas, 1991; Lazarides, 1997):

- Matas perennes y vigorosas,
- Numerosos macollos, algunos de los cuales dan cañas floríferas de 60 a 180 cm de altura,
- Vainas de las hojas basales de color púrpúreo y pilosas mientras que las de las hojas superiores son glabras,
- Láminas largas y angostas de 30 a 80 cm de longitud y de 3 a 8 mm de ancho, planas y convolutadas, glabras o pilosas, en general colgantes,
- Lígula formada por una franja de pelos densamente dispuestos de alrededor de 5 mm de longitud,
- Cañas floríferas que llevan una panoja terminal de 15 a 50 cm de longitud, amplias y laxas o estrechas y compactas (tipo conferta),
- Espiguillas dispuestas apretadamente contra las ramas de las panojas, constando de cinco a diez antecios y
- Semillas ovoides, de 0,8 a 1,7 mm de longitud, de color castaño, rojizo o vinoso. El embrión ocupa aproximadamente la mitad de la longitud de la misma (si es de color azul violáceo es viable, en cambio si es del mismo color que el resto de la semilla es inviable).

Los suelos arenosos o franco-arenosos y profundos son los preferidos por esta especie, pero el conjunto de los distintos cultivares cubre una amplia gama de suelos en cuanto a su textura. No se adapta a suelos salinos y/o sódicos pero sí tolera los moderadamente ácidos. En cuanto al clima, el pasto llorón prospera con temperaturas que superen los 12°C como media anual y con lluvias que, coincidiendo con su periodo de crecimiento, no sean inferiores a 250 mm anuales. En consecuencia, el pasto llorón puede cultivarse, en sentido latitudinal, desde la región de la Puna del noroeste hasta el sureste de la provincia de Río Negro (Covas, 1991). Es notable la resistencia a la sequía dada por la cubierta cerosa, especialmente en el tipo robusta (Carcellar *et al.*, 1980; Polci, 2000).

El origen de los cultivares de pasto llorón es difícil de determinar, ya que casi todos provienen de selecciones practicadas sobre materiales nativos de diversas localidades

sudafricanas, como por ej. Tanzania, Transvaal o Middelburg (Fernández *et al.*, 1991). Fue introducido en nuestro país aproximadamente en el año 1930 desde los EEUU por el Sr. John Nelson, en una estancia de la provincia de San Luis. En 1947, semillas del cultivar Tanganyika (primer cultivar adaptado), fueron remitidas a la Estación Experimental Anguil del INTA, donde fueron multiplicadas, constituyendo la base de la intensificación del cultivo en nuestro país. El INTA ha realizado numerosos estudios técnicos y comparativos de variedades, principalmente en las EEA Anguil y San Luis, donde se reunieron colecciones de más de 70 biotipos introducidos de pasto llorón, a partir de los cuales se seleccionaron los cultivares argentinos (Fernández *et al.*, 1991).

E. curvula incluye genotipos de diferente ploidía, (desde $2x$ hasta $8x$, con $x=10$), donde los diploides ($2n=2x=20$) son raros en la naturaleza, siendo la mayoría poliploides ($2n=4x=40$ a $2n=8x=80$), existiendo además formas aneuploides. Los diploides se reproducen sexualmente y son autoincompatibles (necesitan polinización cruzada), mientras que los poliploides se reproducen por apomixis y son autocompatibles. Aunque la mayoría de las colecciones realizadas en Sudáfrica están constituidas por materiales apomícticos obligados, también existen unos pocos facultativos (Brix, 1974, Vorster y Liebenberg, 1977).

El único informe de triploidía en el complejo *E. curvula* es el de Leigh (1960) para el tipo robusta. De acuerdo a Voigt (comunicación personal), los triploides de pasto llorón son inviábiles. Poverene (1988) no encuentra ninguna planta triploide ni aneuploide entre las accesiones que evaluó y Vorster y Liebenberg (1977) informan haber encontrado sólo una planta pentaploide. Si bien el nivel heptaploide ($2n=7x=70$) es más frecuente, los materiales par-poliploides parecen ser mucho más abundantes que los impar-poliploides en el complejo *E. curvula* (Poverene, 1988). Es evidente que la persistencia de los impar-poliploides se debe a la reproducción apomíctica, pero la inestabilidad meiótica que los caracteriza necesariamente debe representar una desventaja adaptativa (Poverene y Curvetto, 1991). Varios autores han encontrado aneuploidías y la propagación de dichos citotipos también se debe a la apomixis (Leigh, 1960; Jones *et al.*, 1978).

El pequeño tamaño de los cromosomas, característico de las eragrostoides, y la dificultad para obtener preparados suficientemente claros son posiblemente las causas

de que ningún trabajo citológico sobre pasto llorón presente descripciones de cariotipo. Los estudios realizados por Poverene (1988) muestran que predominan los cromosomas metacéntricos y submetacéntricos y el tamaño medio es de 2 a 3 μm .

Poverene (1988) estudió la meiosis en las anteras de pasto llorón para observar qué tipo de conformaciones predominan y observó que la más frecuentemente encontrada es la de bivalentes, aunque en la mayor parte de las líneas evaluadas también se observaron multivalentes y univalentes. La mayor frecuencia de los multivalentes observados en ese estudio correspondieron a cuadrivalentes, tanto abiertos como cerrados. La cantidad de trivalentes fue menor y sólo se observaron sextivalentes en frecuencia muy reducida en tres de los cultivares analizados. En el cv. Tanganyika ($2n=4x=40$) se encontró la mayor frecuencia de configuraciones múltiples (cuatro tetraivalentes y un trivalente en promedio). Las irregularidades se presentaron mayormente en las accesiones de mayor ploidía y las más frecuentes fueron: placas metafásicas fragmentadas, asincronía durante la segunda división, puentes cromatínicos y cuartetos anormales, formados por tres, cinco ó seis células, micrósporas lineales y distribuciones desiguales de los cromosomas hacia los polos. Los resultados concordaron con las observaciones de Streetman (1970) y Vorster y Liebenberg (1977) en que las meiosis fueron regulares en plantas con bajo nivel de ploidía, mientras que hubo una tendencia a meiosis anormales en los altamente poliploides. En las accesiones tetraploides, la presencia de multivalentes demuestra que existe al menos una homología parcial u homeología entre genomas, pero la mayor parte de los cromosomas se aparean en forma bivalente. Especies tetraploides de *Paspalum* donde predomina el apareamiento en bivalentes con un número variable de cuadrivalentes son consideradas aloploides segmentales (Quarín *et al.*, 1996). Vorster y Liebenberg (1977) también encuentran alteraciones estructurales, por ello consideran que se trata de aloploidía segmental. La mayor frecuencia de univalentes e irregularidades meióticas en los cultivares de mayor ploidía demostrarían una mayor complejidad genómica y menor homología cromosómica (Poverene, 1988).

El tipo de apareamiento cromosómico observado sugiere que existieron procesos de hibridación y, posiblemente, de duplicación genómica en este complejo, de modo que consiste principalmente de aloploides segmentales. Estos procesos no parecen recientes, ya que ninguna de las accesiones mostró el comportamiento típico de los híbridos de primera generación (Poverene, 1988).

Poverene (1988), en función de las observaciones realizadas en el cv. Tanganyika (mayor frecuencia de configuraciones múltiples, presencia de hilos cromatínicos uniendo estas figuras y las frecuencias de cuadrivalentes en forma de anillo) hipotetiza que sería un cultivar autopoliploide, dado que existe una alta homología de los cuatro cromosomas de la asociación. Cardone (2006) analizando el genotipo tetraploide UNST1131, obtenido por duplicación cromosómica a partir de semillas de un genotipo diploide, encuentra en promedio 12,2 bivalentes, 3,1 cuadrivalentes, 0,8 trivalentes y 0,8 univalentes. Estos resultados son similares a los observados por Poverene (1988) en el cv. Tanganyika, lo que apoyaría la hipótesis de un origen autopoliploide en el cv. Tanganyika, ya que el genotipo UNST1131 es un verdadero autopoliploide por su origen.

En general la viabilidad del polen en varios cultivares de diferentes ploidías es elevada, ya que al menos el 50% de los granos de polen son viables (Poverene, 1988; Polci, 2000). Este valor puede considerarse normal y ya que esta gramínea es pseudógama (el desarrollo del endosperma requiere de la fertilización del núcleo polar), la producción de semilla no se encontraría comprometida. Los análisis de viabilidad de polen indican que ninguna de las accesiones es altamente estéril, a pesar de la alta frecuencia de anomalías meióticas observadas.

En cuanto al mejoramiento genético de la especie, la obtención de genotipos adaptados a diferentes ambientes y con mejor calidad forrajera, representan los mayores desafíos (Covas, 1991). Tradicionalmente el mejoramiento del pasto llorón se limitó a la selección de ecotipos en sus lugares de origen o sobre colecciones y procedencias sudafricanas en otros países. Posteriormente, con la aparición de genotipos sexuales se recurrió a los cruzamientos (Voigt *et al.*, 2004).

El pasto llorón constituye un grupo botánico muy polimórfico por lo que en numerosas oportunidades se hace referencia a esta especie como el complejo *E. curvula* o como *E. curvula sensu lato* (Vorster y Liebenberg, 1977; Covas y Cairnie, 1985; Voigt *et al.*, 2004). Este complejo es morfológicamente diverso, pobremente conocido y no bien circunscrito. La dificultad en definir la estructura del mismo es causada por la falta de conocimiento taxonómico. Si bien existen diferencias morfológicas marcadas entre las variedades de esta gramínea, la existencia de formas o ecotipos con características

intermedias entre ellas dificulta la clasificación. A lo anterior se suma la reproducción por apomixis, que fija cualquier nueva variación. Esto ha llevado a una considerable confusión entre los ecotipos y cultivares que se hallan actualmente a disposición de los mejoradores, técnicos y productores (Poverene, 1988; Covas, 1991).

Apomixis

El concepto de apomixis en plantas que cuenta con mayor aceptación entre los diferentes autores es el de reproducción asexual por medio de semillas (Nogler, 1984a). Este fenómeno involucra cambios en relación al desarrollo de una semilla normal, que es producto de reproducción sexual. Estos cambios suceden muy temprano en el desarrollo del óvulo, y afectan procesos como la meiosis, la megagametogénesis, la fecundación y la embriogénesis (Crane 2001). La apomixis es un poderoso sistema de clonación natural a través de semillas que ha evolucionado como un sistema de reproducción alternativo a la sexualidad a través de la reformulación de los programas de desarrollo del ovario (Grimanelli *et al.*, 2001a). Afecta a los procesos que suceden en el óvulo y, salvo raras excepciones, permite el desarrollo de polen viable, aunque puede afectar la tasa de viabilidad. Por esto, los estudios sobre la apomixis históricamente conciernen al óvulo (Savidan, 2000).

En la reproducción sexual la progenie generalmente difiere del genotipo materno, a no ser que la consanguinidad sea muy estricta y prolongada en el tiempo. En general, las especies apomícticas forman complejos agámicos o grupos en los cuales biotipos sexuales y apomícticos se encuentran a distintos niveles de ploidía. En la mayoría de los casos, los citotipos diploides son sexuales y los poliploides son apomícticos. Por esto, salvo raras excepciones, la apomixis gametofítica se encuentra siempre asociada a la poliploidía (Quarín, 1992; Savidan, 2000).

Aunque a veces se la considera una curiosidad botánica, la apomixis esta lejos de ser una rareza ya que ha sido descrita en más de 400 especies de plantas que representan más de 40 familias, tanto de mono como de dicotiledóneas y, curiosamente, se encuentra ausente en gimnospermas.

De los 14.000 géneros de angiospermas, sólo 127 presentan especies apomíticas, la mayoría de las cuales aparecieron durante o después del Pleistoceno (Spillane *et al.*, 2001). Actualmente, algunos trabajos cuestionan el número de géneros con especies realmente apomíticas, ya que se han registrado como apomíticas especies con anomalías en el desarrollo y la acumulación y falta de corroboración de estos informes han llevado a sobreestimar el número real de géneros apomíticos. Por ejemplo, en la familia Asteraceae, de los géneros informados como apomíticos, 22 fueron confirmados, 16 requieren confirmación, aunque existen evidencias consistentes y 30 fueron catalogados como no apomíticos (Noyes, 2007). La distribución de la apomixis en las angiospermas no es homogénea, ya que el 75% de las especies confirmadas pertenecen a tres familias: Asteraceae, Rosaceae y Poaceae, grupos que colectivamente constituyen sólo el 10% de las plantas con flor. Algunos autores han postulado que este patrón de distribución puede reflejar la predisposición de cierto grupo de plantas a experimentar los cambios de desarrollo y genéticos que caracterizan a la apomixis (Bicknell y Koltunow, 2004). Hay coincidencia en considerar que la apomixis ha evolucionado varias veces en forma independiente desde ancestros sexuales y puede ser vista como una modificación del programa de reproducción sexual (Spillane *et al.*, 2001).

La apomixis involucra una serie de alteraciones en el desarrollo sexual típico, que sin embargo permiten la obtención de semillas viables. Estas son: (1) ausencia o alteración de la reducción meiótica o desarrollo de megasporas no reducidas a partir de células nucelares (apomeiosis), (2) desarrollo de un megagametofito a partir de las megasporas no reducidas y posteriormente de un embrión por partenogénesis a partir de la ovocélula o de células de los integumentos y (3) inicio del desarrollo autónomo o por pseudogamia del endosperma (Vijverberg *et al.*, 2004).

En la reproducción apomítica, los dos núcleos espermáticos del grano de polen penetran en el saco embrionario por una de las sinérgidas. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en la reproducción sexual, la ovocélula no es fertilizada y su desarrollo se lleva a cabo por partenogénesis. En algunos casos, la ovocélula no reducida puede ser fertilizada, resultando en un embrión híbrido con un nivel elevado de ploidía. A estos embriones se los denomina BIII (Berthaud, 2001). Cuando ocurre meiosis en una especie apomítica, con reducción de cromosomas, lo que generalmente sucede es la

singamia entre la célula huevo y la célula espermática. Aunque a veces, esta ovocélula (n), puede desarrollarse por partenogénesis produciendo un embrión haploide o polihaploide (Ozias-Akins, 2006). Por lo tanto, en una planta apomíctica pueden encontrarse cuatro distintos tipos de descendientes:

Meiosis	Fertilización	
	Sí	No
Sí	n+n (sexual)	n+0 (haploide)
No	2n+n (BIII)	2n+0 (apomíctico)

En la mayoría de las plantas que se reproducen por apomixis gametofítica, el desarrollo partenogenético del embrión requiere de la fertilización del/los núcleos polares, lo cual es denominado pseudogamia (Nogler, 1984a). En las Poaceae, las cuales son polinizadas por el viento, la pseudogamia es la regla general, con sólo tres excepciones: *Calamagrostis*, *Cortaderia jubata* y *Amprothyrsus* (Noirot *et al.*, 1997). Un hecho importante es que los genotipos sexuales de las gramíneas apomícticas son alógamos, con un alto grado de autoincompatibilidad, mientras que los apomícticos son autocompatibles (Voigt y Bashaw, 1972; Noirot *et al.*, 1997). La autocompatibilidad en las plantas apomícticas tiene grandes ventajas, entre la que podemos resaltar la posibilidad de dispersión en forma clonal sobre áreas importantes, ya que la autoincompatibilidad traería serios inconvenientes a la reproducción por semilla en estas condiciones (Noirot *et al.*, 1997). Algunas especies apomícticas, como sucede en especies de la familia Asteraceae, no requieren de la fertilización de la célula central y el endosperma se desarrolla de manera autónoma (Noyes, 2007).

La contribución materna y paterna en el desarrollo del endosperma y su relación con el nivel de ploidía del embrión causa un fuerte efecto sobre la viabilidad de la semilla sexual. En el caso del maíz, que ha sido ampliamente estudiado, el desarrollo normal del endosperma tiene una relación 2m/1p. En cambio, las especies apomícticas son más tolerantes a las variaciones en la relación de ploidías entre los genomas materno y paterno o bien presentan adaptaciones para restituir esta relación. Como ejemplo, podemos citar genotipos apomícticos tetraploides de *Tripsacum dactiloides* que producen endosperma con dos núcleos polares no reducidos que se fusionan con un

núcleo espermático reducido para lograr una relación $8m/2p$, que permite el normal desarrollo del endosperma (Grimanelli *et al.*, 1997).

Mecanismos de apomixis

Los procesos de desarrollo por los que se obtiene una semilla apomíctica pueden clasificarse en tres: la diplosporía, la aposporía y la embriogénesis adventicia. A los dos primeros se los clasifica como apomixis gametofítica (Figura I.2). Estos mecanismos apomícticos difieren en el tiempo en que se inician en relación a un proceso sexual típico. La diplosporía y la aposporía son iniciadas muy temprano en el desarrollo del óvulo, en el momento de la diferenciación de la célula madre de la megáspora en el primer caso y luego de la diferenciación de dicha célula en el segundo. Al contrario, la embriogénesis adventicia es iniciada tardíamente en el desarrollo del óvulo.

Los dos tipos de diplosporía, meiótica y mitótica, se muestran en la Figura I.2. En la diplosporía meiótica, la célula madre de la megáspora comienza la meiosis, pero ésta es inhibida en un determinado estadio por mecanismos desconocidos y el núcleo es restituido a su estado original (núcleo de restitución) para luego ocurrir una serie de mitosis que llevan a un saco embrionario que conserva la estructura típica de los sacos de origen meiótico de tipo *Poligonum* con siete células y ocho núcleos (tipos *Taraxacum* e *Ixeris*, Figura I.2). En la diplosporía mitótica, la cual es la forma más frecuente de diplosporía, la célula madre de la megáspora no inicia la meiosis, sino que después de una larga interfase, se produce un crecimiento celular acompañado por una profunda vacualización, seguido de tres mitosis sucesivas que dan origen a un saco embrionario maduro compuesto de ocho núcleos, todos no reducidos (tipo *Antennaria*, Figura I.2). Es posible que en algunas plantas que exhiben diplosporía mitótica, se produzca la meiosis y sea inhibida en estadios muy tempranos, sin embargo esta sólo podría ser demostrada a nivel molecular y no a nivel citológico (Nogler, 1984a; Koltunow, 1993).

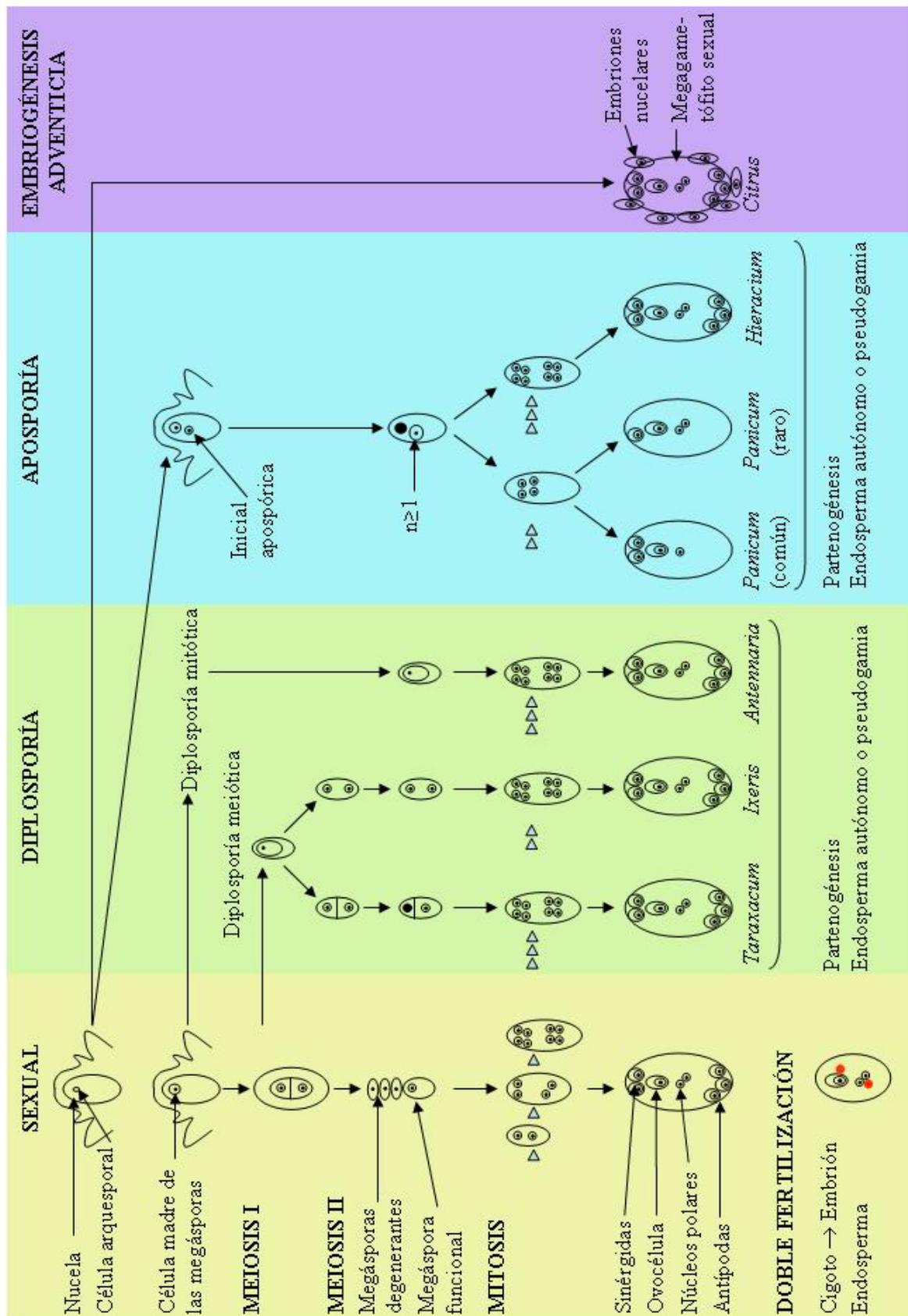


Figura I.2. Mecanismos de apomixis (diplosporía, aposporía y embriogénesis adventicia) comparados con los eventos de la reproducción sexual de plantas (Adaptado de Koltunow, 1993).

A diferencia de lo que ocurre en la diplosporía, en la aposporía el saco embrionario se forma a partir de una célula de la nucela que no es la célula arquesporial (Figura I.2). Esta célula, llamada célula inicial apospórica, al igual que la célula arquesporial, posee un gran núcleo y citoplasma denso. Por lo tanto, a diferencia de la diplosporía, en la aposporía pueden coexistir procesos apomíticos y sexuales en un mismo óvulo. En la aposporía, una o más células iniciales apospóricas pueden diferenciarse en la nucela inmediatamente antes o conjuntamente con el desarrollo de la célula arquesporial del proceso sexual y comenzar la formación de un saco embrionario apospórico (n) (Figura I.2). En algunas especies apospóricas, el porcentaje de óvulos con sacos embrionarios apomíticos y sexuales puede ser muy elevado, sin embargo el proceso sexual frecuentemente termina en el estadio célula madre de la megáspora o megáspora funcional y los productos de la meiosis degeneran (Nogler, 1984a; Asker y Jerling, 1992). El saco embrionario apospórico se desarrolla más rápido que el sexual porque evita la meiosis. En la aposporía tipo *Hieracium*, la formación del saco embrionario se produce después de tres divisiones mitóticas, originándose ocho núcleos que se distribuyen en siete células en un saco embrionario similar al sexual de tipo *Polygonum*, pero a diferencia de este, en el saco apomítico los núcleos no están reducidos. Los sacos embrionarios tipo *Panicum* se forman a partir de células iniciales de la aposporía que luego de dos mitosis sucesivas dan origen a sólo cuatro núcleos, los cuales se distribuyen hacia un solo polo (Figura I.2). Por lo tanto los sacos embrionarios quedan constituidos por dos sinérgidas, una ovocélula y una célula central con un solo núcleo polar, careciendo de antípodas (Koltunow, 1993).

Diplosporía y aposporía resultan en la formación de una estructura megagametofítica sin reducción meiótica y el embrión se desarrolla a partir de una ovocélula que se encuentra dentro de dicho megagametofito no reducido. Al contrario, la embriogénesis adventicia es iniciada tardíamente en el desarrollo del óvulo y usualmente ocurre en óvulos maduros. Los embriones se inician directamente desde células individuales de la nucela, tejido del óvulo que es externo al megagametofito sexual. Aunque en la apomixis no se produce meiosis en la megáspora, si existe en la micróspora, es decir que los granos de polen de las plantas apomíticas son reducidos (n). Este polen es funcional y necesario en la gran mayoría de las plantas apomíticas, ya que son pseudógamas (Koltunow, 1993).

En la Tabla I.2 se mencionan algunos de los géneros que presentan especies apomícticas y el mecanismo de apomixis que poseen.

Contexto donde se expresa

Existe una relación estrecha entre la apomixis y la poliploidía, ya que la manifestación de la misma depende fuertemente del nivel de ploidía, tanto que los genotipos diploides ($2n=2x=20$) son generalmente sexuales y los correspondientes poliploides ($2n=4x=40$ o mayores) son apomícticos (Asker y Jerling, 1992; Savidan, 2000). Sin embargo, la apomixis es común en plantas diploides con embriogénesis adventicia, tales como *Citrus*, *Nothoscordum*, *Sarcococca* y *Euphorbia* (Gustafsson, 1946). La descripción de algunos diploides con apomixis gametofítica parece ser la excepción a la regla (Naumova *et al.*, 1999; Siena *et al.*, 2008). Sin embargo, existe mucha controversia al respecto, a tal punto que repeticiones del análisis de algunas de esas excepciones determinaron lo contrario (Holm y Ghatnekar, 1996; Holm *et al.*, 1997). En varios citotipos diploides de *Paspalum* se ha mencionado la presencia de sacos embrionarios apospóricos junto a los sacos embrionarios meióticos normales (Norrman *et al.*, 1989).

También existe el caso de *Boechera holboellii*, que es un diploide diplospórico, sin embargo en esta especie la apomixis fue asociada a la presencia de sustituciones cromosómicas, aberraciones y a la presencia de cromosomas B, por lo que no se trataría de un verdadero diploide (Kantama *et al.*, 2007). Por otro lado, como se ha mencionado previamente, la sexualidad generalmente se mantiene a muy bajo nivel en las plantas apomícticas (Bicknell y Koltunow, 2004).

Tabla I.2. Algunos géneros que presentan especies con reproducción apomítica (modificado de Carman, 1997). El asterisco (*) indica que en ese género existen especies con ambos tipos de apomixis gametofítica (diplosporía y aposporía).

Diplosporía	Aposporía	Embriogenesis adventicia
Calamagrostis (Poaceae)	Antheophora (Poaceae)	Cenchrus *(Poaceae)
Dichanthium* (Poaceae)	Anthoxanthum (Poaceae)	Pennisetum* (Poaceae)
Elymus (Poaceae)	Bothriochloa (Poaceae)	Nothoscordum (Liliaceae)
Eragrostis (Poaceae)	Bouteloua (Poaceae)	Sarcococca
Nardus (Poaceae)	Brachiaria (Poaceae)	Euphorbia (Euphorbiaceae)
Paspalum* (Poaceae)	Buchloe (Poaceae)	Citrus (Rutaceae)
Pennisetum* (Poaceae)	Cenchrus (Poaceae)	
Poa* (Poaceae)	Chloris (Poaceae)	
Saccharum (Poaceae)	Cortaderia (Poaceae)	
Sorghum* (Poaceae)	Dichanthium* (Poaceae)	
Tripsacum (Poaceae)	Echinochloa (Poaceae)	
Allium (Alliaceae)	Eremopogon (Poaceae)	
Habranthus (Amaryllidaceae)	Eriochloa (Poaceae)	
Zephyranthes (Amaryllidaceae)	Eulaliopsis (Poaceae)	
Burmannia (Burmanniaceae)	Eustachys (Poaceae)	
Antennaria* (Asteraceae)	Fingerhuthia (Poaceae)	
Arnica (Asteraceae)	Harporchloa (Poaceae)	
Artemisia* (Asteraceae)	Heteropogon (Poaceae)	
Bellis* (Asteraceae)	Hyparrhenia (Poaceae)	
Blumea (Asteraceae)	Lamprothyrus (Poaceae)	
Brachyscome (Asteraceae)	Melinis (Poaceae)	
Chondrilla (Asteraceae)	Panicum (Poaceae)	
Erigeron* (Asteraceae)	Paspalum* (Poaceae)	
Eupatorium* (Asteraceae)	Pennisetum* (Poaceae)	
Hieracium* (Asteraceae)	Poa* (Poaceae)	
Ixeris (Asteraceae)	Rendlia (Poaceae)	
Leontopodium (Asteraceae)	Schizachyrium (Poaceae)	
Parthenium* (Asteraceae)	Setaria (Poaceae)	
Rudbeckia (Asteraceae)	Sorghum* (Poaceae)	
Taraxacum (Asteraceae)	Themeda (Poaceae)	
Balanophora (Balanophoraceae)	Tricholaena (Poaceae)	
Aerva (Amaranthaceae)	Urochloa (Poaceae)	
Beta* (Chenopodiaceae)	Ornithogalum (Hyacinthaceae)	
Houttuynia (Saururaceae)	Tacca (Taccaceae)	
Pomaderris (Rhamnaceae)	Zygopetalum (Orchidaceae)	
Wikstroemia (Thymelaeaceae)	Antennaria* (Asteraceae)	
Boehmeria (Urticaceae)	Artemisia* (Asteraceae)	
Dorstenia (Urticaceae)	Aster (Asteraceae)	
Elatostema* (Urticaceae)	Bellis* (Asteraceae)	

Tabla I.2 (continuación). Algunos géneros que presentan especies con reproducción apomítica (modificado de Carman, 1997). El asterisco (*) indica que en ese género existen especies con ambos tipos de apomixis gametofítica (diplosporía y aposporía).

Diplosporía

Limonium (Limoniaceae)
 Casuarina (Casuarinaceae)
 Alnus (Betulaceae)
 Crataegus* (Rosaceae)
 Potentilla* (Rosaceae)
 Rubus* (Rosaceae)
 Sorbopyrus* (Rosaceae)
 Sorbus* (Rosaceae)
 Garcinia (Hypericaceae)
 Ochna* (Ochnaceae)
 Boehera (Arabis) (Brassicaceae)
 Cucumis* (Cucurbitaceae)
 Luffa (Cucurbitaceae)
 Momordica (Cucurbitaceae)

Aposporía

Bidens (Asteraceae)
 Calotis (Asteraceae)
 Carthamus (Asteraceae)
 Centaurea (Asteraceae)
 Cichorium (Asteraceae)
 Coreopsis (Asteraceae)
 Crepis (Asteraceae)
 Erigeron* (Asteraceae)
 Eupatorium* (Asteraceae)
 Eurybiopsis (Asteraceae)
 Gerbera (Asteraceae)
 Grindelia (Asteraceae)
 Gutierrezia (Asteraceae)
 Haplopappus (Asteraceae)
 Helianthus (Asteraceae)
 Hieracium* (Asteraceae)
 Leontodon (Asteraceae)
 Leucanthemum (Asteraceae)
 Melampodium (Asteraceae)
 Parthenium* (Asteraceae)
 Picris (Asteraceae)
 Solidago (Asteraceae)
 Tridax (Asteraceae)
 Beta* (Chenopodiaceae)
 Sambucus (Adoxaceae)
 Cliftonia (Cyrillaceae)
 Globularia (Globulariaceae)
 Elatostema* (Urticaceae)
 Eugenia (Myrtaceae)
 Atraphaxis (Polygonaceae)
 Ranunculus (Ranunculaceae)
 Skimmia (Rutaceae)
 Triphasia (Rutaceae)
 Zanthoxylum (Rutaceae)
 Cordia (Boraginaceae)
 Cynoglossum (Boraginaceae)
 Photinia (Aronia)

Aposporía

Alchemilla (Rosaceae)
 Amelanchier (Rosaceae)
 Cotoneaster (Rosaceae)
 Crataegus* (Rosaceae)
 Malus (Rosaceae)
 Potentilla* (Rosaceae)
 Pyrus (Rosaceae)
 Rubus* (Rosaceae)
 Sanguisorba (Rosaceae)
 Sorbopyrus* (Rosaceae)
 Sorbus* (Rosaceae)
 Hiptage (Malpighiaceae)
 Hypericum (Hypericaceae)
 Ochna* (Ochnaceae)
 Raphanobrassica (Brassicaceae)
 Cucumis* (Cucurbitaceae)
 Marah (Cucurbitaceae)
 Aglaonema (Araceae)
 Manihot (Euphorbiaceae)
 Spiranthes (Orchidaceae)
 Betula (Betulaceae)

Existen tres teorías que explican la ausencia de apomixis a nivel diploide. Una fue propuesta por Nogler (1984a) y sostiene que el alelo dominante A, responsable de la aposporía, no puede ser transmitido a través de gametas haploides, con lo cual la apomixis no puede ser encontrada en diploides naturales. La segunda hipótesis fue propuesta por Mogie (1988) y sostiene la existencia de un dosaje génico para un alelo mutante a-, en presencia del alelo salvaje a+, para que el carácter se exprese. De acuerdo a esta teoría la ausencia de apomixis en los diploides naturales se debe más bien a una falta de expresión, en lugar de la no-transmisión propuesta por Nogler (1984a). Mogie (1988) sugiere que se necesitan dos copias del alelo a- (frecuencia mayor a 0,5) para la expresión de la apomixis. En contraste con esta teoría, Noirot (1993) propone que el alelo a+ no debería estar presente en una frecuencia mayor de 0,25. Mogie (1988) propone que el efecto de dosaje afecta al mismo alelo determinante de la apomixis, mientras que Quarín *et al.* (2001) proponen que el efecto de dosaje estaría afectando a uno o varios genes adicionales (diferentes del alelo determinante de la apomixis) cuya expresión es necesaria para el desarrollo de la apomixis. Esta segunda teoría se propuso porque quedó demostrado en numerosos casos que la apomixis está determinada por un alelo dominante en configuración uniplex (Aaaa), y por lo tanto su expresión no podría estar sujeta a un efecto de dosaje. Sin embargo, se observaba que al duplicar individuos diploides sexuales con colchicina, en algunos casos se generaban tetraploides apomícticos. Se propuso que el efecto de dosaje estaría afectando a otros genes (diferentes del gen A disparador), necesarios para el desarrollo de la apomixis.

Otras dos características están presentes en las plantas apomícticas. En general son perennes (no anuales) y poseen otros mecanismos de reproducción asexual, tales como estolones, rizomas o bulbos. La otra particularidad es que existen genotipos facultativos (poliploides) que son fundamentalmente apomícticos y tienen un grado de sexualidad remanente, por lo que en una misma panoja se pueden encontrar flores con distinto sistema reproductivo. En contraste a lo anterior, la apomixis facultativa raramente se encuentra en los animales (Spillane *et al.*, 2001).

En todos los mecanismos de apomixis conocidos y en todos los genotipos estudiados en profundidad se ha observado algún grado de sexualidad remanente en las plantas apomícticas por lo que se las debería considerar facultativas. Verdaderos apomícticos

obligados son los que forman sólo semillas apomícticas y son muy raros en la naturaleza (Asker y Jerling, 1992).

Una de las conclusiones más importantes a que se ha llegado en los últimos años de intensa investigación es que la apomixis resulta de cambios en un pequeño número de eventos claves típicos de la reproducción sexual. Esto indicaría que la identificación y manipulación de ellos sería la mejor estrategia para producir semillas asexuales (Bicknell y Koltunow, 2004).

Apomixis en pasto llorón

Los primeros estudios sobre el sistema reproductivo del pasto llorón lo describen como apomíctico obligado (Brown y Emery, 1958; Leigh, 1960). Streetman (1963) estudió detalladamente la reproducción de *E. curvula*, *E. chloromelas* y *E. lehmanniana*, concluyendo que el tipo de apomixis presente en estas especies es diplospórica, con sacos embrionarios de tipo *Antennaria*. La polinización es necesaria para la formación de la semilla, prueba de ello es que los embriones no desarrollan hasta varias horas luego de la antesis, siendo la diplosporía seguida de pseudogamia (Streetman, 1963).

Voigt (1971) y Voigt y Bashaw (1972) hallaron plantas con reproducción sexual en una línea diploide de *E. curvula* var. *conferta*. Mediante pruebas de pro genie demostraron que esta línea se reproducía sexualmente, con una alta proporción de fecundación cruzada. También hallaron plantas sexuales tetraploides, una de las cuales al cruzarse con plantas apomícticas cercanas, originó una proporción igual de descendientes apomícticos y sexuales (Voigt y Bashaw, 1972). Lo anterior sugeriría un control génico relativamente simple de la diplosporía.

El descubrimiento de apomixis facultativa en *E. curvula* (Voigt y Bashaw, 1973, 1976; Brix, 1974) demostró que el sistema reproductivo del pasto llorón es sumamente complejo. Voigt y Burson (1992) consideran que probablemente la mayor parte de las líneas son apomícticas facultativas, con una baja frecuencia de reproducción sexual. En un estudio citológico y de pro genie del cv. Kromdraai se encontraron plantas apomícticas obligadas y facultativas, y se sugirió que la expresión de la apomixis obligada y facultativa también estaría controlada genéticamente (Brix, 1974).

La formación del saco embrionario en pasto llorón ha sido descrita por varios autores (Streetman, 1963; Voigt y Bashaw, 1972, 1976; Brix, 1974; Stalker y Wright, 1975; Vorster y Liebenberg, 1984). La célula arquesporial se diferencia a partir de una célula hipodérmica de la nucela, tanto en plantas sexuales como apomícticas. El desarrollo puede proseguir luego de dos maneras. El desarrollo del saco embrionario sexual es del tipo *Polygonum* (Vorster y Liebenberg, 1984) y el apomíctico diplospórico presenta peculiaridades que lo hacen distinto a otros por lo que se considera como un modelo particular, tipo *Eragrostis* (Crane, 2001), aunque previamente se lo había clasificado como de tipo *Antennaria* (Streetman, 1963). En el proceso sexual (Figura I.3), la célula arquesporial se diferencia a partir de una célula hipodérmica de la nucela que se agranda poco a poco para dar paso a la primera división meiótica. Inmediatamente le sigue la segunda división meiótica, donde la célula calazal y la micropilar se dividen transversalmente dando una tétrada lineal, o bien, excepcionalmente, la célula micropilar se divide perpendicularmente formando una tétrada en T. Poco después de la formación de la tétrada las tres megásporas micropilares degeneran, quedando sólo la megáspora calazal, que dará origen al saco embrionario. El saco sexual finaliza su formación tras tres divisiones mitóticas dando una célula huevo, dos sinérgidas, dos núcleos polares y tres antípodas. Estas últimas pueden dividirse y formar un promedio de 15 células en el polo calazal. En el desarrollo del saco embrionario diplospórico la célula arquesporial también se diferencia a partir de una célula nucelar, que a diferencia del proceso sexual, no se divide meióticamente. Esta célula inmediatamente comienza a agrandarse, siendo la vacuola calazal la que más crece, volviéndose dominante y forzando al núcleo hacia el polo micropilar. El crecimiento de esta vacuola continua hasta que el tamaño del saco embrionario es similar al saco embrionario sexual bi o tetranucleado. Luego, esta megáspora funcional elongada, tras dos divisiones mitóticas sucesivas, forma el saco embrionario tetranucleado, que se compone de una ovocélula, dos sinérgidas y un núcleo polar (Figura I.3). Ocasionalmente se encuentran sacos penta a heptanucleados (Streetman, 1963; Vorster y Liebenberg, 1984; Poverene y Curvetto, 1991). Rabeau *et al.* (1986) encuentran dos tipos de sacos diplospóricos: el tipo más frecuente consiste en un saco monopolar tetranucleado y el segundo tipo, en un saco bipolar con seis a siete núcleos. En ningún caso se ha observado actividad de las células nucleares, por lo que se ha descartado la aposporia como mecanismo reproductivo en pasto llorón (Streetman, 1963; Voigt y Bashaw, 1972). Poverene *et al.* (1987) hallaron

plantas mellizas con cierta frecuencia en varios cultivares, lo cual es una posible evidencia de la existencia de embriones múltiples en esta especie.

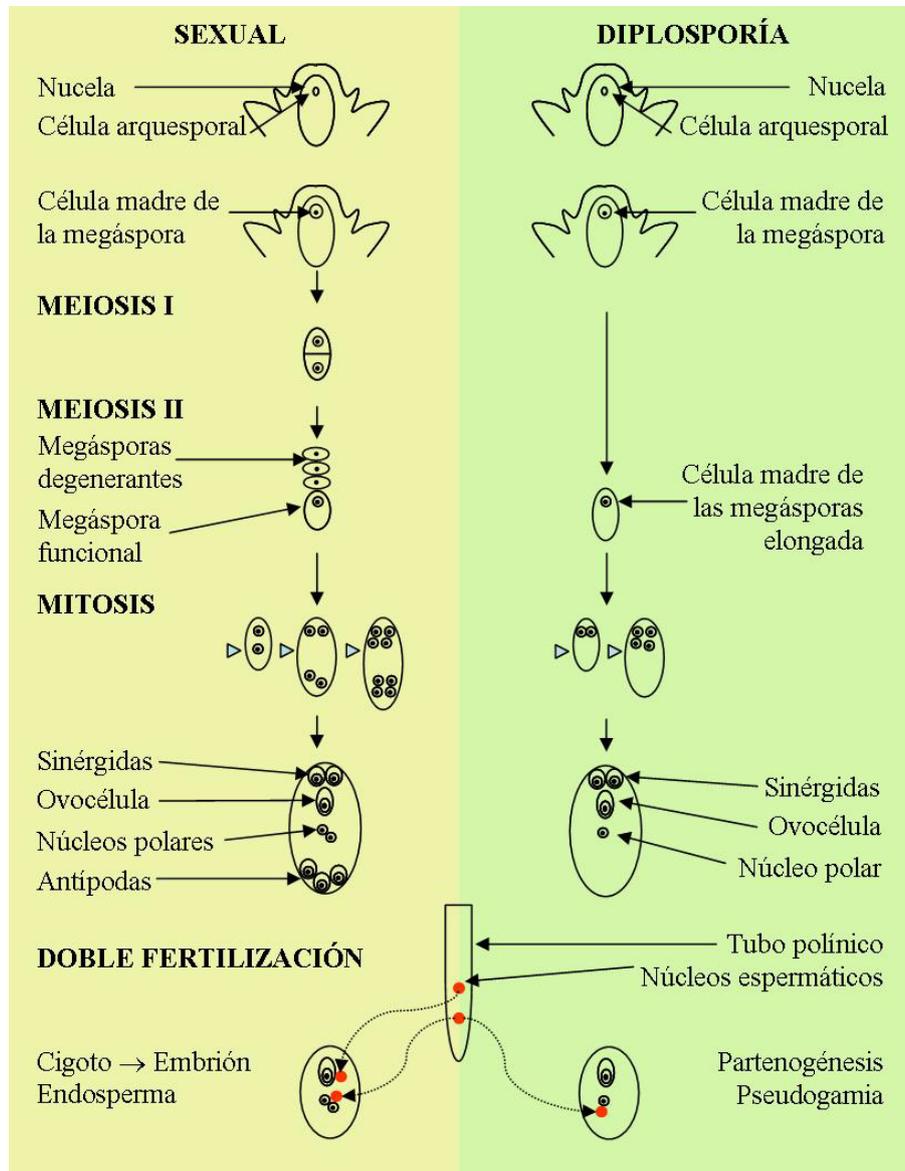


Figura I.3: Megagametogénesis en pasto llorón. Proceso sexual y apomítico diplosporítico tipo *Eragrostis*.

Herencia y genética de la apomixis

Los primeros estudios acerca de la apomixis indicaban que era un carácter heredable, pero no se conocían los genes o mecanismos involucrados (Gustafsson, 1946). A pesar de su amplia distribución en las plantas con flores el carácter apomixis no está presente en muchas especies de interés agronómico, a excepción de varias gramíneas forrajeras

(Bicknell y Koltunow, 2004). Esto ha llevado a que la mayoría de los estudios genéticos sobre el mismo deban ser realizados en especies silvestres altamente heterocigotas y poco caracterizadas genéticamente. Existen varios modelos que intentan explicar la herencia de la apomixis en diversas especies (Pessino *et al.*, 1999; Savidan, 2000). En el caso particular de las gramíneas las hipótesis más aceptadas se basan en la existencia de uno o unos pocos genes ligados y co-adaptados de herencia simple (Savidan, 2000). Una de las principales observaciones de los últimos años en los estudios de mapeo genético es que la región genómica vinculada a la formación de gametófitos no reducidos (apomeiosis) es normalmente pobre en recombinación (Bicknell y Koltunow, 2004; Vijverberg *et al.*, 2004). Se detectaron marcadores moleculares ligados a la apomixis en híbridos de maíz-*Tripsacum*, *Brachiaria*, *Pennisetum* y *Paspalum notatum* (Ortiz y Pessino, 2002; Martínez *et al.*, 2003). En el caso de la aposporía, los marcadores identificados parecen encontrarse asociados definiendo una región genómica específica (ASGR, apospory-specific genomic region) que muestra una alta restricción a la recombinación y está asociada a un efecto pleiotrópico letal o ligada a un alelo con letalidad parcial que afecta a los gametos masculinos (Ozias-Akins *et al.*, 1998, Pupilli *et al.*, 2001, Martínez *et al.*, 2003). Esta región se ha identificado y caracterizado en especies como: *Pennisetum squamulatum* (Ozias-Akins *et al.*, 1998; Goel *et al.*, 2003; Akiyama *et al.*, 2004), *Tripsacum dactyloides* (Grimanelli *et al.*, 1998), *Paspalum simplex* (Pupilli *et al.*, 2001; Pupilli *et al.*, 2004) y *P. notatum* (Stein, 2006). En el caso especial de *P. notatum*, los estudios realizados hasta el presente indican que la aposporía está determinada por un locus simple dominante (apo-locus) con fuerte distorsión de la segregación (Martínez *et al.*, 2001; Martínez *et al.*, 2003; Stein *et al.*, 2004). Se ha demostrado que la diplosporía se encuentra controlada por un locus simple en *Tripsacum* (Leblanc *et al.*, 1995b) y se han detectado marcadores ligados al mismo (Leblanc *et al.*, 1995b; Grimanelli *et al.*, 1998). Estos mismos marcadores fueron mapeados en una población sexual diploide y se localizaron en un segmento que demostró ser co-linear con un sector homeólogo del genoma de maíz correspondiente al cromosoma 6L (duplicado en los cromosoma 3L y 8L) (Grimanelli *et al.*, 1998). En *Erigeron annuus* la diplosporía y la partenogénesis se encuentran controladas por genes independientes (Noyes y Rieseberg, 2000). En *Taraxacum*, estudios recientes mostraron que varios elementos independientes (apomeiosis, partenogénesis y endosperma autónomo) controlan la diplosporía (Záveský *et al.*, 2007). Dado que no existe una correspondencia entre los marcadores moleculares de RFLPs

que han sido asociados a la aposporía y a la diplosporía (Leblanc *et al.*, 1995b, Pessino *et al.*, 1997; Pupilli *et al.*, 2001; Pupilli *et al.*, 2004), los resultados hasta el momento parecen indicar que ambas formas de apomixis están gobernadas por genes diferentes (Grimanelli *et al.*, 2001a).

A nivel de expresión se realizaron estudios en plantas apospóricas y se identificaron numerosos genes relacionados con el carácter: 179 en *Poa pratensis* y 65 en *Paspalum notatum* (Albertini *et al.*, 2004; Laspina *et al.*, 2008). La expresión de la apomixis diplospórica ha sido estudiada sólo en pasto llorón por nuestro grupo y se identificaron 112 genes relacionados con el carácter (Cervigni *et al.*, 2008b). En todos los casos los genes están agrupados en unas pocas clases ontológicas: transducción de señales, metabolismo de proteínas, ARN y ADN y control de ciclo celular. Muchos de los genes identificados también están regulados diferencialmente durante los cambios de ploidía (Laspina *et al.*, 2008, Cervigni *et al.*, 2008b).

Estudios citoembriológicos han revelado que la diplosporía está caracterizada por una alteración en el tiempo de desarrollo de la esporogénesis y del embrión (Grimanelli *et al.*, 2003). Las plantas que exhiben este modo reproductivo muestran un fenotipo heterocrónico, resultado de una alteración temporal en la progresión del proceso sexual (Grimanelli *et al.*, 2003). Es interesante el caso de una raza pentaploide de *Paspalum minus* donde aparecen simultáneamente procesos apospóricos y diplospóricos en el mismo óvulo (Bonilla y Quarín, 1997).

La herencia de la apomixis puede ser explicada por la genética mendeliana, pero también se encuentran interacciones epistáticas, componentes que son expresados esporofítica o gametofíticamente, presencia de modificadores, poliploidía, distorsiones en la segregación y supresión de la recombinación (Ozias-Akins y van Dijk, 2007). En la Tabla I.3 se resume el estado actual del conocimiento sobre el control génico de la apomixis en las principales especies modelo.

Tabla I.3. Situación actual del conocimiento sobre constitución del genotipo y supresión de la recombinación en las regiones cromosomales específicas de la apomixis en especies modelo de dico y monocotiledóneas con diferente tipo de apomixis (Tomado de Ozias-Akins y van Dijk, 2007).

