



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTORADO EN BIOLOGÍA

Estrés genómico y expresión de la apomixis en
pasto llorón (*Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees.)

Lic. Juan Manuel Rodrigo

BAHÍA BLANCA

ARGENTINA

2014

PREFACIO

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Biología, 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 ámbito del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia durante el período comprendido entre octubre de 2009 y junio de 2014, bajo la dirección de la Dra. Viviana Echenique y la dirección adjunta del Dr. Diego Zappacosta.

Lic. Juan Manuel Rodrigo



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el/..../..... , mereciendo la calificación de(.....)

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por haberme otorgado el sustento económico para realizar mis estudios de doctorado. Asimismo deseo agradecer a las autoridades del CERZOS y el Dpto. de Biología, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional del Sur por haberme brindado el espacio de trabajo.

A Viviana, mi directora de tesis, por estar siempre dispuesta a enseñarme, discutir y brindarme sus conocimientos y experiencia en mi formación como investigador, y sobre todo gracias por confiar en mí.

A mi co-director, Diego, por sus valiosas sugerencias, todos los conocimientos brindados y por su invaluable ayuda en el laboratorio.

A todos los integrantes del Laboratorio de Biotecnología y Genética Vegetal, por hacer del lugar de trabajo un lugar en el que uno realmente desea estar, gracias por los gratos momentos compartidos.

A Manfred, Dani, Diego y Juan, por su amistad y la ayuda que me dieron durante la realización de este trabajo.

A Luis Hernández e Ivone Lindström, por haberme dado la posibilidad de trabajar en su laboratorio, gracias por haber sido tan atentos, tanto en la relación laboral como en lo personal.

A mis padres, Nilda y José Luis, por la formación que me dieron, por alentarme siempre en el camino del estudio y el trabajo, y por estar siempre a mi lado.

A mis hermanos, Lucila, Laureano y Candela, por todo el amor que me brindan y por ser las maravillosas personas que son. Gracias por estar.

A Carmen y Juan Carlos, por todo su cariño y el alimento brindado.

A mis amigos, siempre dispuestos a darme una mano en cualquier momento si lo necesitaba.

A Lorena, mi mujer, por su contención, su comprensión y su paciencia durante el desarrollo de esta tesis. Gracias mi amor por todo el amor que me das, por estar conmigo siempre y especialmente gracias por darle sentido a mi vida.

A Bruno y Lana, por darme amor.

A todos ustedes, sinceramente muchas gracias.

Juan.

Publicaciones generadas durante el desarrollo de la tesis

Publicaciones en revistas científicas

- Zappacosta D., Ochogavía A., Rodrigo J.M., Romero J., Meier M., Polci P., Garbus I., Pessino S., Echenique V. (2014) Increased apomixis expression concurrent with genetic and epigenetic variation in a newly synthesized *Eragrostis curvula* polyploid. Scientific reports, 4.

Publicaciones en Revistas de Divulgación:

- Echenique V., Pessino S.C., Meier M., Selva J.P., Ochogavía A., Zappacosta D., Romero J.R., Rodrigo J.M., Garbus I., Terenti C., Diaz A. (2012) Apomixis en *Eragrostis curvula*. Ciencias Agronómicas, 20: 77.
- Rodrigo J.M., Zappacosta D., Bonaventure G., Echenique V. (2012) Efectos del estrés abiótico sobre la expresión de la apomixis en pasto llorón. Ciencias Agronómicas, 20: 79.
- Zappacosta D., Meier M., Terenti C., Rodrigo J.M., Echenique V. (2012) Poblaciones de mapeo en pasto llorón - éxitos y fracasos. Ciencias Agronómicas 20: 81.
- Rodrigo J.M., Selva J.P., Zappacosta D., Echenique V. (2013) Epigenética, revolucionando la expresión génica. AgroUNS, (En Prensa).

Presentaciones a congresos

Internacionales

- Rodrigo J.M., Ochogavía A., Meier M., Zappacosta D., Pessino S., Echenique V. “Effects of stress and genomic plasticity on the reproductive mode of facultative apomictic plants of weeping lovegrass [*Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees]”. The 6th international symposium on the molecular breeding of forage and turf. 15-19 de marzo 2010, Buenos Aires, Argentina.
- Rodrigo J.M., Orellano N, Selva JP, Echenique V, Zappacosta D. “Determinación del modo reproductivo de *Tetrachne dregei* Ness.”. XV Congreso Latinoamericano de Genética. 28 - 31 de octubre de 2012. Rosario, Santa Fe, Argentina.