Especie	Tipo de apomixis	Loci	Genotipo	Supresión de la recombinación	Referencias
<i>Brachiaria brizantha</i>	Aposporía, pseudogamia	1	Aaaa	-	Valle <i>et al.</i> , 1994
<i>Cenchrus ciliaris</i>	Aposporía, pseudogamia	1	Aaaa	+	Sherwood <i>et al.</i> , 1994
<i>Erigeron annuus</i>	Diplosporía, endosperma autónomo	2	(D/dd*) Ppp	+ -	Noyes y Rieseberg, 2000; Noyes <i>et al.</i> , 2007
<i>Hieracium caespitosum</i>	Aposporía, endosperma autónomo	2	Aaaa Pppp	- +	Bicknell <i>et al.</i> , 2000; Catanach <i>et al.</i> , 2006
<i>Panicum maximum</i>	Aposporía	1	Aaaa	+	Ebina <i>et al.</i> , 2005; Savidan, 1980
<i>Paspalum notatum</i>	Aposporía, pseudogamia	1	Aaaa	+	Martínez <i>et al.</i> , 2003, Stein <i>et al.</i> , 2004
<i>Paspalum simplex</i>	Aposporía, pseudogamia	1	Aaaa	+	Calderini <i>et al.</i> , 2006; Pupilli <i>et al.</i> , 2004
<i>Pennisetum squamulatum</i>	Aposporía, pseudogamia	1	Aaaa	+	Ozias-Akins <i>et al.</i> , 1993; Roche <i>et al.</i> , 2001
<i>Poa pratensis</i>	Aposporía	2	Aaaa Pppp	-	Albertini <i>et al.</i> , 2001; Porceddu <i>et al.</i> , 2002
<i>Ranunculus auricomus</i>	Aposporía, pseudogamia	1	Aaaa	??	Nogler, 1984b
<i>Taraxacum officinale</i>	Diplosporía, endosperma autónomo	3	Ddd Ppp	- +	van Dijk, 2003; Vijverberg <i>et al.</i> , 2004
<i>Tripsacum dactyloides</i>	Diplosporía, pseudogamia	1?	Dddd	+	Grimanelli <i>et al.</i> , 1998; Leblanc <i>et al.</i> , 1995b

A: aposporía, D: diplosporía, P: partenogenesis

* La región genómica única para un modelo de herencia disómica es más adecuada que el modelo trisómico

Relevancia del tema

A pesar de su amplia distribución en las plantas con flores la apomixis no está presente en muchas especies de interés agronómico, a excepción de varias gramíneas forrajeras (*Poa pratensis*, *Brachiaria decumbens*, etc.), la mandioca, la manzana, los cítricos, el

mango y la frutilla. Dado que los dos tipos de apomixis presentes en gramíneas (aposporía y diplosporía) parecen estar controladas por un gen único o un grupo de genes ligados y coadaptados se ha especulado mucho acerca de la posibilidad de manipular el carácter para su transferencia a especies sexuales de interés agrícola, como el maíz y el arroz, por medio de la ingeniería genética. En teoría cualquier arreglo genético que lleve los factores determinantes de la apomixis podría ser mantenido y multiplicado como una réplica exacta por innumerables generaciones vía semillas. La perspectiva de clonar genotipos superiores híbridos podría representar una ayuda importante para los productores agropecuarios de los países en desarrollo, permitiéndoles sostener altos rendimientos año tras año usando parte de las semillas cosechadas sin pérdidas en la producción debidas a la segregación de caracteres y la depresión por endogamia. Esto representaría una herramienta de enorme impacto en la producción de alimentos, sin embargo, es primordial conocer con exactitud el mecanismo molecular de control y sus posibilidades de expresión para poder intentar dicha introgresión.

Los principales beneficios de la apomixis son los siguientes (Bicknell y Bicknell, 1999; Vielle-Calzada *et al.*, 1996):

- Rápido desarrollo de nuevas variedades híbridas. En los cultivos donde se utilizan variedades híbridas como el girasol y el maíz, el desarrollo de híbridos es costoso, laborioso y lleva varios años. Con la transferencia de la apomixis, sería posible fijar los genes de interés inmediatamente, reduciendo los costos y el tiempo en el desarrollo de híbridos.
- Posibilidad de propagar por semilla cultivos altamente heterocigotos. Existen cultivos que se propagan exclusivamente en forma vegetativa. Es el caso de la papa, caña de azúcar, etc. En estos cultivos las plantas generadas por semilla son altamente variables por lo que se descarta este método de propagación. La incorporación de la apomixis en dichos cultivos garantizaría la homogeneidad genética en las semillas y brindaría grandes ventajas frente a la propagación vegetativa (conservación, transporte, siembra, transmisión de enfermedades, etc.), reduciendo considerablemente los costos.
- Incremento en la eficiencia reproductiva. Limitaciones en los mecanismos de reproducción, tales como dificultades en la fertilización o en la polinización, causada por variedades incompatibles, inadecuada actividad de polinizadores o por estrés biótico

o abiótico provocan pérdidas en los cultivos. Estas limitaciones podrían ser superadas en especies apomícticas autónomas, que no requieren de la polinización.

- Facilitaría la obtención de transgénicos, considerando que una planta transgénica apomíctica fijaría inmediatamente el nuevo carácter y se convertiría en un cultivar luego de su multiplicación.
- Reduciría al mínimo el aislamiento físico requerido para preservar líneas genéticas homocigotas.

Por el gran valor que representa la transferencia de la apomixis a un cultivo comercial, se han realizado varios intentos en distintos cultivos, en su mayoría sin éxito o con un éxito parcial, por ej. transferencia de la apomixis pero conjuntamente con caracteres no deseables (Miles, 2007). La introducción de esta característica a cultivos que se propagan sexualmente generalmente se puede alcanzar por dos caminos:

- Introgresión. Típicamente implica la hibridización entre un cultivo y una especie apomíctica relacionada, seguida por un programa de retrocruzas usando la especie de propagación sexual como parental recurrente. Ejemplos de este método incluyen los intentos de transferencia de la apomixis desde *Pennisetum squamulatum* a la especie cultivada *P. glaucum* (mijo) (Roche *et al.*, 2001), desde *Elymus rectisetus* a *Triticum* (trigo) (Liu *et al.*, 1994) y desde *Tripsacum dactyloides* a *Zea mays* (maíz) (Grimanelli *et al.*, 2001b). Dos patentes han sido logradas con esta metodología (ver Tabla I.4).
- Síntesis. Otros investigadores han intentado sintetizar plantas apomícticas por cruzamientos con plantas con mutaciones en procesos claves, esperando crear formas apomícticas. Ejemplos de este tipo de mutaciones incluyen aquellas producidas con mutantes meióticos o con el desarrollo de embriones sin fertilización (mutantes partenogénicos). Importantes progresos se han logrado por este camino en papa, aunque no se han logrado mutantes apomícticos (Hermsen, 1980).

En la Tabla I.4 se presentan algunas patentes desarrolladas con la transferencia de la apomixis a cultivos o el desarrollo de estrategias de transferencia de la apomixis. En el sitio de internet www.freepatentonline.com existen 290 patentes registradas indicando la relevancia económica y el interés comercial en el tema.

Tabla I.4. Patentes registradas relacionadas a la apomixis (Tomado de Bicknell y Bicknell, 1999 y Dresselhaus *et al.*, 2001).

Número de registro y fecha	Título	Detalle	Registrador
US5710367 (1995)	Maíz apomítico	Híbridos maíz/ <i>Tripsacum</i> usados para la introgresión de la apomixis en maíz.	USDA
US5811636 (1995)	Apomixis para producir progenies uniformes	Transferencia de gen(es) desde <i>Pennisetum squamulatum</i> a plantas cultivadas resultando en progenies apomíticas.	USDA
WO9743427 (1996)	Producción de semilla apomítica	Expresión de un gen que lleva a la producción de embriones a partir de tejidos del saco embrionario.	Novartis
WO9828431 (1997)	Regulación transcripcional en plantas	Promotores específicos de meiosis que pueden dirigir actividad de genes en tejidos asociados a la formación de gametas en plantas	John Innes Centre Innovations Ltd.
WO9836090 (1998) AU6405498	Método para la identificación de secuencias de nucleótidos involucradas en la apomixis	Genes de especies sexuales de gramíneas conocidos por ser ortólogos a secuencias asociadas con la apomixis en especies relacionadas. Aislamiento y modificación de dichas secuencias.	CIMMYT-ABC
WO9837184 (1998)	Genes leafy cotydon1 y sus usos	Genes específicos del embrión y sus promotores que pueden ser de útiles para la expresión dirigida en embriones.	Universidad de California
WO9808961 (1998)	Promotores y usos de genes específicos del endosperma y nucela	Promotores específicos de endosperma y nucela	Linnestad, Olsen y Doan
W09953083 (1999)	Grupo de genes Polycomb específicos de semilla	Métodos de uso de los genes, usando represores del desarrollo del embrión y del endosperma	Cold Spring Harbor Lab.
W09935258 (1999)	Marcadores de apomixis	Marcadores de ADN de la región genómica de aposporía de <i>Paspalum</i>	Universidad de Georgia
W0024914 (2000)	Apomixis conferida por expresión de proteínas que interactúan con SERK	Gen SERK relacionado al potencial embriogénico	Novartis
US 2004/0103452 A1 (2003)	Apomixis inducible	Pasos para incrementar la probabilidad de apomixis en plantas transgénicas	Russinova y col.
US 2004/0148667 A1 (2003)	Identificación de secuencias involucradas en la apomixis	Método para la identificación en maíz de secuencias nucleotídicas involucradas en la apomixis	Savidan y col.
US 2004/0168216 A1 (2004)	Métodos para producir plantas apomíticas	Obtención a partir de plantas sexuales divergentes con respecto a las respuestas a fotoperiodo y desarrollo de la megáspora y gametofito	Carman y col.
US 2008/0155712 A1 (2008)	Identificación de secuencias involucradas en la apomixis	Método para identificar secuencias nucleotídicas particularmente de maíz relacionadas a la apomixis	Savidan y col.

Marcadores moleculares

Los marcadores genéticos derivan de pequeñas regiones de ADN que muestran polimorfismos de secuencia entre individuos dentro de una especie, que pueden provenir de modificaciones en la secuencia de ADN y de la longitud de fragmentos por inserciones, deleciones o acumulación de copias, por ejemplo de secuencias repetitivas (Figura I.4). Estos polimorfismos son ubicuos y abundantes en todos los organismos vivos y segregan, la mayoría de las veces, de manera mendeliana. Los principales tipos de marcadores son los basados en las técnicas de hibridación tipo Southern, y en el método de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). En el primer caso se exploran las variaciones en la longitud de los fragmentos de ADN ocasionados por su digestión con enzimas de restricción (RFLPs), y en el segundo, se trata de observar cambios en regiones amplificadas de ADN (ej. microsatélites) utilizando distintos criterios para la elección de los *primers* o cebadores (Figura I.4).

Usando marcadores moleculares, los mejoradores pueden evitar los métodos de selección basados en el fenotipo, los cuales involucran el crecimiento de las plantas hasta su madurez y la observación detallada de sus características para poder seleccionar fenotipos superiores. El valor potencial de los marcadores morfológicos para su uso como criterio de selección ha sido conocido por los mejoradores desde principios del siglo pasado, ya que se usaron tradicionalmente para seleccionar fenotipos elite. Sin embargo, la disponibilidad de estos marcadores es escasa, su análisis puede ser subjetivo, y suelen presentar expresión por dominancia, interacciones epistáticas, efectos pleiotrópicos y penetrancia o expresividad incompleta (Weising *et al.*, 2005).

Los marcadores de ADN tienen numerosas ventajas sobre los marcadores basados en características morfológicas, fisiológicas o proteínas. Sobre todo se encuentran en gran número, lo que posibilita su utilización incluso en la comparación de genotipos muy relacionados. También se pueden aplicar en cualquier momento del desarrollo de la planta y en cualquier órgano, incluso en las semillas, ya que al utilizar ADN siempre se presenta el mismo patrón de marcadores. Otra característica es que se requiere muy poco material para su aplicación, ya que las técnicas más frecuentes utilizan PCR, esto

es muy importante ya que en los planes de mejoramiento a veces se cuenta con muy poco material en las primeras generaciones de selección (Weising *et al.*, 2005).

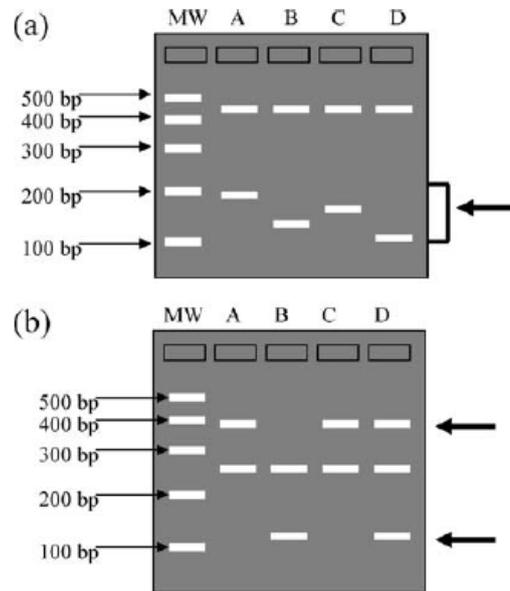


Figura I.4. Diagrama representando marcadores de ADN hipotéticos entre los genotipos A, B, C y D. Los marcadores polimórficos están indicados por flechas. Los marcadores que no discriminan entre genotipos son llamados marcadores monomórficos. a) Ejemplo de marcadores microsatélites. El marcador polimórfico revela diferencias en tamaño para el alelo del marcador en los cuatro genotipos y representa un locus genético único. b) Ejemplo de marcadores generados por RAPDs. Notar que estos marcadores están presentes o ausentes. Junto a las calles que corresponden a cada genotipo se incorpora una calle (MW) con fragmentos de ADN de peso molecular conocido para tenerlos como referencia (Tomado de Collard *et al.*, 2005)

Durante las pasadas tres décadas, diferentes tipos de marcadores de ADN han sido desarrollados, incluyendo Polimorfismos en la Longitud de Fragmentos de Restricción - RFLPs (Beckmann y Soller, 1986), Polimorfismos de ADN Amplificado Aleatoriamente - RAPDs (Williams *et al.*, 1990), Polimorfismos en la Longitud de Fragmentos Amplificados - AFLPs (Vos *et al.*, 1995), Numero Variable de Repeticiones en Tandem - VNTRs o minisatélites (Jeffreys *et al.*, 1985), Secuencias Simples Repetidas - SSRs o microsatélites (McCouch *et al.*, 1997), Polimorfismos de Secuencias Cortadas Amplificadas - CAPS (Konieczny y Ausubel, 1993), Secuencia de Regiones Amplificadas Caracterizadas - SCARs (Paran y Michelmore, 1993), Etiquetas de Secuencias Expresadas - ESTs (Adams *et al.*, 1991), Secuencias Ortólogas Conservadas - COS (Fulton *et al.*, 2002), Polimorfismos de Nucleótido Simple - SNPs y

Marcadores de Inserción-Delección - InDels (Landegren *et al.*, 1998). Las principales ventajas y características de las técnicas de marcadores más frecuentes están descriptas en la Tabla I.5.

Tabla I.5. Ventajas y desventajas de los marcadores de ADN usados comúnmente (Tomado de Collard *et al.*, 2005) C: codominante, D: dominante

Marcador molecular	C-D	Ventajas	Desventajas	Referencias
RFLPs	C	<ul style="list-style-type: none"> • Robusto • Confiable • Transferible entre poblaciones 	<ul style="list-style-type: none"> • Laborioso, caro y demanda tiempo • Requiere grandes cantidad de ADN • Polimorfismos limitados (especialmente en líneas relacionadas) 	Beckmann y Soller, 1986; Tanksley <i>et al.</i> , 1989
RAPDs	D	<ul style="list-style-type: none"> • Rápido y simple • Barato • Múltiples loci con un sólo <i>primer</i> • Requiere poca cantidad de ADN 	<ul style="list-style-type: none"> • Problemas en reproducibilidad • En general no transferible 	Penner, 1996; Williams <i>et al.</i> , 1990
SSRs	C	<ul style="list-style-type: none"> • Técnicamente simple • Robusto y confiable • Transferible entre poblaciones 	<ul style="list-style-type: none"> • Se requiere gran cantidad de tiempo y labor para el desarrollo de los <i>primers</i> • Usualmente requiere geles de poliacrilamida 	McCouch <i>et al.</i> , 1997; Powell <i>et al.</i> , 1996
AFLPs	D	<ul style="list-style-type: none"> • Múltiple loci • En general altos niveles de polimorfismo 	<ul style="list-style-type: none"> • Requiere gran cantidad de ADN • Metodología complicada 	Vos <i>et al.</i> , 1995

Mapeo genético

Un mapa de ligamiento genético se construye cuantificando la frecuencia con que dos marcadores se heredan juntos, de acuerdo a los valores de recombinación obtenidos de una población en segregación. La frecuencia de recombinación observada es comúnmente convertida en unidades de mapeo (centiMorgan, cM) por la aplicación de una función de mapeo (Kosambi, 1944) y siguiendo la segregación de los marcadores genéticos en una población, los eventos de recombinación son linealmente ordenados en grupos de ligamiento que pueden o no coincidir con el número de cromosomas. Así, se ubican las regiones cromosómicas asociadas a cierta característica cuantitativa de interés, con lo cual es factible seleccionar los materiales genéticos portadores del carácter de interés. Por lo tanto el objetivo del mapeo es conectar genotipo con fenotipo mediante asociaciones estadísticas (Dwivedi *et al.*, 2007).

Años atrás, la construcción de mapas de ligamiento utilizando marcadores morfológicos fue lenta en la mayoría de los cultivos debido a la falta de suficientes marcadores. Por ello, la construcción de mapas era muy laboriosa, tomaba muchos años y requería varias poblaciones de mapeo, ya que los polimorfismos en los marcadores morfológicos no podían obtenerse en un sólo cruzamiento. Estos primeros mapas contenían un número limitado de marcadores y no podían ser usados eficientemente para la ubicación de genes blanco. Con la aparición de los marcadores de ADN, muchas limitaciones asociadas con los marcadores morfológicos e isoenzimáticos fueron superadas y el mapeo genético ingresó en una nueva era de mucho progreso, mejorando significativamente la eficiencia del mejoramiento y la genética vegetal. La mayor ventaja del mapeo con marcadores moleculares es la posibilidad de analizar un gran número de marcadores de ADN en una única población de mapeo. Estos marcadores permitieron la construcción de mapas en la totalidad de las plantas cultivadas importantes, sin embargo el número de marcadores y la densidad de las marcas varía ampliamente. La mayoría de los mapas se basan en marcadores RFLPs y últimamente los marcadores mayormente usados son aquellos basados en PCR. Entre las plantas cultivadas, el arroz es el que presenta el mapa más saturado (Varshney *et al.*, 2004).

La construcción de un mapa de ligamiento requiere de una población segregante, es decir una población derivada de un cruzamiento. Los padres seleccionados para la población de mapeo deben diferir en uno o más caracteres de interés. El tamaño de las poblaciones en estudios preliminares está generalmente en el rango de 50 a 250 individuos (Mohan *et al.*, 1997), pero para la obtención de mapas de mayor resolución se requiere de poblaciones de más elevado número de individuos (Collard *et al.*, 2005). En especies que se autopolinizan (autógamas), generalmente las poblaciones de mapeo se originan de padres que son ambos altamente homocigotos. En especies de polinización cruzada (alógamas), la situación es más complicada, ya que la mayoría de las especies no tolera la autofecundación. En estos casos, a veces las poblaciones de mapeo derivan del cruzamiento entre un padre heterocigoto y otro homocigoto. Por ejemplo, en especies de polinización cruzada como trébol blanco (*Trifolium repens*), se han obtenido poblaciones de mapeo (F₁) de manera exitosa cruzando padres heterocigotos que diferían en características asociadas a persistencia y producción de semilla (Barrett *et al.*, 2004).

En la mayoría de las plantas cultivadas se han usado poblaciones F_2 , ya que ellas se generan en menor tiempo y con menos esfuerzos. No obstante, para mapear caracteres cuantitativos, otro tipo de poblaciones son preferidas, como las RILs (Líneas Endocriadas Recombinantes) y los haploides duplicados, ya que se pueden mantener en el tiempo por autocruzamiento y se pueden hacer réplicas en distintos años y lugares. Actualmente existen mapas tanto para caracteres cuali como cuantitativos. Los caracteres cualitativos son controlados por un gen de herencia mendeliana simple y ejemplos de ellos son: color en fruta fresca en durazno, color del grano en maíz y color de la flor en petunia. Caracteres cuantitativos como producción y tolerancia a sequía o frío muestran una variación continua y son controlados por varios genes. Los genes individuales que controlan la expresión de caracteres cuantitativos son ahora llamados Loci de Caracteres Cuantitativos-QTL. QTLs de relativamente fuerte efecto son los mejores objetivos para la selección asistida por marcadores, especialmente en caracteres de difícil medición (Varshney *et al.*, 2004).

En las últimas dos décadas se han desarrollado mapas de ligamiento para la mayoría de las especies vegetales de importancia agrícola (Dixon *et al.*, 2007). Tales mapas moleculares han sido utilizados para mapear genes mayores y para identificar componentes genéticos en características poligénicas. Mapas de ligamiento se han utilizado exitosamente para la identificación de marcadores ligados a genes de interés y de esta forma utilizar a estos marcadores en selección asistida (MAS). La disponibilidad de mapas genéticos también posibilita el mapeo comparativo, el cual permite la comparación de la organización y orientación de marcadores comunes en especies relacionadas o filogenéticamente muy distantes (Dixon *et al.*, 2007).

Como se trabaja con un gran número de marcadores, los análisis se realizan con la ayuda de programas informáticos desarrollados para este propósito (Dwivedi *et al.*, 2007). Existen varios programas informáticos, pero los más utilizados son los siguientes: MapMaker/EXP (Lander *et al.*, 1987), JoinMap (Stam, 1993), Carthagene (de Givry *et al.*, 2005) y GQMol (Cruz y Schuster, 2004).

Antecedentes de aplicación de técnicas biotecnológicas para el mejoramiento del pasto llorón

Desde hace varios años el laboratorio de Biotecnología Vegetal del CERZOS-UNS ha trabajado en distintos aspectos de la fisiología, genética y en la implementación de herramientas biotecnológicas para el mejoramiento de esta especie apomíctica. Inicialmente se trabajó en temas relacionados con la resistencia a la sequía y estrés hídrico y temperatura (Echenique, 1987) y en la incorporación de marcadores proteicos en la taxonomía de la especie (Poverene, 1988). Luego se incursionó en el cultivo de tejidos como una metodología para la generación de variación somaclonal (Echenique *et al.*, 1996a; Echenique *et al.*, 1996b; Frayssinet *et al.*, 1999; Polci, 2000) y en la optimización de un sistema de transformación (Echenique *et al.*, 2001; Díaz y Echenique, 2004; Díaz *et al.*, 2004; Díaz, 2006). De los trabajos de cultivo *in vitro* se obtuvo una planta diploide surgida por cultivo de inflorescencias a partir de un cultivar tetraploide apomíctico, Tanganyika (Polci, 2000). Se evaluó el modo reproductivo de esta planta por pruebas de progenie utilizando RAPDs y AFLPs y estudio de la megasporogenesis y se corroboró que era sexual (Cardone, 2006; Cardone *et al.*, 2006). Un conjunto de aproximadamente 500 semillas del genotipo diploide fueron tratadas con colchicina y se obtuvieron dos plantas con el número cromosómico duplicado, tetraploides (Cardone *et al.*, 2006). También se evaluó el modo reproductivo de estas dos plantas tetraploides. Utilizando marcadores moleculares en pruebas de progenie se encontró que producían descendencia variable, la cual llevó a concluir que las mismas tenían un alto grado de sexualidad, no pudiendo descartar un cierto nivel de apomixis residual (Tabla I.6). En otras especies, como *Tripsacum dactyloides* (Leblanc *et al.*, 1995a) y *Brachiaria brizantha* (Aráujo *et al.*, 2005), se obtuvieron resultados similares, ya que la duplicación cromosómica de diploides sexuales produjo tetraploides sexuales, ninguno de los cuales mostró evidencia de apomixis.

De manera que se logró contar con una serie euploide de diferente ploidía y modo reproductivo en un mismo fondo genético. Toda la serie se caracterizó genéticamente (cv. Tanganyika, diploide y tetraploides) y se encontró que las plantas tetraploides eran casi indistinguibles y la diploide presentaba marcadas diferencias con las otras (Cardone *et al.*, 2006). Estas plantas obtenidas fueron registradas como poblaciones de plantas en

colaboración con la Asociación de Cooperativas Argentinas (ACA), donde quedaron bloques experimentales destinados a la evaluación del comportamiento agronómico de los nuevos genotipos que tienen la siguiente denominación: diploide (UNST1122) y tetraploides (UNST1131 y UNST1112). También por cultivo *in vitro* de inflorescencias del cv. Tanganyika se obtuvieron dos somaclones de mayor ploidía (UNST9335 y UNST9446). Uno de ellos, UNST9446, mostró ser apomíctico y poseer 64 cromosomas (Dra. Susana Cardone, Cátedra de Genética, Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Buenos Aires, comunicación personal y datos propios). Se registraron en el INASE las progenies del diploide sexual UNST1122 (cv. Victoria, Número de Solicitud: RC9192, Fecha de Publicación: 11/10/2006), del tetraploide UNST1131 (cv. Bahiense, Número de Solicitud: RC9193, Fecha de Publicación: 11/10/2006) y de uno de los hexaploides, UNST9446 (cv. Don Luis, Número de Solicitud: RC9191, Fecha de Publicación: 11/10/2006).

Tabla I.6. Análisis del modo reproductivo por test de progenie (RAPDs) en los genotipos UNST1131 y UNST1112

Planta	Número de marcadores	Número de polimorfismos detectados en las plantas de la progenie							
		H1	H4	H10	H12	H14	H15	H16	H21
UNST1112	64	3	5	26	4	6	7	5	6
		HA	HB	HC	HD	HE	HF	HG	
UNST1131	12	2	1	2	2	4	1	5	

Esta serie de plantas constituye un sistema ideal para estudiar los cambios genéticos y epigenéticos que ocurren ante cambios de ploidía y modo reproductivo. Por lo tanto se encaminaron una serie de estudios sobre los cambios genéticos, epigenéticos y en expresión de genes relacionados con el cambio en el nivel de ploidía y modo reproductivo con la siguiente serie: cv. Tanganyika (4x apomíctico), UNST1122 (2x, sexual) y UNST1131 (4x, sexual).

En primer lugar se generó una colección de etiquetas de secuencias expresadas (ESTs) a partir de cuatro genotecas de ADNc de panojas y hojas jóvenes de las plantas de la serie. En total se lograron 12.295 secuencias de alta calidad que fueron agrupadas y ensambladas generando 8.884 unigenes, que incluyeron 1.490 secuencias consenso o

contigs y 7.394 secuencias únicas o *singletons* (Cervigni *et al.*, 2008a). Estas secuencias se substrajeron *in silico* de a pares y se identificaron 207 genes diferencialmente expresados por ploidía y sexualidad, de las cuales 188 fueron funcionalmente anotados. En cuanto a modo reproductivo, 18 genes fueron reprimidos y ocho sobreexpresados en plantas sexuales. En cuanto a ploidía, 31 genes fueron reprimidos y cinco sobreexpresados en plantas tetraploides. Curiosamente se encontró un grupo de 50 genes que mostraron expresión similar en la planta tetraploide apomíctica y en la diploide sexual (Cervigni *et al.*, 2008b). Los mismos se encuentran sobreexpresados en la planta tetraploide sexual. Esto llevó a postular que se requiere de una reprogramación del transcriptoma para mantener la sexualidad en los poliploides. Estos genes podrían representar el nexo entre la apomixis y la poliploidía (Cervigni *et al.*, 2008b).

Los estudios de expresión, se complementaron utilizando la técnica de *differential display* (Liang y Pardee, 1992) para analizar los perfiles de expresión diferencial por modo reproductivo o ploidía (Selva *et al.*, inédito).

Los estudios realizados en relación a la comparación *in silico* de transcriptos de genotecas de plantas de *E. curvula* con diferentes modos reproductivos y niveles de ploidía, combinados con experimentos de representación diferencial de transcriptos, permitieron identificar genes candidatos relacionados con estos procesos. Se encontraron secuencias relacionadas con modo reproductivo (cadena beta de la ATP sintasa, proteína hipotética mitocondrial, posible hidrolasa, proteína ribosomal S14, y una fructosa-bifosfato aldolasa) y con ploidía (factor de elongación 1-alfa, CHK1 checkpoint homólogo, proteína ribosomal S14, cadena beta de la ATP sintasa, ubiquitina, enolasa, proteína ribosomal 60S L19-1, proteína inactivadora del ribosoma, lactoilglutación liasa, entre otras). Estos resultados llevaron a plantear que un incremento en el nivel de ploidía requiere de la activación/silenciamiento de un grupo particular de genes, que por alguna razón fallan en las plantas diplospóricas (Cervigni *et al.*, 2008b). El mapeo *in silico* de estos genes diferencialmente expresados en el genoma de arroz demostró que muchos de ellos se localizan en los cromosomas 1 y 3. El cromosoma 1 de arroz contiene regiones sinténicas al locus de la diplosporía en *Tripsacum* (Grimanelli *et al.*, 1998).

También se caracterizó la serie de plantas por RAPDs y AFLPs y se observó un considerable nivel de polimorfismos. Un número significativo de marcadores moleculares (31,5% de 1008 marcadores RAPDs y AFLPs) mostró un patrón que revierte cuando el nivel tetraploide se reestablece, es decir que están presentes en el cv. Tanganyika, no lo están en el diploide y vuelven a aparecer en el tetraploide UNST1131. Las bandas polimórficas involucraron principalmente regiones no codificantes, aunque algunas mostraron homología con genes conocidos. Esto sugeriría que las alteraciones en el genoma son específicas y confieren una estructura característica a cada nivel de ploidía (Mecchia *et al.*, 2007).

Es ampliamente conocido que los cambios de ploidía están asociados a cambios epigenéticos, por lo que también se estudiaron los cambios en la metilación de citosinas en la serie de plantas mediante la técnica de MSAP (Xiong *et al.*, 1999). Se observaron alteraciones en los patrones de metilación de citosinas, afectando principalmente regiones génicas, observándose un menor nivel de metilación en la planta diploide que en las tetraploides. Los polimorfismos hallados también muestran un comportamiento de reversión, aunque es menos reproducible que las observaciones a nivel génico y de expresión de genes (Ochogavía *et al.*, en prensa).

De lo anterior se puede concluir que en el pasto llorón se cuenta, hasta el momento, con información molecular obtenida de una serie de plantas que permite estudiar tanto variaciones producidas por cambio de ploidía como por cambios en el modo reproductivo. Por otro lado, la disponibilidad de plantas tetraploides sexuales posibilita el cruzamiento de las mismas, como madres, con polinizadores apomícticos, de manera de obtener poblaciones de mapeo que segreguen para el carácter.

Hipótesis

El conocimiento de la biología reproductiva y la disponibilidad de materiales vegetales adecuados y caracterizados a nivel molecular permitirán la construcción de un mapa genético donde localizar regiones asociadas al modo reproductivo.

Objetivo

Los objetivos de la presente tesis fueron: 1) analizar la variabilidad existente en el germoplasma nacional de pasto llorón, a fin de seleccionar los genotipos apropiados para desarrollar una población segregante para la apomixis; 2) estudiar el modo reproductivo de la especie; 3) construir un mapa genético a nivel tetraploide utilizando una población segregante para el modo reproductivo y 4) localizar regiones genómicas asociadas a la apomixis.

Desarrollo del trabajo

Previo a la realización de los cruzamientos, fue necesario realizar una selección de las plantas que serían utilizadas como progenitores sexuales y apomícticos. El primer criterio que se tomó fue trabajar con genotipos tetraploides, ya que el cruzamiento entre diploides y tetraploides no siempre produce descendencia y cuando lo hace, genera un bajo número de individuos. Como se mencionó previamente, en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal (CERZOS-CCT Bahía Blanca, UNS) se disponía de dos genotipos tetraploides con alta expresión de sexualidad (UNST1131 y UNST1112) que fueron utilizados como progenitor femenino en los cruzamientos. Para la elección del donante de polen se disponía de varios cultivares comerciales tetraploides apomícticos obligados que fueron analizados utilizando marcadores moleculares para elegir el polinizador que tuviera mayor cantidad de polimorfismos con las madres.

Debido a las dificultades existentes para discriminar entre cultivares de pasto llorón, los mismos se evaluaron utilizando distintos tipos de marcadores moleculares. Se utilizó una colección de germoplasma proveniente del INTA (EEA Anguil, La Pampa) que son los más difundidos en Argentina y algunos desarrollados en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal (CERZOS, UNS). Se utilizaron marcadores RAPDs y AFLPs y se desarrollaron marcadores SSRs a partir de las genotecas de ADNc de *E. curvula* generadas por el grupo de trabajo (Cervigni *et al.*, 2008a).

Para la evaluación del modo reproductivo se analizaron diferentes técnicas, de manera de contar con un test rápido y preciso para la caracterización de la población de mapeo.

Para el mapeo de la apomixis es necesaria la evaluación fenotípica de una población de por lo menos 100 individuos. Se realizaron estudios citoembriológicos de sacos embrionarios (con distintas tinciones) y pruebas de progenie con marcadores moleculares.

Se obtuvo una población producto del cruzamiento entre materiales con distinto modo reproductivo que fue analizada por marcadores moleculares.

Al observarse una baja frecuencia de progenie variable en la descendencia de las plantas tetraploides sexuales de aproximadamente el 20% en el momento de realizarse el cruzamiento (año 2007), comparado a las correspondientes frecuencias encontradas previamente (100% variable, Cardone *et al.*, 2006), se procedió a analizar este comportamiento utilizando estudios anteriores, conteo de sacos embrionarios, AFLPs, MSAP y estudios *in silico* de secuencias.

Capítulo 1

**Desarrollo y aplicación de marcadores moleculares
para estudiar la variabilidad y taxonomía en el
complejo *Eragrostis curvula***

Situación taxonómica dentro de la especie

Como se mencionara previamente, el pasto llorón constituye un grupo botánico muy polimórfico por lo que en numerosas oportunidades se hace referencia a esta especie como el complejo *E. curvula* o como *E. curvula sensu lato* (Vorster y Liebenberg, 1977; Covas y Cairnie, 1985; Voigt *et al.*, 2004). El complejo *E. curvula* incluye formas intermedias que se superponen con *E. chloromelas* y *E. lehmanniana*, por lo que algunos autores no consideran a estas especies separadas de *E. curvula sensu lato* (Leigh y Davidson, 1968; Streetman, 1963). En varias publicaciones de EEUU se ha clasificado como *E. chloromelas* al pasto Boer, que ahora se identifica como una variedad botánica de *E. curvula*, conferta (Covas y Cairnie, 1985; Voigt, 1970). Otro grupo, no siempre incluido en el complejo *E. curvula*, es el pasto lehmann, que presenta características morfológicas que lo diferencian del pasto llorón: es más robusto y resistente al frío (Streetman, 1970; Voigt *et al.*, 2004). Burson y Voigt (1996) consideran que *E. curvula* y *E. lehmanniana* están genéticamente aislados y deberían considerarse dos especies separadas.

La diversidad morfológica de este complejo ha llevado a la designación o creación de tipos agronómicos que son utilizados para describir el germoplasma de la especie, pero con serias limitaciones. Leigh (1961) y Leigh y Davidson (1968) reconocen dentro de *E. curvula* seis tipos agronómicos: curvula, robusta azul, robusta verde, robusta intermedio, chloromelas alto y chloromelas bajo. Esta clasificación se basa principalmente en características morfológicas de la hoja e inflorescencia, tamaño de planta y hábito de crecimiento. Tales características son influenciadas por el crecimiento y la fertilización y aunque son generalmente distinguibles en las plantas maduras, resultan difíciles de reconocer durante el primer año de la planta (Leigh y Davidson, 1968). Si bien las formas netamente características de estos `tipos` son fácilmente identificables, en muchos casos la presencia de plantas con características intermedias hace dificultosa la clasificación, por lo que algunos autores no la tienen en cuenta por considerar que la variación dentro del complejo *E. curvula* era demasiado grande como para reconocer unidades taxonómicas formales (Leigh y Davidson, 1968). Posteriormente, Jacobs (1982), en un estudio basado en procedimientos matemáticos de agrupamiento demostró que el único grupo que podía ser reconocido consistentemente era el tipo conferta, previamente considerado como *E. chloromelas* o pasto Boer.

La gran variación morfológica existente en el complejo es acompañada por una variación similar en las características fisiológicas y agronómicas, tales como resistencia a frío, respuesta al fotoperíodo, adaptación a distintos tipos de suelo, calidad forrajera, respuesta al pastoreo, etc. (Covas y Cairnie, 1985; Colom y Vazzana, 2001).

Covas (1991) no reconoce todos los tipos anteriormente definidos, descarta a chloromelas, a la que considera como una especie diferente (*E. chloromelas*) y propone una clasificación basada en características de las semillas, láminas foliares y panojas para materiales que se cultivan en Argentina. Los nuevos tipos agronómicos y los cultivares nacionales más importantes son los siguientes: curvula (cvs. Tanganyika, Ermelo, Morpa y Don Arturo INTA), pilosa (cv. Don Juan INTA), conferta (cv. Don Walter INTA) y robusta (cvs. Don Carlos INTA, Don Eduardo INTA y Don Pablo INTA). En la Tabla 1.1 se presenta una descripción de sus principales características morfológicas y agronómicas.

El sistema reproductivo del pasto llorón parece haber jugado un rol fundamental en el establecimiento de una superestructura compleja de formas poliploides, como ha ocurrido en otras gramíneas donde existe una amplia serie de formas genéticamente relacionadas (Quarín y Burson 1991; Adamowski *et al.*, 2005). Aunque el pasto llorón es considerado apomítico, en algunas variedades existe un bajo porcentaje de sexualidad, por lo que se las considera apomíticas facultativas (Poverene y Voigt, 1995). En tanto que la sexualidad permitiría la aparición de tipos poliploides, progresivamente más complejos, por la unión de gametos de diferente ploidía, la apomixis aseguraría la supervivencia de esas nuevas líneas meióticamente inestables. Por su parte, en las plantas apomíticas la fecundación de gametos no reducidos también posibilitaría la aparición de genotipos de mayor ploidía (Berthaud, 2001). El complejo *E. curvula* consiste en un conjunto de poblaciones, la mayor parte de las cuales son clonales y una proporción más pequeña, que son sexuales. El contacto entre ellas agrega continuamente nuevos genotipos al complejo, que constituye de esta manera una verdadera especie colectiva (Poverene, 1988).

Tabla 1.1. Características morfológicas y agronómicas de las principales variedades de pasto llorón cultivadas en Argentina, agrupadas de acuerdo a su tipo agronómico (clasificación de Leigh y Davidson, 1968) (Tomado de Bavera y Peñafort, 2005).

Agrupamiento	Conferta	Curvula				Robusta verde	Chlorome-las	Robusta azul (poseen cubierta cerosa)		
Nombre y sinonimia	Don Walter (Pasto Boer)	Tanganyika	Ermelo	Morpa	Don Arturo	Don Eduardo	Don Juan	Don Pablo	Renner	Don Carlos
Semillas	1 mm Castaño claro	1,3-1,7 mm Castaño				1-1,3 mm Vinoso	0,8-1,1 mm Castaño oscuro	0,9-1,3 mm Vinoso		
Porte		+60 cm					Bajo 60-80 cm	Alto + 1 m		+ alto
Ancho hojas		Angostas								
Panoja terminal	Piramidal y compacta	Amplias y laxas								Grande
Color follaje		Verde claro				Verde oscuro	Verde-azul-grisáceo			
Diferenciación cultivares		No pueden diferenciarse entre sí					No pueden diferenciarse entre sí			
Valor forrajero invierno	Superior al resto, se hiela menos					Superior a Tanganyika				
Proteína en primavera-verano en orden decreciente	1	2	3	3		1				
Proteína en invierno	+5%	2-3%				+5%				
Palatabilidad		Menor	Más que Tanganyika	Más que Ermelo			Bovinos: muy buena Ovinos: excelente	Muy buena antes del encañe; Después baja mucho (amargo)		
Crecimiento en orden decreciente			4	3		1	2	5		
Rebrote primaveral		10-20 días antes que Don Pablo y Don Juan				Antes que todos				
Rusticidad		Alta						Alta	Alta	
Damping off						Sensible				
Engorde				Antes que Tanganyika		Mayor capacidad				
Digestibilidad		Inferior a Morpa y Ermelo			En otoño baja		Inferior a todos			
Materia seca/ha en orden decreciente	2	1	1	3			De menor producción			
Experiencias en engorde primavera-verano		404 g/día	430 g/día	435 g/día				290 g/día		

Los tipos intermedios surgidos por hibridación se expresan en los cultivares como una combinación de características morfológicas y agronómicas de las distintas variedades botánicas. Actualmente no existe una descripción precisa de cada cultivar ni un método adecuado de tipificación de la semilla. Las características morfológicas son afectadas por las condiciones de crecimiento y la edad de la planta y la identificación se dificulta también por la existencia de caracteres intermedios (Covas, 1991). La semilla carece de un número suficiente de caracteres distintivos que permitan identificar lotes de cultivares pertenecientes a una misma variedad botánica (Poverene, 1988). El color,

forma y tamaño de la semilla de diversos cultivares pertenecientes a un mismo tipo morfológico son notablemente constantes, si bien existen apreciables diferencias de esas características entre un tipo y otro.

Varios autores han tratado de relacionar el número cromosómico con los tipos morfológicos o especies que integran el complejo, pero los datos son dispares (Leigh, 1960; Spies, 1982). Cada uno de las especies o tipos morfológicos incluye una serie de números cromosómicos diferentes, que constituyen distintos citotipos (Poverene, 1988). En las gramíneas es muy común la variación intraespecífica del número cromosómico (Quarín *et al.*, 1996).

Caracterización de genotipos

La diferenciación entre cultivares o variedades cultivadas de una especie tiene gran importancia práctica en agronomía, tanto para el productor agropecuario como para la industria y consumidores, ya que los cultivares poseen características agroecológicas y de calidad industrial muy diversas. También es necesaria para su uso adecuado en los programas de mejoramiento y para su potencial comercialización.

En el caso del pasto llorón, la caracterización del germoplasma también es indispensable a efectos de su conservación, ya que *E. curvula* fue considerada una gramínea prioritaria para su conservación por el Programa de Colección del IBPGR (International Board for Plant Genetic Resources) para regiones áridas y semiáridas (IBPGR, 1985).

La caracterización del germoplasma de cada especie consiste en el registro de caracteres altamente heredables que sean poco influenciados por el ambiente y los marcadores moleculares cumplen muy bien estos requisitos.

Uso de marcadores moleculares para la caracterización de genotipos

Los marcadores moleculares representan una alternativa interesante para resolver problemas de identificación varietal en pasto llorón y pueden aportar información para complementar la caracterización basada en criterios morfológicos y de isoenzimas. Los

fragmentos amplificados con *primers* aleatorios (RAPDs) fueron los primeros marcadores moleculares utilizados en forrajeras (Williams *et al.*, 1990). Posteriormente se desarrollaron los polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados, AFLPs (Vos *et al.*, 1995), los polimorfismos en las secuencias simples repetitivas o microsatélites, SSRs (McCouch *et al.*, 1997) y otros marcadores descritos en la Introducción. Los microsatélites se localizan tanto en secuencias que se expresan como en intergénicas. Los denominados SSRs génicos (EST-SSRs) presentan un nivel menor de polimorfismo que los microsatélites de regiones no codificantes, pero por otro lado tienen una mayor probabilidad de transferencia entre especies o materiales distantes genéticamente (Varshney *et al.*, 2005).

En el género *Eragrostis* se han empleado AFLPs, RAPDs, ISSRs y RFLPs para la caracterización de cultivares y accesiones de un importante cereal de Etiopía, *E. tef* (Bai *et al.*, 2000). Esta es una especie autotetraploide ($2n=2x=40$) sexual, que posee un genoma relativamente pequeño, comparado con otros cereales, donde el valor C sería de 714 a 733 Mpb (Ayele *et al.*, 1996) o 0,70 pg (Caetano-Anollés, 2005) igual a la estimación realizada para *E. curvula* (Bennet y Smith, 1976). La diversidad en la especie se estudió utilizando RAPDs (Bai *et al.*, 2000), AFLPs (Ayele *et al.*, 1999, Bai *et al.*, 1999, Ayele y Nguyen, 2000) y se encontró un bajo nivel de polimorfismo. En estos estudios el coeficiente de similitud entre los genotipos de tef estudiados varía entre 84 y 96% para RAPD y entre 73 y 99% para AFLPs (Assefa *et al.*, 2003). En esta especie se elaboró un mapa genético y se mapearon QTLs para algunas características de importancia agronómica (Yu *et al.*, 2007). También se secuenciaron ESTs (Yu *et al.*, 2006). En *E. curvula*, se han utilizado marcadores bioquímicos, como isoenzimas, para la caracterización de cultivares y evaluación del sistema reproductivo (Poverene, 1988; Poverene y Voigt, 1997) y RAPDs (Cardone, 2006) para la caracterización de algunos cultivares de pasto llorón.

Hipótesis

Dado que existe un amplio grado de diversidad entre los genotipos de pasto llorón a nivel morfológico y bioquímico, los marcadores moleculares aportarán información más

precisa que redundará en una mejor caracterización de la especie y de los nuevos materiales obtenidos en nuestro laboratorio.

Objetivo

El presente trabajo tuvo como objetivo la aplicación de marcadores RAPDs, AFLPs y EST-SSRs en *Eragrostis curvula* para: 1) evaluar la homogeneidad intracultivar y proveer un test preciso para identificación de pureza varietal; 2) establecer las relaciones genéticas entre cultivares; 3) caracterizar los nuevos genotipos obtenidos en nuestro laboratorio y 4) la elección de los parentales o donantes de polen adecuados para la obtención de una población de mapeo tendiente a la identificación de regiones relacionadas con la apomixis.

Materiales y Métodos

Material vegetal

Se evaluaron nueve cultivares comerciales apomícticos. Las semillas de ocho de ellos fueron provistas por la EEA Anguil del INTA y se analizaron 15 individuos por cultivar. Las semillas del cv. Kromdraai se obtuvieron de colecciones existentes en el Departamento de Agronomía de la UNS. Los nuevos materiales desarrollados en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal (CERZOS-UNS) que fueron mencionados en la Introducción también se incorporaron al estudio. El genotipo UNST1122 es diploide y fue generado por cultivo *in vitro* de inflorescencias inmaduras del cv. Tanganyika (Polci, 2000; Cardone *et al.*, 2006). Semillas de este cultivar fueron tratadas con colchicina y se obtuvieron dos plantas tetraploides: UNST1131 y UNST1112. Los tres genotipos se mantienen en invernadero por clonación (división de macollos) y se analizará una planta por cada genotipo. Poblaciones obtenidas de semillas de los materiales UNST1122 y UNST1131 fueron registradas en el INASE (ver Introducción) y se mantienen en lotes aislados en el Criadero de Cereales de Invierno de la Asociación de Cooperativas Argentinas ACA.

En la Tabla 1.2 se detallan los materiales de pasto llorón utilizados, indicando tipo agronómico (según clasificación de Covas, 1991), número cromosómico y el código de identificación (CI) con el que se les hará referencia. En el caso del genotipo UNST1122, el tipo agronómico se indica como “¿?” porque morfológicamente no se adecua totalmente a ninguno de los descriptos por Covas (1991).

Tabla 1.2. Materiales de pasto llorón utilizados, indicando tipo agronómico (según clasificación de Covas, 1991), número cromosómico y el código de identificación (CI) con el que se les hará referencia.

Cultivar	Tipo agronómico	Número cromosómico (2n)	CI
Don Juan	Pilosa	80	DJ
Don Pablo	Robusta	70	DP
Don Eduardo	Robusta	60	DE
Kromdraai	Curvula/Robusta	60	K
Don Walter	Conferta	40	DW
Don Arturo	Curvula	40	DA
Morpa	Curvula	40	M
Ermelo	Curvula	40	E
Tanganyika	Curvula	40	T
UNST1112	Curvula	40	U
UNST1131	Curvula	40	B
UNST1122	¿?	20	V

Las semillas se germinaron en invernáculo. Quince plantas de cada cultivar comercial fueron transplantadas en macetas con suelo y cultivadas con fotoperiodo natural (invierno) y a 25±4°C. Luego de un periodo de dos meses de cultivo, se colectaron muestras de hojas para la extracción de ADN.

Como control de la uniformidad dentro de cada genotipo se evaluaron plantas provenientes de semillas de una misma panoja de los cultivares apomícticos Morpa (30 plantas) y Tanganyika (25 plantas) y del genotipo sexual UNST1122 (20 plantas).

Extracción de ADN

Se utilizó un protocolo de extracción rápida a partir de material fresco. El ADN genómico se extrajo utilizando el siguiente *buffer* o solución reguladora: 50 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA pH 8, 100 mM ClNa, 10% SDS y 10 mM β-mercaptoetanol.

Para la extracción se partió de material fresco (aprox. 50 mg) de plantas de aproximadamente dos meses de edad. Se cortaron hojas en pequeñas porciones y se colocaron en un mortero tubular de vidrio esmerilado y se homogeneizaron con el *buffer* con ayuda de un pilón. El producto obtenido se transfirió a un tubo Eppendorf de 1,5 ml y se incubó durante 20 min a 65°C con agitación lenta (estufa con agitador vertical). Posteriormente se agregaron 200 µl de C₂H₃O₂K 5 M pH 4,8 y se incubó en hielo durante 20 min. Pasado ese tiempo se centrifugaron los tubos en una centrífuga Eppendorf (20 min a 13.000 rpm) para eliminar restos de tejido. El paso anterior se repitió para lograr un sobrenadante más limpio. El mismo se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf de 1,5 ml y se agregaron 700 µl de isopropanol para precipitar el ADN. Los tubos se incubaron durante 10 min a -20°C. El ADN se precipitó por centrifugación a 13.000 rpm durante 4 min. El precipitado se lavó con 600 µl de alcohol 70% y se centrifugó durante 4 min a 13.000 rpm. Este lavado se repitió una segunda vez. Luego el pellet se secó a estufa a 37°C o en flujo laminar durante aproximadamente 60 min y se resuspendió en 50 µl de *buffer* TE 1X. La concentración de ADN se determinó en un fluorímetro BioRad, utilizando como estándar ADN de timo de ternera en varias concentraciones para establecer una curva de calibrado. Se utilizó como colorante fluorescente Hoechst 33258 (BioRad).