- Meier M., Rodrigo J.M., Zappacosta D., Echenique V. “Efecto mentor en pasto llorón, *Eragrostis curvula*”. XV Congreso Latinoamericano de Genética. 28 - 31 de octubre de 2012. Rosario, Santa Fe, Argentina.
- Rodrigo J.M., Zappacosta D., Echenique V. “Evaluación de la estabilidad reproductiva en pasto llorón (*Eragrostis curvula* Nees).”. XV Congreso Latinoamericano de Genética. 28 - 31 de octubre de 2012. Rosario, Santa Fe, Argentina.

Nacionales

- Rodrigo J.M., Marinangeli P.A., Curvetto N.R. “Propagación vegetativa de *Rhodophiala bifida*”. XI Jornadas Nacionales de Floricultura. 7-9 de octubre 2009. Montecarlo, Misiones. SELECCIONADO PARA PRESENTACIÓN ORAL
- Rodrigo J.M., Meier M., Zappacosta D., Echenique V. “Expresión de la apomixis bajo estrés hídrico en pasto llorón”. XL Congreso Argentino de Genética y I Jornadas Regionales SAG-NEA. 18-21 de septiembre 2011. Corrientes, Corrientes.

Índice

PREFACIO	3
AGRADECIMIENTOS	5
PUBLICACIONES GENERADAS DURANTE EL DESARROLLO DE LA TESIS	6
RESUMEN	11
ABSTRACT	14
INTRODUCCIÓN	17
Las plantas y el estrés	18
Del estrés ambiental al estrés genómico	19
Efecto del estrés sobre el modo reproductivo	21
La apomixis en plantas	23
Mecanismos de apomixis	27
Control genético de la apomixis	30
Apomixis y Poliploidía	31
Filogenia y distribución geográfica de la apomixis	33
Apomixis en pasto llorón	34
Importancia de la Apomixis en la Agricultura	38
Estrategias para el desarrollo de cereales apomícticos	40
<i>Eragrostis curvula</i> (Pasto llorón, weeping lovegrass)	41
Apomixis y estrés	45
HIPÓTESIS	49
OBJETIVOS	51
Objetivo general	52
Objetivos particulares	52
 CAPÍTULO I - "Expresión de la apomixis en pasto llorón durante el periodo de floración."	53
Introducción	54
Hipótesis	62
Objetivo	62
Materiales y Métodos	63
Material Vegetal	63
Estudios citoembriológicos	63
Análisis estadísticos	64
Resultados y Discusión	64
Estudios citoembriológicos	64
Análisis del desarrollo de la inflorescencia	69

CAPÍTULO II - "Expresión de la apomixis bajo diferentes situaciones que provocan estrés genómico."	74
Las plantas y el estrés	75
Plasticidad vegetal en respuesta estrés	76
Estrés hídrico	79
Ácido abscísico	80
Cultivo <i>in vitro</i>	82
Técnicas para determinar el origen de la progenie	84
Hipótesis	85
Objetivo	85
Materiales y Métodos	86
A) Tratamiento de estrés hídrico	86
Contenido relativo de agua (CRA)	86
B) Tratamiento con ácido abscísico (ABA)	86
Contenido endógeno de fitohormonas	87
C) Cultivo <i>in vitro</i>	88
Medios de cultivo	88
I) Cultivo a partir de semillas	88
II) Cultivo de inflorescencias	89
III) Cultivo en medios selectivos	89
Estudios citoembriológicos	90
Pruebas de progenie	90
Extracción de ADN	90
Marcadores RAPDs	91
Resultados y discusión	93
Estudios citoembriológicos en plantas en situaciones de estrés	93
A) Tratamiento de estrés hídrico	93
B) Tratamiento con ácido abscísico.....	98
Contenido endógeno de fitohormonas	99
C) Cultivo <i>in vitro</i>	103
I) Cultivo a partir de semillas	103
II) Cultivo de inflorescencias	104
III) Cultivo en medios selectivos	107
Pruebas de progenie con marcadores RAPDs en plantas sometidas a estrés hídrico .	108

CAPÍTULO III - “Efecto del estrés genómico producido por hibridación sobre la expresión de la apomixis.”	115
La inestabilidad híbrida como estrés genómico	116
Modelo de estrés híbrido	119
Hipótesis	121
Objetivo	121
Materiales y Métodos	122
Material Vegetal	122
Estudios citoembriológicos	122
Prueba de progenie	122
Análisis estadístico	122
Resultados y discusión	123
Estudios citoembriológicos	123
Prueba de progenie	127
CAPÍTULO IV - “Análisis del metiloma en plantas de pasto llorón sometidas a estrés.”	130
Control epigenético de la gametogénesis femenina	133
Epigenética y estrés	134
Uso de marcadores AFLPs para el análisis genético	136
Estudio de variaciones en los patrones de metilación	136
Hipótesis	138
Objetivo	138
Materiales y Métodos	139
Material Vegetal	139
Extracción de ADN	139
AFLP y MSAP	140
Polimorfismos sensibles a metilación	141
Aislamiento y clonación de los fragmentos de ADN	142
Análisis de las secuencias obtenidas	142
Resultados y discusión	143
CONSIDERACIONES FINALES	159
BIBLIOGRAFÍA	163

Resumen

El estrés ejerce sus efectos sobre el organismo, no sólo a través de las vías de respuesta fisiológica, sino también a través de vías genéticas y epigenéticas. Muchos autores sostienen que el estrés es un factor clave para explicar el papel evolutivo del sexo en los organismos de modo reproductivo facultativo. Por lo tanto, es esperable que los mismos se crucen más frecuentemente bajo situaciones de estrés, facilitando la adaptación a ambientes cambiantes.

Eragrostis curvula es un complejo polimórfico donde la mayoría de sus miembros se reproducen por apomixis, reproducción asexual a través de semillas, que conduce a la generación de progenies genéticamente idénticas a la planta madre.

El objetivo de esta tesis fue determinar el efecto de diferentes factores que generan estreses genómicos sobre la expresión de la apomixis en pasto llorón, como el estrés hídrico, el cultivo *in vitro*, la poliploidización y la hibridación intraespecífica. Para ello, se analizaron sacos embrionarios de plantas de distintos genotipos de pasto llorón luego de haber sido sometidas a dichas condiciones. Además, se realizaron pruebas de progenie con marcadores moleculares y se analizó el nivel de metilación de los genomas luego de los diferentes tratamientos.

Antes de evaluar el efecto de situaciones estresantes sobre el modo reproductivo fue necesario analizar la estabilidad del carácter a lo largo del periodo de floración, hallándose que el cv. Tanganyika INTA presenta una sexualidad promedio menor al 2 % en condiciones de invernáculo. Plantas del cv. Tanganyika INTA bajo condiciones de estrés por déficit hídrico mostraron un 14 % de sacos sexuales, indicando un incremento de expresión de la sexualidad respecto de las plantas control. Luego de un periodo de rehidratación mostraron una sexualidad residual del 5,3 %, indicando una disminución significativa de la misma, siendo, sin embargo, significativamente diferente del control. Se realizaron pruebas de progenie con marcadores RAPDs y se detectaron polimorfismos solamente en las plantas sometidas a estrés hídrico, aunque en una proporción menor a la esperada de acuerdo a los análisis citoembriológicos, indicando que no todos los sacos embrionarios sexuales producidos dan lugar a plantas viables. El cv. Tanganyika USDA no evidenció en ningún momento la capacidad de generar sacos sexuales, clasificándose como apomítico obligado. El genotipo facultativo UNST1131 presentó una proporción de procesos sexuales del 18,5 % bajo condiciones

de estrés hídrico. Sin embargo este valor no fue significativamente distinto al control (10 %), debido principalmente a la gran variabilidad observada. Para evaluar efectos mediados por ABA se realizaron ensayos de aplicación foliar en plantas del cv. Tanganyika INTA normalmente regadas. El análisis citoembriológico no permitió detectar diferencias significativas en el número de sacos sexuales en relación con el control, descartándose momentáneamente a la concentración de esta hormona como mediadora del efecto generado por estrés. También se analizó el efecto del cultivo *in vitro* realizando diferentes ensayos en los que se varió el tipo de explanto, el medio de cultivo y la duración de los mismos. Se evaluaron los cultivares Tanganyika USDA y Tanganyika INTA. Solo uno de los ensayos (exposición a medios selectivos) generó un efecto significativo sobre el número de sacos sexuales producidos, que incrementaron, demostrando una cierta plasticidad del carácter en situaciones de estrés. Estos resultados indicarían que situaciones de estrés previas y durante la etapa de floración podrían estar regulando la expresión de la sexualidad en genotipos apomícticos facultativos de pasto llorón. Es evidente que en los cvs. Tanganyika USDA, Tanganyika INTA y UNS1131 expresan diferentes niveles de apomixis/sexualidad, desde cero a 33%.