Desarrollo de microsatélites y aplicación a la diferenciación de cultivares

Los microsatélites de pasto llorón se buscaron en las genotecas de ADNc de pasto llorón con el programa SSR Discovery (Robinson *et al.*, 2004). Este programa fue utilizado para la identificación de secuencias repetitivas y para el diseño de los *primers*. Para la selección de los EST-SSRs se tuvieron los siguientes criterios: mínimo de seis repeticiones para dinucleótidos, de cinco repeticiones para trinucleótidos, de cuatro repeticiones para tetra y pentanucleótidos, productos de amplificación de 200 a 500 pb, temperatura de *annealing* entre 56 y 62°C, contenido de CG entre 40 y 60% y *primers* entre 18 y 25 pb. Se sintetizaron 60 *primers* de los seleccionados (AlphaDNA, Canadá) para determinar la eficiencia de amplificación y el patrón de amplificación utilizándose ADN del cv. Tanganyika. Para la amplificación se utilizó el siguiente protocolo (20 µl): 2 µl *buffer* 10X, 2,5 mM Cl₂Mg, 0,125 mM de cada dNTP, 10 mM *primer*, 1,6 U Taq polimerasa (InVitroGen), 50 ng ADN. El programa de amplificación fue tipo

touchdown (la temperatura baja de a 1°C en los primeros ciclos de amplificación): 4 min a 94°C, 18 ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg a 68°C (-1°C/ciclo), 1 min a 72°C, 30 ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg a 50°C y 1 min a 72°C y luego 1° min a 72°C, en un ciclador MJ Research 100. Los productos de amplificación se separaron en geles de acrilamida al 6% que se tiñeron con plata. Trece de los *primers* que dieron patrones de amplificación fueron utilizados para evaluar los polimorfismos existentes entre distintos cultivares de pasto llorón. Para ello se utilizó ADN de los cultivares mencionados previamente, un programa de amplificación tipo *touchdown* y geles de acrilamida al 6% con tinción de plata.

Amplificación y revelado de RAPDs

El protocolo de amplificación para RAPDs fue estándar (CIMMYT, 2006), con algunas modificaciones. Se utilizaron cinco *primers* de RAPDs (*Primers* 221, 225, 237, 241 y 245 de la serie NAPS de *primers* estándar). La composición de la mezcla de reacción (25 µl) fue la siguiente: 2,5 µl *buffer* 10X, 2,5 mM Cl₂Mg, 0,2 mM de cada dNTP, 30 ng *primers*, 2 U Taq polimerasa (InVitroGen) y 50 ng ADN. El programa de amplificación utilizado fue: 4 min a 94°C, 36 ciclos de 30 seg a 94°C, 1 min a 36°C y 1 min a 72°C y finalmente 6 min a 72°C. Se utilizó un ciclador MJ Research 100. Los productos de amplificación de RAPDs se separaron tanto en geles de acrilamida al 6% como en geles de agarosa al 2,5%. Los geles de agarosa se tiñeron con bromuro de etidio y los de acrilamida con plata.

Amplificación y revelado de AFLPs

Los AFLPs, se realizaron con la colaboración de las Dras. Susana Cardone y Gabriela Pacheco en el Instituto de Genética de INTA-Castelar. Se utilizó material fresco y el ADN fue extraído con el kit Nucleon Phytopure (Amersham). Se siguió el protocolo de Vos *et al.* (1995) con algunas modificaciones. Alícuotas de 400 ng de ADN genómico fueron simultáneamente digeridos durante 1,5 hs a 37°C con las enzimas de restricción *Pst*I y *Mse*I (5 U de cada una, Invitrogen). En un segundo paso, los adaptadores fueron ligados a los fragmentos de restricción (Tabla 1.3). Para ello, 10 µl de una mezcla conteniendo 5 pMol adaptadores para *Pst*I, 50 pMol adaptadores para *Mse*I, 1 U T4 ADN-ligasa (Invitrogen), 1 mM ATP en buffer 10mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM Cl₂Mg,

50 mM ClK, 5 mM DTT, 50 ng/μl BSA fueron incorporados a 40 μl de la mezcla de restricción y se continuó la incubación por 3,5 hs a 37°C. Los *primers* para la pre-amplificación contenían un nucleótido selectivo, P+A y M+A respectivamente (Tabla 1.3). La mezcla de reacción de la pre-amplificación (20 μl) incluyó 1 μl de una mezcla de ligación, 200 μM de cada dNTP, 2 mM Cl₂Mg, 30 ng de *primer PstI+1*, 30 ng de *primer MseI+1*, 1 U Taq polimerasa (Promega) y 50 mM Tris-HCl pH 9. El programa de PCR de la pre-amplificación fue de 30 ciclos de 30 seg a 94°C, 1 min a 56°C y 1 min a 72°C. Los productos de la pre-amplificación fueron diluidos (1:50) en ddH₂O estéril y fueron usados como plantillas para la segunda ronda de amplificación, donde se utilizaron combinaciones de *primers* para ambos adaptadores conteniendo tres nucleótidos selectivos, P+3 y M+3, respectivamente (Tabla 1.3). Para la amplificación final la mezcla de reacción (20 μl) incluyó 1 μl del producto de la pre-amplificación diluída, 20 mM Tris-HCl pH 8,4, 50 mM ClK, 200 μM de cada dNTP, 1,5 mM Cl₂Mg, 30 ng de *primer PstI+3*, 30 ng de *primer MseI+3* y 1 U Taq polimerasa (Invitrogen). El programa de PCR de la amplificación final fue de 12 ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg a 65°C (-0,7°C/ciclo) y 1 min a 72°C. Las reacciones de pre-amplificación y amplificación final fueron realizadas en un termociclador Biometra T. En total se utilizaron 14 combinaciones de *primers* de AFLPs. Para aumentar la confiabilidad de los datos, se realizaron por duplicado. Luego de la amplificación final, los productos de PCR fueron mezclados con un volumen igual de *buffer* de siembra (95% (V/V) formamida, 0,025% (P/V) azul de bromofenol y 0,025% (P/V) xilen cianol), desnaturalizados 5 min a 95°C e inmediatamente llevados a hielo. Siete microlitros de las muestras desnaturalizadas fueron cargadas en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 6% (P/V) y para la separación de los fragmentos se utilizó un equipo SequiGen (BioRad). Los productos de amplificación fueron visualizados con coloración de plata y digitalizados para el posterior análisis.

Análisis de datos

Se registraron sólo las bandas polimórficas que se podían observar claramente en todos los genotipos evaluados y que fueron consistentes en ambas muestras evaluadas. El registro fue de presencia/ausencia y los datos se integraron en una matriz con el programa Microsoft Excel por separado según el tipo de marcador utilizado. No se consideró la diferencia de intensidad entre bandas. La distancia fenética entre los

genotipos se estimó por el método del ligamiento promedio UPGMA (media aritmética no ponderada). Como medida de similitud se utilizó el coeficiente de Jaccard (1908). Este coeficiente toma valores entre 0 (cuando los materiales no presentan ningún marcador en común) y 1 (cuando los materiales presentan todos los caracteres en común). El agrupamiento se realizó por el procedimiento de aglomeración, para lo cual se tomó un índice de distancia o disimilitud que resulta de restar a la unidad el valor del coeficiente de Jaccard: distancia = 1 - Jaccard. Los resultados de los agrupamientos se muestran en dendrogramas. Los datos de cada clase de marcador fueron analizados independientemente. Los cálculos se realizaron utilizando el programa NTSyS (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System; Rohlf, 1993).

Tabla 1.3. Adaptadores y *primers* utilizados para ligación, pre-amplificación y amplificación en las reacciones de AFLP.

Adaptadores	
<i>Pst</i> I	5'-CTCGTAGACTGCGTACATGCA CATCTGACGCATGT-5'
<i>Mse</i> I	5'-GACGATGAGTCCTGAG TACTCAGGACTCAT-5'
Primers +1 (con un nucleótido selectivo)	
<i>Pst</i> I +1	GACTGCGTACATGCAG <u>A</u> -3'
<i>Mse</i> I +1	GATGAGTCCTGAGTA <u>A</u> C-3'
Primers +3 (con tres nucleótidos selectivos)	
<i>Pst</i> I +3	5'-GACTGCGTACATGCAG <u>AA</u> C-3' 5'-GACTGCGTACATGCAG <u>AA</u> G-3' 5'-GACTGCGTACATGCAG <u>AC</u> G-3' 5'-GACTGCGTACATGCAG <u>AG</u> A-3' 5'-GACTGCGTACATGCAG <u>AT</u> A-3' 5'-GACTGCGTACATGCAG <u>AT</u> G-3'
<i>Mse</i> I +3	5'-GATGAGTCCTGAGTA <u>CAA</u> -3' 5'-GATGAGTCCTGAGTA <u>CAC</u> -3' 5'-GATGAGTCCTGAGTA <u>CAG</u> -3' 5'-GATGAGTCCTGAGTA <u>CAT</u> -3' 5'-GATGAGTCCTGAGTA <u>CTA</u> -3' 5'-GATGAGTCCTGAGTA <u>CTC</u> -3' 5'-GATGAGTCCTGAGTA <u>CTT</u> -3'

Resultados y Discusión

Desarrollo de microsatélites

Se detectaron 254 microsatélites en las genotecas de unigenes de pasto llorón, de ellos 219 se hallaron sobre secuencias únicas (*singletons*) y 35 sobre secuencias consenso (*contigs*). A diferencia de lo que se ha encontrado en otras gramíneas, incluso en *Eragrostis tef* (Yu *et al.*, 2006), en pasto llorón los microsatélites con repeticiones de dos y tres nucleótidos están igualmente representados en las 254 EST-SSRs, con porcentajes del 38,95 y 40,16% respectivamente. Los tetra y penta-nucleótidos muestran valores significativamente menores (12,04 y 8,33%, respectivamente). No obstante, las proporciones de ESTs que contienen SSRs, como así también la frecuencia de la detección *in silico* de SSRs, incluso para la misma especie es muy variable en la literatura (Peng y Lapitan, 2005).

Al igual que en otras especies (Nicot *et al.*, 2004), los motivos di-nucleótidos más abundantes fueron (GA)_n y (AC)_n, representado un 63,37 y un 27,72% del total, respectivamente. Como en el caso del trigo (Nicot *et al.*, 2004), los motivos GC están pobremente representados (1,98%). Aunque se cree que los microsatélites (AT)_n son muy abundantes en el genoma de las plantas (Lagercrantz *et al.*, 1993; Morgante y Olivieri, 1993), en *E. curvula* sólo representaron un 4,95%. Resultados similares fueron hallados por Nicot *et al.* (2004) en trigo. Estos autores sugieren que la auto-complementación existente en los microsatélites (AT)_n dificulta su detección. Los motivos di-nucleótidos pueden representar múltiples codones dependiendo del marco de lectura y traducirse en diferentes aminoácidos. Por ejemplo, los motivos (GA)_n o (CT)_n, según que hebra del ADN sea codificante, pueden traducirse en los aminoácidos Arg, Glu, Ala y Leu. Ala y Leu están presentes en las proteínas con frecuencias del 8 y 10%, respectivamente (Lewin, 1994). Kantety *et al.* (2002) sugieren que esta podría ser una de las razones de la alta frecuencia de los motivos (GA)_n en las genotecas de ESTs.

Entre las combinaciones de trinucleótidos, los tipos predominantes fueron (CCG)_n y (CCT)_n, representado el 25,71 y 23,81% del total de microsatélites, respectivamente. En trigo y arroz estos motivos representan 83 y 79% del total (Kantety *et al.*, 2002). La

Rota *et al.* (2005), informan que en trigo, cebada y arroz, la relación entre los di-, tri-, tetra- y penta-nucleótidos varía en relación a la longitud de las repeticiones. En este estudio, sólo en arroz la relación entre los di- y tri-nucleótidos fue similar, pero sólo en aquellos casos donde la longitud de las secuencias fue mayor a 30 pb. Esta diferencia con nuestros resultados puede depender del número de unigenes detectados en ambos casos, 8884 en *E. curvula*, contra la secuenciación completa del genoma de arroz.

Como se mencionara en Materiales y Métodos, se diseñaron *primers* para 60 de los 254 EST-SSRs encontrados (AlphaDNA, Canadá, secuencia de *primers* en Anexo) que fueron amplificados para su validación utilizando ADN del cv. Tanganyika. De ellos, 35 (58%) fueron efectivamente amplificados en las condiciones experimentales mencionadas previamente (ver Materiales y Métodos). Como se menciona en el trabajo de Nicot *et al.* (2004), la falta de amplificación puede deberse a varias razones: i) uno de los *primers* diseñados desde secuencias de ESTs puede quedar entre dos exones, ii) el amplicon puede contener un intron demasiado largo dando un producto de PCR que no puede ser visualizado en el perfil electroforético, iii) error en la secuenciación o problemas durante la síntesis de los *primers* y iv) como se usaron secuencias consenso obtenidas de la compilación de varios ESTs, algunas de ellas puede resultar de la adición de diferentes copias del mismo gen (homeólogos o paralógos).

Con algunos de los *primers* se obtuvieron patrones de amplificación con múltiples bandas, similares a los obtenidos al utilizar marcadores RAPDs (Figura 1.1). Con SSRs se espera un menor número de bandas amplificadas y los resultados obtenidos en esta tesis pueden deberse al tipo de programa utilizado en la amplificación (touch-down), que puede generar bandas inespecíficas (debido a las temperaturas bajas que permite la unión de *primers* a regiones inespecíficas) o a la presencia de varios sitios de unión de los *primers* ya que para el desarrollo de los mismos sólo se contó con la secuenciación de una pequeña porción del genoma del pasto llorón.

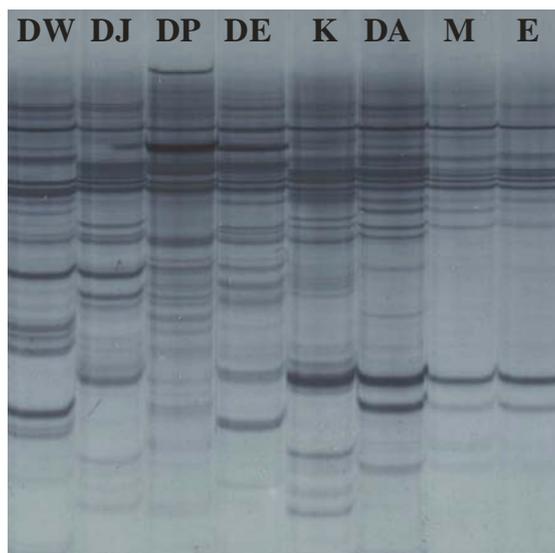


Figura 1.1. Patrón de amplificación de microsatélites obtenido con el *primer* E39. Las calles corresponden a ADN de los cvs.: DW: Don Walter, DJ: Don Juan, DP: Don Pablo, DE: Don Eduardo, K: Kromdraai, DA: Don Arturo, M: Morpa y E: Ermelo.

Trece de los *primers* seleccionados (15%) presentaron polimorfismos para al menos uno de los 12 genotipos donde fueron evaluados.

Evaluación de homogeneidad intracultivar

En las pruebas de homogeneidad realizadas utilizando semilla proveniente de una misma panoja se observó uniformidad en las progenies de las plantas apomícticas (cvs. Morpa y Tanganyika) y variabilidad en las progenies del genotipo sexual UNST1122 con los tres *primers* de RAPDs utilizados.

Cuando se realizaron las pruebas para determinar uniformidad dentro de los cultivares, se encontraron, en algunos casos, patrones variables. De los 15 individuos evaluados en cada cultivar se encontraron patrones de amplificación distintos en seis individuos de Morpa, cuatro de Don Eduardo, uno de Tanganyika y uno de Don Pablo. Esta variabilidad podría deberse a tres causas: la presencia de un cierto grado de reproducción sexual, la coexistencia de varios clones (biotipos) y/o la mezcla accidental de semillas en la cosecha o almacenaje. Las pruebas de progenie utilizando semilla de una misma panoja y las referencias bibliográficas (Poverene, 1988; Polci, 2000) indicarían que se trata de cultivares apomícticos obligados, por lo que se descarta la reproducción sexual.

Con el objetivo de explicar la variación observada, los patrones de amplificación de las plantas fuera de tipo fueron analizados y comparados con aquellos de otros cultivares. Con este estudio pudo mostrarse que en Morpa las seis plantas que presentaron patrones diferentes, correspondían a los patrones de Don Walter (tres individuos), Don Pablo (un individuo) y Don Eduardo (dos individuos), confirmando de esta forma la mezcla de semillas en el lote analizado. En el caso de Don Eduardo no se llegó a confirmar fehacientemente la contaminación de las semillas, por lo que no se lo consideró en el análisis posterior. En Tanganyika y Don Pablo se halló un individuo con patrón diferencial, en el primer caso altamente polimórfico y en el segundo levemente polimórfico (Figura 1.2). Estos patrones fuera de tipo no pudieron ser asignados a ninguno de los patrones de los materiales incluidos en el estudio, por lo que no puede descartarse la contaminación con otros materiales de pasto llorón no incluidos en el presente estudio, ni la coexistencia de varios clones.

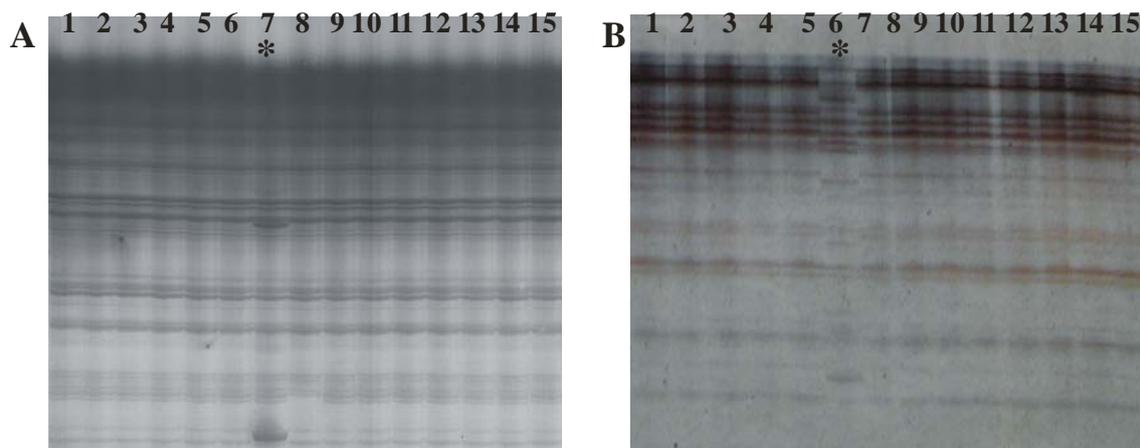


Figura 1.2. Patrones de amplificación de RAPDs de 15 individuos de los cvs. Don Pablo (A) y Tanganyika (B), mostrando un individuo con patrón polimórfico (*).

Los cultivares Don Walter, Don Juan, Ermelo, Don Arturo y Kromdraai mostraron uniformidad entre sus individuos presentado un patrón monomórfico. En la Figura 1.3A se muestra un gel de acrilamida con los patrones de RAPDs de plantas de Don Walter donde se observa la ausencia de variabilidad intracultivar. En la Figura 1.3B se observa el patrón de RAPDs de plantas de Morpa, donde se aprecia que nueve individuos presentan el mismo patrón de amplificación y los otros seis poseen distintos patrones.

El cultivar Kromdraai fue clasificado en trabajos previos como apomítico facultativo, basado en test de progenie donde algunas plantas mostraban sexualidad y otras sólo reproducción clonal (Guzmán *et al.*, 1992). En el presente estudio, los patrones moleculares fueron completamente uniformes, sugiriendo que el conjunto de semilla analizado proviene de plantas apomíticas.

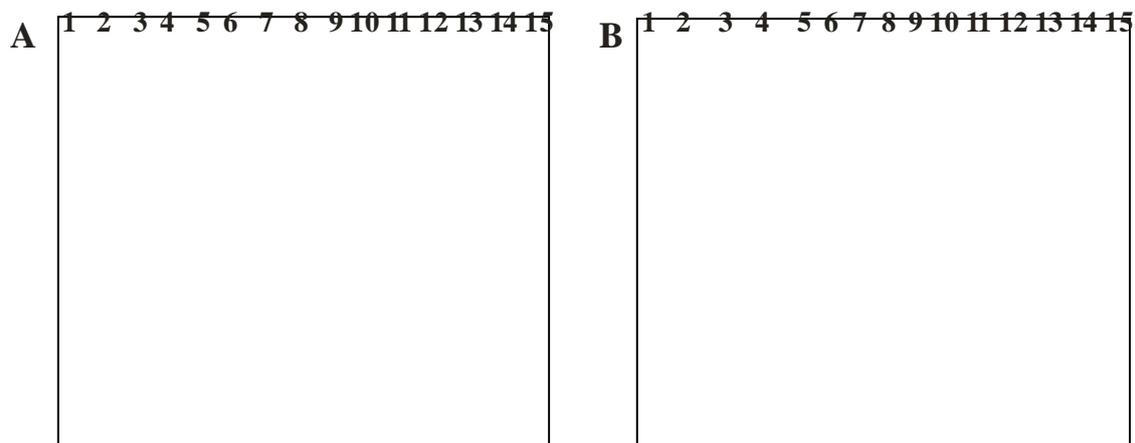


Figura 1.3. **A.** Patrón de amplificación de RAPDs de 15 individuos del cv. Don Walter, donde no se aprecia variación intracultivar. **B.** Patrón de amplificación de RAPDs de 15 individuos del cv. Morpa, donde se observan nueve individuos con igual patrón (círculos azules) y el resto de las plantas presentan polimorfismos.

Diferenciación de cultivares

Variabilidad entre cultivares fue observada con los tres tipos de marcadores de ADN evaluados, hallándose 56 bandas polimórficas con RAPDs, 101 con AFLPs y 26 con SSRs. Todos los *primers* utilizados en RAPD y AFLP mostraron al menos un polimorfismo entre los materiales de pasto llorón. En el caso de SSR, 10 de los 13 *primers* (77%) fueron polimórficos. Aunque ninguno de los *primers* individualmente fue suficientemente informativo para diferenciar todos los genotipos, la combinación de todos los polimorfismos de todos los marcadores permite una completa separación de los genotipos. En la Figura 1.4 se muestran geles representativos de cada uno de los marcadores.

Con los datos obtenidos a partir de estos marcadores se elaboraron los índices de similitud de Jaccard y se graficaron las relaciones de similitud para cada marcador por separado. En la Figura 1.5 se observan los análisis de agrupamiento obtenidos con marcadores SSRs, AFLPs y RAPDs.

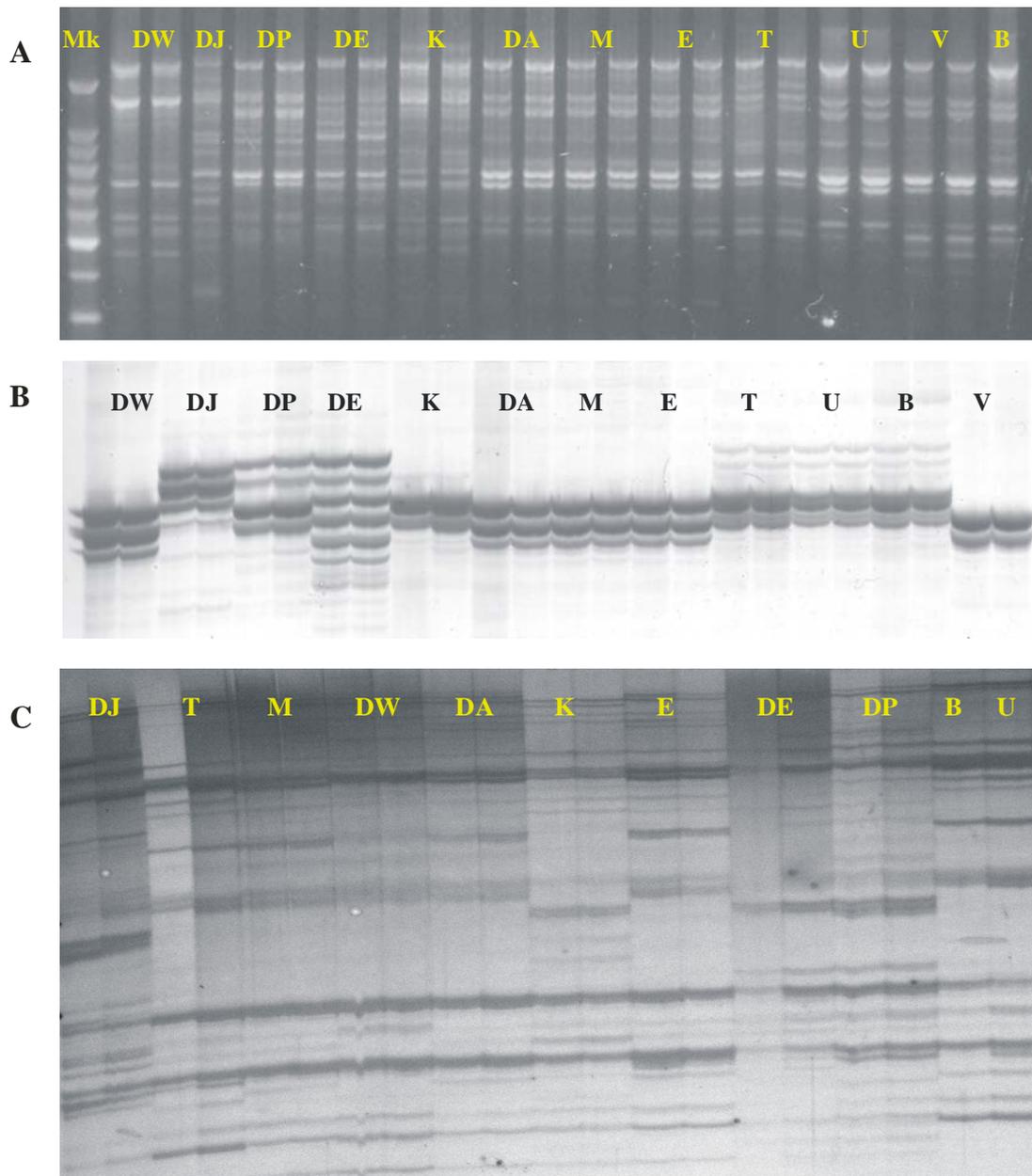


Figura 1.4. Patrones de amplificación obtenidos con RAPDs (A), SSRs (B) y AFLPs(C) de diferentes materiales de pasto llorón. Las letras corresponden a los siguientes genotipos: DW: Don Walter, DJ: Don Juan, DP: Don Pablo, DE: Don Eduardo, K: Kromdraai, DA: Don Arturo, M: Morpa, E: Ermelo, T: Tanganyika, U: UNST1112, V: UNST1122 y B: UNST1131. Mk: marcador de peso molecular de 100pb (ladder).

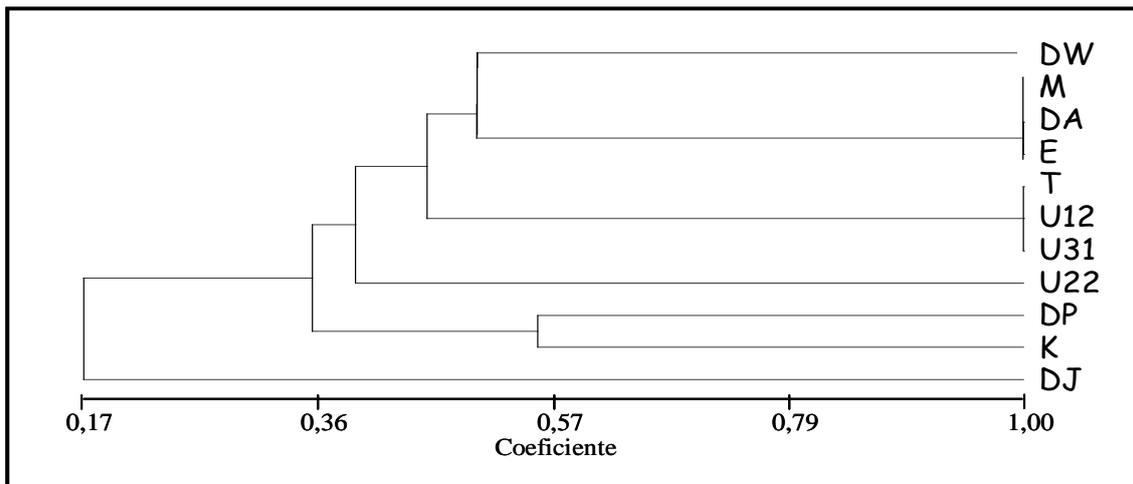
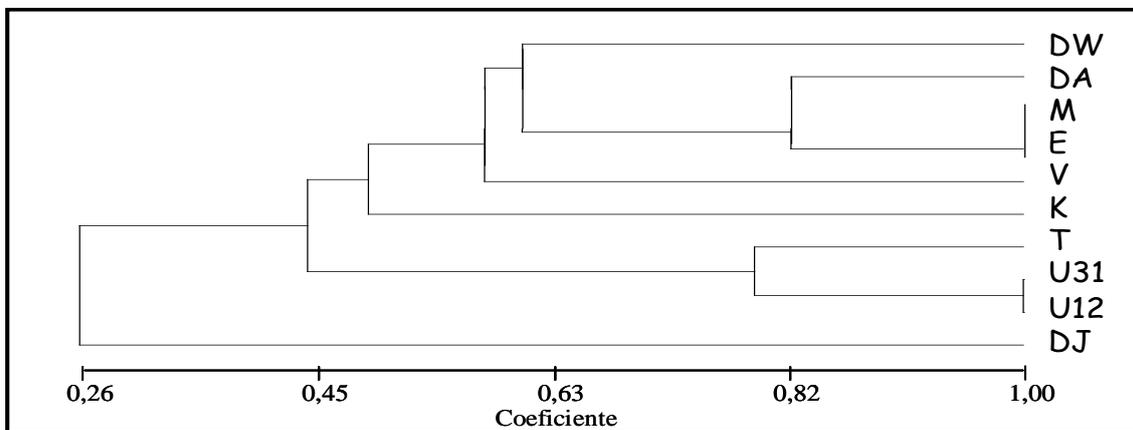
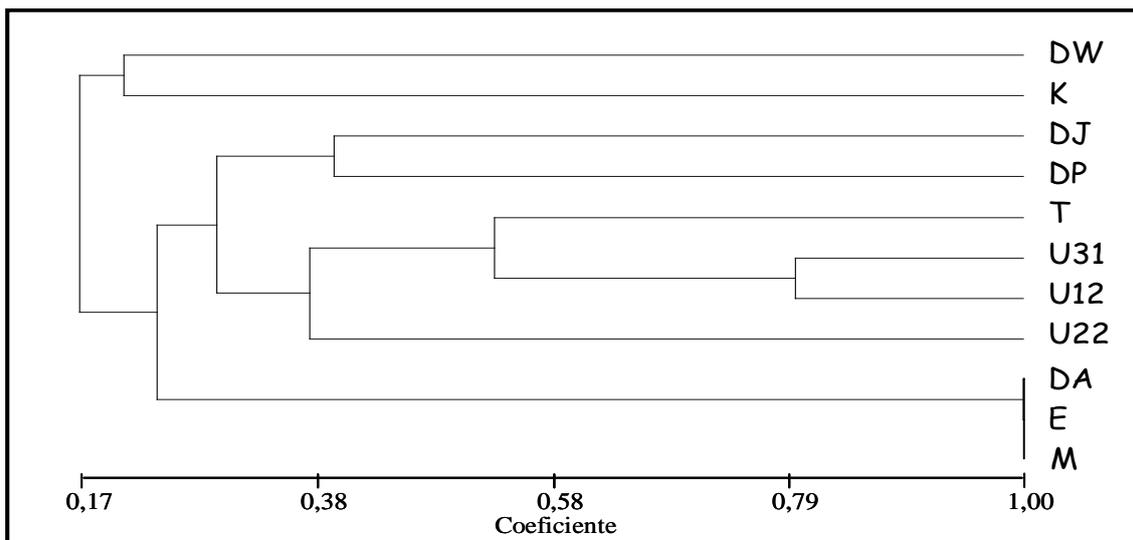
A**B****C**

Figura 1.5. Agrupamientos obtenidos con marcadores SSRs (A), AFLPs (B) y RAPDs (C). Las letras corresponden a los siguientes genotipos: DW: Don Walter, DJ: Don Juan, DP: Don Pablo, DE: Don Eduardo, K: Kromdraai, DA: Don Arturo, M: Morpa, E: Ermelo, T: Tanganyika, U12: UNST1112, U22: UNST1122 y U31: UNST1131.

Los gráficos de agrupamiento obtenidos para cada tipo de marcador molecular fueron diferentes, aunque presentaron varias similitudes. En los tres dendrogramas, los cultivares tipo curvula forman un grupo definido, siendo Don Walter (conferta) y UNST1122 los genotipos más cercanos y el resto de los cultivares se ubican en distintas posiciones. Una relación cercana entre los tipos curvula y conferta fue previamente observada y un origen común para ambos ha sido propuesto, ya que genotipos de tipo conferta pueden ser uno de los ancestros de los curvula y fundadores del complejo *E. curvula* (Poverene y Voigt, 1997).

En todos los casos fue posible diferenciar a los distintos tipos agronómicos, aunque algunos marcadores no fueron lo suficientemente informativos para separar a los cultivares incluidos dentro del tipo curvula. Se encontró en este trabajo que los microsatélites fueron los marcadores que presentaron menor poder discriminatorio. Los AFLPs fueron los únicos que permitieron separar a todos los cultivares comerciales, incluyendo a Don Arturo de Ermelo y Morpa. Los agrupamientos obtenidos con SSRs y AFLPs fueron en general similares entre sí y con el agrupamiento previo obtenido con isoenzimas (Poverene, 1988). Ellos muestran a Don Walter vinculado al grupo de los curvula y a Kromdraai vinculado a Don Pablo de manera similar a lo observado por medio de isoenzimas.

Dentro de los cultivares del tipo curvula, Tanganyika es el único claramente diferenciable del resto por caracteres morfológicos, isoenzimáticos y por marcadores moleculares. Los otros tres cultivares (Morpa, Ermelo y Don Arturo) presentan grandes similitudes, no pueden ser diferenciados por caracteres morfológicos y estudios en semillas utilizando isoenzimas indicaron que Morpa y Ermelo son indiferenciables (Poverene, 1988). Con isoenzimas también se observó que Don Arturo presentó un patrón cualitativamente igual a los anteriores, pero la intensidad relativa de cuatro de las cinco bandas fue menor. Una causa que puede explicar lo anterior es que los cultivares Ermelo y Morpa fueron seleccionados a partir de un mismo ecotipo y el cultivar Don Arturo se cree que también lo fue (Poverene, 1988). El cultivar Morpa, desarrollado por el grupo del Dr. Paul Voigt, presenta, a diferencia de los anteriores, una mayor producción de carne, que podría deberse a una mayor palatabilidad (Voigt *et al.*, 1970). En el presente trabajo sólo con AFLPs fue posible diferenciar Don Arturo de Ermelo y Morpa.

Con respecto a los nuevos materiales analizados, los tetraploides (UNST1131 y UNST1112) se agruparon dentro de los curvula y vinculados a Tanganyika, que es el cultivar a partir del cual se originaron. Con AFLPs y RAPDs se logró diferenciarlos de Tanganyika y sólo con RAPDs se logró diferenciarlos entre sí. El caso de UNST1122 es peculiar, ya que al ser diploide presenta amplias diferencias morfológicas con los otros cultivares del grupo curvula y también a nivel molecular. Con los tres tipos de marcadores se logró ubicar a UNST1122 dentro del grupo curvula, aunque en distintas posiciones según el marcador y en el caso de los AFLPs también vinculado a Don Walter, que es tipo conferta.

Con el diploide PI299920 (ver Capítulo 3) se realizaron estudios morfológicos e isoenzimáticos (Poverene y Voigt, 1997) y se encontró que a ambos niveles se asemeja más al tipo robusta que al tipo curvula, aunque no está bien asociado a ninguno de los tipos agronómicos definidos a nivel poliploide, por lo que más que un diploide ancestral se considera que derivó de plantas de mayor ploidía por reducción cromosómica (Voigt *et al.*, 2004). Al igual que otros diploides surgidos artificialmente, el diploide obtenido en el laboratorio de Biotecnología Vegetal (CERZOS-UNS) posee un mayor vigor que el tetraploide del cual fue obtenido. Observaciones similares fueron realizadas por Stupar *et al.* (2007) en una serie euploide de papa. Este autor señala que los diploides obtenidos artificialmente poseen estas características. Es decir que la ploidía es un factor muy importante que confiere características importantes y típicas de cada nivel. Este material reforzaría la hipótesis de que los diploides en esta especie provienen de materiales de mayor ploidía y no al revés.

Por su robustez y facilidad de lectura los SSRs serían los marcadores de elección para la caracterización de cultivares. Además los microsatélites cumplen los cuatro criterios propuestos por Bailey (1983) para un marcador óptimo: 1) máxima variación entre cultivares; 2) mínima variación intracultivar; 3) estabilidad ambiental y 4) reproducibilidad experimental. En este caso el agrupamiento obtenido con SSRs fue muy similar al obtenido con isoenzimas y al agrupamiento por caracteres morfológicos propuesto por Covas (1991), sin embargo es necesario incrementar el número de *primers* utilizados para discriminar entre todos los genotipos evaluados.

Poverene (1988) encuentra que la variación intravarietal puede tener dos orígenes: la primera es la existencia de biotipos y la segunda consiste en la ocurrencia de reproducción sexual. El análisis de un gran número de individuos de cada accesión (20-30) podría garantizar la ausencia de variación intravarietal en pasto llorón. Sin embargo, en el caso de hallarse tal variación y que, como en el caso del cv. Kromdraai, se sospechara que es causada por la reproducción sexual, la caracterización por isoenzimas o marcadores moleculares con fines de identificación varietal presentaría los mismos inconvenientes que en el caso de especies alógamas. En estas especies, la metodología para su caracterización se basa en el cómputo de las frecuencias alélicas observadas en loci alozímicos y es indispensable el conocimiento del modo de herencia de estos loci.

Crawford (1983) propone tres hipótesis para explicar la dificultad para delimitar algunos grupos taxonómicos en los cuales los límites entre especies son borrosos:

- 1- los taxa fueron originados recientemente y la divergencia no es aun notoria,
- 2- existe un alto nivel de plasticidad fenotípica que permite que genomas divergentes converjan fenotípicamente bajo condiciones similares,
- 3- existe hibridación entre poblaciones de distintas especies.

La última hipótesis parece ser la más adecuada para explicar los problemas taxonómicos dentro del género *Eragrostis*, ya que se ha informado la hibridación dentro del género (Vorster y Liebenberg, 1977).

En cuanto a los cruzamientos para la obtención de la población de mapeo para apomixis los mejores donantes de polen serían los cultivares Ermelo, Don Arturo y Morpa, ya que ellos son muy similares entre sí y se diferencian claramente de Tanganyika, que es muy similar a los tetraploides sexuales que serán usados como progenitor femenino (genotipos UNST1112 y UNST1131). De esta manera, al lograr un mayor nivel de polimorfismos, se vería facilitado el mapeo genético.

Conclusiones

De lo expuesto se concluye que:

- Es posible determinar el grado de uniformidad de los cultivares y detectar la presencia de contaminación de semilla. Esta información es de importancia práctica y fue solicitada por el INASE y publicada en su Boletín.
- El agrupamiento con EST-SSRs y AFLPs concuerda con estudios previos realizados con isoenzimas (Poverene, 1988) y caracteres morfológicos (Covas, 1991).
- Los AFLPs son los marcadores que presentan mayor poder de discriminación entre cultivares.
- Los nuevos materiales desarrollados en nuestro laboratorio deberían clasificarse como del tipo *curvula* en el caso de UNST1131 y UNST1112.
- Se sugiere crear un nuevo tipo agronómico donde incluir a los diploides por poseer caracteres de tipo *robusta* y perfiles moleculares de tipo *curvula*.
- Los donantes de polen más adecuados para la obtención de una población de mapeo serían los cultivares Ermelo, Don Arturo y Morpa.

Si bien el valor sistemático de estos datos es limitado dado el pequeño número de accesiones analizadas, en comparación con el extenso número de ecotipos existentes en las regiones de origen de esta gramínea, es válido dado que las accesiones analizadas representan adecuadamente el rango de variación morfológica existente en el complejo en nuestro país.

La información obtenida en este trabajo permite concluir que los datos aportados por marcadores moleculares se ajustan a los datos previos citológicos y quimiosistemáticos y pueden ser integrados con datos morfológicos y resultar de gran valor para investigaciones taxonómicas, para la evaluación de colecciones de germoplasma y para la caracterización de los genotipos de *E. curvula*.

Capítulo 2

Métodos para la caracterización del modo reproductivo

Introducción

Existen varios indicadores de la existencia de reproducción apomítica en una especie, como la alta frecuencia de poliembrionía (embriones múltiples), la alta producción de semillas en plantas que se esperaban estériles (por ej. híbridos entre plantas poco relacionadas, triploides y aneuploides) y progenie homogénea (Leblanc y Mazzucato, 2001). Estos indicadores a veces son difíciles de evaluar, como en el caso de materiales naturales y siempre se requieren investigaciones profundas para establecer el tipo de apomixis presente y el nivel de expresión de este carácter.

En la reproducción sexual, las dos gametas que se fusionan son producidas por meiosis. El desarrollo sexual permite la recombinación genética y la segregación, lo cual lleva a ampliar la diversidad genética. Por ello, salvo algunas excepciones (por ej. plantas autógamas estrictas), la descendencia de una planta sexual son nuevos genotipos, distintos a los de ambos progenitores. La apomixis se caracteriza por la falta de meiosis y fertilización, que llevan a la obtención de progenies que son réplicas genéticas exactas (clones) de la planta madre (Leblanc y Mazzucato, 2001).

Un requisito fundamental cuando se quiere estudiar el modo reproductivo de una especie, la herencia de la apomixis o incluso identificar los genes que determinan el carácter es contar con métodos simples cuali o cuantitativos que permitan la caracterización fenotípica en los parentales y en la progenie. Para confirmar sin error la existencia de apomixis es necesario disponer de información genética a través de pruebas de progenie (uniformidad en la descendencia) como también citológica (ausencia de meiosis, diferencias en la estructura del saco embrionario, etc.). La determinación del modo reproductivo no es simple y varias técnicas deben ser utilizadas para garantizar precisión en este aspecto.

Algunas de estas metodologías son las siguientes (Naumova, 1997; Sherwood, 2001):

Citoembriología: se basa en la observación de las diferencias en la megasporogénesis y megagametogénesis entre procesos sexuales y apomíticos (ej.: secciones de parafina combinado con tinciones como safranina-fast green, clarificado de ovarios, etc.). Es

necesario conocer todos los estadios de la megasporogénesis y megagametogénesis en plantas sexuales y apomícticas y buscar diferencias que puedan ser claramente distinguibles, como por ejemplo cantidad o ubicación de núcleos o células en el saco embrionario. La técnica de clarificado de ovarios es muy útil y relativamente sencilla. Se basa en métodos de clarificación de tejidos y squash y permite observar al microscopio óptico y con poca elaboración del material, todo el proceso de megasporogénesis y evaluar la presencia de un proceso sexual o apomíctico. La técnica de clarificación de Herr (1971) aportó mejoras para estudiar los estadios de la megasporogénesis, fundamentalmente en la aposporía. En muchos casos es la técnica citológica de elección para la evaluación del modo reproductivo cuando existen numerosos individuos a evaluar.

Citometría de flujo: se basa en el estudio del nivel de ploidía en el endosperma (doble fertilización) y en el embrión de la semilla de manera de establecer la relación de ploidía entre ambos, ya que esta relación generalmente varía en semillas provenientes de reproducción sexual y apomíctica (Matzk *et al.*, 2000). Se realiza un macerado de la semilla en un *buffer* conteniendo un colorante de ADN (ej. DAPI) y el citómetro indica cuales son las ploidías más frecuentes de los núcleos (picos). Como se mencionó en la Introducción, la relación embrión/endosperma frecuentemente varía entre los procesos sexuales y apomícticos, ya que el endosperma se forma por la unión de tres núcleos, dos núcleos polares (maternos) y un núcleo espermático (paterno) y en los procesos sexuales los tres núcleos son de ploidía n y en procesos apomícticos los núcleos polares son $2n$, dando una relación embrión/endosperma para semilla sexual de $2/3$ y para semilla apomíctica de $2/5$. Esta diferencia es claramente detectable con un citómetro de flujo y los equipos actuales pueden trabajar con semillas tan pequeñas como la del pasto llorón.

Pruebas de pro genie: originalmente fueron utilizadas con caracteres morfológicos comparando las progenies con la planta materna. Ya que las plantas apomícticas producen pro genie uniforme (clones maternos), la identidad de los descendientes con la planta madre indica un posible origen apomíctico. Posteriormente con la aparición y utilización de los marcadores moleculares, éstos fueron aplicados para realizar las pruebas de pro genie. Cuando existen, también se pueden usar marcadores ligados a la apomixis, tales como RFLPs, SSRs, AFLPs, etc. Esta técnica ha sido exitosa para la evaluación del modo reproductivo en poblaciones de *Hieracium perforatum* usada en

combinación con técnicas citológicas (Arnholdt-Schmitt, 2000), como así también en *Paspalum notatum* (Ortiz *et al.*, 1997; Stein *et al.*, 2007).

Las técnicas anteriores pueden ser agrupadas de la siguiente manera de acuerdo a Naumova (1997). En primer lugar se encuentran las técnicas utilizadas para análisis en progenies (semillas o plantas), las cuales evitan la inclusión del material en parafina, la realización de cortes y tinción de las secciones. Estas técnicas permiten el estudio de numerosas muestras en menor tiempo. El segundo grupo incluye las técnicas clásicas de citoembriología utilizando tanto el microscopio óptico como el electrónico para el estudio de los aspectos básicos en el desarrollo del modo reproductivo. Estas técnicas requieren mucho tiempo, pero brindan información fundamental para el conocimiento de los mecanismos de la apomixis.

Estos dos tipos de técnicas no evalúan exactamente lo mismo. Las técnicas citoembriológicas detectan el grado de apomeiosis que presenta una planta apomíctica gametofítica. O sea qué porcentaje de los sacos embrionarios serán no reducidos. Mientras que las pruebas de progenie (en semillas o plantas) evalúan el grado real de reproducción apomíctica de esa planta, que puede coincidir o no con el grado de apomeiosis. Para dar un ejemplo: una planta puede formar un 50% de sacos meióticos y un 50% de sacos apomícticos (no reducidos), y será clasificada como apomíctica facultativa con 50% de apomixis en las pruebas citoembriológicas, pero si los únicos que forman semillas viables son los sacos sexuales la progenie será 100% sexual en las pruebas de progenie. Por eso es muy necesario hacer los dos tipos de pruebas y compararlos, y también es importante para detectar desacoples entre la apomeiosis y la partenogénesis (plantas que hacen apomeiosis pero no hacen partenogénesis y viceversa).

Si bien pueden utilizarse diferentes técnicas, las observaciones citoembriológicas son siempre necesarias para confirmar el origen del saco embrionario y el tipo de apomixis presente (Leblanc y Mazzucato, 2001).

En el caso particular de la diplosporía se cuenta además con la prueba de deposición de calosa, que se basa en la observación de que en los procesos sexuales se deposita calosa en la pared celular de la arqueospora (Leblanc y Mazzucato, 2001). De acuerdo a la

literatura las plantas diplospóricas no presentan calosa en ningún estadio del desarrollo embrionario, por lo que esta técnica permitiría diferenciar, de manera rápida y eficiente, plantas sexuales de apomícticas (Peel *et al.*, 1997).

La calosa esta compuesta de glucanos unidos por uniones β -1,3-glicosídicas en cadena lineal y se deposita entre la membrana plasmática y la pared celular celulósica. Es un componente característico de la pared celular en elementos del floema (Evert, 2006). Es sintetizada en la pared celular de células heridas o infectadas por patógenos, células embrionarias antes de la embriogénesis somática, células estigmáticas siendo parte responsable de la incompatibilidad polen-estilo, en tubos polínicos durante el crecimiento del tubo en el estilo, y en los meiocitos masculinos y femeninos de la mayoría de las especies de angiospermas durante la esporogénesis (Peel *et al.*, 1997). Antes de iniciar la meiosis, la calosa se deposita alrededor de la célula madre de la megáspora y de la célula madre del polen en la antera. Cuando la meiosis finaliza la megáspora funcional ya no se encuentra rodeada por calosa, sin embargo, las megásporas degenerantes, presentan sus paredes rodeadas por esta sustancia (Rodkiewicz, 1970).

Los procesos sexuales y apomícticos en el pasto llorón presentan determinadas características que tienen que ser tomadas en cuenta a la hora de elegir el método de evaluación del modo reproductivo. En la Introducción fueron detalladas las características de ambos procesos. En cuanto a aspectos citológicos las principales diferencias entre la megasporogénesis y megagametogénesis en ovarios sexuales y apomícticos son las siguientes:

Proceso sexual	Proceso apomíctico
Célula Madre de la Megáspora no elongada	Célula Madre de la Megáspora elongada
Tétrada (meiosis)	Sin rastros de meiosis
Posición de núcleos durante las divisiones mitóticas en el saco embrionario	Posición de núcleos durante las divisiones mitóticas en el saco embrionario
- saco binucleado	- saco binucleado
- saco tetranucleado	- saco tetranucleado
Saco embrionario maduro con ocho o más núcleos (proliferación de antípodas)	Saco embrionario maduro generalmente con cuatro núcleos (sin antípodas)

Un factor muy importante a tener en cuenta en esta especie es el modo en que se forma el endosperma. En los procesos sexuales sigue el patrón típico. En los apomícticos, al existir un solo núcleo polar no reducido ($2n$) y al ser estas plantas pseudógamas, es decir que la polinización es necesaria y el grano de polen aporta un núcleo reducido al endosperma (n), la relación de ploidía entre embrión y endosperma no varía entre semillas de plantas sexuales y apomícticas ($2n/3n$).

Hipótesis

Las distintas metodologías aplicables a la caracterización de la apomixis pueden ser aplicadas al estudio del modo reproductivo en pasto llorón y mostrarán distinta aptitud para su aplicación en el análisis de una población de mapeo.

Objetivo

Frente a la necesidad de caracterizar fenotípicamente una población de mapeo en cuanto a modo reproductivo, el objetivo de esta parte de la tesis fue evaluar distintos métodos utilizados para la caracterización de progenies en plantas apomícticas (citometría de flujo, citoembriología y test de deposición de calosa) en progenies de plantas sexuales y apomícticas de pasto llorón, a fin de determinar su confiabilidad y tiempo requerido en su aplicación.

Materiales y Métodos

Material vegetal

Los materiales vegetales (*E. curvula*) evaluados en este estudio se mantuvieron en invernáculo y forman parte de la colección de cultivares existente en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal (CERZOS-UNS). También se tomaron muestras de plantas creciendo en condiciones de campo (Criadero de Cereales de Invierno de la Asociación de Cooperativas Argentinas - ACA, Cabildo). Se evaluaron distintos cultivares apomícticos (Tanganyika, Morpa, Don Pablo, Don Eduardo, Don Juan) y sexuales (genotipo UNST1122 y cultivar Victoria).

Citometría de flujo

Los estudios se realizaron en el citómetro de flujo del Laboratorio de Genética del IBONE (Instituto de Botánica del Noreste, Corrientes) gracias a la gentileza del Dr. Camilo Quarín. Se utilizaron semillas de un cultivar apomíctico (Tanganyika) y uno sexual (genotipo UNST1122) para evaluar la existencia de diferencias en la relación de ploidías entre embrión y endosperma.

Para los análisis en el citómetro de flujo se siguió el protocolo de Matzk *et al.* (2000), con algunas modificaciones. Las semillas fueron maceradas en una caja de Petri con 1 ml de *buffer* de extracción y tinción. La composición del *buffer* fue la siguiente: 0,107 g $\text{Cl}_2\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6$; 0,5 g ClNa ; 0,1 ml Triton X-100 y 1,21 g Tris en 200 ml de agua destilada, pH 7,5. A este *buffer* se incorporó el colorante 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) para lograr una concentración final de 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$. La suspensión obtenida con el material de semilla y *buffer* fue filtrada e incubada durante 30 min a 4°C. La intensidad de fluorescencia en el citómetro de flujo fue calculada a través de la medición de aproximadamente 5.000 núcleos por muestra.

Estudios citoembriológicos

Las panojas se colectaron en el momento de presentar los primeros signos de antesis, tiempo en el cual es posible encontrar todo el rango del desarrollo del saco embrionario, desde la célula arqueospórica hasta la posible fertilización (Brown y Emery, 1958; Streetman, 1963). Estas fueron inmediatamente fijadas en FAA (10% formol, 5% ácido acético, 50% alcohol y 35% agua destilada) donde se conservaron hasta el momento de su utilización. Luego se procedió a la inclusión de las espiguillas, por separado, en parafina (Paraplast), montado y corte en micrótomos en secciones de 10 μm de espesor. Todo el proceso se realizó de acuerdo a la técnica de Johansen (1940).

Coloración con azul de anilina y observación al microscopio de fluorescencia

Para la detección de calosa utilizando azul de anilina, las secciones fueron desparafinadas e hidratadas de acuerdo a procedimientos estándar y teñidas con azul de anilina (0,005%) en *buffer* 0,067 M PO_4K_2 pH 9,5 (Carman *et al.*, 1991). Las secciones

teñidas fueron examinadas utilizando un microscopio óptico de fluorescencia Nikon (Departamento de Agronomía, UNS) y un Nikon (Eclipse) 80I (IADO-CCT Bahía Blanca) utilizando el filtro UV2E.

Coloración con safranina-fast green

Como control de las observaciones realizadas con fluorescencia, los mismos preparados se tiñeron con safranina-fast green, a fin de observar las estructuras y correlacionarlas con las zonas fluorescentes observadas con la tinción de azul de anilina. Para ello, luego de la observación con fluorescencia se retiraron los cubreobjetos, se lavaron los preparados con agua destilada (5 min), se sumergieron en alcohol 50% (5 min) y se siguió la tinción típica con safranina-fast green (Johansen, 1940). Los preparados teñidos de esta manera fueron observados en un microscopio óptico Zeiss.

Pruebas de progenie utilizando marcadores moleculares

Como control de la uniformidad dentro de cada cultivar se evaluaron plantas provenientes de una misma panoja de los cultivares apomícticos Morpa (30 plantas) y Tanganyika (25 plantas) y del genotipo sexual UNST1122 (20 plantas). Para las pruebas de progenie se cosecharon panojas durante la floración estival del año 2006 a partir de plantas de la colección de cultivares existente en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal (CERZOS-UNS). Se hicieron almácigos y luego las plantas fueron transplantadas a macetas individuales.

La extracción de ADN se realizó utilizando el protocolo mencionado en el Capítulo 1 y para los marcadores RAPDs se utilizaron cuatro *primers* en cada población de plantas analizada (211, 222, 237 y 241 de la serie NAPS de *primers* estándar). Los productos de amplificación se separaron en geles de poliacrilamida que se tiñeron con plata. Se utilizaron las mismas metodologías explicadas en el Capítulo 1.

Resultados y Discusión

Citometría de flujo

En la Figura 2.1A se muestra el citoespectrofotograma de una semilla de una planta apomíctica de pasto llorón, cv. Tanganyika. Los tres picos señalados con flechas, indican tres frecuencias principales de ploidías, que corresponden a núcleos del embrión y del endosperma en dos momentos del ciclo celular, fases G1 y fase G2, donde está duplicado el genoma previo a la división celular. La fase G2 tiene menor intensidad y no se observa en el endosperma por la baja actividad mitótica.

En la Figura 2.1B se muestra el correspondiente citoespectrofotograma de una semilla de una planta diploide sexual de pasto llorón (genotipo UNS1122). Se observan los mismos tres picos. Como era de esperarse de una planta de estas características, la relación embrión/endosperma se mantuvo en 1/1,5 o 2/3

Prueba de deposición de calosa

El estudio de cortes longitudinales de las espiguillas de *E. curvula* muestra una sucesión de flores que va desde la más desarrollada en la base a la de menor desarrollo en su ápice. Cada una de estas espiguillas puede contener siete o más flores en distintos estados de desarrollo (Figura 2.2A). En la Figura 2.2B se observa el corte longitudinal de un antecio de *E. curvula* cv. Tanganyika, teñido con safranina-fast green, con sus glumelas, un par de anteras, el pistilo compuesto por sus dos estilos con estigmas plumosos y el ovario, con una célula madre de las megásporas (CMM) en el centro.

La tinción con azul de anilina (Figuras 2.2C), aunque es específica para detectar calosa, permitió diferenciar las distintas estructuras que componen los antecios de pasto llorón. Dentro del ovario y en posición central, se encuentra la CMM, donde el patrón de fluorescencia observado toma la forma de esta célula en función de la forma en que este β -glucano se deposita sobre la pared de la misma (Figuras 2.2D y 2.2G).

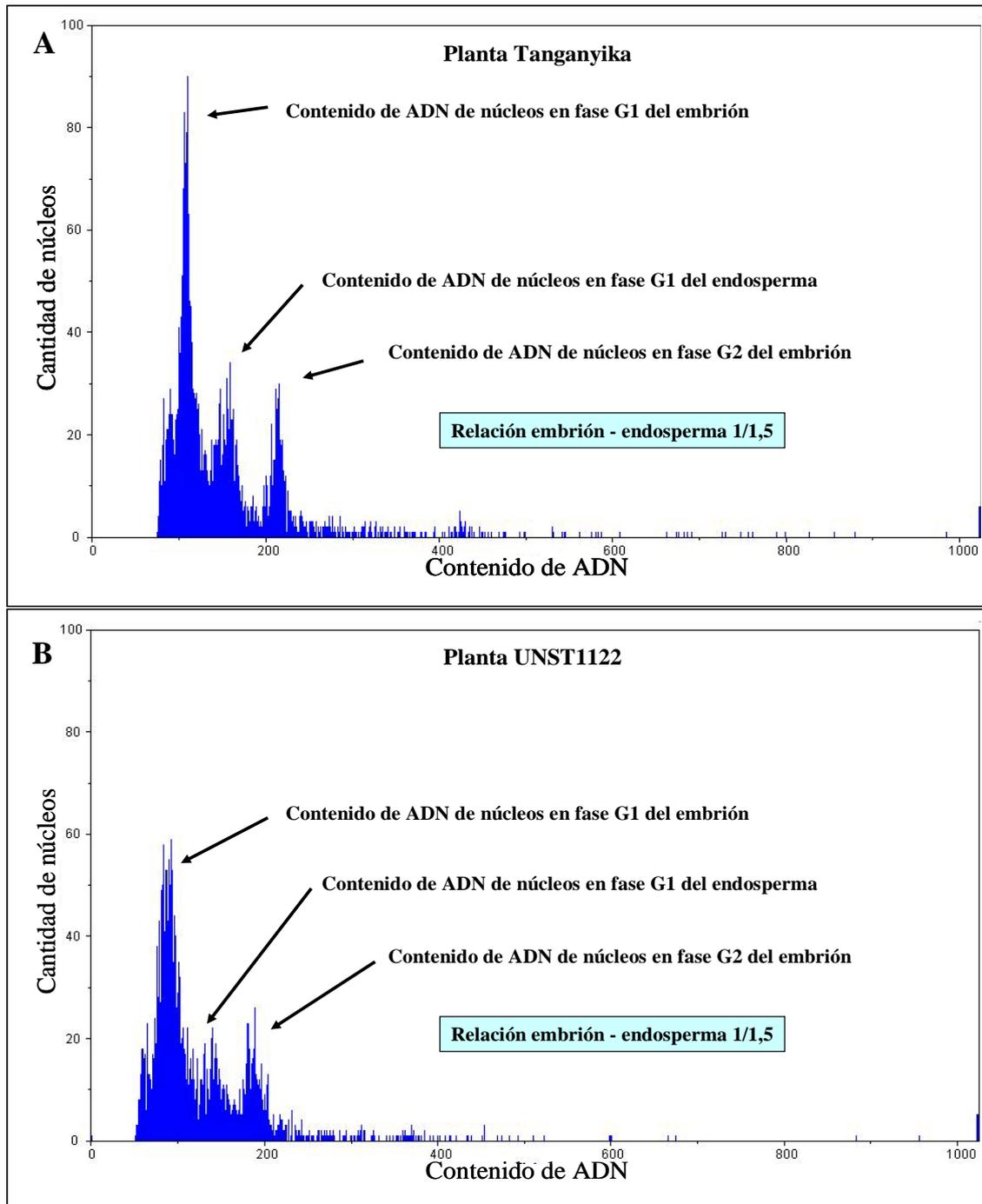


Figura 2.1. Citoespectrofotograma mostrando las relaciones de ploidía embrión/endosperma de una semilla de una planta del cv. apomíctico Tanganyika (A) y de una semilla de una planta diploide sexual de pasto llorón del genotipo UNST1122 (B). La posición de los picos con respecto al eje x en ambas muestras es independiente y arbitraria, no reflejando las diferencias en los niveles de ploidía.

El patrón de deposición de calosa observado en el material sexual, genotipo UNST1122 (Figuras 2.2D, 2.2E y 2.2F) sigue los patrones previamente descritos en procesos sexuales (Rodkiewicz, 1970). En la Figura 2.2D se observa la CMM en posición central. Puede observarse claramente la formación de una tétrade lineal (Figura 2.2E),

características de un proceso meiótico, donde las cuatro células están rodeadas de calosa. Luego la megáspora funcional del extremo calazal pierde su cubierta de calosa y se observan las tres megásporas degenerantes (Figura 2.2F) que se dirigen hacia el lado micropilar del saco embrionario en formación reteniendo la cubierta de calosa temporalmente.

En las plantas apomíticas, cv. Tanganyika, (Figuras 2.2G, 2.2H y 2.2I) se registró deposición de calosa alrededor de la CMM, pero no se observaron evidencias de procesos sexuales típicos (tétrades y degenerantes). Las formas fluorescentes observadas en las CMMs apomíticas (Figura 2.2G) fueron similares a las CMMs sexuales (Figura 2.2D). Sin embargo, en muchos casos estas CMMs apomíticas continuaron rodeadas de calosa durante su elongación dentro del espacio nucelar (Figura 2.2H y 2.2I). A este estadio se lo denomina célula madre de la megáspora elongada (CMME). El patrón de deposición de calosa en las CMMEs no es muy regular en cuanto a la cantidad y la forma sobre la pared celular, sino que parece acompañar el crecimiento de esta célula entre las células nucleares en dirección calazal-micropilar, mientras la fluorescencia se va perdiendo gradualmente con el tiempo. Al extremo micropilar de las CMMEs se lo diferencia del calazal porque se ve más dilatado (Figura 2.2H y 2.2I). La presencia de calosa en las CMMEs indica que este β -glucano no impide el crecimiento de estas células.

Las secciones recuperadas luego de la tinción con azul de anilina y tratadas posteriormente con safranina-fast green permanecieron en muchos casos en condiciones óptimas, lo que permitió controlar y corroborar que el material con el que se trabajó presentaba los estadios de la gametogénesis femenina observados con la coloración fluorescente.

En el caso de las espiguillas sexuales del genotipo UNST1122 (Figuras 2.3A-2.3C), se encontraron estadios típicos de procesos sexuales, como son las tétrades lineales (Figura 2.3A), las megásporas degenerantes micopilares (Figuras 2.3B y 2.3C) y la megáspora funcional calazal. Además se observaron arquesporas, CMMs, sacos binucleados (2N), tetranucleados (4N), octanucleados (8N) (Figura 2.3G) y proliferación de antípodas.

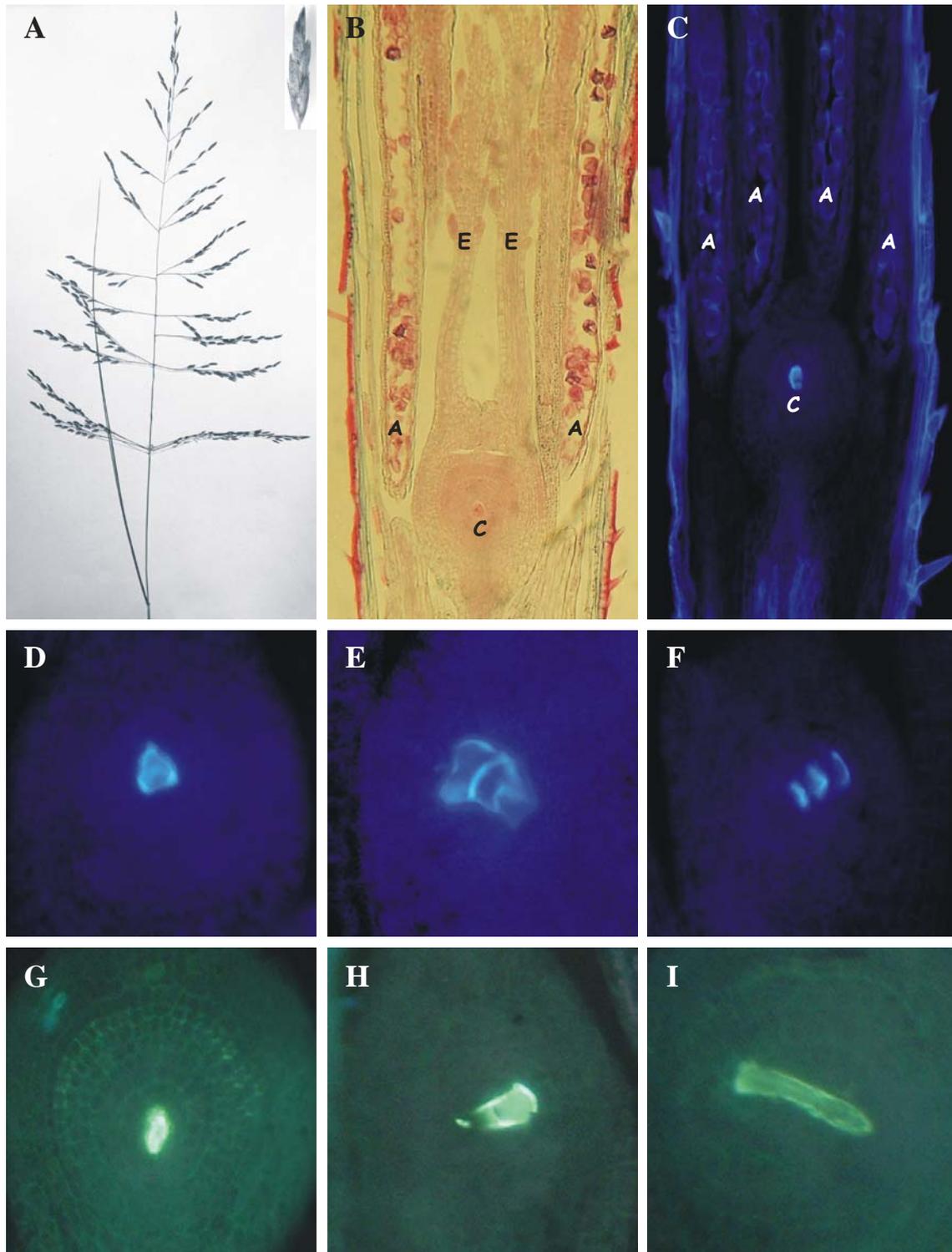


Figura 2.2. Inflorescencia y megasporogénesis en pasto llorón. **A.** vista general y detalle de una espiquilla (Tomado de Selva *et al.*, en preparación). **B.** Corte longitudinal de un antecio teñido con safranina-fast green (100X). **C.** Corte longitudinal de un antecio teñido con azul de anilina (100X). **D-F.** Cortes longitudinales de ovarios del genotipo sexual UNST1122 teñidos con azul de anilina con detalles de la megasporogénesis (200X). **D.** Célula madre de la megáspora (CMM), **E.** Dos células de una tétrada lineal y **F.** detalle de las tres megásporas degenerantes. **G-I.** Corte longitudinal de ovarios del cv. Tanganyika teñidos con azul de anilina con detalle de la megasporogénesis (200X). **G.** célula madre de la megáspora (CMM), **H e I.** célula madre de la megáspora elongada (CMME). A: antera, C: célula madre de la megáspora (CMM), E: estilo plumoso.

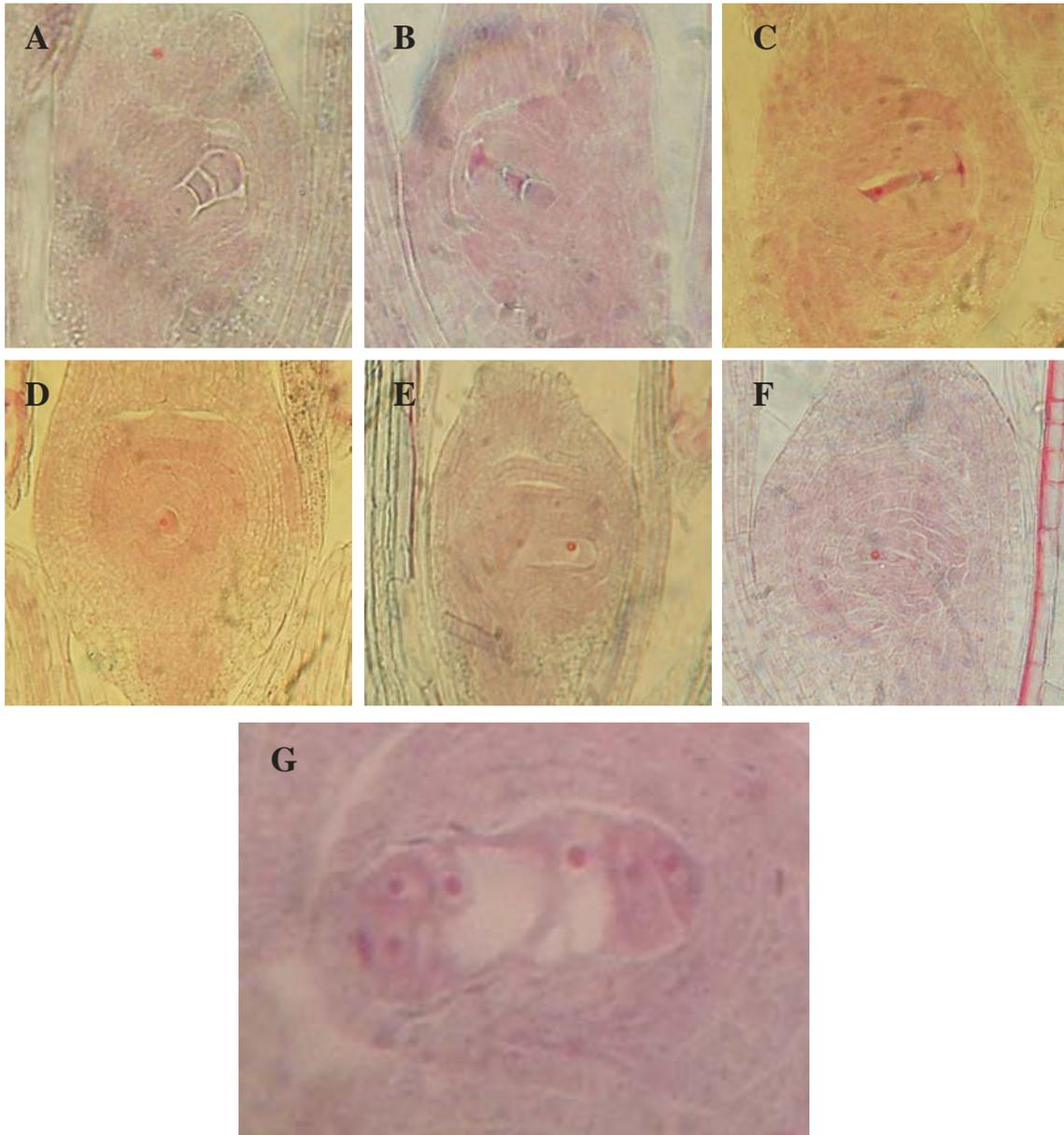


Figura 2.3. Megasporogénesis y megagametogénesis en pasto llorón (250X). **A-C.** Corte longitudinal de un ovario del genotipo sexual UNST1122. **A.** Tres células de una tétrade lineal, **B y C.** megásporas degenerantes. **D-F.** Corte longitudinal de un ovario apomíctico del cv. Tanganyika. **D.** Célula madre de la megáspora (CMM), **E y F.** Célula madre de la megáspora elongada (CMME). **G.** Corte longitudinal de un ovario del genotipo sexual UNST1122 mostrando un saco embrionario octanucleado.

En las secciones de las espiguillas apomíticas del cv. Tanganyika (Figuras 2.3D-2.3F) se presentaron estadios de CMM (Figuras 2.3D) y CMME (Figuras 2.3E y 2.3F). También se vieron arqueosporas, sacos binucleados (2N) y tetranucleados (4N).

En la Figura 2.4 se presentan las imágenes comparativas que nos permiten diferenciar procesos sexuales y apomíticos en la megasporogénesis de pasto llorón con la tinción de azul de anilina, es decir la presencia de las megásporas reducidas producto de la meiosis (tétrade o degenerantes) y la elongación de la CMM en procesos apomíticos.

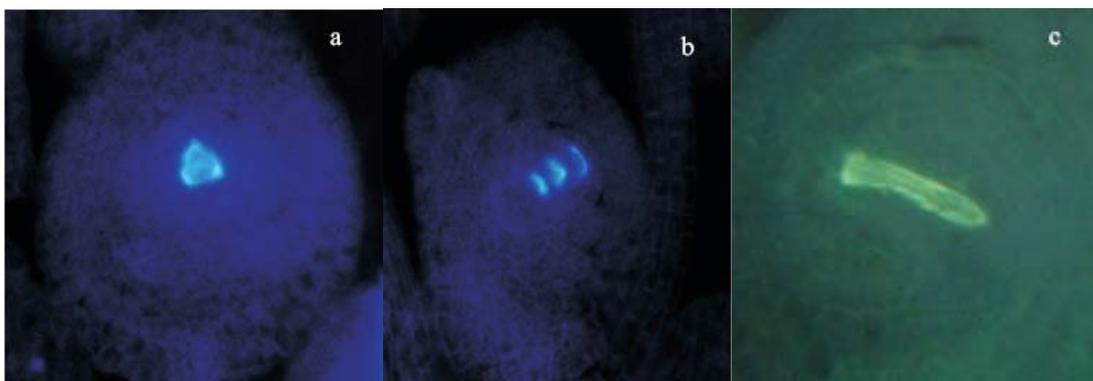


Figura 2.4. Aspectos comparativos para la diferenciación de procesos sexuales (A y B) y apomíticos (C) en pasto llorón con la tinción de azul de anilina. **A.** célula madre de la megáspora (CMM), **B.** megásporas degenerantes, **C.** célula madre de la megáspora elongada (CMME) (200X).

En total se cortaron 211 espiguillas de pasto llorón del genotipo UNST1122 (planta R₀ y una planta R₁, registrada como cultivar Victoria) y de los cvs. Tanganyika, Don Juan, Don Eduardo y Don Pablo. En la Tabla 2.1 se presentan los datos referentes al número de espiguillas observadas en cada cultivar de pasto llorón discriminando la cantidad de CMM y procesos apomíticos y sexuales observados. Como proceso sexual se consideró la presencia de tétrades o de megásporas degenerantes y como proceso apomítico se consideró la ausencia de las estructuras anteriores y la presencia de CMME. Algunas formas fluorescentes observadas no pudieron catalogarse en ninguno de los grupos, por considerarse que no correspondían a las formas típicas.

Tabla 2.1. Número de espiguillas, células madre de las megásporas (CMM), procesos sexuales (PS) y apomíticos (PA) y porcentaje de apomixis observados con tinción de azul de anilina en distintos cultivares de pasto llorón.

Genotipo	N° Espiguillas	CMM	PS	PA	Total	Porcentaje apomixis
UNST1122	50	9	48	0	57	0
Victoria (F1)	26	18	35	0	53	0
Tanganyika	43	2	0	32	34	100
Don Juan	31	0	0	14	14	100
Don Eduardo	38	0	0	17	17	100
Don Pablo	23	0	0	3	3	100
Total	211	29	83	66	178	

Nuestros resultados permiten afirmar, sin lugar a dudas, que se deposita calosa en la célula madre de la megáspora (CMM) y se mantiene hasta los primeros estadios de saco embrionario en plantas diplospóricas de distintos cultivares de pasto llorón, lo que contradice trabajos previos informados en esta especie y en otras especies diplospóricas (Peel *et al.*, 1997).

Carman *et al.* (1991) informaron la ausencia de calosa en las CMM apomíticas de *Elymus rectisetus*, especie apomítica diplospórica facultativa. En un trabajo posterior Peel *et al.* (1997), del mismo grupo de trabajo del Dr. John Carman, amplían estas observaciones a ocho especies diplospóricas de *Tripsacum* e incluyen al pasto llorón cv. Morpa. Otros autores tampoco encuentran calosa en la pared de CMM de especies diplospóricas, como Naumova *et al.* (1993) en *Poa nemoralis* y Leblanc *et al.* (1995c) en especies del género *Tripsacum* (grupo de trabajo del Dr. John Carman). Con esta información, Peel *et al.* (1997), sugieren que todas las CMM diplospóricas (tipos *Antennaria*, *Eragrostis*, *Taraxacum* e *Ixeris*) carecen de calosa.

En el trabajo de Peel *et al.* (1997), se informa que la calosa estaba ausente en 88 de 89 pistilos de pasto llorón cv. Morpa estudiados y las fotografías muestran la ausencia de fluorescencia en la megasporogénesis. La única fluorescencia observada se restringía a la pared de la CMM más cercana al micrópilo. Este patrón de deposición de calosa es el que mencionara Carman *et al.* (1991) en pistilos diplospóricos de *Elymus rectisetus* (Carman *et al.*, 1991). La fluorescencia de calosa que ellos observan en los procesos sexuales fue la típicamente observada en otras especies sexuales.

En los procesos apospóricos en general la deposición de calosa es irregular y al encontrarse en el mismo óvulo procesos sexuales con presencia de calosa, a veces es difícil definir si la calosa pertenece a la CMM sexual o a las iniciales apospóricas. La limitación frecuentemente observada en la deposición de calosa en la pared del meiocito cercano al micrópilo en el apospórico *Poa pratensis* esta relacionada con la iniciación temprana del desarrollo del saco embrionario (Naumova *et al.*, 1993). Resultados similares fueron observados en los apospóricos *Panicum maximum* (Naumova y Willemse, 1995), *Pennisetum squamulatum* y *Pennisetum ciliare* (Peel *et al.*, 1997).

En los procesos sexuales típicos (tipo *Polygonum*), la pared de la megáspora y del megagametofito aumentan de grosor durante todo su desarrollo. Medina *et al.* (1981) adjudican a este proceso una función principal: aislar los tejidos germinales de los vegetativos (nucela). Los dos principales cambios en este proceso son el progresivo engrosamiento de la pared y la desaparición de los plasmodesmos. El primero quizás sea el responsable del segundo. Otros autores (Peel *et al.*, 1997) también toman esta barrera física impuesta por la calosa como un requisito fundamental para el desarrollo de procesos sexuales, ya que la falta de calosa permitiría el paso hacia la CMM de señales de la nucela que la conducirían al desarrollo de procesos mitóticos, que es lo que sucede en la diplosporía. Nuestros datos no concordarían con esta hipótesis, ya que la presencia de calosa igual permite la iniciación de procesos mitóticos. Podemos suponer que en el pasto llorón, que presenta reproducción diplospórica, la señal o las señales para el inicio de la formación del saco embrionario ya estarían en la CMM, o bien serían provistas por la misma, ya que la calosa, que la aísla de su entorno e impide que reciba señales desde la nucela, se llega a depositar en muchos casos sobre las paredes de estas células y se mantiene acompañando su elongación.

Análisis genéticos de plantas sexuales han demostrado que los eventos que guían a la formación del gametofito femenino y al desarrollo de la semilla son ambos independientes e interdependientes de eventos y señales de los tejidos del esporofito que lo rodean. En cambio no se conoce claramente si esta relación existe en los procesos apomícticos (Koltunow y Grossniklaus, 2003).

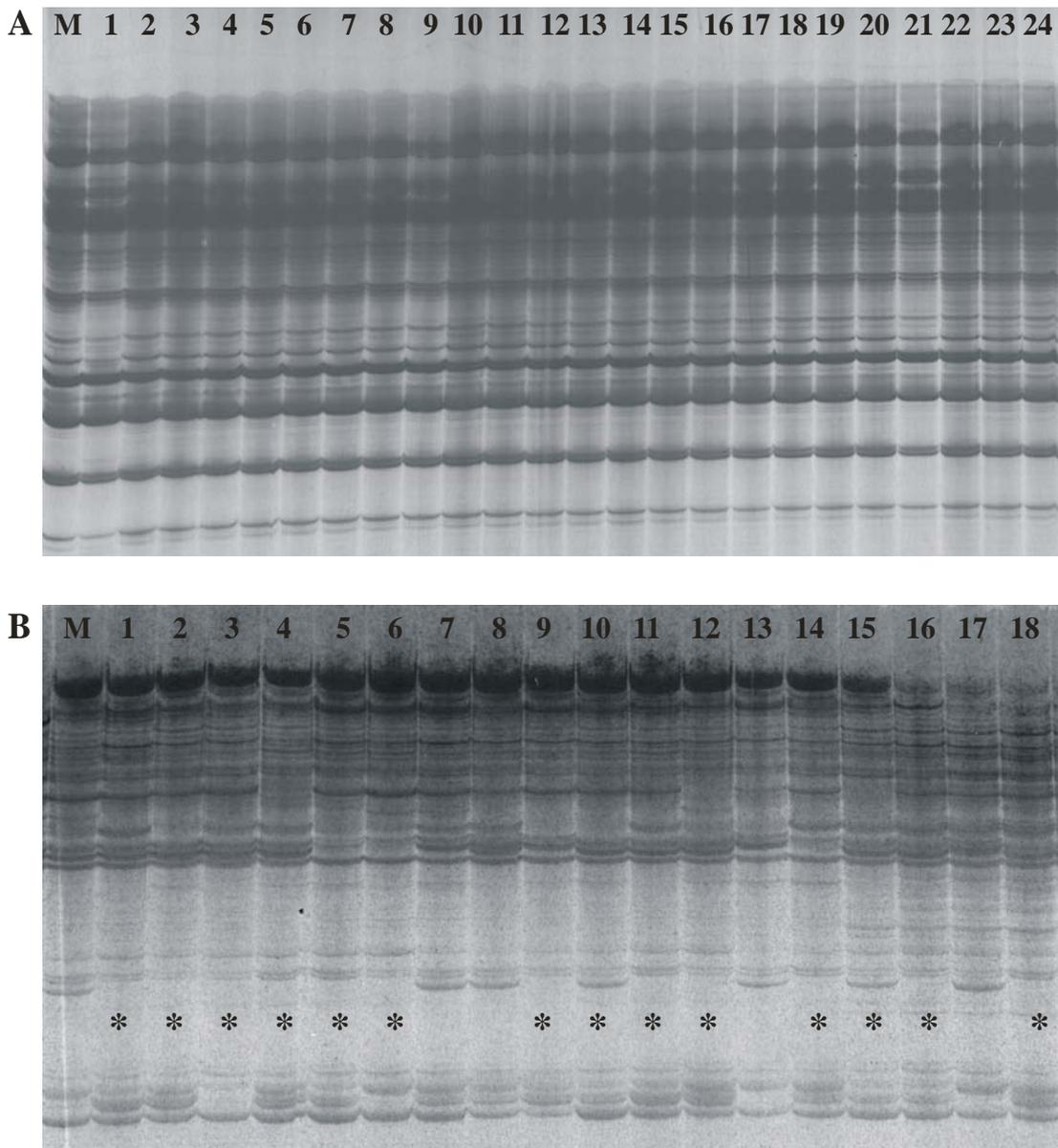
Algunos trabajos relacionan la presencia o ausencia de calosa a la actividad de la enzima β -1,3-glucanasa, también llamada calasa y que es la responsable de la

degradación de la calosa (Tucker *et al.*, 2001). Peel *et al.* (1997) hipotetizan que la reducción o ausencia de calosa en las paredes de la CMM de especies diplospóricas puede deberse a la superposición temprana del programa de desarrollo del saco embrionario (la síntesis de la β -1,3-glucanasa) con el programa meiótico de la síntesis de calosa. Sin embargo, Tucker *et al.* (2001), trabajando con genotipos sexuales y apomícticos apospóricos de *Hieracium*, no encuentran cambios en la localización espacial y temporal de transcritos de β -1-3-glucanasa, lo cual no sustenta la hipótesis anterior.

Los resultados no sustentarían la hipótesis acerca de un potencial rol diferencial de la calosa entre los procesos sexual y apomíctico, dado que se comprobó fehacientemente que este β -glucano se deposita en numerosos genotipos que presentan los dos modos reproductivos. Lo que sí puede observarse es un patrón diferencial de deposición en los genotipos sexuales y apomícticos, lo cual hace a esta técnica muy atractiva para la caracterización de plantas por su modo reproductivo en los diferentes cultivares de pasto llorón.

Pruebas de progenie

Los patrones de amplificación de RAPDs de las progenies de plantas sexuales y apomícticas de pasto llorón corroboraron lo esperado, es decir la ausencia de polimorfismos entre el patrón materno y el de las progenies en las plantas apomícticas y la presencia de polimorfismos entre el patrón materno y el de las progenies en la planta sexual. En este último caso también se observó variación en el patrón de bandas entre plantas de la progenie y la cantidad de polimorfismos fue variable con los distintos *primers* utilizados. Toda la progenie de la planta sexual UNST1122 presentó algún polimorfismo con respecto al patrón materno, por lo que fue considerada 100% producto de reproducción sexual. En la Figuras 2.5A y 2.5B se muestran los patrones típicos para progenies de plantas apomícticas y sexual, respectivamente, obtenidos en geles de poliacrilamida.



Figuras 2.5. Pruebas de progenie con marcadores RAPDs en geles de poliacrilamida de **A.** un cv. apomítico de pasto llorón (cv. Morpa) con el *primer* 211 y **B.** del genotipo diploide sexual UNST1122 con el *primer* 222. En primer lugar se observa el patrón materno (M) y luego su progenie. Con asteriscos (*) se indican los patrones polimorfismos con respecto al materno.

Conclusiones

De las tres técnicas evaluadas para el estudio del modo reproductivo en pasto llorón, las pruebas de progenie con marcadores moleculares y la citoembriología mostraron ser adecuadas para el análisis del modo reproductivo, permitiendo categorizar a las plantas en sexuales o apomíticas con mínimas probabilidades de error. Las pruebas de

progenie utilizando marcadores moleculares y el patrón de deposición de calosa simplifican el análisis y agilizan el proceso de caracterización fenotípica en poblaciones de mapeo segregantes para el modo reproductivo. No obstante ello, la única forma de corroborar estos análisis y demostrar fehacientemente el modo reproductivo son los estudios citoembriológicos. Con citometría de flujo se confirmó que la relación de ploidías entre embrión/endosperma en la semilla no se modifica en los procesos apomícticos con respecto a los sexuales, por lo que esta técnica no serviría para la caracterización del modo reproductivo.

Con respecto a la citoembriología, la incorporación de la tinción de calosa permite disminuir el tiempo en la preparación del material, pero sobre todo agiliza la observación de las muestras, ya que sólo se observan las zonas teñidas que corresponden básicamente al óvulo y a los granos de polen. Los controles llevados a cabo con safranina-fast green demostraron que las pruebas de deposición de calosa permiten identificar las mismas formas de la megasporogénesis y distinguir entre un proceso apomíctico y otro sexual. Además estas pruebas lo hacen de un modo más rápido y sencillo que la metodología de tinción convencional.

La observación de calosa en la megasporogénesis de plantas apomícticas cuestiona observaciones realizadas previamente. Esto demostraría que no es la ausencia de calosa la que determina el pasaje de una señal desde las células de la nucela para desencadenar el proceso apomíctico.

Capítulo 3

Estudios preliminares tendientes a la obtención de una población de mapeo para la región determinante de la apomixis en *Eragrostis curvula*

Ventajas y particularidades del modelo *Eragrostis* en relación al control de la apomixis

El tipo de apomixis diplospórica que se presenta en el pasto llorón es considerado característico del género *Eragrostis* (Crane, 2001). La apomixis tipo *Eragrostis* se distingue por la ausencia de estadios meióticos. Luego de dos rondas de mitosis que experimenta el megasporocito se forma un saco embrionario tetranucleado con una ovocélula, dos sinérgidas y un núcleo polar, todos no reducidos. La descripción original incluye sacos bipolares con más de cuatro núcleos, por lo que inicialmente se la consideró como una variación de la apomixis de tipo *Antennaria* (Streetman, 1963).

Otra particularidad del modelo *Eragrostis* es que al poseer un núcleo polar no reducido en el saco embrionario y presentar pseudogamia (unión de un núcleo espermático con el núcleo polar), la relación de ploidías entre el embrión y el endosperma es exactamente la misma, tanto en procesos sexuales como apomícticos (relación embrión/endosperma $2x/3x$).

Este último aspecto es muy importante, ya que cuando se plantea la transferencia de la apomixis a cultivos de interés, por transformación o por cruzamiento, hay que considerar que muchas especies no toleran desequilibrios en la relación embrión/endosperma. Los cereales, que serían los blancos más adecuados en este sentido, son sumamente sensibles a cambios en la misma. Generalmente en otros tipos de apomixis esta relación se altera, ya que en los sacos embrionarios hay dos núcleos polares no reducidos y al producirse la pseudogamia el endosperma queda con un nivel pentaploide, es decir $5x$ (relación embrión/endosperma $2x/5x$).

Aunque tanto en monocotiledóneas como en dicotiledóneas el esporofito puede desarrollarse sin la contribución del genoma de uno de los progenitores, para la formación con éxito del endosperma se requiere, en la mayoría de los casos, de los dos genomas. No obstante, no todos los genes de ambos parentales se encuentran activos durante el desarrollo, ya que se produce un silenciamiento selectivo de algunos genes paternos y otros maternos. Este proceso de silenciamiento se denomina “*imprinting*” y es controlado por metilación de citosinas (Grossniklaus *et al.*, 2001). Con cruzamientos

entre parentales de distinta ploidía fue posible observar las perturbaciones que se producen en el desarrollo del endosperma por desbalances cromosómicos. La evidencia más importante en relación al requerimiento de los genomas materno y paterno en una proporción adecuada proviene del maíz, especie en la cual si la relación entre los genomas es distinta de 2/1 (materno/paterno) el endosperma no se desarrolla (Alleman y Doctor, 2000). En *Arabidopsis* la situación es algo diferente, ya que se toleran algunos desbalances. Por ejemplo, el cruzamiento entre plantas diploides y tetraploides produce semilla viable, aunque también aparece un porcentaje de semilla anormal. Con un exceso del genoma materno (4/1 materno/paterno en el endosperma) se reduce el tamaño de la semilla. Con un exceso del genoma paterno (2/2 materno/paterno), se producen semillas de mayor tamaño (Scott *et al.*, 1998).

Considerando los modelos de desarrollo apomítico conocidos, las ventajas mencionadas anteriormente posicionan al tipo *Eragrostis* como un excelente candidato para la transferencia del carácter a especies de interés agronómico. El mapeo genético del/los genes disparadores de la diplosporía en *Eragrostis* constituye la primera etapa obligatoria para el clonado posicional de los mismos y el posterior control de su expresión en especies de gran cultivo. Por eso el objetivo inicial de esta parte del trabajo de tesis consistió en realizar un mapa genético de la especie donde se pudieran ubicar las regiones que controlan la diplosporía.

Herencia de la apomixis en pasto llorón

Como se ha mencionado previamente, existen en la naturaleza genotipos diploides de pasto llorón (Voigt, 1971). Este autor informa la existencia de reproducción sexual en tres accesiones diploides de pasto llorón colectadas en distintos lugares de Sudáfrica. Actualmente el USDA (United States Department of Agronomy) posee en su colección de germoplasma de *E. curvula* las siguientes accesiones sexuales:

PI208214: Diploide. Colectado en Sudáfrica. En el valle del río Fish al noroeste de Grahamstown.

PI299919: Diploide. Colectado en Sudáfrica. Glen Agricultural College, Glen (1400 metros de altura)

PI299920: Diploide. Colectado en Sudáfrica. Glen Agricultural College, Glen (1400 metros de altura)

PI299928: Diploide. Colectado en Sudáfrica. Diez kilómetros al norte de Middelburg (1430 metros de altura)

PI559907: Diploide. Derivada de cruces de polinización abierta entre colecciones de Vorster (459, 467 y 469), Sudáfrica.

PI299929: Tetraploide. Colectado en Sudáfrica. Grootfontein Agricultural College, Middelburg.

PI574506: Tetraploide. Material desarrollado por mejoramiento en Texas, Estados Unidos.

En 1970 Vorster y Liebenberg describieron materiales sudafricanos con números cromosómicos entre $2n=2x=20$ a $2n=8x=80$ ($x=10$). En relación a los diploides, fueron colectados en una localidad específica de Sudáfrica. Todos los intentos posteriores de colectar diploides en la zona no fueron exitosos (Prof. Johan Spies, Voorsitter Department Genetika, Universiteit van die Vrystaat, Sudáfrica, 2008, comunicación personal)

En las poblaciones tetraploides de Sudáfrica se encontraron las mayores diferencias en el modo reproductivo, habiendo materiales completamente sexuales, facultativos y apomícticos obligados. Con respecto a los de mayor ploidía, se hallaron algunos materiales facultativos en los hexaploides (Prof. Johan Spies, comunicación personal). Según comentarios del Prof. Spies, muchas gramíneas sudafricanas se reproducen sexualmente, incluso con niveles de ploidía elevados. Aproximadamente el 82% de estas gramíneas son poliploides y alrededor del 40% muestra algún grado de apomixis.

Entre 1965-80, en el Laboratorio de Suelos y Aguas de Grassland (USDA, ARS, Temple, Texas, EEUU) Voigt y colaboradores realizaron estudios tendientes a dilucidar el control genético de la apomixis en pasto llorón (Voigt y Bashaw, 1972; Voigt y Burson, 1992). Estos investigadores realizaron cruzamientos entre plantas tetraploides sexuales y apomícticas. La evaluación del modo reproductivo fue realizada a través de dos tipos de análisis: pruebas de progenie de plantas espaciadas a 1 m en parcelas a campo (evaluación de variabilidad en caracteres morfológicos) y por análisis citológico de la megasporogenesis y desarrollo del saco embrionario. En las pruebas de progenie

se analizaron de 12 a 15 progenies de cada planta y se midió: el tamaño y la altura de la planta, ancho y color de la hoja, número de cañas floríferas y tipo de ramificación de las inflorescencias. En estas pruebas, los híbridos eran clasificados como apomícticos si la progenie contenía un 30% o menos de plantas fuera de tipo, como sexuales si la progenie presentaba un fenotipo no uniforme o como intermedios cuando unas pocas plantas de la progenie eran uniformes. En el análisis citológico, los híbridos se consideraron apomícticos, intermedios o sexuales cuando 0-25%, 26-75% o 76-100% de los sacos embrionarios analizados eran sexuales, respectivamente. El estudio de la progenie (150 individuos) dio como resultado 57 plantas apomícticas, 11 intermedias y 84 sexuales. Esto representa una proporción apomíctico/sexual de 1/1,4. Estos autores observan que cuando el grado de sexualidad es bajo, las pruebas de progenie suelen dar resultados equívocos. Por esta razón en un estudio posterior (Poverene y Voigt, 1995) se evaluó el uso de isoenzimas para estudiar el modo reproductivo trabajando con individuos previamente caracterizados para el carácter y obtuvieron buenas correlaciones entre las pruebas de isoenzimas y la caracterización por citoembriología y morfología.

En 1992 Voigt y Burson proponen un modelo genético simple para la herencia de la apomixis en el pasto llorón, donde la apomixis es dominante sobre la sexualidad y es controlada por un solo gen. Éste análisis asume que la sexualidad es el modo básico de reproducción y que la apomixis es derivada y puede suprimir, pero no eliminar la sexualidad. Teniendo esto en cuenta, aquellas plantas que demuestran tener algún grado de reproducción apomíctica, aunque sea bajo, deberían considerarse apomícticas en el análisis anterior, ya que tienen el potencial para expresar el carácter. El análisis anterior asume la presencia adicional de otros genes que controlan el nivel de expresión de la apomixis en plantas que contienen el gen determinante del carácter.

Ante esta situación se puede replantear la proporción apomíctico/sexual 1/1,4 presentada por Voigt y Bashaw (1972) y Voigt y Burson (1992), ya que si una planta posee aunque sea un saco embrionario apomíctico debe ser considerada apomíctica, ya que tendría la región determinante del carácter. Re-analizando los datos de Voigt *et al.* en virtud de esta consideración (57 plantas apomícticas, 11 intermedias y 84 sexuales) y las observaciones de Poverene y Voigt (1995) donde de las plantas sexuales que ellos analizan, un 66% presentan sólo procesos sexuales se puede reagrupar la progenie de la

siguiente manera: 56 plantas sexuales y 96 plantas apomícticas. Estos valores cambian la relación antes planteada (1/1,4) a una proporción apomíctico/sexual de 1,7/1. Si bien esto se discutirá más ampliamente en la sección resultados y discusión, esta relación no se aproximaría a la proporción 1/1 esperada según la hipótesis de un gen con dos alelos, siendo dominante la apomixis sobre la sexualidad, sino más bien a la presencia de dos genes con efecto epistático que dan una proporción 9/7.

Stalker y Wright (1975) y Busey y Wright (1978) informan la utilización de un material tetraploide sexual obtenido por duplicación con colchicina donde en cruces con un tetraploide apomíctico (cv. Catalina, tipo conferta) produce un 100% de progenie sexual. Estos autores postulan en relación a estos resultados que la sexualidad es dominante sobre la apomixis. Este trabajo fue cuestionado por Voigt y Burson (1992), argumentando la falta de pruebas que demuestren la naturaleza híbrida de la progenie además de no aportar información acerca de la forma en que se determinó el modo reproductivo. Por lo expuesto, puede considerarse que los estudios del grupo de Voigt son la fuente más confiable con la que se cuenta actualmente acerca de la herencia de la apomixis en pasto llorón.