Por otro lado, este estudio permitió demostrar que no solo las condiciones externas promueven estreses genómicos que alteran la expresión de la apomixis en pasto llorón. Condiciones como la poliploidización y la hibridación intraespecífica también afectan al modo reproductivo. El análisis de la expresión de la apomixis a través del tiempo en dos híbridos (105 y 60) obtenidos a partir de la cruce entre materiales contrastantes para el modo reproductivo mostró diferencias en la expresión del carácter. El primero (105) mostró un comportamiento errático en las proporciones de procesos apomíctico/sexuales, con estabilización del carácter tendiente a una relación 1:1 mientras que el otro, (60) presentó solo sacos sexuales en las dos primeras floraciones y una pequeña proporción de sacos apomícticos en la tercera. Los resultados obtenidos en las pruebas de progenie mostraron correlación con los observados por estudios citoembriológicos.

Dada la relación entre la apomixis y el ambiente, podría especularse que los genes involucrados en el modo reproductivo son controlados por factores epigenéticos como la metilación del ADN. Se realizaron análisis comparativos sobre los genomas (AFLP) y epigenomas (MSAP) de varios grupos de plantas con el fin de establecer el efecto de estreses genómicos sobre el genoma y epigenoma. Los grupos de plantas comparadas

fueron: 1) tratadas por estrés hídrico y plantas control del cv. Tanganyika INTA y 2) plantas híbridas del primer año de análisis y luego de tres años. En el primer caso, no se hallaron cambios genéticos en el tiempo en las plantas sometidas a estrés hídrico y control, mientras que las comparaciones con marcadores MSAP permitieron evidenciar un gran número de marcadores polimórficos debidos a procesos de metilación y desmetilación del ADN entre los dos tiempos de muestreo. Si bien no existe una diferencia estadística entre la suma de cambios ocurridos en el tiempo entre el grupo de plantas control y tratadas, se observó un alto grado de correlación ($R^2= 0,7949$) entre los porcentajes de cambios ocurridos en el tiempo y los porcentajes de sexualidad calculados a través del análisis citoembriológico para cada individuo. En el híbrido 60 no se hallaron cambios genéticos en el tiempo, pero si se hallaron en el híbrido 105. En el análisis de los perfiles epigenéticos, el híbrido 60 mostró una mayor proporción de procesos de metilación, mientras que el 105 reveló una tendencia mayoritaria hacia la desmetilación del ADN. Esto podría atribuirse a una mayor inestabilidad genómica, que podría asociarse a un comportamiento más errático del modo reproductivo. La secuenciación de una muestra de los polimorfismos obtenidos por AFLP y MSAP mostró una alta proporción (55 %) de secuencias sin homología con regiones conocidas del genoma, pudiendo tratarse de metilaciones y desmetilaciones en regiones no codificantes o en secuencias del genoma aún no informadas. Las secuencias que mostraron homología con secuencias previamente anotadas fueron principalmente elementos transponibles.

Los resultados aquí presentados y los previos obtenidos por el grupo de trabajo nos permiten hipotetizar que existe una región determinante de la apomixis, que estaría ausente en las plantas tetraploides sexuales. La misma podría contener regiones repetitivas y con redundancia génica que estarían silenciando la sexualidad en plantas apomícticas. Existen numerosas evidencias sobre el control mediado por pequeños ARNs en el silenciamiento de regiones repetitivas y elementos transponibles. Ante determinadas circunstancias, como condiciones de estrés prolongado, en esta región podría estar ocurriendo un efecto de des-represión epigenética, permitiendo un aumento en la proporción de procesos sexuales. Si bien aún resta trabajo experimental para comprobar esta hipótesis, los procesos de metilación y desmetilación observados y los elementos transponibles secuenciados serían evidencias preliminares a considerar.

Abstract

Stress affects the organisms generating physiological, genetic and epigenetic responses. Many authors argue that stress is a key factor to explain the evolutionary role of sex in organisms with facultative reproductive mode. Therefore, it is expected that facultative organisms will cross more frequently under stress, facilitating the adaptation to changing environments.

Eragrostis curvula constitutes a polymorphic complex where most of its members reproduce by apomixis, asexual reproduction through seeds, which leads to the generation of progenies genetically identical to the mother plant.