Voigt *et al.* (1992) también estudiaron la megasporogénesis en *E. lehmanniana*, especie muy relacionada al complejo *E. curvula*. Aunque esta especie es apomíctica se encontró un diploide natural sexual, en el cual se halló un óvulo conteniendo una célula madre de la megáspora muy elongada, típica de procesos apomícticos. Existen otras evidencias acerca de la presencia de procesos apomícticos en diploides. Las especies del género *Boechera* se reproducen por apomixis a nivel 2x (Kantama *et al.*, 2007) y en diploides de *Paspalum rufum* se demostró la presencia de sacos apomícticos funcionales que generan progenies maternas, aunque en baja proporción (Siena *et al.*, 2008). La ocurrencia de tasas muy bajas de apomixis a nivel diploide podrían explicar la generación ocasional de nuevos poliploides apomícticos por hibridización $2n + n$ ó $2n + 2n$ (este último caso cuando existen poblaciones simpátricas de 2x y 4x) (Daurelio *et al.*, 2004; Siena *et al.*, 2008).

En función de todo lo expuesto, el objetivo inicial de esta sección de la tesis fue, en primer lugar, estudiar la herencia de la apomixis en pasto llorón a través de cruzamientos entre materiales que difieren en su modo reproductivo y en segundo lugar,

mapear el locus o loci que gobierna/n el carácter. Para ello se realizaron cruzamientos entre los materiales sexuales obtenidos por nuestro grupo de trabajo (ver Introducción) con plantas de cultivares fuertemente apomícticos. La idea original era clasificar a los individuos de la progenie según el modo de reproducción para iniciar el mapeo. Sin embargo, como se indicará en la sección Resultados, se manifestó una situación inesperada: gran parte de la progenie generada en la crucea presentó perfiles genéticos maternos, característicos de la reproducción apomíctica. Esto indicaba que el progenitor femenino clasificado en el verano del 2003 como “altamente sexual”, presentaba ahora una expresión mucho menor de la sexualidad. Este capítulo está destinado a informar nuestros intentos de establecer una progenie segregante para el modo reproductivo, la determinación del nivel de expresión de la sexualidad en los posibles progenitores femeninos disponibles y las conclusiones a las que se arribó luego de estos experimentos.

Hipótesis

El cruzamiento entre progenitores contrastantes para el modo reproductivo permitirá la obtención de una población segregante a partir de la cual se podrá construir un mapa genético donde localizar la/s región/es relacionadas con la apomixis.

Objetivo

Los objetivos del presente capítulo fueron: 1) realizar cruzamientos utilizando como madres los genotipos sexuales UNST1131 y UNST1112 y como donantes de polen individuos de los cvs. Morpa y/o Ermelo; 2) analizar en las progenies la segregación de marcadores que resultaran polimórficos entre los parentales; 3) analizar el modo reproductivo en esta progenie y 4) construir un mapa genético donde localizar regiones genómicas asociadas a la apomixis.

Materiales y Métodos

Material vegetal

Para establecer una población segregante para el modo reproductivo debe utilizarse siempre un parental femenino completamente sexual y un donante de polen apomítico. Como se explicó en el capítulo 1, para los cruzamientos se buscaron los parentales que presentaran mayor nivel de polimorfismos entre ellos. Las dos plantas utilizadas como madres (plantas UNST1131 y UNST1112, clasificadas como altamente sexuales por Cardone *et al.*, 2006) mostraron ser muy similares entre sí y con el cultivar que les dio origen, Tanganyika. Por lo tanto se utilizaron como donantes de polen en los cruzamientos los cvs. apomíticos Morpa y Ermelo, los cuales presentan un buen nivel de polimorfismos con Tanganyika.

Una vez seleccionados los parentales pistilados y los donantes de polen se realizaron las cruces en invernáculo colocando una panoja del progenitor femenino en un sobre de papel junto con 1-3 panojas del progenitor masculino. A fin de evitar cruzamientos no deseados, las panojas se mantuvieron ensobradas durante aproximadamente 20 días, ya que la floración es muy prolongada en el tiempo. Luego de ese periodo se retiraron los sobres para evitar la proliferación de hongos sobre las semillas y se marcaron las panojas. Cuando se consideró que las semillas ya estaban totalmente formadas, alrededor de un mes luego del inicio de la antesis, se cosecharon. Las semillas fueron trilladas, limpiadas y conservadas a 4°C, pues necesitan un periodo de frío para asegurar un alto porcentaje de germinación. Luego de dos meses a 4°C se sembraron en almácigos con tierra estéril y luego de un mes las plantas se llevaron a macetas individuales.

Extracción de ADN de la F1

Se realizaron extracciones de ADN de la F1 para obtener un perfil genético general de la misma. El ADN genómico de cada una de las plantas se extrajo utilizando el protocolo detallado en el Capítulo 1.

Caracterización genética de la F1: *primers* y condiciones de PCR

Se utilizó el mismo protocolo de RAPDs descrito en el Capítulo 1 y se utilizaron cinco *primers* para cada cruzamiento. En la Tabla 3.1 se presentan las secuencias de los mismos. Se compararon los patrones de RAPDs de parentales y progenies y se analizaron los posibles polimorfismos.

Tabla 3.1. *Primers* utilizados. La secuencia esta representada en dirección 5' a 3' (Serie NAPS de *primers* standard)

Nombre	Secuencia
211	GAA GCG CGA T
222	AAG CCT CCC C
225	CGA CTC ACA G
237	CGA CCA GAG C
244	CAG CCA ACC G

Análisis citoembriológicos en los posibles progenitores femeninos

Se colectaron y fijaron panojas de las plantas UNST1112 y UNST1131 en el estadio óptimo para la observación de procesos sexuales y apomícticos de acuerdo a lo descrito en el Capítulo 2. Estas panojas luego fueron incluidas y los cortes seriados fueron teñidos con azul de anilina y con safranina- fast green (ver detalles en Capítulo 2).

Resultados y Discusión

Cruzamientos

En la Tabla 3.2 se listan los cruzamientos realizados con el detalle del número de individuos obtenidos de cada uno de ellos. Problemas relacionados con la sincronización de la floración impidieron la obtención de un mayor número de individuos y de cruzamientos. Las plantas de la progenie en el invernáculo no presentaban, a simple vista, grandes variaciones en su morfología. Estos cruzamientos fueron realizados en el verano del año 2007. Desde el verano del 2005 se intentó realizar varias cruza sin éxito debido a la dificultad de las plantas para florecer en el

invernáculo del CERZOS, quizás debido a la falta de temperaturas extremas (altas o bajas).

Tabla 3.2. Cruzamientos realizados y poblaciones obtenidas.

♀	♂	Morpa	Ermelo
UNST1112		15	-
UNST1131		7	109

Análisis genético de la F₁

Dado que las plantas con reproducción apomíctica son en general altamente heterocigotas, en la F₁ se esperaba observar polimorfismos segregantes provenientes de ambos parentales.

Antes de iniciar la clasificación de la F₁ por modo reproductivo, se caracterizaron las poblaciones obtenidas de los cruzamientos en relación a los parentales utilizando RAPDs. Sorprendentemente, este estudio demostró la casi ausencia de variabilidad en la progenie y una elevada similitud con el progenitor femenino (Tabla 3.3). Es decir que las poblaciones obtenidas de los cruzamientos eran genéticamente muy homogéneas. En la Figura 3.1A se muestran los patrones de RAPDs en gel de poliacrilamida de individuos obtenidas del cruzamiento entre UNST1131 X Ermelo.

Tabla 3.3. Cantidad de individuos que presentaron polimorfismos con respecto al patrón materno con los distintos *primers* de RAPDs

<i>Primer</i>	Cantidad de individuos con polimorfismos
211	12
222	2
225	7
237	9
244	4

En la Tabla 3.4 se indica el número de plantas examinadas y aquellas que presentaron patrones de RAPDs polimórficos en relación al patrón materno, expresado como porcentaje de polimorfismos. En promedio se registró un 20% de polimorfismos (18% en las progenies obtenidas de la planta UNST1131 y 20% para la progenie obtenida de

UNST1112). Los porcentajes fluctuaron entre el 5 y el 33%, al considerar progenies provenientes de panojas individuales.

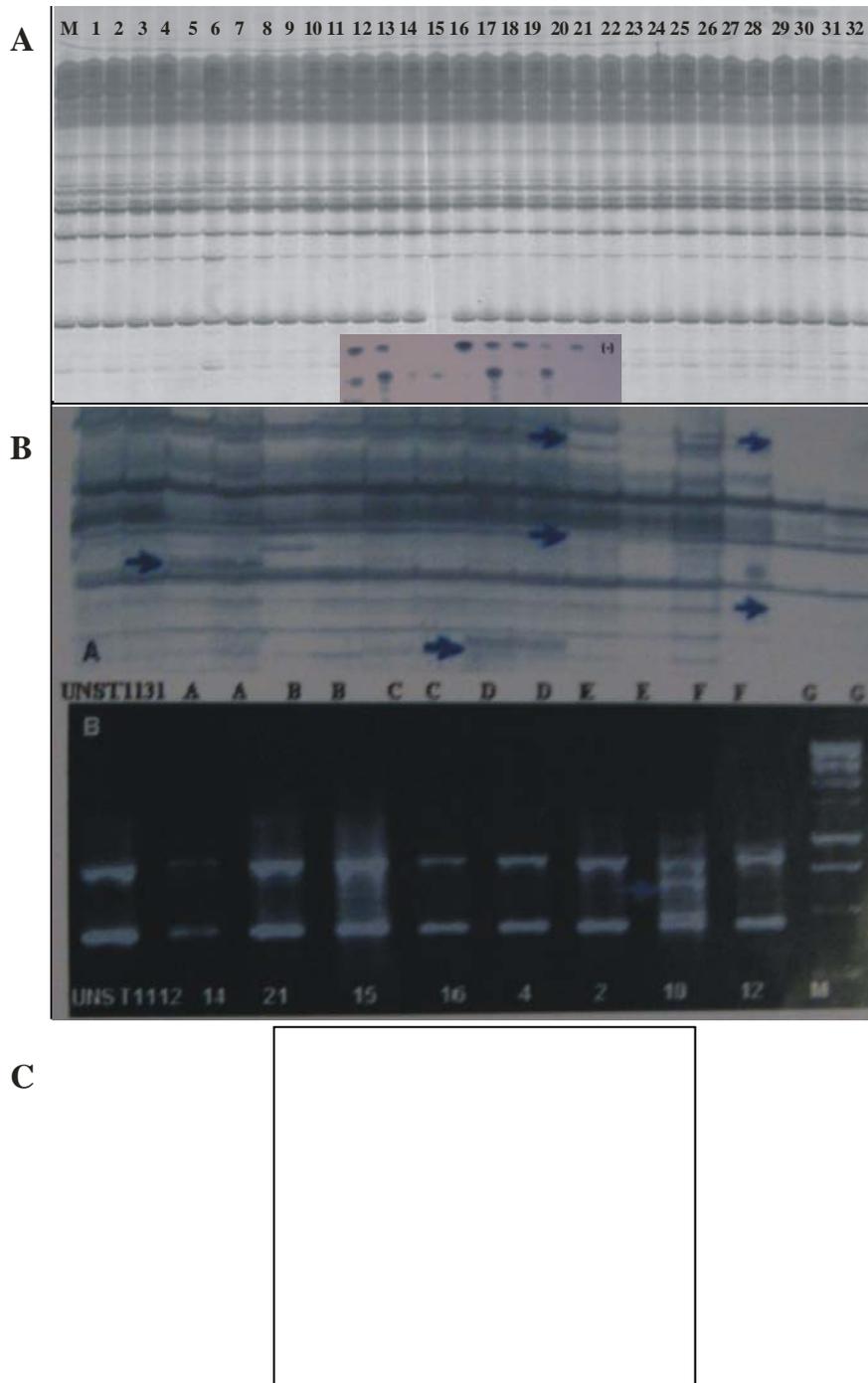


Figura 3.1. Pruebas de progenie. **A.** Patrones actuales de RAPDs en gel de poliacrilamida de descendientes de UNST1131 obtenidos con el *primer* 244. La flecha indica el único polimorfismo observado. **B.** Patrones de RAPDs de progenies de las plantas UNST1131 (A) y UNST1112 (B) obtenidos en el año 2003. Las flechas señalan polimorfismos presentes en la progenie con respecto al progenitor femenino. **C.** Patrones isoenzimáticos de malato dehidrogenasas (A) y peroxidasas (B) de ocho individuos de la progenie de la planta UNST1112 (obtenidos en el año 2003). En todos los geles, la primera calle corresponde a la planta madre y luego a individuos de la progenie.

Tabla 3.4. Número de individuos analizados y número y porcentaje que presentaron polimorfismos con marcadores RAPDs en las pruebas de progenie.

Progenitor femenino	Número de individuos	Número individuos polimórficos	%Polimórficos
UNST1131	99	18	18
UNST1112	15	3	20

La primera observación que surge al analizar estos resultados y compararlos con aquellos obtenidos en el año 2003 (Tabla I.5, Introducción; Cardone *et al.*, 2006) utilizando las mismas plantas UNST1112 y UNST1131 como progenitor femenino (incluso utilizando algunos de los mismos *primers* que se utilizaron en aquella oportunidad), es que el nivel actual de polimorfismos es notablemente inferior (100% en el 2003 vs. 18-20% en el 2007).

Esta situación inesperada llevó a reconsiderar los resultados anteriores, tratando de explicar esta observación. Las plantas utilizadas como madres en estos cruzamientos habían sido obtenidas por duplicación de un somaclon diploide sexual. Estas plantas colchiploides fueron consideradas altamente sexuales, aunque no se descartó la ocurrencia de apomixis en una tasa baja (Cardone *et al.*, 2006). En el año 2003 no se realizó un estudio de sacos embrionarios debido a que la experiencia del grupo de trabajo era limitada en esta técnica y a que otros autores indicaban que las pruebas de progenie con marcadores moleculares eran muy adecuadas y precisas para la clasificación del modo de reproducción de otras forrajeras apomícticas (Ortiz *et al.*, 1997; Arnholdt-Schmitt, 2000; Casa *et al.*, 2002). Por ello en ese momento las plantas se analizaron con marcadores de RAPDs e isoenzimas. Con ambos tipos de marcadores se encontró un elevado número de polimorfismos en relación al patrón materno, indicativo de reproducción sexual. Como ejemplo de la variación observada en el año 2003 se incluyen aquí fotografías cedidas gentilmente por el Lic. Martín Mecchia y la Dra. Susana Cardone, quienes realizaron las pruebas de progenie con marcadores RAPDs e isoenzimas, respectivamente. Los estudios de RAPD formaron parte de los estudios de la tesina de grado de Mecchia en la Universidad Nacional de Rosario (Figura 3.1B) (Mecchia *et al.*, 2006) y los de isoenzimas de la tesis de Doctorado de Cardone en la Universidad Nacional del Sur (Figura 3.1C) (Cardone, 2006).

Una de las plantas analizadas en ese momento, planta H10 (ver Tabla I.5, Introducción), progenie proveniente de la planta UNST1112 (polinización libre) mostró un elevadísimo nivel de polimorfismos respecto a la planta madre. Durante el examen del número cromosómico que se hizo sobre la totalidad de las progenies resultó ser hexaploide ($2n=6x=60$) (Susana Cardone, comunicación personal). Esta observación aportaría información adicional para sustentar la hipótesis de que dichas plantas colchípoides, si bien expresarían la sexualidad en un alto grado, podrían formar eventualmente algún saco no reducido, o sea, deberían ser clasificadas como apomícticas, puesto que esta planta hexaploide podría tratarse de un híbrido BIII. La formación de híbridos BIII es característica de plantas que presentan algún nivel de reproducción apomíctica (Berthaud, 2001) y proviene de la unión de un gameto femenino no reducido (en este caso $4x$) con un grano de polen reducido (en este caso $2x$) de otra planta tetraploide.

Ante las evidentes diferencias en las pruebas de progenie realizadas en los años 2003 y 2007, se procedió a realizar estudios citoembriológicos, de manera de confirmar el modo reproductivo de estas plantas y de otros materiales vegetales disponibles en el invernadero del CERZOS-UNS. De esta manera también se podría determinar fehacientemente si la correlación obtenida en otras especies en relación a pruebas de progenie con marcadores y citoembriología también era aplicable a *Eragrostis*.

En la Tabla 3.5 se presentan los datos obtenidos del estudio citoembriológico de espiguillas colectadas en la primavera del año 2007.

Los datos presentados en la Tabla 3.5 son contundentes y permiten arribar a dos conclusiones. En primer lugar, las pruebas de progenie con marcadores moleculares y los estudios citoembriológicos son coincidentes, indicando que las plantas en el año 2007 presentan entre 10 - 20% de reproducción sexual. En segundo lugar, los resultados permiten inferir que en el año 2003 las plantas tenían un porcentaje de sexualidad más elevado que el actual. Nótese en la Tabla 3.5, que las únicas plantas que presentan sacos sexuales y apomícticos en la misma panoja son las dos tetraploides obtenidas con colchicina.

Tabla 3.5. Análisis citoembriológico de espiguillas de distintos genotipos de pasto llorón. CMM: célula madre de la megáspora, PS: procesos sexuales, PA: procesos apomícticos.

Genotipo	Ploidía	Número de espiguillas	CMM	PS	PA	% sex	Total de óvulos analizados
UNST1122	2x	50	9	48	0	100	57
Victoria	2x	26	18	35	0	100	53
Tanganyika	4x	43	2	0	32	0	34
UNST1131	4x	69	19	4	46	9	69
UNST1112	4x	44	4	1	11	9	16
Don Eduardo	6x	38	0	0	17	0	17
Don Pablo	7x	23	0	0	3	0	3
Don Juan	8x	31	0	0	14	0	14

Herencia del carácter apomixis en pasto llorón

Al analizar las pruebas de progenie realizadas por Voigt *et al.* (Voigt y Bashaw, 1972; Voigt y Burson, 1992) y considerando apomícticas a todas las plantas que expresan este carácter, aunque sea en un bajo nivel, se observa que la proporción de progenie apomíctica vs sexual es de 96/56, lo que representa una proporción apomíctico/sexual de 1,7/1. Estos autores, como se especifica en la introducción de este Capítulo, clasifican a las plantas en sexuales, apomícticas e intermedias. Con esta clasificación formulan un modelo de un gen dominante regulando la expresión del carácter (proporción 1/1,4). Sin embargo, como se estableciera posteriormente (Savidan, 2000), toda planta que tenga, aunque sea un solo saco apomíctico, debe ser considerada apomíctica. En función de estas consideraciones, el modelo que mejor explica los resultados de Voigt *et al.* es de dos genes independientes con efecto epistático (proporción 9/7 si es diploide, 2/1 para un tetraploide, como es el caso del pasto llorón, ver Tabla de obtención de gametos).

Cabe recordar, como se mencionara en la Introducción, que varios trabajos actuales señalan que la apomixis podría estar especificada por dos o más loci independientes. Consideremos si un modelo de dos genes independientes dominantes con epistasis es aplicable a las observaciones realizadas en el pasto llorón. Los dos supuestos genes serán denominados: A y B. Las plantas apomícticas tendrían la constitución genética: A---B---, asumiendo que son poliploides. Todas las demás combinaciones (A---bbbb,

aaaaB--- y aaaabbbb) serían sexuales. O sea que se necesitan las dos regiones dominantes, en al menos una dosis, para que las plantas expresen la apomixis.

El producto del cruzamiento entre una madre sexual aaaabbbb y un padre apomítico AAaaBBbb daría una progenie compuesta de la siguiente manera:

Gametos del padre apomítico:

	1/6 BB	4/6 Bb	1/6 bb
1/6 AA	1/36 AABB (apo)	4/36 AABb (apo)	1/36 AAbb (sex)
4/6 Aa	4/36 AaBB (apo)	16/36 AaBb (apo)	4/36 Aabb (sex)
1/6 aa	1/36 aaBB (sex)	4/36 aaBb (sex)	1/36 aabb (sex)

El parental femenino sólo daría gametos del tipo aabb

Por lo tanto, el producto del cruzamiento sería:

1/36 AAaaBBbb (apo)	4/36 AAaaBbbb (apo)	1/36 AAaabbbb (sex)
4/36 AaaaBBbb (apo)	16/36 AaaaBbbb (apo)	4/36 Aaaaabbbb (sex)
1/36 aaaaBBbb (sex)	4/36 aaaaBbbb (sex)	1/36 aaaabbbb (sex)

La progenie presenta una proporción apomítico/sexual de 25/11, que es casi 2/1.

Estos resultados respaldarían la hipótesis de dos genes controlando la apomixis en pasto llorón. Sin embargo falta la evidencia experimental para confirmar el modelo propuesto. Actualmente se están realizando los cruzamientos para poder corroborar o no esta hipótesis.

Conclusiones

En virtud de los resultados actuales (año 2007) y los obtenidos previamente por Cardone (2006) y Mecchia *et al.* (2007) realizados en el año 2003, puede concluirse que en las plantas tetraploides UNST1112 y UNST1131 obtenidas por duplicación a partir del diploide sexual UNST1122 se alteró el grado de expresión de la apomixis. En un primer momento se observó un alto nivel de reproducción sexual (cercano al 100%, aunque no se descartó la ocurrencia de apomixis), mientras que en el actual estudio

presentan entre un 10 a 20% de reproducción sexual, analizado por pruebas de pro genie y citoembriología. Esto indicaría que la expresión de la sexualidad disminuyó con el tiempo y aumentó el nivel de apomixis en estas plantas.

Otra conclusión importante de este estudio es que el somaclón diploide, a pesar de que expresa 100% de sexualidad (nunca se observaron sacos apomícticos) porta la región responsable del carácter, ya que las plantas obtenidas por duplicación con colchicina a partir de semillas de esta planta actualmente presentan un alto grado de reproducción apomíctica. Existen otros antecedentes de cambios en la expresión del carácter apomixis, por ejemplo en respuesta al fotoperíodo (Knox, 1967; Quarín, 1986), a diferentes situaciones de estrés (Gounaris *et al.*, 1991; Davies y Cohen, 1992; Haluskova y Cellarova, 1997), al cultivo *in vitro* (Polci, 2000) y a cambios en las condiciones de cultivo (Houliston *et al.*, 2006).

El modelo de herencia propuesto por Voigt *et al.* podría modificarse teniendo en cuenta las pautas más aceptadas actualmente para la clasificación de plantas apomícticas y sexuales. Por lo tanto, se propone un nuevo modelo para el control de la apomixis en pasto llorón, donde el carácter apomixis estaría gobernado por dos loci independientes.

La siguiente etapa del trabajo de tesis tuvo como objetivo comprobar si durante el periodo 2003-2007 se produjeron alteraciones de tipo genético y/o epigenético en las plantas colchiploides, a fin de explicar la reducción en la expresión de la sexualidad. Si bien se sabe que el carácter apomixis presenta expresividad variable, como se mencionara más arriba, este caso semeja a un silenciamiento progresivo en aquellas plantas que poseen la región determinante del carácter, más que un cambio estacional. También se estudió la actividad de retrotransposones en las genotecas de *E. curvula* disponibles para estimar la posibilidad de mutaciones y reestructuraciones epigenéticas dirigidas por estos elementos, así como también se relevó detalladamente la literatura nacional e internacional en busca de antecedentes de cambios similares en plantas apomícticas. Estos resultados son analizados en el Capítulo 4.

Capítulo 4

Estudios del potencial de plasticidad genómica en plantas apomícticas facultativas

Antecedentes

Como se mencionara en el Capítulo anterior, se observó un cambio en la expresión de la sexualidad en las dos plantas tetraploides de *Eragrostis curvula* obtenidas por duplicación cromosómica utilizando colchicina en semillas de un somaclon diploide sexual. Cuatro años después de las primeras determinaciones del modo reproductivo la expresión de la sexualidad disminuyó en un 80%.

Estas observaciones concuerdan con las observaciones previas del grupo de trabajo en relación a cambios en el modo reproductivo en situaciones de estrés, diferentes de la poliploidización. Echenique (1987) encontró progenies variables en plantas sometidas a estrés osmótico inducido con soluciones de PEG 6000 en plantas en estado reproductivo. Sin embargo, no se profundizó en su evaluación, dado que no era el objetivo del trabajo. También se estudió el efecto de un periodo de sequía durante el estado reproductivo en tres cultivares de pasto llorón: Don Pablo, Don Eduardo y Tanganyika (Echenique y Polci, 1994). El estrés provocó un incremento en el porcentaje de irregularidades meióticas en la microgametogénesis y disminución en la viabilidad y tamaño del polen. Es decir que el estrés hídrico afectó las estructuras reproductivas de estas plantas, así como la meiosis y su progenie. Se observó mayor inestabilidad en todo el proceso en los cvs. Don Pablo y Don Eduardo, que exhiben mayores niveles de ploidía.

Posteriormente el grupo de trabajo de la UNS-CERZOS desarrolló protocolos de cultivo *in vitro* para diferentes cultivares de pasto llorón con el objeto de incrementar la variabilidad natural con fines de mejoramiento (Polci, 2000). Las inflorescencias manifestaron una buena capacidad de regeneración y se halló variabilidad entre las plantas obtenidas por esta vía (generación R₀) (Polci, 2000). Esta variación, denominada variación somaclonal, puede resultar de quimerismo preexistente en el tejido donante o puede ser producto de mutaciones debido al pasaje por una etapa de callo, que involucra una fuerte inestabilidad genómica (Kaepler *et al.*, 2000; Jain, 2001). Esta variación también puede tener un origen epigenético. Al analizar las progenies de estas plantas (R₀ y R₁) por isoenzimas se hallaron altos índices de variabilidad. Esto puede apreciarse en la Tabla 4.1, donde se presentan los índices de Shannon y Weaver para cuatro

cultivares donde se compara la variabilidad obtenida en la R_0 , en la R_1 (primera generación obtenida a partir de semillas de la R_0) (Polci, 2000) y en progenies naturales (datos obtenidos de Poverene, 1988).

Tabla 4.1. Índice de Shannon y Weaver para isoenzimas peroxidasas, estandarizado para cuatro cultivares de pasto llorón, generaciones R_0 y R_1 (Polci, 2000). Los datos de variabilidad natural fueron obtenidos de Poverene (1988).

Cultivar	R_0	R_1	Natural
Morpa	0,80	0,71	0,00
Tanganyika	0,86	0,84	0,00
Don Pablo	0,78	0,68	0,00
Kromdraai	0,64	0,82	0,79

Kromdraai presenta normalmente variación natural ya que es una variedad apomítica facultativa (Guzmán *et al.*, 1992). Esta variación no incrementó demasiado luego del pasaje por cultivo *in vitro*. Sin embargo, los cultivares que normalmente no presentan variación en sus progenies presentaron un elevado nivel de variación. A estos cultivares se los considera apomíticos obligados (Poverene, 1988), sin embargo no se han realizado estudios a lo largo del período de floración que indiquen estacionalidad en la expresión de la sexualidad, como ocurre en especies del género *Paspalum* (Quarín, 1986). En especies de este último género, al finalizar el período de floración se produce un pico de reproducción sexual. Los datos volcados en la Tabla 4.1 indican que los materiales tetraploides obtenidos de INTA Anguil no presentan evidencias de reproducción sexual, como se mostrara con RAPDs previamente en este trabajo de tesis (ver Capítulo 1). Sin embargo, las progenies de plantas regeneradas *in vitro* presentaron variación, la cual puede apreciarse en las Figuras 4.1 y 4.2 (tomadas de Polci, 2000), donde se muestran pruebas de pro genie con peroxidasas y RAPDs, respectivamente. Los patrones isoenzimáticos de algunas de estas plantas parecerían indicar cruzamientos entre plantas del cv. Tanganyika y de Kromdraai o Don Pablo, actuando estos últimos como polinizador/es. Aunque la pro genie (R_1) de las plantas regeneradas a partir de callos (R_0) fue variable, las progenies de algunas de estas plantas (generación R_2) fueron uniformes.

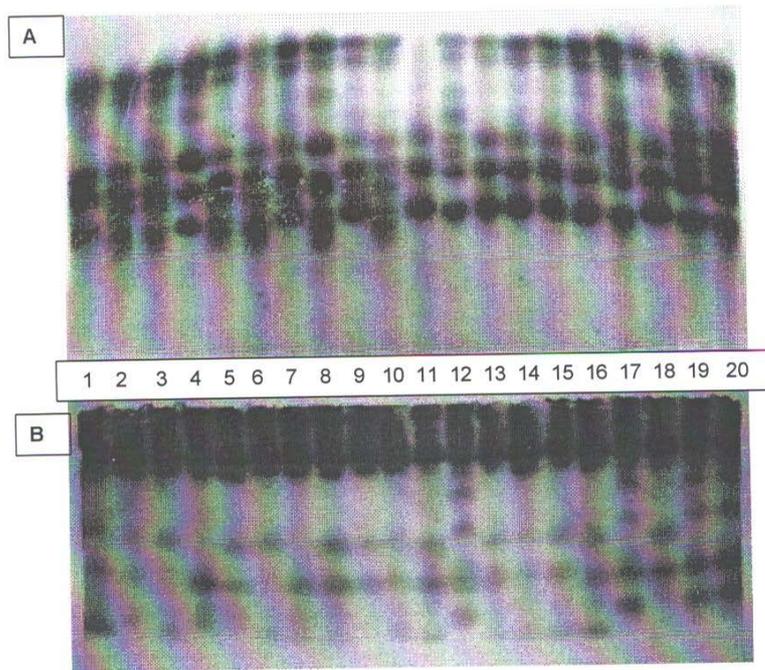


Figura 4.1. Patrones isoenzimáticos de malato deshidrogenasas (A) y peroxidasas (B) de plantas R₁ (primera generación obtenida de semillas de plantas regeneradas *in vitro*) 1: control cv. Tanganyika, 2 a 9: descendientes R₁ de planta R₀₋₁, 10:R₀₋₁, 11:R₀₋₂, 12 a 17: descendientes R₁ de planta R₀₋₂, 18: control cv. Tanganyika, 19 y 20: control cv. Don Pablo (Tomado de Polci, 2000).

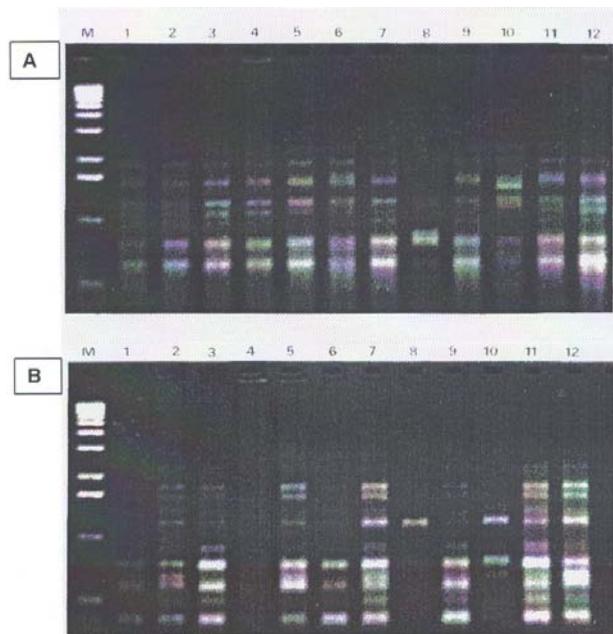


Figura 4.2. Patrones de RAPDs de plantas R₁ cv. Morpa, analizadas con los *primers* OPO05 (A) y OPU08 (B) (Tomado de Polci, 2000).

Como se mencionara previamente, la variación somaclonal se refiere a los cambios genéticos o epigenéticos que aparecen luego del cultivo de células, tejidos u órganos de plantas, los cuales a veces alteran la expresión de genes y pueden modificar el fenotipo (Larkin y Scowcroft, 1981). Aunque se han informado numerosos ejemplos de variación somaclonal y el fenómeno ha sido documentado en numerosas especies (Kaeppler *et al.*, 2000; Jain, 2001; Guo *et al.*, 2006), no se conoce la base molecular de este fenómeno, que parece ser diversa. Kaeppler y Phillips (1993) proponen una base molecular común para todos estos eventos mutagénicos provocados por el cultivo *in vitro*. Un posible mecanismo involucra la alteración en los patrones de metilación, que podría modificar la expresión génica y la estructura de la cromatina. (Phillips *et al.*, 1994; Jaligot *et al.*, 2000; Kubis *et al.*, 2003; Guo *et al.*, 2007). Kaeppler y Phillips (1993) observaron una alta frecuencia de variación en patrones de metilación entre familias derivadas de regenerantes primarias de maíz, incluso entre aquellas provenientes del mismo embrión. Sin embargo, no encontraron cambios en la secuencia de bases del ADN. Todos los cambios involucraron disminuciones en el nivel de metilación y fueron heredables y estables luego de la autofecundación. Este estudio demuestra que los cambios en metilación ocurren con una frecuencia lo suficientemente alta como para ser considerados una fuente importante de variación en el cultivo de tejidos. La tendencia hacia la disminución en la metilación indicaría que genes o transposones, pueden ser activados (Madlung y Comai, 2004). Estos autores indican que los sitios con cambios en los patrones de metilación son aleatorios, sugiriendo que muchas regiones codificantes pueden ser afectadas. Es posible que la disminución en el nivel de metilación pueda afectar la estructura de la cromatina, lo cual llevaría a cambios en la expresión de genes debido a efectos de posición, cambios en las tasas de recombinación y cambios en el tiempo de replicación del ADN, conduciendo en algunos casos a rupturas cromosómicas. Otros estudios indican que algunos de estos cambios no son al azar y son dirigidos a secuencias específicas, representando una respuesta común ante situaciones de estrés (Cullis, 2003). De manera que ciertos cambios en la metilación del ADN podrían permitir la expresión de la sexualidad, aunque en una ventana temporal limitada. El restablecimiento del modo reproductivo en la misma planta y en la generación R₁ permitiría mantener y multiplicar los genotipos híbridos que resultaran de interés.

En algunas gramíneas, la ocurrencia de sequía durante el período en que se desarrolla la meiosis provoca una disminución en la producción de semilla por inducción de androesterilidad (Bingham, 1966), respuesta atribuida al incremento en la concentración de ácido abscísico (ABA) endógeno que se acumula en las espigas o panojas a consecuencia del estrés (Morgan, 1980). La pérdida de turgencia de la hoja puede disparar la síntesis de ABA (Pierce y Raschke, 1980) que sería transportado subsecuentemente a la inflorescencia (Goldbach y Goldbach, 1977; Morgan, 1980; Saini y Aspinall, 1981). El estrés hídrico dispara la producción de ABA endógeno que a su vez induce la transcripción de varios genes. Algunos genes que responden a ABA son también expresados en los estadios tardíos de la embriogénesis durante el desarrollo de la semilla y se piensa que funcionan en la protección de las células a la deshidratación (Skriver y Mundy, 1990). Se ha observado la inducción de genes por ABA en diferentes situaciones de estreses abióticos (Iuchi *et al.*, 1996). En ambas situaciones (sequía y cultivo de tejidos, plantas recién extraídas del ambiente de cultivo) se observó en pasto llorón un efecto de aceleración de la senescencia, donde panojas que presentaban un aspecto juvenil ya tenían polen maduro (Polci, 2000). Tal vez este desfase en el desarrollo podría alterar el modo reproductivo. Un detalle adicional mencionado en el trabajo de Polci (2000) y también en el de Frayssinet *et al.* (1999) es una deposición diferente de la calosa durante la microsporogénesis de plantas R₀, formando una capa más engrosada de la normal. Varios autores han mencionado que la calosa es característica de la reproducción sexual, la misma aislaría a la célula reproductiva de las células somáticas que la circundan (Rodkiewicz, 1970). Si bien no se realizaron estudios citoembriológicos, todas estas evidencias tenderían a indicar que ante este tipo de situaciones se produce un cambio en el modo reproductivo de las plantas, permitiendo la expresión de la sexualidad. Esto lleva a pensar que de alguna manera este tipo de plantas tienen la capacidad de expresar ambos tipos de reproducción, predominando normalmente la apomixis y expresando la sexualidad sólo en determinadas situaciones.

Otros autores también informan cambios en el modo reproductivo de plantas apomícticas frente a situaciones de estrés. Gounaris *et al.* (1991), encuentran progenie variable en plantas apomícticas de *Cenchrus ciliaris* (buffelgrass) expuestas a condiciones de alta salinidad *in vitro*. También observan alteraciones en la formación de sacos embrionarios (embriones múltiples, ausencia de antípodas, etc.). Algunos pistilos

de genotipos apomícticos obligados (apospóricos) tratados con sales producen sacos embrionarios de tipo *Polygonum* (4 a 13%). Estos autores postulan que el estrés salino cambia las prioridades en el desarrollo: a- del saco embrionario nucelar al de la megáspora en apospóricos (apomíctico a sexual) y b- de la megáspora calazal a las otras megásporas en procesos sexuales. Esto permite el cambio a reproducción sexual en plantas apomícticas y que más de una megáspora forme sacos embrionarios reducidos en plantas sexuales. Otro estudio informa variabilidad en progenies de somaclones con respecto a la planta donante de explanto en *Hypericum perforatum* (Haluskova y Cellarova, 1997). Estos autores encuentran diferencias en los patrones de RFLP en progenies (1 planta de 10 y 1 planta de 8). Estas variaciones las atribuyen a procesos sexuales y no a cambios genéticos o epigenéticos, aunque no se realizaron observaciones acerca del modo de desarrollo del saco embrionario.

También Davies y Cohen (1992) observan progenie variable en plantas de *Paspalum dilatatum* (pasto miel) regeneradas *in vitro* y sugieren una ruptura o disrupción de la apomixis hacia la reproducción sexual. Burson y Tischler (1993), encuentran variabilidad generada por cultivo *in vitro* en plantas regeneradas de la misma especie. Sin embargo, estas plantas producen progenie uniforme, aunque presentan diferencias en la cantidad de semillas por planta por aborto o formación de un mayor número de sacos embrionarios. En otro trabajo en el mismo género, con la especie *Paspalum simplex*, Molinari *et al.* (2003) evalúan plantas regeneradas luego de un mes de cultivo de callos. Utilizando sondas (RFLP) dirigidas hacia la región de la apomixis, estos autores no encuentran variación entre las plantas regeneradas y las progenies de las mismas son uniformes. Resultados similares fueron obtenidos por Taliaferro *et al.* (1989) en plantas aneuploides de *Bothriochloa sp.* Esto no descarta, sin embargo, que puedan producirse cambios epigenéticos.

En trabajos de mejoramiento de pasto llorón llevados a cabo en USDA (Estados Unidos) por el Dr. Paul Voigt se encontraron algunos individuos tetraploides sexuales (ver Capítulo 1). Uno de ellos provino de una semilla producida por un genotipo altamente apomíctico. Aunque el Dr. Voigt nunca obtuvo evidencia experimental, asumió que el evento que condujo a la formación de este individuo de reproducción sexual se encontraba asociado a las condiciones ambientales durante el desarrollo del saco embrionario (Paul Voigt, comunicación personal).

Lo anterior permite plantear algunas preguntas: las situaciones de estrés ¿pueden modificar el modo reproductivo en una planta apomíctica?, ¿existe plasticidad o adaptabilidad en los sistemas reproductivos?, ¿cuál sería la base molecular del o los mecanismos que regulan esta plasticidad? y ¿se encuentran ambos modos de reproducción en todas las plantas o existe una región génica en las plantas apomícticas que de alguna manera lleva al silenciamiento de la sexualidad?.

Estrés y variabilidad

El carácter sésil de las plantas ha sido posiblemente la base para la evolución de sus numerosos mecanismos de respuesta a estrés. Las respuestas generales al estrés involucran vías de detección del estímulo, síntesis de proteínas, detención del ciclo celular en determinados estadios y la activación de mecanismos de reparación del ADN (Joyce *et al.*, 2003). Los estreses abióticos no sólo provocan respuestas fisiológicas programadas como síntesis de proteínas de choque de calor (heat-shock proteins) y proteínas relacionadas a la patogénesis (PR proteins), sino que también inducen cambios en el genoma. Estos cambios no tendrían un blanco determinado, más bien representarían un mecanismo evolutivo para responder adecuadamente a situaciones inusuales (Madlung y Comai, 2004). Estas respuestas genómicas inducidas por estrés (stress-induced genomic responses) incluyen modificación en la cantidad de copias de ADN repetitivo, metilación de ADN, escisión e inserción de elementos transponibles, amplificación o delección de genes y acetilación de histonas. De esta forma, en muchos organismos, el genoma puede reorganizarse a si mismo frente a situaciones adversas, para las cuales no está preparado, con el objeto de asegurar su supervivencia (Cullis, 2003).

Madlung y Comai (2004) asocian el estrés producido por el cultivo de tejidos a la respuesta a heridas provocadas durante la separación del explanto, alteraciones en los niveles hormonales que pueden provocar la activación de transposones y situaciones de estrés oxidativo. Aunque, el mecanismo que vincula al cultivo de tejidos con la activación de transposones es desconocido, algunos autores han observado una disminución en la metilación del ADN (Madlung y Comai, 2004). Las alteraciones en la actividad transcripcional mediadas por transposones pueden afectar genes que lleven a evitar o tolerar las situaciones de estrés. Respuestas relacionadas a estrés promueven la

reprogramación genómica en la actividad transcripcional requerida para que las células somáticas se tornen embriogénicas (Madlung y Comai, 2004). Por ejemplo, el pretratamiento en condiciones de estrés (calor o falta de nutrientes) de microsporas aisladas o en la planta, redirecciona su destino de desarrollo, produciendo embriones en lugar de granos de polen (Aionesei *et al.*, 2005).

Un caso interesante de cambio de reproducción asexual a modo sexual bajo situaciones de estrés es el que sucede en la levadura *Schizosaccharomyces pombe*. Actualmente se conoce la base molecular de la regulación de este cambio, donde genes involucrados en la reproducción sexual (meiosis) se encuentran adyacentes a LTRs (long terminal repeats) de ciertos retrotransposones. Estos genes se encuentran normalmente reprimidos y bajo condiciones de déficit de nitrógeno se activan (Schramke y Allshire, 2003). Estos autores concluyen que la ruptura de ARNi (ARN de interferencia) causa la liberación de la represión transcripcional de los genes adyacentes a los LTRs, permitiendo que la meiosis tenga lugar.

Varios casos han sido documentados en los que el genoma se altera en respuesta al medio ambiente (Evans *et al.*, 1966; McClintock, 1984; Walbot y Cullis 1985; Johnston *et al.*, 1996). Los ejemplos incluyen la evolución adaptativa en *Escherichia coli*, la esporulación en *Bacillus*, el cambio del modo reproductivo en levaduras, la activación de elementos transponibles, la variación inducida por el cultivo de tejidos y la amplificación de genes, entre otros (Cairns y Foster, 1991; Foster y Cairns, 1992; Hall, 1988; Stragier *et al.*, 1989; Sprague *et al.*, 1983; McClintock, 1984; Roth *et al.*, 1989; Stark *et al.*, 1989). Todos estos sistemas tienen un factor común, que son cambios a nivel del ADN que involucran mutaciones que surgen, aparentemente, en respuesta a un estímulo ambiental.

El supuesto básico es que el genoma es variable y puede ser reorganizado en respuesta a diversas situaciones de estrés (Walbot y Cullis, 1985; Roth *et al.*, 1989; Cullis, 2003). Sin embargo, no todo el genoma es igualmente sensible a estos cambios, de manera que las variaciones que se producen en respuesta al estrés deben estar localizadas en un subconjunto del mismo. La fracción específica del genoma que se modifica en respuesta a estrés depende del estado fisiológico de la célula y del tipo de estrés al que se enfrenta el organismo (Cullis 1977; Cullis y Greissen 1987). Algunas de las regiones pueden ser

más variables que otras y, por lo tanto, siempre se alteran independientemente del estrés inductor (Cullis, 2003).

Las variaciones en el ADN inducidas por el medio ambiente son generalmente de carácter transitorio. Bajo determinadas condiciones, sin embargo, pueden ser de carácter permanente y, por tanto, transmitidas a las siguientes generaciones (Cullis, 2003).

Situaciones de estrés abiótico como calor y salinidad y también algunos bióticos parecen, en general, incrementar el nivel de recombinación somática en plantas (Lebel *et al.*, 1993; Puchta *et al.*, 1995; Lucht *et al.*, 2002) y se han documentado alteraciones genómicas en respuesta a cambios ambientales (McClintock, 1984; Walbot y Cullis 1985). Las respuestas del genoma vegetal a las amenazas del medio ambiente podrían estar programadas, con la participación particular de cadenas de transducción de señales que culminan en cambios genómicos, permitiendo una adaptación rápida y flexible de las poblaciones de plantas a los cambios en el entorno (Ulm, 2003). Esto ya había sido mencionado por McClintock en 1983, en su disertación para recibir el premio Nobel, proponiendo que las plantas poseen mecanismos para responder a situaciones de estrés relacionadas a reestructuraciones en su genoma (McClintock, 1984). Como ejemplo cabe citar los genotifos de lino, informados por Cullis en los años setenta (Cullis, 1977).

En los últimos años la visión acerca de la evolución del genoma ha cambiado y ahora se acepta que el genoma presenta una plasticidad extremadamente alta. Intercambio de cromátidas, deleciones, inserciones o amplificaciones son producidas recurrentemente y las nuevas combinaciones resultan, en algunos casos, en la aparición de nuevos genes (Linacero *et al.*, 2000). Más aún, se ha propuesto que la plasticidad del genoma somático, que es mayor en plantas que en animales, puede mejorar las posibilidades de adaptación individual (Buiatti y Bogani, 1998). Por otro lado, se sabe que existen regiones hipervariables en el genoma (regiones en las cuales la tasa de mutación es mayor que en otras secuencias). Debido a este hecho, estas secuencias se denominan hot spot o puntos calientes de mutación (Linacero *et al.*, 2000).

Elementos transponibles o transposones

Un transposón es una secuencia de ADN que puede moverse autosuficientemente a diferentes partes del genoma de una célula, fenómeno conocido como transposición. En este proceso, pueden causar mutaciones y cambio en la cantidad de ADN del genoma. Existe una amplia diversidad de elementos genéticos móviles y pueden ser clasificados en base a su mecanismo de transposición. Los elementos genéticos móviles de clase I, o retrotransposones, se mueven en el genoma siendo transcritos a ARN y después a ADN por una retrotranscriptasa, mientras que los de clase II se mueven directamente de una posición a otra en el genoma usando una transcriptasa. Los transposones tienden a incrementar su número entre generaciones al replicarse a si mismos y forman una parte sustancial del genoma de las plantas. Dada su capacidad potencial de causar mutaciones, existen múltiples mecanismos para reconocerlos y silenciarlos epigenéticamente, por lo que la vasta mayoría de los transposones son inactivos (Lischt, 2009).

La expresión de los retrotransposones vegetales mejor caracterizados no es constitutiva. En general, la mayoría se activan por situaciones de estrés o factores ambientales, tales como el cultivo *in vitro* o la respuesta a heridas (Hirochika *et al.*, 1996; Echenique *et al.*, 2002). Un ejemplo muy estudiado es el caso de los elementos móviles *Tnt1* y *Tto1* de tabaco. Su movilidad en respuesta a estrés ha sido demostrada a través de la inducción transcripcional en circunstancias que incluyen elicitores, ataque de patógenos, ácido salicílico, heridas, aislamiento de protoplastos, cultivo de células, 2,4-D, metil jasmonato, Cl_2Cu y estrés oxidativo. Hirochika *et al.* (1996) fueron los primeros investigadores que informaron la movilidad inducida por cultivo de tejidos de los retrotransposones de arroz *Tto1*, *Tto2* y *Tnt1*. La inserción de retrotransposones en secuencias codificantes ha sido observada en numerosos trabajos, indicando que los mismos pueden contribuir significativamente a la variación somaclonal. La activación de varios retrotransposones en estas condiciones particulares plantea la pregunta de si su expresión se encuentra vinculada a la activación de programas de división celular o a la activación de respuestas a estrés, o ambas (Grandbastien, 1998).

La fracción del genoma que involucra retrotransposones incrementa con el tamaño del mismo, desde el arroz, que es el cereal con genoma más pequeño (430 Mb, ~14% LTR retrotransposones, Tarchini *et al.*, 2000), el maíz con un genoma intermedio (2500 Mb,

50-80% LTR retrotransposones, SanMiguel *et al.*, 1996) hasta la cebada (5000 Mb, >70% LTR retrotransposones, Vicient *et al.*, 1999).

Los elementos transponibles son la mayor fuente de variación genética, que varía desde pequeñas modificaciones en la expresión de ciertos genes a alteraciones cromosómicas. Tomadas en conjunto, estas observaciones llevan a sugerir que los elementos transponibles están involucrados en la adaptación de los organismos a los cambios ambientales. En particular, debido a su participación en la regulación génica, los transposones han sido propuestos como el mayor factor involucrado en la macroevolución. Sin embargo, no existen claras evidencias en este sentido, pero cada vez es más lejano el concepto de secuencias parásitas, aunque su rol como forjadores de la evolución es aún controvertida (Grandbastien, 1998).

Los elementos transponibles juegan un rol clave en las reestructuraciones genómicas. Su potencial para silenciar dinámicamente diferentes sitios del genoma los postula como responsables de la plasticidad en el desarrollo de las plantas. Aunque existen mecanismos que controlan su actividad, existen unos pocos retrotransposones activos en plantas (entre ellos el *Tnt1* de tabaco). Transposones y retrotransposones podrían ser los responsables de las reversiones observadas en pasto llorón por Mecchia *et al.* (2007), Cervigni *et al.* (2008b) y Ochagavía *et al.* (2009, en prensa) a nivel genético, transcripcional y epigenético, respectivamente. El estrés provocado por el cultivo *in vitro* y la posterior duplicación genómica a que fueron sometidas las plantas utilizadas en el presente estudio (UNST1131 y UNST1112), podría haber resultado en el movimiento no azaroso de estos elementos en el genoma. Estos cambios podrían haber resultado en la des-represión de genes involucrados en la reproducción sexual, llevando a la expresión de la sexualidad, por lo menos temporalmente.

Los retrotransposones activos pueden ser hallados en genotecas de ADNc, es decir que se transcriben y representan un porcentaje importante de las mismas, como fuera informado por Engel *et al.* (2003), quienes encuentran un 8% en genotecas de maíz. En el año 2002 nuestro grupo de trabajo, en colaboración con el Dr. Jorge Dubcovsky, realizó un análisis de tipo “Northern electrónico” buscando retrotransposones en las bases de datos de ESTs de las Tritíceas (EST Consortium y DuPont EST), encontrando que el 0,176% de las ESTs disponibles en ese momento presentaban similitud con al

menos un retrotransposón de tipo Ty1-copia o Ty3-gypsy (Echenique *et al.*, 2002). También se observó que el porcentaje de ESTs similares a retrotransposones fue significativamente mayor en las genotecas provenientes de hojas en comparación a las obtenidas de raíces, anteras o espigas. En este trabajo se encontraron tres a cuatro veces más secuencias similares a retrotransposones en genotecas de plantas bajo condiciones de estrés (biótico y abiótico) que en las de plantas creciendo en condiciones normales. Llamó la atención una genoteca donde un 0,6% de las ESTs eran retrotransposones. Se trataba de una genoteca de tiras epidérmicas, que habían sido retiradas de las hojas con una pinza. La alta tasa de ocurrencia de copias de retrotransposones en el transcriptoma podría deberse a una respuesta a las heridas ocasionadas (Echenique *et al.*, 2002).

Apomixis y epigenética

Koltunow y Grossniklaus (2003) proponen una hipótesis epigenética para el carácter apomixis, donde este tipo de reproducción se produciría por una desregulación temporal o espacial de un proceso sexual ancestral. Esta desregulación puede ser causada por hibridación y poliploidización, creando variaciones epigenéticas que son la base para la evolución de este proceso complejo. Por lo tanto la sexualidad y la apomixis están fuertemente interrelacionadas y poseen muchos componentes comunes.

Dos modelos han sido propuestos para explicar molecularmente la apomixis (Koltunow y Grossniklaus, 2003):

- El modelo de la mutación genética, que predice que un factor regulatorio clave de la reproducción sexual es mutado o se ve alterada su función. Esto llevaría a la desregulación de la vía sexual. La mutación no es totalmente penetrante, ya que los procesos sexuales pueden seguir ocurriendo.
- El modelo epigenético, que predice que cambios reversibles en la configuración de la cromatina pueden alterar la expresión de genes regulatorios clave, tanto en el tiempo como en el espacio, posiblemente activando las vías apomícticas a diferentes tiempos del desarrollo o en diferentes tipos celulares.

Estos modelos no son mutuamente excluyentes, considerando que una mutación en un regulador epigenético puede llevar a la alteración en la formación de la heterocromatina.

Algunas evidencias apoyan la teoría de la regulación epigenética de la apomixis, incluyendo la observación de que la mayoría de los programas de desarrollo apomícticos no están finamente conservados y que diferencias en el tiempo de inicio y variaciones en las estructuras formadas ocurren en una misma planta en respuesta a diferentes condiciones ambientales o estreses. Tal flexibilidad es característica de la regulación epigenética (Koltunow y Grossniklaus, 2003; Grant-Downton y Dickinson, 2006).

Por otro lado, se han informado algunos casos de apomixis gametofítica en diploides (Bicknell, 1997; Kojima y Nagato, 1997), por lo que la poliploidía no sería un requisito absolutamente necesario para la expresión de la apomixis. Sin embargo, en estos ejemplos, la formación de la semilla asexual es a menudo pobre, por lo que la poliploidía puede aumentar la expresión de la apomixis en muchos sistemas en lugar de garantizar su expresión *per se*. Evidencias acerca de cómo esto podría funcionar proceden de estudios en levaduras y *Arabidopsis*, donde las alteraciones en el nivel de ploidía se sabe que afectan el grado de metilación y la expresión de diferentes alelos (Galitski *et al.*, 1999; Lee y Chen, 2001). Por el contrario, son intrigantes los casos de expresión de la apomixis en plantas sexuales después de la duplicación de cromosomas (Quarín *et al.*, 2001). Sin embargo, hay cierto debate en estos ejemplos acerca de la posibilidad de una predisposición innata, ya que las plantas utilizadas fueron miembros sexuales de grupos que contienen genotipos apomícticos. Por el contrario, se recuperó una planta sexual después de la duplicación de un biotipo apomíctico de *Potentilla argentea* (Asker, 1967). Por último, la poliploidía ha sido inducida en un gran número de plantas, pero muy rara vez se informó de la apomixis en los productos (Bicknell y Koltunow, 2004), a menos que existieran antecedentes de apomixis en la especie. Esto indicaría que debe existir una región relacionada con el carácter, sujeta a regulación epigenética con genes o vías compartidas con el desarrollo sexual. Los resultados trabajando con nuestra serie euploide de plantas parece apoyar esta hipótesis.

Apomixis y ambiente

Una cuestión importante a tener en cuenta es la influencia que tienen los factores ambientales sobre la expresión de la apomixis. Los cambios estacionales en los regímenes de temperatura y luz pueden influenciar el modo reproductivo en las

poblaciones (Asker y Jerling, 1992). En *E. curvula*, la exposición a condiciones experimentales de día corto, disminuyó el porcentaje de sacos embrionarios no reducidos (Brix, 1977). Entre las gramíneas apospóricas, el fotoperíodo también ejerce su influencia sobre la mayor o menor producción de sacos embrionarios no reducidos. En *Dichanthium annulatum* el acortamiento de las horas de luz aumenta significativamente el porcentaje de sacos embrionarios apospóricos (Knox y Heslop-Harrison, 1963). Quarín (1986) analizó la incidencia del fotoperíodo en la formación de sacos embrionarios en óvulos maduros de tres citotipos de *Paspalum cromyorrhizon*, bajo condiciones naturales y experimentales. Las plantas diploides de reproducción sexual mostraron durante la primavera los valores más altos de presencia de sacos embrionarios mixtos (meióticos + apospóricos) mientras que los tetraploides apomícticos facultativos también tuvieron una mayor expresión de sacos embrionarios apospóricos durante la primavera y el verano. Esto es coincidente con un fotoperíodo largo, de 14 hs de luz y 10 hs de oscuridad. Sin embargo, en condiciones de fotoperíodo corto (12 hs de luz y 12 de oscuridad) hay una mayor incidencia de sacos embrionarios de origen meiótico.

Houliston *et al.* (2006), trabajando con la especie apomíctica facultativa *Hieracium pilosella*, evaluaron las alteraciones en la frecuencia de sexualidad bajo el efecto del cultivo a campo vs. invernadero, el nivel de nutrientes y la infección con patógenos. Estos autores encuentran un incremento significativo en el nivel de sexualidad en plantas cultivadas en invernadero frente a las cultivadas a campo, sin embargo no encuentran diferencias con la variación en los niveles de nutrientes, ni con la infección con un patógeno. El fotoperíodo tampoco modificó la frecuencia de aparición de sexualidad. En varios de los experimentos hallaron que la producción de semilla fue significativamente diferente entre los tratamientos, sin alterar la frecuencia de sexualidad, indicando una mayor plasticidad en este carácter. En todos los experimentos hallaron una relación positiva entre fecundidad y frecuencia de sexualidad, con una mayor producción de semillas en plantas sexuales. La hipótesis de los autores es que el costo de la reproducción sexual en esta especie puede ser compensado por un incremento en la fecundidad, con un costo de la meiosis diluido por un incremento en la producción total de progenie.

La presencia de modificadores que afectan la expresión de la apomixis sugerida por Bicknell *et al.* (2000) y Koltunow *et al.* (2000) pueden influenciar no sólo a genotipos apomícticos para mantener un cierto nivel de reproducción sexual, sino también en la plasticidad de este carácter (Houliston *et al.*, 2006). Estos alelos modificadores de la expresión de la apomixis o sexualidad serían los responsables de la presencia de variaciones en el modo reproductivo de una misma planta ante situaciones ambientales o con el tiempo (Ceplitis, 2001). En plantas apomícticas facultativas se ha observado en varias oportunidades la variación en los porcentajes de sacos embrionarios sexuales y apomícticos en distintos momentos del año (Dr. Camilo Quarín, comunicación personal). Sin embargo, esto parece diferir en las diferentes especies.

Knox (1967), evalúa seis poblaciones naturales de *Dichanthium annulatum* presentes en sitios donde el fotoperíodo difiere, encontrando que en las tres poblaciones donde el fotoperíodo excede las 14 hs de luz la incidencia de sacos apomícticos es menor (alrededor del 60%), mientras que en los sitios donde el fotoperíodo es menor de 14 hs de luz, el porcentaje de sacos apomícticos es mayor (aprox. 90%). El aumento en la longitud del día, seguido de condiciones de estrés en la estación seca llevaría a una menor incidencia de la reproducción apomíctica en esta especie. Otras observaciones (Nygren, 1951) indican una versatilidad en el sistema reproductivo similar en la gramínea *Calamagrostis purpurea*, donde las primeras panojas son sexuales mientras que las más tardías son apomícticas.

Ceplitis (2001) demuestra que en *Allium vineale* la proporción exacta de semilla sexual y apomíctica parece resultar de una compleja relación entre genes y ambiente y que la variación genética para este carácter afecta directamente esta proporción en condiciones de campo.

Hipótesis

La expresividad variable de la apomixis en aquellas plantas que poseen la/s región/nes determinantes del carácter se debería a factores genéticos y epigenéticos que pueden ser afectados por el ambiente.

Objetivos

En función de los resultados obtenidos en el capítulo anterior, en esta sección de la tesis se plantearon los siguientes objetivos: 1) analizar los cambios en el modo reproductivo de las plantas tetraploides obtenidas por duplicación cromosómica; 2) comparar esta situación con otras previas de obtención de progenie variable en plantas regeneradas por cultivo *in vitro* por el grupo de trabajo; 3) analizar la variación a nivel genético y epigenético que experimentaron estas plantas tetraploides en cuatro años, que es el tiempo que dista entre su obtención y la detección de progenie uniforme (2003-2007) y 4) analizar la actividad de retrotransposones en las bibliotecas de ESTs de los mismos genotipos, a fin de estimar su capacidad potencial de provocar rearrreglos genéticos y/o epigenéticos asociados con sus movimientos que pudieran causar los cambios en el modo reproductivo.

Materiales y Métodos

Material vegetal

Se utilizaron las plantas tetraploides UNST1112 y UNST1131 obtenidas por duplicación con colchicina del diploide UNST1122 (Cardone *et al.*, 2006). Como control se utilizó una planta del cv. Tanganyika, ya que de inflorescencias de plantas de este cultivar se obtuvo el somaclon UNST1122 (Echenique *et al.*, 1996b; Polci, 2000). También se incorporó al análisis el somaclon UNST9330, tetraploide que se obtuvo por cultivo *in vitro* de callos del cv. Tanganyika en el mismo año que el somaclon UNST1122 (Echenique *et al.*, 1996b) y que mostró progenie variable en el análisis por isoenzimas de la R₁ (Figura 4.1, planta R_{O-1}; Polci, 2000). Esta planta se mantuvo a campo y en el invernáculo de la UNS propagándose en forma vegetativa (macollos) desde el momento de su extracción del tubo de cultivo *in vitro*. Al igual que en el análisis realizado en 1998, las semillas se obtuvieron por polinización libre. Se analizaron 20 plantas obtenidas de semillas de la misma panoja cosechadas en el año 2007.

Pruebas de progenie con RAPDs

El ADN de los 20 individuos descendientes de la planta UNST9330 se extrajo con el mismo protocolo mencionado en el Capítulo 1. Se utilizaron marcadores de RAPDs (ver protocolo en Capítulo 1) para realizar la prueba de progenie.

Amplificación de polimorfismos sensibles a metilación (MSAP)

Los ensayos de MSAP se realizaron en colaboración con la Lic. Ana Ochagavía y la Dra. Silvina Pessino del laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Rosario. La técnica de MSAP se utiliza para determinar el grado de metilación en el ADN. Básicamente es similar a la de AFLPs, sin embargo utiliza enzimas de restricción sensibles a la metilación para realizar los cortes previos a las amplificaciones. En la Figura 4.3 se pueden apreciar los isoesquizómeros de las enzimas utilizadas *MspI* y *HpaII* con sus respectivos patrones de bandas observados en geles de poliacrilamida. Se adoptó la siguiente nomenclatura para el registro de las bandas: I: metilada en citosina interna, E: metilada en citosina externa, D: desmetilada y M: full metilada en ambas citosinas o cambio de secuencia en el sitio de corte.

Para realizar los estudios de MSAP y AFLPs se utilizó ADN extraído en los años 2003 y 2007 de la planta UNST1131 y de una planta del cv. Tanganyika (la misma en ambos casos) para evaluar la ocurrencia de cambios genéticos o epigenéticos en las plantas en el transcurso de esos 4 años.

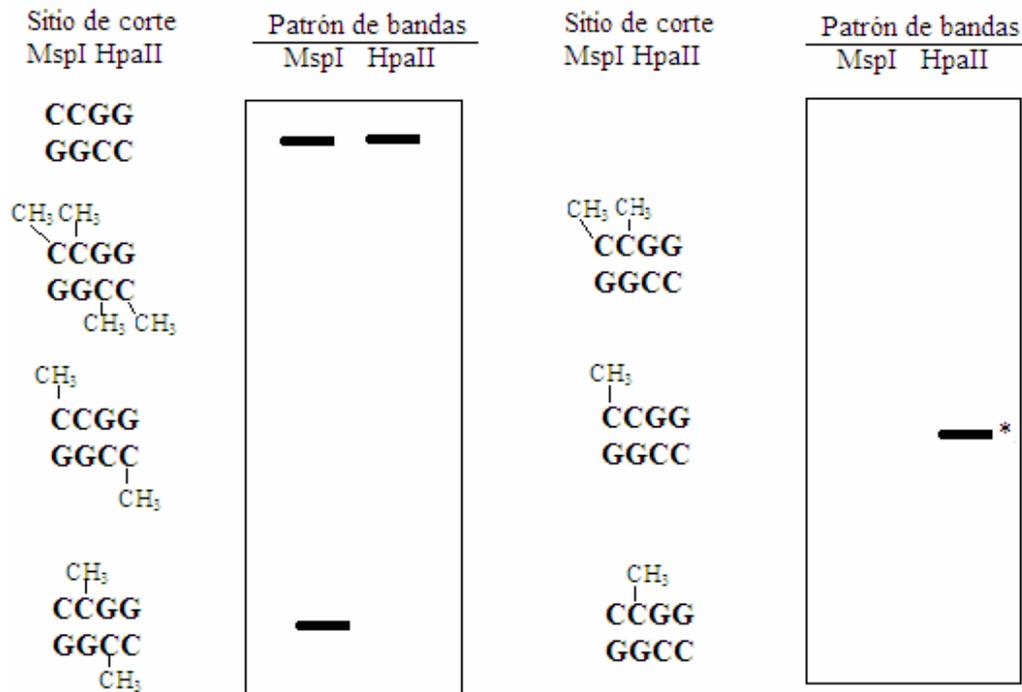


Figura 4.3. Esquema de los patrones de metilación posibles en el sitio de corte de los isoesquizómeros *MspI* y *HpaII* con sus respectivos patrones de bandas observado en geles de poliacrilamida por MSAP. El corte con *HpaII* cuando el sitio se encuentra hemimetilado en la citosina externa se produce con 50 veces menor actividad que cuando se produce en el sitio no metilado (*).

Los marcadores MSAP fueron obtenidos de acuerdo a Xiong *et al.* (1999). Se utilizaron los isoesquizómeros *HpaII* y *MspI*, sensibles a la metilación, como enzimas de corte frecuente y *EcoRI* como enzima de corte poco frecuente. La secuencia de los adaptadores para *EcoRI* fueron: 5'-CTC GTA GAC TGC GTA CC-3' para el adaptador superior y 5'-TTA ACC ATG CGT CAG-3' para el inferior. Las secuencias de los adaptadores para *HpaII* y *MspI* fueron las siguientes: 5'-GAC GAT GAG TCT AGA A-3' para el adaptador superior y 5'-CGT TCT AGA CTC ATC-3' para el inferior. Los cebadores complementarios a los adaptadores de *EcoRI* que fueron usados en la reacción de pre-amplificación tenían solo un nucleótido de selección (E+A), y aquellos utilizados en la amplificación tenían tres nucleótidos de selección (E+3). Los cebadores complementarios a los adaptadores de *HpaII-MspI* que fueron usados en la reacción de pre-amplificación no tenían nucleótido de selección (H-M+0), y aquellos utilizados en la amplificación selectiva tenían tres nucleótidos de selección (H-M+3). Se emplearon siete combinaciones. La secuencia de los cebadores utilizados fueron las siguientes: 1) cebadores *EcoRI*: *Primer* E+A: 5'-GACGGCGTACCAATTCA-3'. Cebadores E+3:

E32 5'-GACGGCGTACCAATTCAAA-3', E34: 5'-GACGGCGTACCAATTCAAT-3', E35: 5'-GACGGCGTACCAATTCACA-3', E36: 5'-GACGGCGTACCAATTCACC-3', E37: 5'-GACGGCGTACCAATTCACG-3', E40: 5'-GACGGCGTACCAATTCAGC-3'. Cebadores *HpaII-MspI*: *Primer* H-M+0: 5'-GATGAGTCTAGAACGG-3'. Cebadores H-M+3: H-M4: 5'-GATGAGTCTAGAACGGAGT-3', H-M5: 5'-GATGAGTCTAGAACGGAGC-3', H-M6: 5'-GATGAGTCTAGAACGGACA-3'; H-M7: 5'-GATGAGTCTAGAACGGACT-3'. Alícuotas de 600 ng de ADN genómico fueron incubadas durante 4 h a 37°C en una solución conteniendo 1X *buffer* OPA, 0,05 mg/ml BSA, 5 mM DTT, 5 U *EcoRI* y 5 U *HpaII* (o alternativamente *MspI*), en un volumen final de 50 µl. Dos µl de esta reacción fueron sembrados y corridos electroforéticamente en un gel de agarosa al 1,5% y teñidos con bromuro de etidio para estimar la extensión de la digestión. Los fragmentos fueron ligados a los adaptadores complementarios a los extremos cohesivos de los cortes de *EcoRI* y *HpaII/MspI* por agregado de 10 µl de la siguiente mezcla de reacción de ligación: 1X *buffer* OPA, 5 mM DTT, 0,05 mg/ml BSA, 1 mM ATP, 1 U T4 ADN ligasa, 45 pmol adaptadores *EcoRI* y 50 pmol adaptadores *HpaII-MspI*. La reacción fue incubada durante una noche a 18°C. La pre-amplificación se realizó en un volumen final de 25 µl conteniendo: 2 µl de mezcla de ligación, 30 ng de cebadores H-M+0 y E+A, 0,2 mM dNTPs, 1 U polimerasa GoTaq (Promega) y 1X *buffer* conteniendo Cl₂Mg (Promega). El programa de amplificación fue el siguiente: 1 ciclo de 30 seg a 94°C, 20 ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg a 60°C, 1 min a 72°C y un ciclo de elongación final de 5 min a 72°C. El producto de la pre-amplificación fue diluido 1:10 en agua destilada estéril. La amplificación selectiva se realizó en un volumen final de 25 µl conteniendo: 4 µl del producto de pre-amplificación diluido, 0,2 mM dNTPs, 1,2 U Taq polimerasa (Promega), 1X *buffer* (Promega), 30 ng *primer* E+3 y 30 ng *primer* H-M+3. El producto de la PCR fue desnaturalizado y resuelto en un gel de poliacrilamida al 5%. Los geles fueron teñidos con plata, secados y registrados para su análisis.

Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados - AFLPs

Los ensayos de AFLPs se realizaron en colaboración con la Lic. Ana Ochagavía y la Dra. Silvina Pessino del laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Rosario. Para ello se siguió el protocolo de Vos *et al.*

(1995) con algunas modificaciones. Alícuotas de 600 ng de ADN genómico fueron simultáneamente digeridas con las enzimas de restricción *EcoRI* y *MseI*. Los fragmentos fueron ligados a adaptadores para *EcoRI* y *MseI* y constituyeron las plantillas para las siguientes amplificaciones. Las secuencias de los adaptadores de *EcoRI* fueron las siguientes: 5'-CTC GTA GAC TGC GTA CC-3' para el superior y 5'-TTA ACC ATG CGT CAG-3' para el inferior. Las secuencias de los adaptadores de *MseI* fueron las siguientes: 5'- GAC GAT GAG TCC TGA G-3' para el superior y 5'-ATG AGT CCT GAG TA-3' para el inferior. Los cebadores para la pre-amplificación contenían un nucleótido selectivo, E+A y M+A respectivamente. Los productos de la pre-amplificación fueron diluidos (1:10) en 10 mM Tris y 0,1 mM EDTA y fueron usados como plantillas para la segunda ronda de amplificación, donde se utilizaron combinaciones de cebadores para ambos adaptadores conteniendo tres nucleótidos selectivos, E+3 y M+3, respectivamente. Las secuencias de los cebadores utilizados fueron las siguientes: 1) *Primers EcoRI*: *Primer E+A*: 5'-GACGGCGTACCAATTCA-3'. Cebadores E+3: E32 5'-GACGGCGTACCAATTCAAA-3', E36: 5'-GACGGCGTACCAATTCACC-3', E40: 5'-GACGGCGTACCAATTCAGC-3'. 2) *Primers MseI*: *Primer M+A*: 5'- GAT GAG TCC TGA GTA AA-3'. Cebadores M+3: M33 5'- GAT GAG TCC TGA GTA AAA G-3' M36 5'- GAT GAG TCC TGA GTA AAC C-3', M37 5'- GAT GAG TCC TGA GTA AAC G-3', M38 5'- GAT GAG TCC TGA GTA AAC T-3'. En total se utilizaron 14 combinaciones de cebadores de AFLPs. Los programas de ciclado indicados por Vos *et al.* fueron utilizados para la amplificación. Para aumentar la confiabilidad de los datos, se realizaron por duplicado. Luego de las amplificaciones, los productos de PCR fueron mezclados con *buffer* de siembra 3X (98% (V/V) formamida, 10 mM EDTA, 0,025% (P/V) azul de bromofenol y 0,025% (P/V) xilen cianol) en proporción 6:1, desnaturalizados a 95°C durante 5 min e inmediatamente llevados a hielo. Cinco microlitros de las muestras desnaturalizadas fueron cargadas en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 5% (P/V). Los productos de amplificación fueron visualizados con coloración de plata y digitalizados para el posterior análisis.

Aislamiento y clonación de los fragmentos de ADN

Una gota de agua destilada estéril se utilizó para humedecer la sección del gel que contiene una banda particular. Las bandas humedecidas fueron cuidadosamente

separadas del gel mediante el uso de un bisturí estéril. La sección del gel fue cortada en fragmentos pequeños y se eluyó durante la noche a 37°C en una solución *buffer* 0,5 M de acetato de amonio 1 mM EDTA pH 8. El ADN fue precipitado en etanol, y reamplificado utilizando las mismas condiciones de PCR que se describieron para los ensayos de AFLPs y MSAP. Todos los fragmentos fueron clonados en pGEM-T® Easy Vector System (Promega) y secuenciados por Macrogen Inc. (Seúl, Corea).

Análisis de los datos de secuenciación

La anotación fue realizada a través del análisis de similitud utilizando las herramientas de BLAST (Altschul *et al.*, 1997), disponibles en los sitios de Internet: NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y Gramene (<http://www.gramene.nlm.nih.org/>). Se localizaron las secuencias ortólogas en el genoma de *Arabidopsis* utilizando las herramientas de BLAST en el sitio TAIR (The *Arabidopsis* Information Resource, <http://www.arabidopsis.org>).

Análisis de representación de retrotransposones en las bibliotecas de ESTs

Se realizó un análisis *in silico* para la detección de secuencias similares o conocidas de retrotransposones en las genotecas de pasto llorón obtenidas por el grupo de trabajo (Cervigni *et al.*, 2008a). Se utilizó la base de datos de TIGR (J. Craig Venter Institute, <http://www.jcvi.org>) con secuencias de retrotransposones de maíz (<http://maize.jcvi.org>). Se eligió la base de datos de maíz ya que es la especie más emparentada con el pasto llorón dentro de las gramíneas cultivadas presentes en las bases de datos. Las secuencias de las cuatro genotecas de ESTs de *E. curvula* (ver Introducción) se compararon con la base de datos utilizando el algoritmo BLAST y comparando la secuencia de nucleótidos de los fragmentos contra la base de datos de secuencias nucleotídicas (BLASTn). Se tomaron dos criterios para considerar la similitud entre dos secuencias: Score 100 y $e \text{ Value} \leq e^{-10}$. Los resultados se expresaron en valores porcentuales (cantidad de secuencias que presentaron similitud/cantidad de secuencias en cada biblioteca).

Resultados y Discusión

Análisis de la variación en la expresión de la apomixis en un somaclón tetraploide de *E. curvula*

La progenie de la planta UNST9330, regenerante primaria (R_0) obtenida por cultivo *in vitro* de inflorescencias (Echenique *et al.*, 1996b; Polci, 2000), mostró en el año 2007 uniformidad en sus patrones de RAPDs y fue idéntica a la planta madre (Figura 4.4B), lo cual es evidencia de reproducción asexual (apomixis). Esta planta había presentado un grado considerable de progenie variable en las primeras floraciones luego de ser extraída del tubo de cultivo *in vitro* (Figura 4.4A). La similitud en patrones de isoenzimas de peroxidasa de algunas de las progenies de esta planta con plantas del cv. Don Pablo o Kromdraai, junto con evidencias cromosómicas, indicarían la existencia de reproducción sexual en algún grado en esta planta. No es posible, sin embargo, descartar algún tipo de cambio adicional (variación somaclonal) debido al cultivo *in vitro*, probablemente de naturaleza epigenética. Estos resultados, anteriores y actuales, tomados en conjunto, indicarían que las plantas de *Eragrostis curvula* que se reproducen por apomixis, ante circunstancias que parecen ocasionar choques genómicos (cultivo de tejidos, duplicación cromosómica), presentan indicios de reproducción sexual. Luego de un tiempo, la sexualidad se silencia, por un mecanismo que desconocemos, y comienza a incrementar el nivel de reproducción apomíctica.

Otra posibilidad sería un incremento en la capacidad de producir híbridos BIII (fertilización de una ovocélula no reducida) ante el cultivo de tejidos. Dos de las plantas descendientes de UNST9330 presentaron 64 y 70 cromosomas, respectivamente. Podrían haberse originado por la unión de un gameto no reducido de la planta apomíctica tetraploide ($2n=4x=40$) con otro reducido de alguno de los cultivares disponibles en el invernadero.

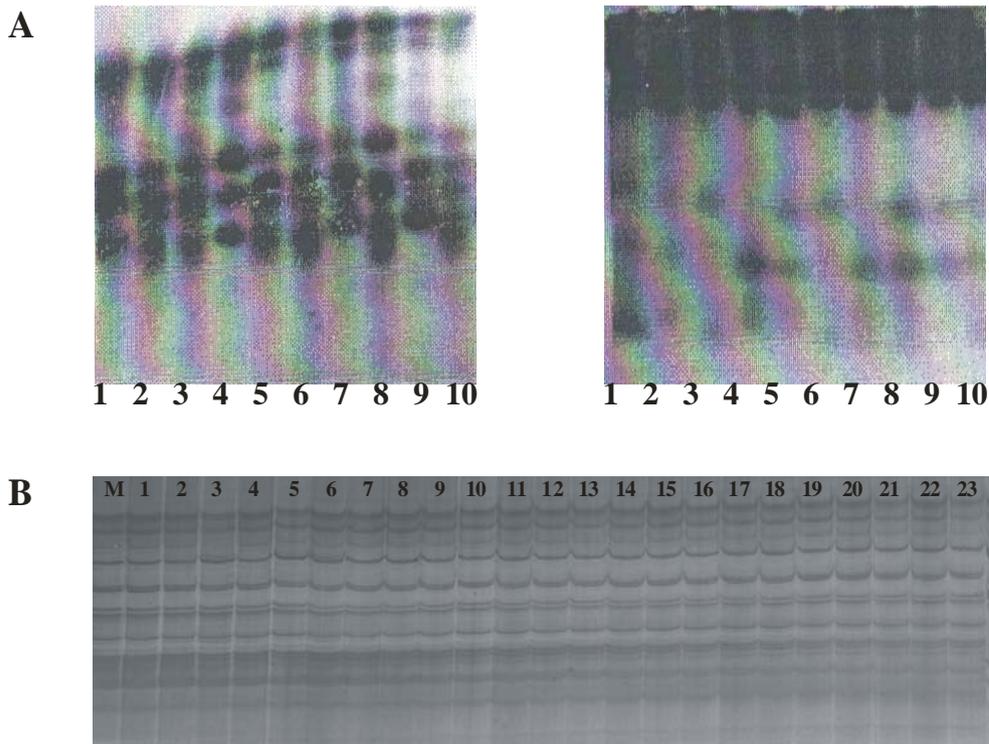


Figura 4.4. Pruebas de progenie de la planta UNST9330, **(A)** en su primer análisis con isoenzimas malato deshidrogenasas y peroxidasas (año 1998), 1: control cv. Tanganyika, 2 a 9: descendientes R_1 de planta UNST9330, 10: planta UNST9330, (Tomado de Polci, 2000) y **(B)** Patrones de amplificación de RAPDs de 20 individuos de la progenie de UNST9330 (año 2007).

Análisis de la variación genética y epigenética ocurrido en las plantas colchiploides en cuatro años (2003-2007)

Para este estudio se utilizó ADN de plantas extraído en los años 2003 y 2007 de manera de estudiar los patrones de AFLPs y MSAP y evaluar la ocurrencia de cambios genéticos o epigenéticos en las plantas en el transcurso de esos cuatro años. Se trabajó con ADN de la planta UNST1131 (C) y de una planta del cv. Tanganyika (T). La otra planta colchiploide (UNST1112) no pudo ser incorporada al estudio dado que el ADN del año 2003 presentaba un cierto nivel de degradación. Por el mismo motivo no se incluyó la planta UNST1122 (diploide sexual).

En la Figura 4.5 se muestran algunos de los patrones de amplificación obtenidos a partir de las plantas UNST1131 y Tanganyika con cuatro años de diferencia, con las técnicas de MSAP (A) y AFLPs (B).

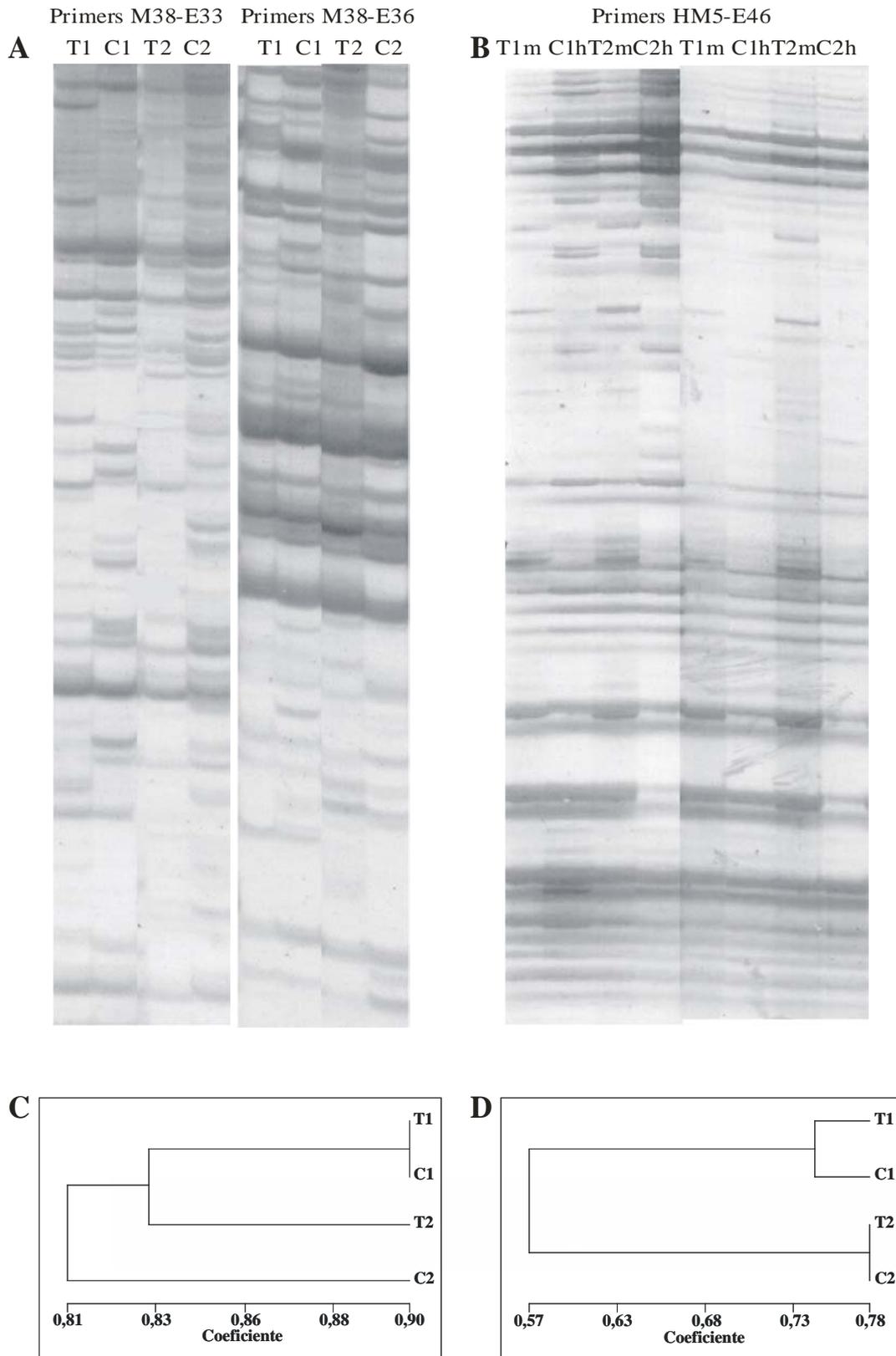


Figura 4.5. Patrones de amplificación de AFLPs (A) y MSAP (B) y relaciones de similitud obtenidas con AFLPs (C) y MSAP (D) de los genotipos Tanganyika (T) y UNST1131 (C). Las muestras corresponden al ADN del año 2003 (1) o del año 2007 (2) digeridas con las enzimas *MspI* (m) o *HpaII* (h).

Se contaron un total de 174 bandas de AFLPs para ambas plantas detectándose un total de 38 bandas polimórficas (22%) que se distribuyeron en las categorías resumidas en la Tabla 4.2.

La Tabla 4.2 indica que hay sectores genómicos cuya secuencia era polimórfica entre las plantas T y C hace cuatro años, y que continúan siendo polimórficas hoy en día (patrones conservados en el tiempo). Otros sectores genómicos cambiaron su secuencia genética en estos cuatro años, pero la cambiaron de manera idéntica en las dos plantas, lo que sugiere que no se trató de una mutación al azar, sino que involucró sectores específicos del genoma que sufrieron la misma modificación (patrones conservados entre plantas). Estos cambios consistieron preferencialmente en la aparición de bandas (patrones 0/0/1/1). Es importante notar que del total de polimorfismos observados, el 23,7% involucran los mismos loci variando en el tiempo de la misma manera (variaciones conservadas) en las dos plantas. Otros sectores sufrieron modificaciones genéticas en estos cuatro años que fueron particulares para cada planta (patrones no conservados entre plantas ni en el tiempo) (60,5% de los patrones polimórficos). Si se consideran los patrones afectados en el tiempo sobre el total de bandas representan un 18,4% (32 de 174).

A fin de analizar la evolución del genoma de las plantas en el tiempo de manera individual se consideraron los polimorfismos de a pares, comparando la variación temporal (2003 vs. 2007) y entre plantas (Tabla 4.3). Estos resultados indican que ambas plantas variaron de manera similar a lo largo del tiempo. En ambas plantas predominó la aparición de bandas por sobre la desaparición.

Estos datos indican que en el lapso de cuatro años el 89% del genoma de la planta T se mantuvo constante, mientras que un 11% presentó algún tipo de variación genética. La planta T no fue sometida a ningún tratamiento, aunque no podemos descartar que al ser una planta perenne en estos años haya estado sometida a situaciones cambiantes del medio ambiente que hayan implicado algún tipo de estrés, o que las respuestas del genoma a estímulos externos e internos sean más frecuentes de lo pensado. Con respecto a C, un 87,4% de su genoma permaneció estable, mientras que un 12,6% del mismo varió.

Tabla 4.2. Análisis de bandas de AFLPs polimórficas de una planta del cv. Tanganyika (T) y de la planta UNST1131 (colchipoide, C), comparando muestras de ADN del año 2003 y 2007. Los valores 0 y 1 representan ausencia o presencia del marcador, respectivamente. El orden de las muestras es T(2003), C(2003), T(2007) y C(2007).

Patrones variables entre plantas y conservados en el tiempo			
(0/1/0/1)		3	
(1/0/1/0)		3	
Total		6	15,8%
Patrones variables en el tiempo y conservados entre plantas			
(0/0/1/1)		7	
(1/1/0/0)		2	
Total		9	23,7%
Patrones no conservados entre plantas ni en el tiempo		23	60,5%
Total de polimorfismos		38	100%

Tabla 4.3. Análisis de bandas de AFLPs polimórficas de la planta UNST1131 (C) y de una planta del cv. Tanganyika (T). El análisis se realizó comparando de a pares el ADN de cada planta en los dos años de muestreo (2003 vs. 2007). Los valores 0 y 1 representan ausencia o presencia del marcador respectivamente.

Tipo de patrón	Planta T		Planta C	
Sin cambio en el tiempo				
(1/1)	145		144	
(0/0)	9		8	
Total	154	89%	152	87,4%
Cambios en el tiempo				
(0/1)	12		14	
(1/0)	7		8	
Total	19	11%	22	12,6%
Total	173	100%	174	100%

Del análisis de los patrones de AFLPs en conjunto y de a pares se puede llegar a las siguientes conclusiones:

- De los patrones polimórficos entre plantas (22% del total de bandas) el 15,8% se mantiene en el tiempo.
- Del total de polimorfismos observados, el 23,7% involucran los mismos loci que varían en el tiempo de la misma manera (variaciones conservadas) en las dos plantas
- En estos patrones que varían en el tiempo pero se mantienen entre plantas predomina la aparición de bandas (7 de 9).
- Ambas plantas se mantienen relativamente estables en el tiempo (89-87,4% de bandas invariables en el tiempo).

En la Figura 4.5C se presentan las relaciones de similitud obtenidas con AFLPs de las plantas Tanganyika (T) y UNST1131 (C), utilizando ADN del 2003 (1) y del 2007 (2). De su análisis se desprende que los ADN de ambas plantas extraídos en el 2003 son más similares entre sí que los actuales. Ambas plantas han cambiado genéticamente pero muchos loci lo han hecho en forma independiente, de manera que ahora las plantas son más diferentes genéticamente. Es importante recordar que UNST1131 proviene de Tanganyika, después de una dihaploidización seguida de una duplicación con colchicina.

El análisis detallado de las bandas polimórficas observadas en los experimentos de MSAP se muestra en la Tabla 4.4. Se nombran como E los sitios metilados en citosinas externas, I los sitios metilados en citosinas internas, D los sitios desmetilados y M si ambas citosinas se encuentran metiladas o existen cambios en la secuencia de nucleótidos en el sitio de corte.

Tabla 4.4. Análisis de bandas polimórficas utilizando la técnica de MSAP comparando Tanganyika (2003), UNST1131 (2003), Tanganyika (2007) y UNST1131 (2007). El estado de metilación se indica con las letras: I: metilado en citosina interna, E: metilado en citosina externa, D: sitios desmetilados y M: full metilada en ambas citosinas o cambio de secuencia en el sitio de corte.

Patrones variables entre plantas y conservados en el tiempo		
(M/E/M/E)	1	
(D/E/D/E)	1	
(I/D/I/D)	5	
Total	7	10,8%
Patrones variables en el tiempo y conservados entre plantas		
(E/E/M/M)	3	
(D/D/M/M)	4	
(D/D/I/I)	1	
(M/M/D/D)	3	
(I/I/M/M)	1	
(I/I/D/D)	6	
(D/D/E/E)	3	
Total	21	32,3%
Patrones variables en el tiempo y entre plantas	37	56,9%
Total de polimorfismos	65	100%

Cuando se analizó el patrón de metilación de las plantas mediante MSAP se registró un total de 274 bandas, 209 (76,3%) de las cuales no presentaron variación (monomórficas) y 65 (23,7%) fueron polimórficas.

Del análisis de la Tabla 4.4 surge que una parte de las bandas polimórficas variables entre ambas plantas (10,8%) no ha experimentado ninguna modificación epigenética en estos cuatro años. Otra parte (32,3%) ha sufrido modificaciones epigenéticas que son de la misma naturaleza en ambas plantas, predominando las metilaciones (12 de 21 vs. 9 de 21), mientras que finalmente otros loci (56,9%) sufren modificaciones que son típicas de cada planta.

En la Tabla 4.5 se consideraron los polimorfismos de a pares, comparando la variación temporal (2003 vs. 2007) y entre plantas. De las bandas polimórficas en T, las desmetilaciones representan el doble de las metilaciones (9,9 vs. 4,7%), e involucran principalmente desmetilaciones de patrones metilados en la citosina interna (18 de 27). De las bandas polimórficas en C, las metilaciones son superiores a las desmetilaciones ocurridas (12% vs. 7%) y las metilaciones involucran principalmente la metilación completa de patrones metilados en la citosina interna (16 de 33). Las desmetilaciones involucran la desmetilación de los patrones metilados en la citosina interna (11 de 19). En ambas plantas se observa un mayor nivel de variación en el tiempo con respecto a los valores observados con AFLP, presentado la planta C un 14,6% y la planta T un 19%.

De lo anterior se deduce que, considerando cada planta de manera individual, hay varios loci que cambian, mayormente desmetilándose, pero hay un subgrupo de loci que cambian igual para ambas plantas, y estos principalmente se metilan.

Si se construye una matriz con los datos de MSAP y se analiza la similitud epigenética entre ambas plantas se observa algo interesante: luego de los cuatro años transcurridos desde que UNST1131 se originó a partir del tratamiento con colchicina, las plantas han sufrido modificaciones que las han acercado epigenéticamente (Figura 4.5D). Luego de estos cambios las plantas son más semejantes en sus patrones de hemimetilación de citosinas externas y metilación en citosinas internas.

Tabla 4.5. Análisis de bandas de MSAP polimórficas analizadas de a pares de la planta UNST1131 (C) y de una planta del cv. Tanganyika (T). El análisis se realizó comparando de a pares el ADN de cada planta en los dos años de muestreo (2003 vs 2007). El estado de metilación se indica con letras: I: metilado en citosina interna, E: metilado en citosina externa, D: sitios desmetilados y M: full metilada en ambas citosinas o cambio de secuencia en el sitio de corte.

Tipo de patrón	Planta T		Planta C	
Sin cambio en el tiempo				
(D/D)	164		172	
(E/E)	14		15	
(I/I)	39		34	
(M/M)	17		1	
Total	234	85,4%	222	81%
Metilaciones en el tiempo				
(E/M)	3		6	
(I/M)	1		16	
(D/M)	5		7	
(D/E)	3		3	
(D/I)	1		1	
Total	13	4,7%	33	12%
Desmetilaciones en el tiempo				
(E/D)	4		0	
(I/D)	18		11	
(M/D)	4		5	
(M/E)	1		2	
(M/I)	0		1	
Total	27	9,9%	19	7%
Total de bandas	274	100%	274	100%

Estos análisis sugieren que existen cambios en el genoma y epigenoma de estas plantas en el tiempo, indicando la existencia de una cierta plasticidad en el genoma de estas plantas. Dado su carácter perenne, es probable que esta plasticidad les permita reacomodarse y enfrentar situaciones ambientales cambiantes. Se han citado casos de movimiento de retrotransposones luego de diferentes situaciones de estrés genómico (en arroz, Hirochika *et al.*, 1996 y en trigo, Echenique *et al.*, 2002). Los dos ejemplos mencionados se refieren a plantas anuales, por lo cual esta situación no se vería traducida en cambios genéticos en la misma planta. En el caso de plantas perennes estos cambios podrían producirse y conducir a estos resultados (12% de cambios en las plantas a lo largo del tiempo). Hay que considerar que una planta se ve expuesta a numerosos estreses ambientales a lo largo de su vida. La acumulación de los efectos de los mismos, sobre todo en especies perennes, podría conducir a un cierto nivel de cambios perdurables en el tiempo. Con respecto a los cambios en el epigenoma con el

tiempo, varios trabajos mencionan variaciones en la metilación y en los patrones de metilación en el desarrollo de las plantas, incluso en plantas anuales como *Arabidopsis thaliana* (Ruiz-García *et al.*, 2005).

En un estudio previo Ochagavía *et al.* (2009 en prensa) encuentran que el nivel de metilación de las plantas tetraploides de pasto llorón es diferente al de la diploide (planta UNST1122), siendo el de estas últimas menor (Tabla 4.6). Si se considera el patrón de metilación (I + E + M), no existen diferencias significativas entre las cuatro plantas, pero en este caso no podemos asegurar en M si la secuencia esta completamente metilada o existe una mutación en la secuencia de nucleótidos en el sitio de corte de la enzima de restricción. Por lo tanto, si se consideran sólo aquellos patrones de metilación “seguros” (I + E), vemos que la planta diploide UNST1122 presenta un nivel de metilación inferior al de las tetraploides. Para discriminar si las bandas consideradas en M están completamente metiladas o existe un cambio en la secuencia de nucleótidos debería utilizarse una técnica más precisa como por ejemplo el análisis de secuencias tratadas con bisulfito (Grunau *et al.*, 2001).

Tabla 4.6. Número de loci que presentan un determinado estado de metilación en las plantas del cv. Tanganyika y en los genotipos UNST1122, UNST1131 y UNST1112 (Tomado de Ochagavía *et al.*, 2009 en prensa). El estado de metilación se indica con letras: I: metilado en citosina interna, E: metilado en citosina externa, D: sitios desmetilados y M: full metilada en ambas citosinas o cambio de secuencia en el sitio de corte.

Estado de metilación	Planta			
	Tanganyika	UNST1122	UNST1131	UNST1112
D	244	239	233	251
I	120 $\left[\begin{array}{l} 36 \\ 7 \end{array} \right]$ 43	125 $\left[\begin{array}{l} 27 \\ 3 \end{array} \right]$ 30	131 $\left[\begin{array}{l} 20 \\ 24 \end{array} \right]$ 44	113 $\left[\begin{array}{l} 42 \\ 5 \end{array} \right]$ 47
E				
M	$\left[\begin{array}{l} 77 \end{array} \right]$	$\left[\begin{array}{l} 95 \end{array} \right]$	$\left[\begin{array}{l} 87 \end{array} \right]$	$\left[\begin{array}{l} 66 \end{array} \right]$
Total	364	364	364	364

Secuenciación de las bandas diferenciales

De las bandas amplificadas con las técnicas de AFLPs y MSAP se seleccionaron las bandas diferenciales más nítidas, se clonaron y se secuenciaron. En la Tabla 4.7 se presentan las bandas secuenciadas con las homologías halladas en las bases de datos del NCBI (BLASTn y tBLASTx en la colección de nucleótidos de plantas), TAIR

(BLASTX; en colección de proteínas de plantas) y GRAMENE (BLASTN; sensibilidad media; *Oryza sativa*). En el Anexo se encuentran las secuencias de nucleótidos de las bandas secuenciadas.

De la información presentada en la Tabla 4.7 se puede concluir que seis secuencias mostraron similitud con elementos móviles o repetitivos, una con una proteína reparadora del ADN en células con xeroderma pigmentosum, una asociada a un marcador del cromosoma sexual Y de *Rumex acetosa* y una con similitud a una secuencia que actúa como prion. Xeroderma pigmentosum es una enfermedad caracterizada por una elevada sensibilidad a los rayos UV resultando en lesiones y cáncer de piel y ojos, que se debe a una falla en los mecanismos de reparación del ADN, especialmente de escindir dímeros de timina.

La banda correspondiente al locus 1B fue obtenida a través de la técnica de MSAP y corresponde a una secuencia que se encuentra metilada en la citosina externa en C1 (ADN de UNST1131 del año 2003) y completamente metilada o con cambio del sitio en C2 (ADN de UNST1131 del año 2007). Esta secuencia presenta una alta homología con el dominio core integrasa y transcriptasa reversa de retrotransposones. El mapeo *in silico* de esta secuencia en el genoma de arroz reveló que la misma se encuentra ubicada en el sector distal del brazo largo del cromosoma 12, en la región cercana a las sondas C901, R1759, C996A, C1069 y C454 que se encontraron ligadas 100% a aposporía en tres especies de *Paspalum* (*P. simplex*, *P. malacophyllum* y *P. notatum*) (Pupilli *et al.*, 2001; Stein *et al.*, 2004). Por lo tanto, esta secuencia es una candidata interesante, dado que se trata de un retrotransposón que actualmente se encuentra completamente metilado y no lo estaba en el año 2003 en la planta colchipoide, pero si lo estaba en la planta apomíctica. Además se encuentra en una región que ha sido asociada previamente a la apomixis apospórica (Pupilli *et al.*, 2001; Stein *et al.*, 2004). Otras secuencias también presentaron alta homología con retrotransposones como los locus 12A, 12C y 14B. Todas las secuencias mencionadas previamente fueron halladas con MSAP, indicando diferencias en la metilación. La relación entre apomixis y metilación ha sido observado también por otros trabajos (Rodríguez y Koltunow, 2005; Köhler *et al.*, 2003) indicando una regulación epigenética sobre la apomixis.

Tabla 4.7. Análisis de similitud de algunas de las secuencias diferenciales obtenidas por AFLPs y MSAP utilizando las herramientas de BLAST disponibles en los sitios NCBI, Gramene y TAIR. Se compararon muestras de Tanganyika (T) y UNST1131 (C) año 2007 (1) y de cuatro años atrás, año 2003 (2), cortadas con las enzimas *MspI* (m) y *HpaII* (h). Los números 0 y 1 indican ausencia o presencia, respectivamente, de banda en las muestras T1m, T1h, C1m, C1h, T2m, T2h, C2m, C2h, respectivamente.

	Origen	NCBI (BLASTn; colección de nucleótidos de plantas)	e Value	NCBI (tBLASTx; colección de nucleótidos de plantas)	e Value
1B (MSAP)	(0/0/0/1/0/0/0/0) Metilado en citosina externa en C1 y full metilado o cambio sitio en C2	4346424 Os09g0121600 <i>Oryza sativa</i> grupo japonica ARNm	$2 e^{-36}$	4346424 Os09g0121600 <i>O. sativa</i> grupo japonica, ARNm (completo) La proteína presenta regiones homólogas al dominio core de Integrasa y a transcriptasa reversa	$5e^{-37}$
2B (MSAP)	(0/0/1/0/0/0/1/0/) No hubo cambios en el tiempo, pero cambios entre plantas metilado en citosina interna en las C	AY170863. <i>Triticum aestivum</i> cv. Chinese Spring, cromosoma 5AL Q locus región, secuencia genómica	0.15	EF567062.1 <i>T. aestivum</i> cv. Glenlea, clon BAC 1648_464 proteína de resistencia a enfermedad (Lr1) región genómica. Se encuentra presente como región repetitiva en retrotransposones: WHAM- 1(tipo athila); retrotransposón Sabrina-1(tipo copia); retrotransposón Fatima-1(tipo gypsy); y otros	0.049
3A (MSAP)	(1/1/1/0/1/1/1/1) C1 con metilación en citosina interna y C2 desmetilada	AM472119.2 <i>Vitis vinifera</i> , consenso VV78X256381.2, secuencia del genoma	0.63	AK241303.1 <i>Oryza sativa</i> grupo japonica, ADNc. Proteína hipotética con un dominio tipo tirosinasa	0.62
4A (MSAP)	(0/0/1/0/1/1/1/1) T1 full metilada o cambio sitio y T2 desmetilada, C1 metilada en citosina int y C2 desmetilada	DQ414511.1 <i>Secale cereale</i> , clone R4-6 secuencia genómica	0.4	NM_001060851.1 <i>Oryza sativa</i> grupo japonica. 4337460 Os04g0685200 <i>Oryza sativa</i> grupo japonica, ARNm (parcial). Proteína hipotética con región homóloga con familia peptidasa aspartica	0.63
12A (MSAP)	(0/0/1/0/0/0/0/0) C1 metilada en citosina interna y C2 full metilada o cambia sitio	AP008212. <i>O. sativa</i> grupo japonica, ADN genómico, cromosoma 6. Regiones genómicas de cromosoma 6, 8, 5, 4, 10, 11, 9, 7 de <i>O. sativa</i> .	0.007	DQ146401.1 <i>T. aestivum</i> , precursor quimera Ch7 gama-gliadina/LMW- glutenina	1.1
12B (MSAP)	(0/0/1/0/0/0/0/0) C1 metilada en citosina interna y C2 full metilada o cambia sitio	AC093612.18 <i>O. sativa</i> grupo japonica, cromosoma 10 clon JNBa0003P07	$6 e^{-04}$	AC184091.2 <i>Populus trichocarpa</i> clon Pop1- 64B3 dbj AK110036.1 <i>O. sativa</i> grupo japonica, ADNc. La secuencia proteica presenta 50% de identidad con una proteína de <i>S. cerevisiae</i> con dominio N-terminal rico en Q que actúa como prion.	0.037 1.7

Tabla 4.7. Continuación

	Origen	NCBI (BLASTn; colección de nucleótidos de plantas)	e Value	NCBI (tBLASTx; colección de nucleótidos de plantas)	e Value
12C (MSAP)	(0/0/1/0/0/0/0) C1 metilada en citosina interna y C2 full metilada o cambia sitio	EF081015.1 <i>Hieracium pilosella</i> , clon HP3B secuencia microsatélite	1.8	AM427842.2 <i>Vitis vinifera</i> , secuencia del genoma	1.5
14B (MSAP)	(0/0/0/1/0/0/0/0) C1 metilada en citosina externa y C2 full metilada o cambia sitio	AJ969546.1 <i>Trebouxia</i> fotobionte, gen 18S ARNr (parcial), ITS1, gen 5.8S ARNr, ITS2 y gen 26S ARNr (parcial) AY522660.1 <i>Rumex acetosa</i> secuencia específica del cromosoma Y, DOP- PCR/AFLP producto- 433	5×10^{-9}	AY520575.1 <i>Rumex acetosa</i> , secuencia el marcador masculino Y-9. Os02g0575700 <i>O. sativa</i> grupo japónica, proteína hipotética	0,17 1,6
1A1 (AFLP)	(1/1/0/0) Banda que desaparece en nuevas	BT018558.1 <i>Zea mays</i> , clon EL01N0439H08.d secuencia ARNm (NP_001105584.12,3- mutasa bisfosfoglicerato- independiente de fosfoglicerato)	6×10^{-9}	EF108763.1 <i>T. aestivum</i> , cepa CRB-INRA- CFD-15658 gen proteína Bp2A	0.004
2A1 (AFLP)	(1/1/1/0) Banda desaparece en C2	no		AT5G26190 <i>A. thaliana</i> , proteína con dominio DC1 [0.076
4A5 (AFLP)	(1/0/1/1) Banda presente en C2 y ausente en C1	AC215380.2 <i>Solanum lycopersicum</i> , cromosoma 2 clon C02HBa0090001	0.3	no	
6A2 (AFLP)	(1/1/0/1) Banda de T1 falta en T2	no		BT018967.1 <i>Zea mays</i> , clon consenso363.F secuencia ARNm (NP_173240.2 proteína familia nucleotidiltransferasa <i>A. thaliana</i> con 68% de identidad)	0.13
7A2 (AFLP)	(0/0/0/1) Banda presente en C2 ausente en C1	NM_180263.2 <i>A. thaliana</i> , ARNm Gen ID: 820890 PBP1 PBP1 (PYK10-binding protein 1)	0.006	no	

Tabla 4.7. Continuación

	Origen	TAIR (BLASTx; colección de proteínas de plantas)	e Value	GRAMENE (BLASTn; sensibilidad media; <i>Oryza sativa</i>)	e Value
1B (MSAP)	(0/0/0/1/0/0/0/0) Metilado en citosina externa en C1 y full metilado o cambio sitio en C2	77551553 ABA94350.1 <i>Oryza sativa</i> grupo japónica, proteína retrotransposón, posible clase Ty1-copia	$6 e^{-27}$	Alta homología con proteínas de retrotransposones (no clasificadas) en todo el genoma. La mayor homología en cromosoma 12 ($1e^{-23}$) da con proteínas de retrotransposones (LOC_Os12g01790) al lado de sondas ligadas a aposporia en especies de <i>Paspalum</i>	$1e^{-30}$ a $1e^{-23}$
2B (MSAP)	(0/0/1/0/0/0/1/0/) No hubo cambios en el tiempo, pero cambios entre plantas metilado en citosina interna en las C	no		Baja homología con proteínas de retrotransposones del tipo Ty3 gypsy en cromosomas 11 (LOC_Os11g22430), 1 (LOC_Os01g62800) y 8 (LOC_Os08g22540)	1.8
3A (MSAP)	(1/1/1/0/1/1/1/1) C1 con metilación en citosina interna y C2 desmetilada	no		no	
4A (MSAP)	(0/0/1/0/1/1/1/1) T1 full metilada o cambio sitio y T2 desmetilada, C1 metilada en citosina interna y C2 desmetilada	no		Baja homología con precursor de alfa-N-arabinofuranosidasa 1 (LOC_Os07g48750) del cromosoma 7; proteína hipotética conservada (LOC_Os10g40324) del cromosoma 10; y subunidad alfa proteosoma tipo 7 (LOC_Os09g36710) del cromosoma 9.	1.8
12A (MSAP)	(0/0/1/0/0/0/0/0) C1 metilada en citosina interna y C2 full metilada o cambia sitio	78059081 ABB17941.1 <i>T. aestivum</i> , precursor quimera Ch7 gama-gliadina/LMW-glutenina	1.3	Alta homología con regiones intergénicas de todo el genoma y algunas proteínas. La de mayor homología es proveniente de retrotransposones de tipo Ty3 gypsy (LOC_Os12g14410) del cromosoma 12	$1 e^{-12}$
12B (MSAP)	(0/0/1/0/0/0/0/0) C1 metilada en citosina interna y C2 full metilada o cambia sitio	no		Homología con regiones intergénicas de cromosomas 1, 7 y 2; y con proteína de retrotransposón (no clasificada) LOC_Os10g12010 en el cromosoma 10	0.45
12C (MSAP)	(0/0/1/0/0/0/0/0) C1 metilada en citosina interna y C2 full metilada o cambia sitio	no		Baja homología con posible proteína reparadora del ADN de células xerodema pigmentosum, expresada (LOC_Os08g33082) en cromosoma 8 y con proteína expresada (LOC_Os05g06530) del cromosoma 5.	3.1
14B (MSAP)	(0/0/0/1/0/0/0/0) C1 metilada en citosina externa y C2 full metilada o cambia sitio	no		Homología (baja) con secuencias intergénicas de cromosoma 10, 7, 3 y 1, aunque la mayor homología la presenta con acil-coenzima A tioesterasa, posible precursor mitocondrial (LOC_Os09g34190) del cromosoma 9.	2.3

Tabla 4.7. Continuación

	Origen	TAIR (BLASTx; colección de proteínas de plantas)	e Value	GRAMENE (BLASTn; sensibilidad media; <i>Oryza sativa</i>)	e Value
1A1 (AFLP)	(1/1/0/0) Banda que desaparece en T2 y C2	14532690 AAK64146.1 <i>A. thaliana</i> , posible 2,3-bisfosfoglicerato-mutasa	0.005	<i>O. sativa</i> , región no codificante del cromosoma 5, sin genes cercanos	0.0002
2A1 (AFLP)	(1/1/1/0) Banda que desaparece en C2	15239620 NP197991.1 <i>A. thaliana</i> , proteína con dominio DC1 Proviene de: AT5G26190.1p	0.4	no	
4A5 (AFLP)	(1/0/1/1) Banda presente en C2 y ausente en C1	2464888 CAB16765.1 <i>A. thaliana</i> , proteína APETALA2	4.2	NP_001060279.1 LOC_Os07g42500 <i>O. sativa</i> , posible proteína asociada a la senescencia (intrón)	0.12
6A2 (AFLP)	(1/1/0/1) Banda de T1 falta en T2	15231009 NP188635.1 <i>A. thaliana</i> , proteína con dominios SNF2 / helicasa y RING finger	2.7	no	
7A2 (AFLP)	(0/0/0/1) Banda presente en C2 ausente en C1	45772999 CR381518.1 <i>A. thaliana</i> , inserción de transposón STS GT5.101454	0.94	LOC_Os10g22039 <i>O. sativa</i> , proteína translocasa/ posible proteína transportadora (intrón)	2.9

Rumex acetosa se caracteriza por ser una especie dioica que posee cromosomas sexuales heteromórficos y el macho posee tres cromosomas sexuales (XY₁Y₂). En el género *Rumex* (Poligonaceae) se menciona la existencia de apomixis o poliembriónía (Carman, 1997), sin embargo no se hallaron claras evidencias en la literatura. Aunque no se hallaron estudios que vinculen la apomixis con la presencia de cromosomas sexuales, la similitud entre la secuencia del marcador 14B de MSAP y el marcador del cromosoma Y de *R. acetosa* no deja de ser un punto de partida para nuevas observaciones.

De ocho secuencias analizadas por la técnica de MSAP seis mostraron similitud con retrotransposones y de cinco secuencias de AFLPs todas mostraron similitud con secuencias génicas. En ambos casos, cada vez que se obtuvo una homología fuerte fue con retrotransposones. Es decir que los cambios de metilación en el tiempo parecen estar ocurriendo en elementos transponibles.

Los cambios detectados con las técnicas de AFLPs y MSAP podrían atribuirse a la actividad de retrotransposones, cuyo movimiento, no azaroso, como se desprende de los resultados encontrados por Mecchia *et al.* (2007), podrían estar afectando una o varias regiones determinantes del modo reproductivo.

Retrotransposones en genotecas de ADNc de pasto llorón

La posibilidad de contar con genotecas de ESTs de plantas de una serie que reúne, en un mismo fondo genético, diferentes niveles de ploidía y distinto modo reproductivo (cv. Tanganyika, UNST1122 y UNST1131) representa una excelente herramienta para evaluar el estado de actividad de los elementos móviles en el genoma de las mismas. Para ello se buscaron secuencias de retrotransposones conocidos o potenciales en una base de datos de secuencias (TIGR) y con el uso del algoritmo BLAST (BLASTn) se buscaron secuencias similares en las genotecas de unigenes y de ESTs de pasto llorón. Los resultados se expresaron como cantidad de secuencias en las genotecas que presentaron similitud con secuencias de retrotransposones o potenciales retrotransposones como porcentaje del total de secuencias en cada genoteca.

De los dos criterios que se tuvieron en cuenta para establecer el límite de similitud ($\text{Score} \geq 100$ y $e\text{-Value} \leq e^{-10}$), en ambos casos los valores relativos fueron similares, aunque en el segundo caso, al ser menos restrictivo los porcentajes de secuencias con similitud fueron mayores. Lo mismo aconteció al utilizar las genotecas de unigenes y ESTs, los valores relativos fueron similares y los porcentajes fueron mayores en el caso de las genotecas de ESTs. En la Tabla 4.8 se muestran los resultados de este análisis como porcentaje de secuencias de unigenes que presentan similitud con retrotransposones sobre el total de unigenes.

Tabla 4.8. Fracción de unigenes de inflorescencias y hojas de pasto llorón que presentaron similitud con secuencias conocidas de retrotransposones o similares presentes en las bases de datos de TIGR de maíz (%).

Genoteca	Score ≥ 100	e Value $\leq e^{-10}$	Genotipo (órgano utilizado)
EC01	0,81	0,98	UNST1122 inflorescencia
EC02	0,43	0,56	Tanganyika inflorescencia
EC03	0,84	0,84	Tanganyika hojas
EC04	1,08	1,20	UNST1131 inflorescencia

Los resultados de este análisis indican que en la genoteca de inflorescencias de la planta Tanganyika (tetraploide apomíctica) existe un porcentaje menor de secuencias similares a retrotransposones transcripcionalmente activos en comparación con las genotecas de inflorescencias de las plantas UNST1122 (diploide sexual) y UNST1131 (tetraploide

altamente sexual, ya que las genotecas se realizaron en el año 2003). El test de Chi cuadrado de comparación de medias de a pares, indica que las diferencias observadas son altamente significativas. La mayor actividad de retrotransposones observada en las plantas sexuales podría deberse, en función de todo lo expuesto previamente, a las situaciones de estrés por las que pasaron durante el cultivo *in vitro* y posterior tratamiento de poliploidización. También se observa, al igual que en otros trabajos, una mayor expresión de secuencias de potenciales retrotransposones en genotecas de hojas comparado con aquellas de inflorescencias (Echenique *et al.*, 2002).

Otros resultados del grupo de trabajo

En el año 2008 se publicó la construcción y caracterización de cuatro genotecas de ESTs (Cervigni *et al.*, 2008a), mencionadas en varias oportunidades en esta tesis. Este estudio a nivel del transcriptoma permitió formular una hipótesis acerca de la expresión de la apomixis en la serie euploide. La misma se basa en la existencia de un grupo de 50 genes que muestran una expresión aumentada luego de la poliploidación. Estos genes no estarían activos en el diploide sexual ni en el tetraploide apomítico y podrían ser el nexo entre la poliploidía y la apomixis. La hipótesis de Cervigni *et al.* (2008b) sería que se requiere de una reestructuración del transcriptoma para mantener la sexualidad en los poliploides, siendo la apomixis, probablemente, debida a una falla en este mecanismo.

Nueva hipótesis

Los resultados de esta tesis apoyarían esta hipótesis con la salvedad de que, luego de un tiempo, por alguna razón, la sexualidad se silencia y comienza a predominar en la planta la apomixis. Como se informara en el Capítulo 1 en el banco de germoplasma de USDA (Estados Unidos) se encuentran materiales tetraploides sexuales (Voigt, 1976). Uno de ellos, PI 574506, desarrollado por un programa de mejoramiento de Texas, fue recibido en el año 2008 y sembrado en el invernáculo del CERZOS-UNS. El análisis reciente de 160 sacos embrionarios, realizado entre septiembre y octubre de 2008, demostró que este genotipo es completamente sexual. Si bien se continuarán los estudios esta evidencia parecería indicar que existe una diferencia entre las plantas colchiploides y el PI 574506, completamente sexual (ausencia total de sacos embrionarios apomíticos).

Esta diferencia podría estar dada por la presencia, en las plantas apomícticas, de una o dos regiones sujeta/s a control epigenético.

Siguiendo con este análisis surge que la planta diploide de la serie euploide tendría la/s región/nes determinante/s del carácter. Aunque la apomixis no se manifiesta en el diploide ni en su progenie diploide, dado que nunca se observaron en estas plantas evidencias de este tipo de reproducción, la/s región/es estarían presentes. Al aumentar el nivel de ploidía, en el tetraploide de reciente formación, la sexualidad aún se expresaría. Si las plantas carecen de la región de diplosporía, permanecerían sexuales. Al estar presente esta región, se silenciaría la sexualidad y se expresaría el carácter.

Conclusiones

Las plantas diploides de *Eragrostis curvula* son completamente sexuales. Las plantas de mayor nivel de ploidía son, en general altamente apomícticas. Algunas plantas tetraploides pueden presentar sexualidad en alto grado, como las colchiploides recientes. Otras son completamente sexuales, como el material PI 574506 del USDA. Estas evidencias indicarían la existencia de una región (o dos) determinantes del carácter apomixis. Esta/s región/es estaría/n ausente/s en las tetraploides completamente sexuales. Las plantas apomícticas pueden desreprimir la sexualidad ante situaciones que provoquen choques genómicos, indicando un control epigenético del carácter.

La/s región/nes también estarían presentes en la planta diploide de la serie euploide, pero no se expresa. Una hipótesis para explicar este fenómeno podría basarse en los mecanismos de silenciamiento que existen en las plantas dependientes del número de copias de ciertos genes. Este mecanismo es dependiente de los ARN de interferencia, ARNi (Yang *et al.*, 2007). Los ARNi cumplen un rol muy importante en la regulación génica y también en la respuesta a estreses (Sunkar *et al.*, 2007)

Bibliografía

- Adamowski, E., M. Pagliarini, A. Mendes Bonato, L. Rocha Batista y J. Montenegro Valls. 2005.** “Chromosome numbers and meiotic behavior of some *Paspalum* accessions”. *Gen. Mol. Biol.*, 28:773-80.
- Adams, M., J. Keller, J. Gocayne, M. Dubnick, M. Polymeropoulos, H. Xiao, C. Merrill, A. Wu, B. Olde, R. Moreno, A. Kerlavage, W. McCombie y J. Venter. 1991.** “Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project”. *Science*, 252:1651-6.
- Aionesei, T., A. Touraev y E. Heberle-Bors. 2005.** “Pathways to microspore embryogenesis”. En: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 56, Haploids in Crop Improvement II, Eds. C. Palmer, W. Keller y K. Kasha, Springer Verlag, Berlin, Alemania, pag. 11-34.
- Akiyama, Y., J. Conner, S. Goel, D. Morishige, J. Mullet, W. Hanna y P. Ozias-Akins. 2004.** “High resolution physical mapping in *Pennisetum squamulatum* reveals extensive chromosomal heteromorphism of genomic region associated with apomixis”. *Plant Physiol.*, 134:1733-41.
- Albertini, E., A. Porceddu, F. Ferranti, L. Reale, G. Barcaccia, B. Romano, M. Falcinelli. 2001.** “Apospory and parthenogenesis may be uncoupled in *Poa pratensis*: a cytological investigation”. *Sex. Plant Reprod.*, 14:213-7.
- Alleman, M. y J. Doctor. 2000.** “Genomic imprinting in plants: observations and evolutionary implications”. *Plant Mol. Biol.*, 43:147-61.
- Altschul, S., T. Madden, A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller y D. Lipman. 1997.** “Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs”, *Nucleic Acids Res.*, 25:3389-3402.
- Araújo, A., J. Nobrega, M. Pozzobon y V. Carneiro. 2005.** “Evidence of sexuality in induced tetraploids of *Brachiaria brizantha* (Poaceae)”. *Euphytica*, 144:39-50.
- Arnholdt-Schmitt, B. 2000.** “RAPD analysis: a method to investigate aspects of the reproductive biology of *Hieracium perforatum*”. *Theor. Appl. Genet.*, 100:906-11.
- Asker, S. 1967.** “Induced sexuality after chromosome doubling in an apomictic *Potentilla argentea* biotype”. *Hereditas*, 57:339-42.
- Asker, S. y L. Jerling. 1992.** “Apomixis in plants”. CRC Press, Boca Raton, USA.
- Assefa, K., A. Merker y H. Tefera. 2003.** “ISSR analysis of genetic diversity in *tef*”. *Hereditas*, 139:174-83.
- Ayele, M., J. Dolezel, M. Van Duren, H. Brunner y F. Zapata-Arias. 1996.** “Flow cytometric analysis of nuclear genome of the Ethiopian cereal *tef* [*Eragrostis tef* (Zucc.) Trotter]”. *Genetica* 98:211-5.
- Ayele, M. y T. Nguyen. 2000.** “Evaluation of amplified fragment length polymorphism markers in *tef*, *Eragrostis tef* (Zucc.) Trotter, and related species”. *Plant Breed.*, 119:403-9.
- Ayele, M., H. Tefera, K. Assefa y H. Nguyen. 1999.** “Genetic characterization of two *Eragrostis* species using AFLP and morphological traits”. *Hereditas*, 130:33-40.
- Bai, G., M. Ayele, H. Tefera y H. Nguyen. 2000.** “Genetic diversity in *tef* and its relatives as revealed by RAPDs”. *Euphytica*, 112:15-22.
- Bailey, D. 1983.** “Isozymic variation and plant breeder’s rights”. En: *Isozymes in plant genetics and breeding*, Part A. Ed. S. Tanksley, y J. Orton, Elsevier, Amsterdam, pag. 425-41.
- Barrett, B., A. Griffiths, M. Schreiber, N. Ellison, C. Mercer, J. Bouton, B. Ong, J. Forster, T. Sawbridge, G. Spangenburg, G. Bryan y D. Woodfield. 2004.** “A microsatellite map of white clover”. *Theor. Appl. Genet.*, 109:596-608.

- Bavera, G. y C. Peñafort. 2005.** “El pasto llorón (lovegrass) *Eragrostis curvula* (Schader) Nees”. Curso de Producción Bovina de Carne, FAV UNRC, www.produccion-animal.com.ar.
- Beckmann, J. y M. Soller. 1986.** “Restriction fragment length polymorphisms in plant genetic improvement”. Oxford Surveys Plant Mol. Biol. Cell. Biol., 3:197-250.
- Bennett, M. y J. Smith. 1976.** “Nuclear DNA amounts in angiosperms”. Phil. Trans. Royal Soc. London, Series B, 274:227-74.
- Berthaud, J. 2001.** “Apomixis and the management of genetic diversity”. En: The flowering apomixis: from mechanisms to genetic engineering. Eds. Y. Savidan, J. Carman y T. Dresselhaus, Mexico D.F., European Commission DG VI (FAIR), Cap. 2, pag. 8-23.
- Bicknell, R. 1997.** “Isolation of a diploid, apomictic plant of *Hieracium aurantiacum*”. Sex Plant Reprod. 10:168-72.
- Bicknell, R y K. Bicknell. 1999.** “Who will benefit from apomixis?”. Biotechnol. Dev. Mon., 37:17-20.
- Bicknell, R., N. Borst y A. Koltunow. 2000.** “Monogenic inheritance of apomixis in two *Hieracium* species with distinct developmental mechanisms”. Heredity 84:228-37.
- Bicknell, R. y A. Koltunow. 2004.** “Understanding apomixis: recent advances and remaining conundrums”. Plant Cell 16:S228-45.
- Bingham, J. 1966.** “Varietal response in wheat to water supply in the field, and male sterility caused by a period of drought in a glasshouse experiment”. Ann. Appl. Biol., 57:365-77.
- Bonilla, J. y C. Quarín. 1997.** “Disposporous and aposporous apomixis in a pentaploid race of *Paspalum minus*”. Plant Sci., 127:97-104.
- Brix, K. 1974.** “Sexual reproduction in *Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees”. Z. Pflanzenzuchtg, 71:25-32.
- Brix, K. 1977.** “The influence of the day length on the relationship of sexual and asexual embryo sacs in *Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees”. Proc. 6th Congr. South African Gen. Soc., Pretoria, pag. 170-7.
- Brown, W. y W. Emery. 1958.** “Apomixis in the Gramineae: Panicoideae”. Am. J. Bot., 45:253-63.
- Buiatti, M. y P. Bogani. 1998.** “Exploiting genome plasticity for the detection of hypervariable sequences”. En: Molecular tools for screening biodiversity, Ed. A. Karp, P. Isaac y D. Ingram, Chapman & Hall, London, pag. 471-84.
- Burson, B. y C. Tischler. 1993.** “Regeneration and somaclonal variation in apomictic *Paspalum dilatatum* Poir”. Euphytica, 67:71-8.
- Burson, B. y P. Voigt. 1996.** “Cytogenetic relationships between the *Eragrostis curvula* and *E. lehmanniana* complexes”. Int. J. Plant Sci., 157:632-7.
- Busey, P. y N. Wright. 1978.** “Sexual reproduction expressed in *Eragrostis curvula*”. J. Arizona-Nevada Acad. Sci., 13:62-4.
- Caetano-Anollés, G. 2005.** “Evolution of genome size in the grasses”. Crop Sci., 45:1809-16.
- Cairns, J. y P. Foster. 1991.** “Adaptive reversion of a frameshift mutation in *Escherichia coli*”. Genetics, 128:695-701.
- Calderini, O., S. Chang, H. de Jong, A. Busti, F. Paolocci, S. Arcioni, S. de Vries, M. Abma-Henkens, R. Klein Lankhorst, I. Donnison y F. Pupilli. 2006.** “Molecular cytogenetics and DNA sequence analysis of an apomixis-linked BAC in *Paspalum simplex* reveal a non pericentromere location and partial microcolinearity with rice”. Theor. Appl. Genet., 112:1179-91.

- Carcellar, M., M. Larrazábal, J. Duhart y A. Díaz. 1980.** “Resistencia al frío y a la sequía de distintos cultivares de *Eragrostis curvula*, *E. chloromelas*, *E. robusta* y *E. lehmanniana*”. Rev. Invest. Agropec., 15:373-80.
- Cardone, S. 2006.** “Caracterización de nuevo germoplasma de pasto llorón obtenido por métodos biotecnológicos y su utilización para el estudio de la apomixis”. Tesis Doctoral, Universidad Nacional del Sur.
- Cardone, S., P. Polci, J. Selva, M. Mecchia, S. Pessino, P. Hermann, V. Cambi, P. Voigt, G. Spangenberg, V. Echenique. 2006.** “Novel genotypes of the subtropical grass *Eragrostis curvula* the study of apomixis”. Euphytica, 151:263-72.
- Carman, J. 1997.** “Asynchronous expression of duplicate genes in angiosperms may cause apomixis, bispory, tetraspory and polyembryony”. Biol. J. Linn. Soc., 61:51-94.
- Carman, J., C. Crane y O. Riera-Lizarazu. 1991.** “Comparative histology of cell walls during meiotic and apomictic megasporogenesis into hexaploid australasian *Elymus species*”. Crop Sci., 31:1527-32.
- Casa, A., S. Mitchell, C. Lopes y J. Valls. 2002.** “RAPD analysis reveals genetic variability among sexual and apomictic *Paspalum dilatatum* biotypes”. J. Heredity, 93:300-2.
- Catanach, A., S. Erasmuson, E. Podivinsky, B. Jordan y R. Bicknell. 2006.** “Deletion mapping of genetic regions associated with apomixis in *Hieracium*”. Proc. Natl. Acad. Sci. USA,
- Ceplitis, A. 2001.** “Genetic and environmental factors affecting reproductive variation in *Allium vineale*”. J. Evol. Biol., 14:721-30.
- Cervigni, G., N. Paniego, M. Diaz, J. Selva, D. Zappacosta, D. Zanazzi, I. Landerreche, S. Felitti, S. Pessino, G. Spangenberg y V. Echenique. 2008a.** “Expressed sequence tag analysis and development of gene associated markers in a near-isogenic plant system of *Eragrostis curvula*”. Plant Mol. Biol., 67:1-10.
- Cervigni, G., N. Paniego, S. Pessino, M. Diaz, J. Selva, G. Spangenberg y V. Echenique. 2008b.** “Gene expression in diplosporous and sexual *Eragrostis curvula* genotypes with differing ploidy levels”. Plant Mol. Biol., 67:11-23.
- CIMMYT, 2006.** “Protocolos de laboratorio: Laboratorio de genética molecular aplicada del CIMMYT”. Tercera edición, CIMMYT, Méjico D. F., Méjico.
- Collard, B., M. Jahufer, J. Brouwer y E. Pang. 2005.** “An introduction to markers, QTL mapping and marker-assisted selection for crop improvement: the basic concepts”. Euphytica, 142:169-96.
- Colom, M y C. Vazzana. 2001.** “Drought stress effects on three cultivars of *Eragrostis curvula*: photosynthesis and water relations”. Plant Growth Regulation, 34:195–202
- Covas, G. 1991.** “Taxonomía y morfología del pasto llorón [*Eragrostis curvula* (Schrad.), Nees], con referencias sobre otras especies cultivadas de *Eragrostis*”. En: El pasto llorón, su biología y manejo. Eds. O. Fernández, R. Brevedad y A. Gargano, CERZOS y Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina, pag. 7-17.
- Covas, G y A. Cairnie. 1985.** “El Pasto Llorón. Manual con Información Básica y Normas para su Cultivo y Utilización”. Editorial Hemisferio Sur, Buenos Aires, Argentina, 76 pag.
- Crawford, D. 1983.** “Phylogenetic and systematic inferences from electrophoretic studies”. En: Isozymes in Plant Genetics and Breeding, Eds. S. Tanksley y T. Orton, Elsevier, Amsterdam, pag. 257-87.
- Crane, C. 2001.** “Classification of apomictic mechanisms”. En: The flowering apomixis: from mechanisms to genetic engineering. Eds. Y. Savidan, J. Carman y T. Dresselhaus, Mexico D.F., European Commission DG VI (FAIR), Cap. 3, pag. 24-43.

- Cronquist, A. 1981.** “Integrated System of Classification of Flowering Plants”. Columbia Univ. Press, Nueva York, EEUU, 1262 pag.
- Cruz, C. e I. Schuster. 2004.** “GQMOL: genética cuantitativa e molecular”. Laboratorio de Bioinformática, Universidad Federal de Viçosa, <http://www.ufv.br/dbg/home3.html>.
- Cullis, C. 1977.** “Molecular aspects of the environmental induction of heritable changes in flax”. *Heredity*, 38:129-54.
- Cullis, C. 2003.** “The environment as an active generator of adaptive genomic variation”. En: *Plant Adaptations to Stress Environments*, Ed. H. Lerner, pag. 149-160.
- Cullis, C. y G. Greissen. 1987.** “Genomic variation in plants”. *Ann Bot. Supp.*, 4:103-3.
- Curtis, M. y U. Grossniklaus. 2008.** “Molecular control of autonomous embryo and endosperm development”. *Sex. Plant Reprod.*, 21:79-88.
- Daurelio, L., F. Espinoza, C. Quarín y S. Pessino. 2004.** “Genetic diversity in sexual diploid and apomictic tetraploid populations of *Paspalum notatum* situated in sympatry or allopatry”. *Plant Syst. Evol.*, 244:189-99.
- Davies, L. y D. Cohen. 1992.** “Phenotypic variation in somaclones of *Paspalum dilatatum* and their seedling offspring”. *Can. J. Plant Sci.*, 72:773-84.
- de Givry, S., M. Bouchez, P. Chabrier, D. Milan y T. Schiex. 2005.** “Carthagene: multipopulation integrated genetic and radiated hybrid mapping”. *Bioinformatics*, 21: 1703-4.
- Díaz, M. 2006.** “Biotecnología aplicada al mejoramiento de la calidad forrajera del pasto llorón, *Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees”. Tesis Doctoral, Universidad Nacional del Sur.
- Díaz, M. y V. Echenique. 2004.** “Biotechnology in forage crops and pasture plants”. En: *Advances in Plant Physiology*, Ed. A. Hemantaranjan. Scientific Publishers, Vol 6., India.
- Díaz, M., V. Echenique, G. Schrauf, S. Cardone, P. Polci, E. Lutz y G. Spangenberg. 2004.** “Aplicación de herramientas biotecnológicas para el mejoramiento de especies forrajeras”. *RIA*. 33:77-104.
- Dixon, R., J. Bouton, B. Narasimhamoorthy, M. Saha, Z. Wang y G. May. 2007.** “Beyond structural genomics for plant science”. *Adv. Agron.*, 95:77-161.
- Dresselhaus, T., J. Carman e Y. Savidan. 2001.** “Genetic engineering of apomixis in sexual crops: a critical assessment of the apomixis technology”. En: *The flowering apomixis: from mechanisms to genetic engineering*. Eds. Y. Savidan, J. Carman y T. Dresselhaus, Mexico D.F., European Commission DG VI (FAIR), Cap. 14, pag. 229-43.
- Dwivedi, S, J. Crouch, D. Mackill, Y. Xu, M. Blair, M. Ragot, H. Upadhyaya y R. Ortiz. 2007.** “The molecularization of public sector crop breeding: progress, problems and prospects”. *Adv. Agron.*, 95:163-318.
- Ebina, M., H. Nakagawa, T. Yamamoto, H. Araya, S. Tsuruta, M. Takahara y K. Nakajima. 2005.** “Co-segregation of AFLP and RAPD markers to apospory in guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.)”. *Grassland Sci.*, 51:71-8.
- Echenique, V. 1987.** “Algunas claves bioquímicas, físicas y anatómicas para el estudio de la resistencia a la sequía en pasto llorón, *Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees”. Tesis Doctoral, Universidad Nacional del Sur.
- Echenique, V., M. Díaz, P. Polci, L. Mroginski. 2001.** “Embryogenic cell suspensions from different explants and cultivars of *Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees”. *Biocell* 25:131-38.

- Echenique, V. y P. Polci. 1994.** “Efecto del estrés hídrico en el estado reproductivo en pasto llorón *Eragrostis curvula* (Schrad) Nees”. Turrialba, 44:189-204.
- Echenique, V., M. Poverene, P. Polci, M. Di Renzo, S. Cardone y N. Frayssinet. 1996a.** “Variabilidad natural y generada por cultivo in vitro en *Eragrostis*”. Biotecnología Aplicada, 13:139-40.
- Echenique, V., P. Polci y L. Mroginski. 1996b.** “Plant regeneration in weeping lovegrass through inflorescence culture”. Plant Cell, Tissue Org. Cult., 46:123-30.
- Echenique, V., B. Stamova, P. Wolters, G. Lazo, V. Carollo y J. Dubcovsky. 2002.** “Frequencies of Ty1-copia and Ty3-gypsy retroelements within the Triticeae EST databases”. TAG, 104:840-4.
- Engel, M., A. Chaboud, C. Dumas y S. McCormick. 2003.** “Sperm cells of *Zea mays* have a complex complement of mRNAs”. Plant Journal, 34:697-707.
- Engler, A. y L. Diels. 1936.** “Syllabus der Pflanzenfamilien”, 11^a ed, Gebrüder Borntraeger, Berlin.
- Evans, G., A. Durrant y H. Rees. 1966.** “Associated nuclear changes in the induction of flax genotrophs”. Nature 212:697-9.
- Evert, R. 2006.** “Esau’s Plant Anatomy. Meristems, Cells, and Tissues of the Plant Body: Their Structure, Function, and Development”, Tercera Edición, John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, USA.
- Fernández, O., R. Brededan y A. Gargano. 1991.** “El pasto llorón su Biología y su Manejo”. CERZOS y Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina, 393 pag.
- Foster, P. y J. Cairns. 1992.** “Mechanisms of directed mutation”. Genetics, 131:783-9.
- Frayssinet, N., S. Cardone, P. Polci, L. Mroginski y V. Echenique. 1999.** “Cytological alterations in *Eragrostis* regenerants”. Cytologia 64:129-35.
- Fulton, T., R. van der Hoeven, N. Eannetta y S. Tanksley. 2002.** “Identification, analysis, and utilization of conserved ortholog set markers for comparative genomics in higher plants”. Plant Cell, 14:1457-67.
- Galitski, T., A. Saldanha, C. Styles, E. Lander y G. Fink. 1999.** “Ploidy regulation of gene expression”. Science, 285:251-4.
- Goel, S., Z. Chen, J. Conner, Y. Akiyama, W. Hanna y P. Ozias-Akins. 2003.** “Delineation by fluorescence in situ hybridization of a single hemizygous chromosomal region associated with aposporous embryo sac formation in *Pennisetum squamulatum* and *Cenchrus ciliaris*”. Genetics, 163:1069-82.
- Goldbach, H. y E. Goldbach. 1977.** “Abscisic acid translocation and influence of water stress on grain abscisic acid content”. J. Exp. Bot., 28:1342-50.
- Gounaris, E., R. Sherwood, I. Gounaris, R. Hamilton y D. Gustine. 1991.** “Inorganic salts modify embryo sac development in sexual and aposporous *Cenchrus ciliaris*”. Sexual Plant Reprod., 4:188-92.
- Grandbastien, M. 1998.** “Activation of plant retrotransposons under stress conditions”. Trends Plant Sci., 3:181-7.
- Grant-Downton, R. y H. Dickinson. 2006.** “Epigenetics and its implications for plant biology 2. The ‘epigenetic epiphany’: epigenetics, evolution and beyond”. Ann. Bot.,
- Grimanelli, D., M. Hernandez, E. Perotti, Y. Savidan. 1997.** “Dosage effects in the endosperm of diplosporous apomictic *Tripsacum*”. Sex. Plant Reprod., 10:279-82
- Grimanelli, D., O. Leblanc, E. Espinoza, E. Perotti, D. Gonzalez de Leon, Y. Savidan. 1998.** “Mapping diplosporous apomixis in tetraploid *Tripsacum*: one gene or several genes?”. Heredity, 80:33-9.
- Grimanelli, D., O. Leblanc, E. Perotti, U. Grossniklaus. 2001a.** “Developmental genetics of gametophytic apomixis”. TiGen, 17:597-604.

- Grimanelli, D., M. Garcia, E. Perotti y O. Leblanc. 2001b.** “Megasporogenesis in diplosporous *Tripsacum* and maize X *Tripsacum* hybrids”. 2nd International Apomixis Conference, APO2001, , Como, Italia, 24-28 de Abril, pag. 23.
- Grimanelli, D., M. Garcia, E. Kaszas, E. Perotti, O. Leblanc. 2003.** “Heterochronic expression of sexual reproductive programs during apomictic development in *Tripsacum*”. *Genetics*, 165:1521-31.
- Grossniklaus, U., C. Spillane, D. Page y C. Kohler. 2001.** “Genomic imprinting and seed development: endosperm formation with and without sex”. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 4:21-7.
- Grunau, C., S. Clark y A. Rosenthal. 2001.** “Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters”. *Nucleic Acids Res.*, 29:e65.
- Guo, W., L. Gong, Z. Ding, Y. Li, F. Li, S. Zhao y B Liu. 2006.** “Genomic instability in phenotypically normal regenerants of medicinal plant *Codonopsis lanceolata*, as revealed by ISSR and RAPD markers”. *Plant Cell Rep.*, 25:896-906.
- Guo, W., R. Wu, Y. Zhang, X. Liu, H. Wang, L. Gong, Z. Zhang y B. Liu. 2007.** “Tissue culture-induced locus-specific alteration in DNA methylation and its correlation with genetic variation in *Codonopsis lanceolata*”. *Plant Cell Rep.*, 26:1297-307.
- Gustafsson, A. 1946.** “Apomixis in higher plants. Part I. The mechanisms of apomixis”. *Lunds Univ. årsskr. N. F. Avd. 2*, 42:1-66.
- Guzmán, N., M. Di Renzo y M. Poverene. 1992.** “Determinación de la variación isoenzimática en progenies de *Eragrostis curvula* (Schrud.) Nees”. *Turrialba*, 42:321-6.
- Hall, B. 1988.** “Adaptive evolution that requires multiple spontaneous mutations. I. Mutations involving an insertion sequence”. *Genetics*, 120:887-97.
- Haluskova, J. y E. Cellarova. 1997.** “RFLP analysis of *Hypericum perforatum* somaclones and their progenies”. *Euphytica* 95:229-35.
- Hermesen, J. 1980.** “Breeding for apomixis in potato: Pursuing a utopian scheme”. *Euphytica*, 29: 595-607.
- Herr, J. 1971.** “A new clearing-squash technique for the study of ovule development in angiosperms”. *Amer. J. Bot.*, 58:785-90.
- Hirochika, H., K. Sugimoto, Y. Otsuki, H. Tsugawa y M. Kanda. 1996.** “Retrotransposons of rice involved in mutations induced by tissue culture”. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:7783-8.
- Holm, S. y L. Ghatnekar. 1996.** “Sexuality and no apomixis found in crossing experiments with diploid *Potentilla argentea*”. *Hereditas*, 125:77-82.
- Holm, S., L. Ghatnekar y B. Bengtsson. 1997.** “Selfing and outcrossing but no apomixis in two natural populations of diploid *Potentilla argentea*”. *J. Evol. Biol.*, 10:343-352.
- Houliston, G., H. Chapman y R. Bicknell. 2006.** “The influence of genotype and environment on the fecundity and facultative expression of apomixis in *Hieracium pilosella*”. *Folia Geobotanica* 41:165–81.
- IBPGR. 1985.** “Report of International Board for Plant Genetic Resources working group on forages for Mediterranean and adjacent semi-arid/arid type areas”. IBPGR Secretaria, Roma, Italia.
- INDEC. 2002.** “Encuesta Nacional Agropecuaria 2001”. Ministerio de Economía, Instituto Nacional de Estadísticas y Censos, 15 pag.
- Iuchi, S., K Yamaguchi-Shinozaki, T. Urao, T. Terao y K. Shinozaki. 1996.** “Novel drought-inducible genes in the highly drought-tolerant cowpea: cloning of cDNAs and

- analysis of the expression of the corresponding genes". *Plant Cell Physiol.*, 37:1073-82.
- Jaccard, P. 1908.** "Nouvelles recherches sur la distribution florale". *Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat.*, 44 :223-70.
- Jacobs, S. 1982.** "Classification in the *Eragrostis curvula* complex in Australia". *Australian Plant Introd. Rev.*, 15:5-14.
- Jain, S. 2001.** "Tissue culture-derived variation in crop improvement". *Euphytica*, 118:153-66.
- Jaligot, E., A. Rival, T. Beul, S. Dussert y J. Verdeil. 2000.** "Somaclonal variation in oil palm (*Elaeis guineensis*): the DNA methylation hypothesis". *Plant Cell Rep.*, 19:684-90.
- Jeffreys, A., V. Wilson y S. Thein. 1985.** "Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA". *Nature*, 314:67-73.
- Jessup, R., B. Burson, G. Burow, Y. Wang, C. Chang, Z. Li, A. Paterson y M. Hussey. 2002.** "Disomic inheritance, suppressed recombination, and allelic interactions govern apospory in buffelgrass as revealed by genome mapping". *Crop Sci.*, 42:1688-94.
- Johansen, D. 1940.** "Plant microtechnique". Mc Graw-Hill Book Co. Inc. New York.
- Johnston, J., A. Jensen, D. Czeschin y H. Price. 1996.** "Environmentally induced nuclear 2C DNA content instability in *Helianthus annuus* (Asteraceae)". *Am. J. Bot.*, 83:1113-20.
- Jones, B., J. Ponti, A. Tavassoli y P. Dixon. 1978.** "Relationships of the Ethiopian cereal T'ef (*Eragrostis tef*): evidence from morphology and chromosome number". *Ann. Bot.*, 42:1369-73.
- Joyce, S., A. Cassells y S. Jain. 2003.** "Stress and aberrant phenotypes in in vitro culture". *Plant Cell Tissue Org. Cult.*, 74:103-21.
- Kaeppler, S., H. Kaeppler y Y. Rhee. 2000.** "Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants". *Plant Mol. Biol.*, 43:179-88.
- Kaeppler, S. y R. Phillips. 1993.** "Tissue culture-induced DNA methylation variation in maize". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:8773-6.
- Kantama, L., T. Sharbel, M. Schranz, T. Mitchell-Olds, S. de Vries y H. de Jong. 2007.** "Diploid apomicts of the *Boechera holboellii* complex display large-scale chromosome substitutions and aberrant chromosomes". *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 104:14026-31.
- Kantety, R., M. La Rota, D. Matthews y M. Sorrells. 2002.** "Data mining for simple sequences repeats in expressed sequence tags from barley, maize, rice, sorghum and wheat". *Plant Mol. Biol.*, 48:501-10.
- Knox, R. 1967.** "Apomixis: seasonal and population differences in a grass". *Science*, 157:325-6.
- Knox, R. y J. Heslop-Harrison. 1963.** "Experimental control of aposporous apomixis in a grass of the Andropogoneae". *Bot. Not.*, 116:127-41.
- Köhler, C., L. Henning, C. Spillane, S. Pien, W. Gruissen y U. Grossniklaus. 2003.** "The polycomb-group protein MEDEA regulates seed development by controlling expression of MADS-box gene *PHERESI*". *Genes Dev.*, 17:1540-53.
- Kojima, A. e Y. Nagato. 1997.** "Discovery of highly apomictic and highly amphimictic dihaploids in *Allium tuberosum*". *Sex. Plant Reprod.*, 10:8-12.
- Koltunow, A. 1993.** "Apomixis: embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules" *Plant Cell*, 5:1425-37.
- Koltunow, A. y U. Grossniklaus. 2003.** "Apomixis: a developmental perspective". *Annu. Rev. Plant Biol.*, 54:547-74.

- Koltunow A., S. Johnson y R. Bicknell. 2000.** “Apomixis is not conserved in related, genetically characterised *Hieracium* plants of varying ploidy”. *Sex. Pl. Reprod.* 12:253-66.
- Konieczny A. y F. Ausubel. 1993.** “A procedure for mapping Arabidopsis mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers”. *Plant J.*, 4:403-10.
- Koperdakova, J., R. Brutovska y E. Cellarova. 2004.** “Reproduction pathway analysis of several *Hypericum perforatum* somaclonal families”. *Hereditas* 140:34-41.
- Kosambi, D. 1944.** “The estimation of map distances from recombination values”. *Ann. Eugen.*, 12:172-5.
- Kubis, S., A. Castilho, A. Vershinin y J. Heslop-Harrison. 2003.** “Retroelements, transposons and methylation status in the genome of oilpalm and the relationship to somaclonal variation”. *Plant Mol. Biol.*, 52:69-79.
- Lagercrantz, U., H. Ellegren y L. Anderson. 1993.** “The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates”. *Nucleic Acids Res.*, 21:1111-5.
- Landegren, U., M. Nilsson y P. Kwok. 1998.** “Reading bits of genetic information: methods for single-nucleotide polymorphism analysis”. *Genome Res.*, 8:769-76.
- Lander, E., P. Green, J. Abrahamson, A. Barlow, M. Daly, S. Lincoln y L. Newburg. 1987.** “Mapmaker an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations”. *Genomics* 1:174-81.
- Larkin, P. y W. Scowcroft. 1981.** “Somaclonal variation - a novel source of variability from cell cultures for plant improvement”. *Theor. Appl. Genet.*, 60: 197-214.
- La Rota, M., R. Kantety, J. Yu y M. Sorrells. 2005.** “Nonrandom distribution and frequencies of genomic and EST derived Microsatellite markers in rice, wheat, and barley”. *BMC Genomics*, 6:23.
- Laspina, N., T. Vega, J. Seijo, A. González, L. Martelotto, J. Stein, M. Podio, J. Ortíz, V. Echenique, C. Quarín y S. Pessino. 2008.** “Gene expression analysis at the onset of aposporous apomixis in *Paspalum notatum*”. *Plant Mol. Biol.*, 67:615-28.
- Lazarides, M. 1997.** “A revision of *Eragrostis* in Australia”. *Aust. Syst. Bot.*, 10:77-187.
- Lebel, E., J. Masson, A. Bogucki y J. Paszkowski. 1993.** “Stress-induced intrachromosomal recombination in plant somatic cells”. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:422-6.
- Leblanc, O., M. Dueñas, M. Hernández, S. Bello, V. Garcia, J. Berthaud e Y. Savidan. 1995a.** “Chromosome doubling in *Tripsacum*: the production of artificial, sexual tetraploid plants“. *Plant Breed.*, 114:226-30.
- Leblanc, O., D. Grimanelli, D. González de León e Y. Savidan. 1995b.** “Detection of the apomictic mode of reproduction in maize-*Tripsacum* hybrids using maize RFLP markers”. *TAG*, 90:1198-203.
- Leblanc, O., J. Peel, J. Carman e Y. Savidan. 1995c.** “Megasporeogenesis and megagametogenesis in several *Tripsacum* species (Poaceae)”. *Am. J. Bot.*, 82:57-63.
- Leblanc, O. y A. Mazzucato. 2001.** “Screening procedures to identify and quantify apomixis”. En: *The flowering apomixis: from mechanisms to genetic engineering*. Eds. Y. Savidan, J. Carman y T. Dresselhaus, Mexico D.F., European Commission DG VI (FAIR), Cap. 9, pag. 121-36.
- Lee, H. y Z. Chen. 2001.** “Protein-coding genes are epigenetically regulated in *Arabidopsis* polyploids”. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 98:6753-8.
- Leigh, J. 1960.** “Some aspects of anatomy, ecology and physiology of *Eragrostis*”. Tesis Ph. D., Universidad de Witwatersrand, Johannesburg, Sudáfrica.

- Leigh, J. 1961.** “Leaf anatomy in certain strains of *Eragrostis* (Beauv.)”. *J. South African Bot.*, 27:141-6.
- Leigh, J. y R. Davidson. 1968.** “*Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees and some other African lovegrasses”. *Plant Introd. Rev. CSIRO*, 5:21-44.
- Lewin, B. 1994.** “Genes V”. Oxford University Press, New York.
- Li, X., X. Yu, N. Wang, Q. Feng, Z. Dong, L. Liu, J. Shen y B. Liu. 2007.** “Genetic and epigenetic instabilities induced by tissue culture in wild barley”. ...
- Liang, P. y A. Pardee. 1992.** “Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction”. *Science*, 257:967-71.
- Linacero, R., E. Freitas Alves y A. Vázquez. 2000.** “Hot spots of DNA instability revealed through the study of somaclonal variation in rye”. *Theor. Appl. Genet.*, 100:506-11.
- Lisch, D. 2009.** “Epigenetic regulation of transposable elements in plants”. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 60:43-66.
- Liu, Z., R. Wang y J. Carman. 1994.** “Hybrids and backcross progenies between wheat (*Triticum aestivum* L.) and apomictic Australian wheatgrass [*Elymus rectisetus* (Nees in Lehm.) A. Löve and Connor]: karyotypic and genomic”. *Theor. Appl. Genet.*, 89:599-605.
- Lucht, J., B. Mauch-Mani, H. Steiner, J. Metraux, J. Ryals y B. Hohn. 2002.** “Pathogen stress increases somatic recombination frequency in *Arabidopsis*”. *Nature Genetics* 30:311-4.
- Madlung A. y L. Comai. 2004.** “The effects of stress on genome regulation and structure”. *Ann. Bot.*, 94:481-95
- Martínez, E. 2001.** “Herencia de la reproducción apomítica e identificación de marcadores moleculares ligados al carácter en *Paspalum notatum*”. Tesis Doctoral, Universidad Nacional de Buenos Aires.
- Martínez, E., E. Hopp, J. Stein, J. Ortiz y C. Quarín. 2003.** “Genetic characterization of apospory in tetraploid *Paspalum notatum* based on the identification of linked molecular markers”. *Mol. Breed.*, 12:319-27.
- Matzk, F., A. Meister y I. Schubert. 2000.** “An efficient screen for reproductive pathways using mature seeds of monocots and dicots”. *Plant J.*, 21:97-108.
- McClintock, B. 1984.** “The significance of responses of the genome to challenge”. *Science* 26:792-801.
- McCouch, S., X. Chen, O. Panaud, S. Temnykh, Y. Xu, Y. Cho, N. Huang, T. Ishii y M. Blair. 1997.** “Microsatellite marker development, mapping and applications in rice genetics and breeding”. *Plant Mol. Biol.*, 35:89-99.
- Mecchia, M., A. Ochogavia, J. Selva, N. Laspina, S. Felitti, L. Martelotto, G. Spangenberg, V. Echenique y S. Pessino. 2007.** “Genome polymorphisms and gene differential expression in a ‘back-and-forth’ ploidy-altered series of weeping lovegrass (*Eragrostis curvula*)”. *J. Plant Physiol.* 164:1051-61.
- Medina, F., M. Risueño y M. Rodríguez-García. 1981.** “Evolution of the cytoplasmic organelles during female meiosis in *Pisum sativum* L.”. *Planta*, 151:215-25.
- Miles, J. 2007.** “Apomixis for cultivar development in tropical forage grasses”. *Crop Sci.*, 47:S238-49.
- Mogie, M. 1988.** “A model for the evolution and control of generative apomixis”. *Biol. J. Linn. Soc.*, 35:127-53.
- Mohan, M., S. Nair, A. Bhagwat, T. Krishna, M. Yano, C. Bhatia y T. Sasaki. 1997.** “Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants”. *Mol. Breed.*, 3:87-103.

- Molinari, L., A. Busto, O. Calderini, S. Arcioni y F. Pupilli. 2003.** “Plant regeneration from callus of apomictic and sexual lines of *Paspalum simplex* and RFLP analysis of regenerated plants”. *Plant Cell Rep.*, 21:1040-6.
- Morgan, J. 1980.** “Possible role of abscisic acid in reducing seed set in water-stressed wheat plants”. *Nature* 285:655-7.
- Morgante, M. y A. Olivieri. 1993.** “PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics”. *Plant J.*, 3:175-82.
- Naumova, T. 1997.** “Apomixis in tropical fodder crops: cytological and functional aspects”. *Euphytica*, 96:93-9.
- Naumova, T., A. Den Nijs y M. Willense. 1993.** “Quantitative analysis of aposporous parthenogenesis in *Poa pratensis* genotypes”. *Acta Bot. Neerl.*, 42:299-312.
- Naumova, T., M. Hayward y M. Wagenvoort. 1999.** “Apomixis and sexuality in diploid and tetraploid accessions of *Brachiaria decumbens*”. *Sex. Plant Reprod.*, 12:43-52.
- Naumova, T. y M. Willense. 1995.** “Ultrastructural characterization of apospory in *Panicum maximum*”. *Sexual Plant Reprod.*, 8:197-204.
- Nicot, N., V. Chiquet, B. Gandon, L. Amilhat, F. Legeai, P. Leroy P, M. Bernard y P. Sourdille. 2004.** “Study of simple sequence repeat (SSR) markers from wheat expressed sequence tags (ESTs)”. *Theor. Appl. Genet.* 109:800-5.
- Nogler, G. 1984a.** “Gametophytic apomixis”. En: *Embryology of Angiosperms*, Ed. B. Johri, Springer Verlag, Berlin, pag. 475-518.
- Nogler, G. 1984b.** “Genetics of apospory in apomictic *Ranunculus auricomus*. V. Conclusion”. *Bot. Helv.* 92:411-23.
- Noirot, M. 1993.** “Allelic ratios and sterility in the agamic complex of the Maximae (Panicoideae) : evolutionary role of the residual sexuality”. *J. Evol. Biol.*, 6: 95-101.
- Noirot, M., D. Couvet, S. Hamon. 1997.** “Main role of self-pollination rate on reproductive allocations in pseudogamous apomicts”. *Theor. Appl. Genet.*, 95:479-83.
- Norrmann, G., C. Quarín y B. Burson. 1989.** “Cytogenetics and reproductive behavior of different chromosome races in six *Paspalum* species”. *J. Hered.*, 80:24-8.
- Noyes, R. 2007.** “Apomixis in the Asteraceae: diamonds in the rough”. *Funct. Plant Sci. Biotechnol.* 1:207-22.
- Noyes, R., R. Baker y B. Mai. 2007.** “Mendelian segregation for two-factor apomixis in *Erigeron annuus* (Asteraceae)”. *Heredity* 98:92-8.
- Noyes, R. y L. Rieseberg. 2000.** “Two independent loci control agamospermy (apomixis) in the triploid flowering plant *Erigeron annuus*”. *Genetics*, 155:379-90.
- Nygren, A. 1951.** “Form and biotype formation in *Calamagrostis purpurea*”. *Hereditas*, 37:519-32.
- Ochogavía, A., G. Cervigni, J. Selva, V. Echenique y S. Pessino. 2009.** “Variation in cytosine methylation patterns during ploidy level conversions in *Eragrostis curvula*”. *Plant Mol. Biol.*, en prensa.
- Ortiz, J. y S. Pessino. 2002.** “Apomixis and its potential role in agriculture”. *AgBiotechNet*, 4:1-4.
- Ortiz, J., S. Pessino, O. Leblanc, M. Hayward y C. Quarín. 1997.** “Genetic fingerprinting for determining the mode of reproduction in *Paspalum notatum*, a subtropical apomictic forage grass”, *Theor. Appl. Genet.*, 95:850-6.
- Ozias-Akins, P. 2006.** “Apomixis: Developmental characteristics and genetics”. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 25:199-204.
- Ozias-Akins, P., E. Lubbers, W. Hanna y J. McNay. 1993.** “Transmission of the apomictic mode of reproduction in *Pennisetum*: co-inheritance of the trait and molecular markers”. *Theor. Appl. Genet.* 85:632-8.

- Ozias-Akins, P., D. Roche y W. Hanna. 1998.** “Tight clustering and hemizyosity of apomixis-linked molecular markers in *Pennisetum squamulatum* implies genetic control of apospory by divergent locus that may have no allelic form in sexual genotypes”. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:5127-32.
- Ozias-Akins, P. y P. van Dijk. 2007.** “Mendelian genetics of apomixis in plants”. *Annu. Rev. Genet.*, 41:509–37.
- Paran, I. y R. Michelmore. 1993.** “Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce”. *Theor. Appl. Genet.*, 85:985-93.
- Peel, M., G. Carman y O. Leblanc. 1997.** “Megaspore callose in apomictic buffelgrass, Kentucky buffelgrass, *Pennisetum squamulatum* Fresen, *Tripsacum* L. and weeping lovegrass”. *Crop Sci.*, 37:724-32.
- Peng, J. y N. Lapitan. 2005.** “Characterization of EST-derived microsatellites in the wheat genome and development of eSSR markers”. *Funct. Integr. Genomics* 5:80-96.
- Penner, G. 1996.** “RAPD analysis of plant genomes”. En: *Methods of Genome Analysis in Plants*, Ed. P. Jauhar, CRC Press, Boca Raton, USA, pag. 251-68.
- Pessino, S., C. Evans, J. Ortiz, I. Armstead, C. Do Valle y M. Hayward. 1998.** “A genetic map of the apospory-region in *Brachiaria* hybrids: identification of two markers closely associated with the trait”. *Hereditas*, 128:153-8.
- Pessino, S., J. Ortiz, M. Hayward y C. Quarín 1999.** “The molecular genetics of gametophytic apomixis”. *Hereditas* 130:1-11.
- Pessino S., J. Ortiz, O. Leblanc, C. do Valle y M. Hayward. 1997.** “Identification of a maize linkage group related to apomixis in *Brachiaria*”. *Theor. Appl. Genet.* 94:439-44.
- Phillips, R., S. Kaeppler y P. Olhoft. 1994.** “Genetic instability of plant tissue cultures: Breakdown of normal controls”. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:5222-6.
- Pierce, M. y K. Raschke. 1980.** “Correlation between loss of turgor and accumulation of abscisic acid in detached leaves”. *Planta*, 148:174-82.
- Polci, P. 2000.** “Cultivo de tejidos para la obtención de variantes somaclonales de pasto llorón, *Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees”. Tesis Doctoral, Universidad Nacional del Sur.
- Porceddu, A., E. Albertini, G. Barcaccia, E. Falistocco y M. Falcinelli. 2002.** “Linkage mapping in apomictic and sexual Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.) genotypes using a two way pseudotestcross strategy based on AFLP and SAMPL markers. *Theor. Appl. Genet.*, 104:273-80.
- Poverene, M. 1988.** “Contribución citogenética y quimiosistemática a la taxonomía del pasto llorón, *Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees s. lat.”. Tesis Doctoral, Universidad Nacional del Sur.
- Poverene, M. y N. Curvetto. 1991.** “Citogenética”. En: *El pasto llorón, su Biología y Manejo*, Eds. O. Fernández, R. Brevedan y A. Gargano. CERZOS y Dpto. Agronomía-UNS, Argentina, Cap. 3, pag. 19-38.
- Poverene, M., M. Di Renzo e I. Tiranti. 1987.** “Poliembrionía en pasto llorón, *Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees s. lat.”. *Actas XXI Jornadas Argentinas de Botánica*, pp. 71.
- Poverene, M. y P. Voigt. 1995.** “Identificación de híbridos apomícticos o sexuales de *Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees mediante análisis isoenzimático”. *Mendeliana*, 11:29-36.
- Poverene, M. y P. Voigt. 1997.** “Isozyme variation and germplasm relationships in the *Eragrostis curvula* complex”. *Biochem. System. Ecol.*, 25:21–32.
- Powell, W., G. Machray y J. Provan. 1996.** “Polymorphism revealed by simple sequence repeats”. *Trends Plant Sci.* 1:215-2.

- Puchta, H., P. Swoboda y B. Hohn. 1995.** “Induction of intrachromosomal homologous recombination in whole plants”. *Plant J.*, 7:203-10.
- Pupilli, F., P. Lobombarda, M. Caceres, C. Quarín y S. Arcioni. 2001.** “The chromosome segment related to apomixis in *Paspalum simplex* is homologous to the telomeric region of the long arm of rice chromosome 12”. *Mol. Breed.*, 8:53-61
- Pupilli, F., E. Martínez, A. Busti, O. Calderini, C. Quarín y S. Arcioni. 2004.** “Comparative mapping reveals partial conservation of synteny at the apomixis locus in *Paspalum* spp”. *Mol. Gen. Genomics*, 270:539-48.
- Quarín, C. 1986.** “Seasonal changes in the incidence of apomixis of diploid, triploid and tetraploide plants of *Paspalum cromyorrhizon*”. *Euphytica*, 35:515-22.
- Quarín, C. 1992.** “The nature of apomixis and its origin in Panicoid grasses”. *Apomixis Newsletter*, 5:8-15.
- Quarín, C. y B. Burson. 1991.** “Cytology of sexual and apomictic *Paspalum* species”. *Cytologia*, 56:223-228.
- Quarín, C., F. Espinoza, E. Martínez, S. Pessino y O. Bovo. 2001.** “A rise of ploidy level induces the expression of apomixis in *Paspalum notatum*”. *Sex. Plant Reprod.*, 13:243-9.
- Quarín, C., M. Pozzobon y J. Valls. 1996.** “Cytology and reproductive of diploid, tetraploid and hexaploid germplasm accessions of a wild forage grass: *Paspalum compressifolium*”. *Euphytica*, 90:345-9.
- Rabeau, T., B. Longly y B. Louant. 1986.** “Unreduced-embryo sac ontogenesis in *Eragrostis curvula*”. *Can. J. Bot.*, 64: 1778-85.
- Robinson, A., G. Christopher, C. Love, J. Batley, G. Barker y D. Edwards. 2004.** “Simple sequence repeat marker loci discovery using SSR primer”. *Bioinformatics* 20:1475–6.
- Roche, D., Z. Chen, W. Hanna y P. Ozias-Akins. 2001.** “Non-Mendelian transmission of an apospory-specific genomic region in a reciprocal cross between sexual pearl millet (*Pennisetum glaucum*) and an apomictic F1 (*P. glaucum* x *P. squamulatum*)”. *Sex. Plant Reprod.* 13:217-23.
- Rodkiewicz, B. 1970.** “Callose in cell wall during megasporogenesis in angiosperms”. *Planta*, 93:39-47.
- Rodrigues, J. y A. Koltunow. 2005.** “Epigenetic aspects of sexual and asexual seed development”. *Acta Biol. Cravov.*, 47:37-49.
- Rohlf, F. 1993.** Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Applied Biostatistics Inc, New York.
- Roodt-Wilding, R. y J. Spies. 2006.** “Phylogenetic relationships in southern African chloridoid grasses (Poaceae) based on nuclear and chloroplast sequence data”. *Syst. Biod.*, 4:401-15.
- Roth, E., B. Frazier, N. Apuya y K. Lark. 1989.** “Genetic variation in an inbred plant: variation in tissue cultures of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]”. *Genetics*, 121:359-68.
- Ruiz-García, L., M. Cervera y J. Martínez-Zapater. 2005.** “DNA methylation increases throughout *Arabidopsis* development”. *Planta*, 222:301-6.
- SanMiguel, P., A. Tikhonov, Y. Jin., N. Motchoulskaia, D. Zakharov, A. Melake-Berhan, P. Springer, K. Edwards, M. Lee, Z. Avramova y J. Bennetzen. 2000.** “Nested retrotransposons in the intergenic regions of the maize genome”. *Science*, 274:765-8.
- Saini, H. y D. Aspinall. 1981.** “Effect of water deficit on sporogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.)”. *Ann. Bot.*, 48:623-33.

- Savidan, Y. 1980.** “Chromosomal and embryological analyses in sexual X apomictic hybrids of *Panicum maximum* Jacq.”. *Theor. Appl. Genet.*, 57:153-6.
- Savidan, Y. 2000.** “Apomixis: genetics and breeding”. *Plant Breed. Rev.*, 18:13-86.
- Schmidt, A. y L. Anderson. 2006.** “Repetitive DNA elements as mediators of genomic change in response to environmental cues”. *Biol. Rev.*, 81:531-43.
- Schramke, V. y R. Allshire . 2003.** “Hairpin RNAs and retrotransposon LTRs effect RNAi and chromatin-based gene silencing”. *Science* 301:1069-74.
- Scott, R., M. Spielman, J. Bailey y H. Dickinson. 1998.** “Parent-of-origin effects on seed development in *Arabidopsis thaliana*”. *Development* 125:3329-41.
- Selva, J., S. Pessino, M. Meier, G. Cervigni, D. Zappacosta, G. Spangenberg y V. Echenique. 2009.** “Differentially expressed transcripts related to ploidy level and reproductive mode in the diplosporous grass *Eragrostis curvula*”. En preparación.
- Sherwood, R. 1994.** “Inheritance of apospory in buffelgrass”. *Crop Sci.*, 34:1490-4.
- Sherwood, R., C. Berg y B. Young. 2001.** “Genetic analysis of apomixis”. En: *The flowering apomixis: from mechanisms to genetic engineering*. Eds. Y. Savidan, J. Carman y T. Dresselhaus, Mexico D.F., European Commission DG VI (FAIR), Cap. 5, pag. 65-82.
- Siena, L., M. Sartor, F. Espinoza, C. Quarín y J. P. Ortiz. 2008.** “Genetic and embryological evidences of apomixis at the diploid level in *Paspalum rufum* support recurrent auto-polyploidization in the species”. *Sex. Plant Reprod.*, 21:205-15.
- Skriver, K. y J. Mundy. 1990.** “Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress”. *Plant Cell.*, 2:503-12.
- Spies, J. 1982.** “Stomatal areas as an anatomical criterion for the determination of chromosome number in the *Eragrostis curvula* complex”. *Bothalia*, 14:119-22.
- Spillane, C., J. Vielle-Calzada y U. Grossniklaus. 2001.** “APO2001: a sexy apomixer in *Como*”. *Plant Cell*, 13:1477-90, 2001.
- Sprague, G., L. Blair y J. Thorner. 1983.** “Cell interactions and regulation of cell type in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*”. *Annu. Rev. Microbiol.*, 37:623-60.
- Stalker, H. y N. Wright. 1975.** “Reproduction of *Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees”. *J. Ariz. Acad. Sci.*, 10:106-10.
- Stam, P. 1993.** “Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package: JoinMap”. *Plant J.*, 3: 739-44.
- Stark, G., M. Dewbatissie, E. Giulotto y G. Wahl. 1989.** “Recent progress in understanding the mechanisms of mammalian DNA amplification”. *Cell* 57:901-08.
- Stein, J. 2006.** “Estudios de localización y herencia de genes relacionados con la apomixis en razas tetraploides de *Paspalum notatum*”. Tesis doctoral, Universidad Nacional de Rosario.
- Stein, J., S. Pessino, E. Martínez, M. Rodríguez, L. Siena, C. Quarín y J. Ortiz. 2007.** “A genetic map of tetraploid *Paspalum notatum* Flüggé (bahiagrass) based on single-dose molecular markers”. *Mol. Breed.*, 20:153-66.
- Stein, J., C. Quarín, E. Martínez, S. Pessino y J. Ortiz. 2004.** “Tetraploid races of *Paspalum notatum* show polysomic inheritance and preferential chromosome pairing around the apospory-controlling locus”. *Theor. Appl. Genet.*, 109:186-91.
- Stragier, P., B. Kunkel, L. Kroos y Losik. 1989.** “Chromosomal rearrangement generating a composite gene for a developmental transcription factor”. *Science* 243:507-12.
- Streetman, L. 1963.** “Reproduction of the lovegrass, the genus *Eragrostis*-I. *E. chloromelas* Steud., *E. curvula* (Schrad.) Nees, *E. lehmanniana* Nees and *E. superba* Peyr”. *Wrightia*, 3:41-51.

- Streetman, L. 1970.** "Cytogenetics of *Eragrostis*". Proceedings of the First Weeping Lovegrass Symposium, The Samuel Roberts Noble Foundation, Oklahoma, USA, 28 y 29 de Abril.
- Stupar, R., P. Bhaskar, B. Yandell, W. Rensink, A. Hart, S. Ouyang, R. Veilleux, J. Busse, R. Erhardt, C. Buell y J. Jiang. 2007.** "Phenotypic and transcriptomic changes associated with potato autopolyploidization". *Genetics*, 176:2055-67.
- Sunkar, R., V. Chinnusamy, J. Zhu y J. Zhu. 2007.** "Small RNAs as big players in plant abiotic stress responses and nutrient deprivation". *Trends Plant Sci.*, 12:301-9.
- Taliaferro, C., S. Dabo, E. Mitchell, B. Johnson, B. Metzinger. 1989.** "Morphologic, cytogenetic, and enzymatic variation in tissue culture regenerated plants of apomictic old-world bluestem grasses (*Bothriochloa sp.*)". *Plant Cell Tissue Org. Cult.*, 19:257-66.
- Tanksley, S., N. Young, A. Paterson y M. Bonierbale. 1989.** "RFLP mapping in plant breeding: New tools for an old science". *Biotechnol.*, 7:257-64.
- Tarchini, R., P. Biddle, R. Wineland, S. Tingey y A. Rafalski. 2000.** "The complete sequence of 340 kb of DNA around the rice *Adh1-Adh2* region reveals interrupted colinearity with maize chromosome 4". *Plant Cell*, 12:381-91.
- Tucker, M., N. Paech, M. Willemse y A. Koltunow. 2001.** "Dynamics of callose deposition and β -1,3-glucanase expression during reproductive events in sexual and apomictic *Hieracium*". *Planta*, 212:487-98.
- Ulm, R. 2003.** "Molecular genetics of genotoxic stress signalling in plants". En: *Topics in Current Genetics*, Vol. 4 *Plant Responses To Abiotic Stress*. Ed. H. Hirt, K. Shinozaki, Springer-Verlag, Alemania, Cap. 8, pag. 217-40.
- Valle, C., C. Glienke y G. Leguizamon. 1994.** "Inheritance of apomixis in *Brachiaria*, a tropical forage grass". *Apomixis Newsl.* 7:42-3.
- van Dijk, P.. 2003.** "Ecological and evolutionary opportunities of apomixis: insights from *Taraxacum* and *Chondrilla*". *Phil. Trans. Royal Soc. London*, 358:1113-21, 2003
- Varshney, A., T. Mohapatra y R. Sharma. 2004.** "Molecular mapping and marker assisted selection of traits for crop improvement". En: *Plant Biotechnology and Molecular Markers*, Eds. P. Srivastava, A. Narula y S. Srivastava, Anamaya Publishers, New Delhi, India, pag. 289-330.
- Varshney, R., A. Graner y M. Sorrells. 2005.** "Genic microsatellite markers in plants: features and applications". *Trends Biotechnol.*, 23:48-55.
- Vicient, C., A. Suoniemi, K. Anamthawat-Jónsson, J. Tanskanen, A. Beharav, E. Nevo, A. Schulman. 1999.** "Retrotransposon BARE-1 and its role in genome evolution in the genus *Hordeum*". *Plant Cell*, 11:1769-84.
- Vielle-Calzada, J., M. Nuccio, M. Budiman, T. Thomas, B. Burson, M. Hussey y R. Wing. 1996.** "Comparative gene expression in sexual and apomictic ovaries of *Pennisetum ciliare* (L.) Link". *Plant Mol. Biol.*, 32:1085-92.
- Vijverberg, K., R. van der Hulst, P. Lindhout, P. van Dijk. 2004.** "A genetic linkage map of the diplosporous chromosomal region in *Taraxacum officinale* (common dandelion; Asteraceae)". *Theor. Appl. Genet.*, 108:725-32.
- Voigt, P. 1970.** "New varieties of weeping lovegrass through plant evaluation and selection". Proceedings of the First Weeping Lovegrass Symposium, The Samuel Roberts Noble Foundation, Ardmore, USA, 28 y 29 de Abril, pag. 14-20.
- Voigt, P. 1971.** "Discovery of sexuality in *Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees". *Crop Sci.*, 11:424-5.
- Voigt, P. 1976.** "Registration of OTA-S weeping lovegrass germplasm (Reg. No. GP8)". *Crop Sci.*, 12:843-7.

- Voigt, P. y E. Bashaw. 1972.** “Apomixis and sexuality in *Eragrostis curvula*”. *Crop Sci.*, 12:843-7.
- Voigt P. y E. Bashaw. 1973.** “Facultative apomixis in *Eragrostis curvula*”. *Agron. Abs.*, 65:16.
- Voigt, P. y E. Bashaw. 1976.** “Facultative apomixis in *Eragrostis curvula*”. *Crop Sci.*, 16:803-5.
- Voigt, P. y B. Burson. 1992.** “Apomixis in *Eragrostis*”. *Proceeding Apomixis Workshop, Atlanta, USA, USDA-ARS, ARS-104*, pag. 8-11.
- Voigt, P., B. Burson y R. Sherman. 1992.** “Mode of reproduction in cytotypes of lehmann lovegrass”. *Crop Sci.*, 32:118-21.
- Voigt, P., W. Kneebone, E. McIlvain, M. Shoop y J. Webster. 1970.** “Palatability, chemical composition and animal gains from selections of weeping lovegrass, *Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees”. *Agron. J.*, 62:673-6.
- Voigt, P., N. Rethman y M. Poverene. 2004.** “Lovegrasses”. En: *Warm-Season (C4) Grasses, Agronomy Monograph no. 45, American Society of Agronomy, USA.*
- Vorster, T. y H. Liebenberg, 1977.** “Cytogenetic studies in the *Eragrostis curvula* complex”. *Bothalia*, 12:215-21.
- Vorster, T. y H. Liebenberg. 1984.** “Classification of embryo sacs in the *Eragrostis* complex”. *Bothalia*, 15:167-74.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Friters, J. Pot, J. Paleman, M. Kuiper y M. Zabeau. 1995.** “AFLP: a new technique for DNA fingerprinting”, *Nucleic Acids Res.*, 23:4407-14.
- Walbot, V. y C. Cullis. 1985.** “Rapid genomic changes in higher plants”. *Annu. Rev. Plant. Physiol.* 36:367-96.
- Weising, K., H. Nybom, K. Wolff y G. Kahl. 2005.** “DNA fingerprinting in plants principles, methods, and applications”, 2nd Ed., *CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, USA*, 444 pag.
- Williams, J., A. Kubelik, K. Livak, J. Rafalski y S. Tingey. 1990.** “DNA Polymorphisms amplified by arbitrary *primers* are useful as genetic markers”. *Nucleic Acids Res.*, 18:6531-5.
- Xiong, L., C. Xu, M. Maroof y Q. Zhang. 1999.** “Patterns of cytosine methylation in an elite rice hybrid and its parental lines, detected by a methylation-sensitive amplification polymorphism technique”. *Mol. Gen. Genet.*, 261:439-46.
- Yang, T., L. Xue y L. An. 2007.** “Functional diversity of miRNA in plants”. *Plant Sci.*, 172:423-32.
- Yu J., Q. Sun, M. La Rota, H. Edwards, H. Tefera, M. Sorrells. 2006.** “Expressed sequence tag analysis in *tef* [*Eragrostis tef* (Zucc.) Trotter]”. *Genome* ,49:365–72.
- Yu, J., E. Graznak, F. Breseghello, H. Tefera y M. Sorrells. 2007.** “QTL mapping of agronomic traits in *tef*”. *BMC Plant Biol.*, 7:30-42.
- Záveský, L., V. Jarolímová y J. Stěpánek. 2007.** “Apomixis in *Taraxacum paludosum* (section *Palustria*, Asteraceae): Recombinations of apomixis elements in inter-sectional crosses”. *Pl. Syst. Evol*, 265:147-63.

Anexo

Tabla A.1. *Primers* EST-SSR detallando el tipo de microsatélite (di: dinucleótido, tri: trinucleótido, tetra: tetranucleótido y penta: pentanucleótido), la secuencia de los *primers* izquierdo y derecho (left y right) y el tamaño del amplificado esperado (en pb)

Nombre	Tipo	Left Primer	Right Primer	Tamaño
E01	tri	AGAGGCAGCAGAGCAGAC	ATTTAGAGGAGGTGGAGGAAC	291
E02	tri	GTTGCTGCTCTTGTCGTT	CCGTTTGTCTTATGTTACCTG	227
E03	tri	GAATACTGCGACAATCAAA	ATCTTCCTCCAATGACCT	325
E04	penta	CACACCGACAAGAAGAAGTAG	ATTGATTGAGCACTGGTTTC	251
E05	penta	CAACCCTACCTACATCCACT	GGGCTTTCAGTTCCAATAA	276
E06	di	AGGAGGTGTTGGGAAGAG	ATAAGCAGGAGGAAAGGAAA	338
E07	tri	AAGAGGACACCAACAAACC	GGAGGAGGAGAAGGAGAAG	146
E08	tri	GTAATCAATCAAGTTTCGGAG	GCTCACAACCATTTCCAG	289
E09	di	AGAGGTGGGCTGATGTTT	TTTGAGTTCCTTCTCCTTCTC	377
E10	di	AGAAGGAGAATGGGAGCA	TTTCAGGGATAACTTGGATTT	190
E11	tri	TCTCCCACCCTTCTTCTC	ATCATACTCCTCCTCCTCCTC	145
E12	di	ATCTTTCTTGGCTGGTTCA	TTTGATTACGGACCTTGTGT	213
E13	tri	TGGAACACATACACAAGGG	CATTTACCCACCAAAGCA	292
E14	penta	ACTACCACTAATCTCGCCTTT	GTGACAGCCTCTTTCCAAC	255
E15	tri	CTTAGCACTTCCCTCCTTG	AGTATTCCATCAACTCTGCC	398
E16	penta	TGCCATCTCTTCCAGCAC	TACTCATTTCCAGCCTTATC	210
E17	tetra	AGTAGTGACCGTTATTTGTGATT	CCGTTTGTCTTATGTTACCTG	161
E18	di	TCCATCCACAAATAAGCC	CAAGGAAAGACATTACGAGAA	245
E19	penta	CTGTGGATGAGTTTGAGGAG	AGAGAGAGAGAGAAAGCCTGA	377
E20	di	AATAGTGCCCAAGAGCCA	AGTCAAAGTCATCGTCTGTTT	400
E21	tri	GAAAGAAGAGAAAGAAGAGGG	CACTGAAGAAGGTGTTGAAAG	293
E22	tri	TCACTTCTCCTTTCTCCCTC	GGGTTTCATCTTCATTAGCAG	265
E23	tri	TCTAATCTAATCCCTCGCC	CGATGACAGAAGTAGGCAC	373
E24	tri	TCTCCAACACGCCACGAC	CAATCCACTACAAGAAACCAC	193
E25	penta	CCGTAAGAAAGAACGAAA	ACAGAGGAGGTCAATGTCAG	248
E26	tetra	AGAGAGAGCAGAGAAATAGGG	ATCCAAATCCACTAAAGCAG	290
E27	tri	TCTCCCACCCTTCTTCTC	GACGGCTAACAATCAACAG	260
E28	tri	GGGCTTGCTGTGTTGAGG	TGAAGACGAGGAGGATGA	264
E29	tri	TTCCAAGCACGACTGACT	AACCCATCTTCTTCTTCTCC	309
E30	tri	ATCAGAGGAAGGGAAGGAA	AAGATGAGGTAGAGGATGAGG	357
E31	tri	GTTATCATCGCAGTCTCTTTC	GTCCTCATCTTTGCCAGTT	193
E32	tri	GTCTAAGGCAGTGGCATC	GCTAAAGAACTCATCAACCAA	352
E33	tri	CTCTTGCTGGCTGGCTGCT	TATCGTGTCTTCCCTTACATC	219
E34	tri	CCTCTCCCTTCTCTCACT	AGGCTGATGGTCGGTGGA	397
E35	tetra	AGCGATAGGTCAGGTCGT	CACAGCAGCACAGCCACA	221
E36	di	TTGCTACCGAACTGTGAACT	TTACTCAATCTATCCATCCAAC	310
E37	tri	CATAAAGATGATGACGAGTGG	GCAAAGAGAAAGAAGAAGAAGA	237
E38	tetra	GCACATACAGATTGGCAG	TCGTAGCGTCAGCAGCGT	246
E39	tetra	CATTTCGACGACATTCCA	ACAGCAGCACAGGTAGACA	156
E40	di	TTTCGTCGTCATCAGTTC	TCTATCACATCCATCACTTCC	314
E41	tri	CTTCACTCCACTCTGCTTTC	ATCCGTTCCGTTTCGTCAG	254
E42	tetra	GTGGGTATGGTGTATGGATT	GGATAGTTCGTTTCATTTGCT	399
E43	tetra	CAACCCTCAACTATGTGCT	GCTGTGTGTGAATCTTGTGCT	202

Tabla A.1. Continuación.

Nombre	Tipo	Left Primer	Right Primer	Tamaño
E44	di	CGTAGAGAGAGAGGAGAGGG	CTGGCTTACACAAGACTGCT	283
E45	tri	CACTTGGTGCCCGATGAC	CTTATTACGCTGGTGAACAAA	389
E46	tri	ATTGCTCCATCTATTCCTG	ACGACCACTTCTCCTGAAC	271
E47	tri	GAACATACAGACACGCATTAC	GGAGAAGACCACGAAGAAG	300
E48	tri	TGGTGGGAGAGAAACTGTAA	GGATGTAGAAGAAGCAGCAC	289
E49	tri	GCTGACAAGATGGTGAAGA	CACTGAGACGAAGATGATG	267
E50	di	GCACCTTACATACGCAGTTTC	CCTTTGGAGTTGGGACTT	333
E51	di	CATAATCTGCTCTGTTTGA	AACCTTCTTCGTAACCTCCTT	329
E52	tetra	TTAGACACGAGGAACCTCACC	GCCACAACCAGTCCATAA	234
E53	tri	AGGATGAGGAGAAGAAGGAG	TAGGGACAGGCACAGTATTT	270
E54	penta	GTGGTAATCAATCAGAAGGG	CAGCACCCAGAACAACAG	367
E55	penta	ACAGGAAGAAGAGGAGAAGAA	GAGTGCGGTTTCAGTGTTG	219
E56	tri	GACCATCTCTTCCTCTCCA	CGTCAGCATCTCGTTCAG	165
E57	di	CGAAACCGAGTAGAATAACAAG	ACCGTAGTGACCAGATGAG	257
E58	tri	AAAGAGGAGGAAGAAAGAAA	GTATCACATCACAACCAGGCA	286
E59	tri	AAGAACATAGCAACGAGGAA	TCAGTCCACATCTCCCTAAC	280
E60	tetra	AACCGATACACAATAACCAAA	ACAGGTAGCAAGGGTAAAGAC	319

Secuencias MSAP

1B (0/0/0/1/0/0/0/0/)

Metilado en citosina externa en C1 y full metilado o cambio sitio en C2

CGGGAATTCGATTGACNGCGTNCCNNNNNANNNNNNNNGGTCAGTGCGGA
 GCGCACCGANCTTCAACTTGGACTCGCCCTCCACGTGCGCTTGGATCTCCTT
 GATCGCCTCCACCACACGGTCCTTGGATGGGANNNNGGCCACCCACATGAA
 ACGGGTGAGGTCGTCGACGAGCAGCAANAANNACTTGTTCCTCGCTCGGAGT
 CNCCGGCGTGATCTGTCCACAGAGATCGCCNTGCACCAACTCCAGACGCCG
 TTGCGCCCTGAACTCCGCCTGCACCGGGAACGAGGTGCGCCTCTGCTTGCCG
 GCCNTGCACGCCTCGCACACCTCCGTCACCTGCCCGAGCTCCGTTCTAGACT
 CATCA

2B (0/0/1/0/0/0/1/0)

No hubo cambios en el tiempo, pero cambios entre plantas metilado en citosina interna en las C

TTGACTGCGTACCAATTCACCACCGCACGCACTAGAGAGAATAAATGAAAG
ATCCTGTGGTAGCTTACTACGGCACGAGAACAACGAAAGCATGCAGCAAGC
CATACCTTCCAACGCTCCGTTCTAGACTCATCA

3A (1/1/1/0/1/1/1/1)

C1 con metilación en citosina interna y C2 desmetilada

TGACTGCGTACCAATTCACCCAGTCATCTCTTTTACACCACTGTGGCTTTTCA
ATTGAATTTGGGCATCTACAAAGGCTGCCGCATGGGCTGGCTATTGAGGCCT
AAATTCCAACACGACCCCTACCCTTCCTTCTCTGGAGCTCCGTTCTAGACTC
ATCA

4A (0/0/1/0/1/1/1/1)

T1 full metilada o cambio sitio y T2 desmetilada, C1 metilada en citosina int y C2 desmetilada

GATGAGTCTAGAACGGAGCAAGACTCACGGCTTGCTGGCGTGGCGAATCGG
AATCAGCAGGTCGGTGCGCAAGTCGGCTTGAGAGACCGTGCGCGGTGAATT
GGTACGCAGTCA

12A (0/0/1/0/0/0/0/0)

C1 metilada en citosina interna y C2 full metilada o cambia sitio

GANGANNCTANNNNNGACTANGCCAAACGGGCTGTTGTTGGGCTAGAGAA
AGAAGTGTGTTGGCCATTAACAATTTCTGGAGAAAAGGAAAAGGGAAGG
GGGAAGCAGGCTGGGCCGAGGTGAAAGGAGAATGGGGTTTCGGCCCGAGA
TGGTTCGGGGAAAGGAAAGGTTTTATTCTTTTCTGGAATTTAAACATGAACT
CAAATTTGAATGTGAATTGGTACGCAGTCA

12B (0/0/1/0/0/0/0)

C1 metilada en citosina interna y C2 full metilada o cambia sitio

GNGNCCGCGGNANTTCGATTGATGAGTCTNNNNNNNNGACTGGGCCGTGGC
GTGTTGGGCTGAGGGAGTTGGTGCAGCCCACGATTGATTCTGGAGAAAAGA
AAAAAAGAAGGGGGAAGCTGGCTGGGCCGAAAGGAGAGGGAGGGGTTT
CGCCCCGAAATAGCTTCATGAATTGGAAATAGGTTTATTCTNTTTTCTGAGAT
TAAACAGGAACTCANATTTCGAATGTGAATTGGTACGCAGTCA

12C (0/0/1/0/0/0/0)

C1 metilada en citosina interna y C2 full metilada o cambia sitio

GGAATTCGATTGATGAGTCTAGAACGGACTGTTCATAGCACCCGATATCGG
CCCTACTTGTGTGTCTCCATGGCCTGCGTTTTGTTGCCATTGAAGCAAGCTA
CTGACGTGTATGTATGAAAATCAATAGTCATGTGCCATACCGCTATAACCA
CGCCCCTGCATCAATAATACAAATTCTGGATAGAAAACCAGGATCGGCACC
AAAGTTGTGAATTGGTACGCAGTCAT

14 B (0/0/0/1/0/0/0)

C1 metilada en citosina externa y C2 full metilada o cambia sitio

ACGTCGCATGCTCCCCNGNCNNCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTGACTG
CGTACCAATTCACATCTAGTTTCAATGAGCATGCACTGTGCAGAGTGTAGAC
CTTGGGGCCTCGGCTCCTCATCTTCCACTTGTGGTCCATGAGCTGATTCTTT
TGGTTCACTCCGTTCTAGACTCATCA

Secuencias AFLP

1A1 (1/1/0/0)

Banda que desaparece en T2 y C2

GATGAGTCCTGAGTAAACGTGGGTGGGATGTTTCAGGTGCTCGGAGAAGCTC
CTCACAAATTTAACGTTCTGTACTGTAAGCAAGCAAGATAACTGTTGACAGT

AAAATTGTCTTTCACTACTTCGCACATAAGGCCTGAGAGATTTGCTTGAGTC
TGTTTCAGGACCAAACTTGGAACACGGTGAATTGGTACGCAGTCA

2A1 (1/1/1/0)

Banda que desaparece en C2

GATGAGTCCTGAGTAAACGGCAATTTCTTGAAATTATTGAAAATTGAGCCTA
GGGTATGATGGTATCAACCACAAATTGAAACAACCTTGGTAGGGAATTTTAG
CCGGGAACACAATATATACTAAAAGTATCACAACAGGCATAACATGAGGGT
GACCAAGGTCTGGGGTGAATTGGTACGCAGTCA

4A5 (1/0/1/1)

Banda presente en C2 y ausente en C1

CGATGAGTCCTGAGTAAACTACGCATTTGGTATACTACCGCGGCGGCTGGC
CGGTCAGCGTGGCCGTTTAAACTGTGGGAACATGTATTTTTCATACAGCACG
ACAGCCTGAACCAGTGAATTACCATGTTAGAGGAACAAGCTCACAGCAAAC
AGAAGAAATATTCTCCAGGTAGCGCAGAATTTACTTTGATTTTTCATCCCC
CCTGGGCTCTAAGAAAGAACAGATCGTACAACCGCTGCTGCTTGAATTGGT
ACGCAGTCTA

6A2 (1/1/0/1)

Banda de T1 falta en T2

GACTGCGTACCAATTCAAGAAAGCAAATACCTTCCTTCTGCCGAAGTAGAG
GTATTCAGATTTACATTTTCAGTCACCACATGCAGGGGAGGCGCGACGGCGA
TTTGGCGGACGCCGGGCAGCGCCCCAGATTTGGCGGACGCTGGGCGGAACC
TGGAAGGTAGAGGATGCTTTAGCGTGTACTGCTGCAACGGGTACCGGGCGG
AGGATCCGCCAAATTTAGGGTACCGGGTCATTTAGCAGGTGCTGTTGCGGTC
AGTCTAACGACCGGTACGTGTGTGAGTGTCCGGTGGGAGAGATTTGCATGG
CCAAACACGCGAAAGGAAGCGAATCTCGAGCTCCAGCTCGCCCTGACACCG
GAAGCCTGTACGCTCTACACGTATGCTGATCCGCGGGAAAGCGGGATGATT
AGCGTCCGGAATACGACCATCACGGGCGGCAAAGTCTTTTACTCAGGACTC
ATCA

7A2 (0/0/0/1)

Banda presente en C2 ausente en C1

TGACTGCGTACCAATTCAAGTTTCCAGATCTATGCAGGATTTACAGTTTGTA
AAATAAAATCAATCAGTTTGAGATGACCAGGTAGACAGGGACTTAGTGGTG
ACGTGGTAGTTGTCTCTTGCAACGTTATTTTTTTTTTCTTCTTAAGAGCTAGT
AGCAGACTCTAACTATCAGGCACACTTTTACTCAGGACTCATC

Publicaciones generadas a partir de este trabajo

Presentaciones a congreso

- **D. Zappacosta**, M. Mitilli, A. Carrera, P. Polci y V. Echenique. “Caracterización molecular de somaclones de pasto llorón en relación al complejo *Eragrostis curvula* (Schrad.) Ness sens. lat.”. VI Simposio de Biotecnología REDBIO Argentina, Buenos Aires, 7 al 10 de Junio de 2005.
- M. Meier, **D. Zappacosta**, G. Cervigni y V. Echenique. “Presencia de callosa en la megasporogenesis de plantas apomícticas y sexuales de pasto llorón”. X Congreso Argentino de Ciencias Morfológicas, Tandil, 15 al 17 de marzo de 2006.
- M. Meier, **D. Zappacosta**, G. Cervigni y V. Echenique. “Deposición de callosa en la megasporogenesis de *Eragrostis curvula* (Schard.) Ness”. XXXV Congreso Argentino de Genética, San Luis, 24 al 27 de Septiembre de 2006, pag. 151.
- **D. Zappacosta**, N. Paniego, G. Cervigni, D. Zanazzi y V. Echenique. “Identificación y caracterización de marcadores EST-SSR en pasto llorón (*Eragrostis curvula*)”. XXXV Congreso Argentino de Genética, San Luis, 24 al 27 de Septiembre de 2006, pag. 152.
- G. Cervigni, N. Paniego, S. Pessino, M. Diaz, J. Selva, **D. Zappacosta**, G. Spangenberg, V. Echenique. “Gene expression study in diplosporous and sexual *Eragrostis curvula* genotypes with different ploidy levels using ESTs and differential display”. 3rd International Apomixis Conference, Wernigerode, Alemania, 27 de junio al 1 de julio, 2007, pag. 63.
- G. Cervigni, N. Paniego, S. Pessino, M. Diaz, J. Selva, **D. Zappacosta**, G. Spangenberg, V. Echenique. “Gene expression study in diplosporous and sexual *Eragrostis curvula* genotypes with different ploidy levels using ESTs and differential display”. 5th International Symposium on the Molecular Breeding of Forage and Turf (MBFT2007), Hokkaido, Japón, 1 al 6 de Julio de 2007.
- **D. Zappacosta**, A. Carrera, S. Cardone, G. Pacheco, G. Cervigni, N. Paniego, M. Meier, L. Piñuel, M. Mitilli y V. Echenique. “Diferenciación de genotipos de pasto llorón (*Eragrostis curvula*) por marcadores RAPDs, AFLP y microsatélites”. REDBIO 2007, VI Encuentro Latinoamericano y del Caribe de Biotecnología Agropecuaria, Viña del Mar, Chile, 22 al 26 de Octubre de 2007.
- M. Meier, **D. Zappacosta** y V. Echenique. “Evaluación del test de deposición de callosa para el fenotipado de una población de mapeo para la región de la diplosporía en pasto llorón”. REDBIO 2007, VI Encuentro Latinoamericano y del Caribe de Biotecnología Agropecuaria, Viña del Mar, Chile, 22 al 26 de Octubre de 2007.
- G. Cervigni, J. Selva, M. Mecchia, A. Ochogavía, N. Paniego, S. Cardone, P. Polci, S. Felitti, L. Martelotto, M. Díaz, **D. Zappacosta**, M. Meier, P. Voigt, G.

Spangenberg, S. Pessino, V. Echenique. "Genetic, epigenetic and transcriptional changes associated to ploidy and diplospory in *Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees". W16: Apomixis. Plant and Animal Genomes XVI Conference, San Diego, USA, 12-16 de enero de 2008.

- J. P. Selva, G. Cervigni, A. Ochogavía, **D. Zappacosta**, M. Meier, S. Pessino y V. Echenique. "Global analysis of the genome, transcriptome and epigenome in the diplosporous grass *Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees". 20th International Congress on Sexual Plant Reproduction, Brasilia, Brasil, 4 al 8 de Agosto.
- V. Echenique, **D. Zappacosta**, G. Cervigni, J. P. Selva, A. Ochogavía, , M. Meier, N. Paniego y S. Pessino. "Cambios genéticos, epigenéticos y transcripcionales asociados a la diplosporía en *Eragrostis curvula*". XXXVII Congreso Argentino de Genética, Tandil, 2008.

Publicaciones

- M. Meier, **D. Zappacosta**, G. Cervigni y V. Echenique. "Presence of callose in the megasporogenesis of apomictic and sexual plants of weeping lovegrass". Biocell, 30:518, 2006.
- G. Cervigni, N. Paniego, M. Díaz, J. P. Selva, **D. Zappacosta**, D. Zanazzi, I. Landerreche, L. Martelotto, S. Felitti, S. Pessino, G. Spangenberg y V. Echenique. "Expressed sequence tag analysis and development of gene associated markers in a near-isogenic plant system of *Eragrostis curvula*". Plant Molecular Biology, 67:1-10, 2008.
- **D. Zappacosta**, A. Carrera, G. Pacheco, S. Cardone y V. Echenique. "Diferenciación varietal de pasto llorón por marcadores moleculares". Revista Análisis de Semillas, 2(8):90-4, 2008.
- M. Meier, **D. Zappacosta**, J. P. Selva, G. Cervigni y V. Echenique. "La apomixis, su estudio y posibles usos". AgroUNS, 9:10-3, 2008.
- V. Echenique, S. Pessino, M. Díaz, J. P. Selva, G. Luciani, **D. Zappacosta**, G. Cervigni, M. Meier, I. Garbus, S. Cardone, R. Miranda y G. Spangenberg. "Aportes de la biotecnología al mejoramiento del pasto llorón (*Eragrostis curvula*)". Revista Argentina de Producción Animal, 28:147-64, 2008.
- **D. Zappacosta**, M. Meier, A. Carrera, G. Pacheco, S. Cardone, J. P. Selva y V. Echenique. "Molecular markers (RAPD, SSR and AFLP) to study the variability within the *Eragrostis curvula* complex". En preparación.
- M. Meier, **D. Zappacosta**, J. P. Selva, S. Pessino y V. Echenique. "Different methods for assessing the reproductive mode of weeping lovegrass plants, *Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees". En preparación.

- J. P. Selva, S. Pessino, M. Meier, G. Cervigni, **D. Zappacosta** y V. Echenique. “Identification of transcripts controlled by ploidy and/or diplosporous apomixis in *Eragrostis curvula*”. En preparación.