The aim of this work was to study the effect of different factors that generate genomic stress on the expression of apomixis in weeping lovegrass, such as water stress, *in vitro* culture, polyploidization and intraspecific hybridization. For this purpose, embryo sacs of different weeping lovegrass genotypes were observed after being the plants subjected to these stress conditions. Moreover, progeny tests were conducted by using molecular markers and the genome methylation status after different treatments was also assessed.

Before evaluating the effect of the mentioned stressors on the reproductive mode it was necessary to analyze the stability of the trait throughout the flowering period, finding that plants of the cv. Tanganyika INTA growing in the greenhouse exhibited an average of sexuality less than 2 %. Plants of this cultivar subjected to water stress showed an average of 14% of sexual embryo sacs, indicating an increased expression of sexuality compared to control plants. After a rehydration period these plants showed an average of sexuality of 5.3 %, indicating a significant reduction in the number of sexual embryo sacs, being, however, significantly different from control plants. Progeny tests were performed with RAPDs markers detecting polymorphisms only in plants subjected to water stress, although in a less ratio than the expected according to the cyto-embryological analysis, indicating that not all the sexual embryo sacs produced develop into viable plants. Plants of the cv. Tanganyika USDA did not show at any time the ability to generate sexual embryo sacs and being classified as full apomictic one. The facultative genotype UNST1131 showed an expression of sexual processes of 18.5 % under water stress conditions, however this value was not significantly different to the control (10%), mainly due to the large variability exhibited by this material. To assess

effects mediated by ABA, foliar application were performed on normally watered cv. Tanganyika INTA plants. The cyto-embryologic analysis was unable to detect significant differences in the number of sexual embryo sacs compared to the control, dismissing for the moment the hormone concentration as a mediator of the effect generated by stress. The effect of *in vitro* culture was also analyzed performing different tests in which the explant type, culture media and time under culture were changed. Tanganyika USDA and Tanganyika INTA cultivars were evaluated. In only one of the trials (exposure to selective media) a significant effect on the number of sexual embryo sacs was observed, which increased, showing a certain plasticity of the trait when the plants were growing under stress conditions. These results indicate that stress situations before and during the flowering stage might be regulating the expression of sexuality in facultative apomictic genotypes of weeping lovegrass. It is evident that Tanganyika USDA, Tanganyika INTA and UNS1131 cultivars express different levels of apomixis/sexuality ratios, from zero to 33%.

This study also demonstrated that not only external conditions promote genomic stresses that alter the expression of apomixis in weeping lovegrass. Conditions such as intraspecific hybridization and polyploidization also affect the reproductive mode. The analysis of the expression of apomixis over time in two hybrids (#105 and #60) obtained from crosses between sexual X apomictic materials showed differences in the expression of the trait. The first one (#105) showed an erratic behavior in the ratio of apomictic/sexual processes, ending after two years with a ratio of 1/1, while the other (#60), only showed sexual embryo sacs on the two first blooms and a small proportion of apomictic embryo sacs during the third one. The results of progeny tests correlated very well with the cytoembryological observations.

Given the close relationship between apomixis and environment, it might be speculated that the genes involved in the control of the reproductive mode could be subjected to epigenetic regulation, involving DNA methylation in some way. Comparative analyses at genomic (AFLP) and epigenetic (MSAP) levels were performed on different groups of plants in order to analyze the effect of genomic stresses. The groups compared were: 1) plants under water stress and normally watered plants (control) belonging to cv. Tanganyika INTA; 2) recently hybridized plants (first blooming) and the same plants in the third blooming period. In the first case (water stressed vs. control plants), no genetic changes over time were observed while comparisons with MSAP showed a large

number of polymorphic markers due to processes of DNA methylations and demethylations, showing a high correlation level ($R^2 = 0.7949$) between the percentages of changes over time and the number of sexual embryo sacs. In the hybrid #60 no genetic changes were detected as it was in the #105. However, the analysis of epigenetics profiles showed a higher proportion of methylation processes in the hybrid #60 than in #105, while DNA demethylation levels were in the opposite direction. This could be associated with a higher genomic instability in #105 than in #60 that could be correlated with an increased erratic behavior of the reproductive mode. The sequencing of a sample of the polymorphic AFLP and MSAP bands showed a high proportion (55 %) of sequences without homology to previously annotated sequences, being probably noncoding regions or unknown genes. The other sequences were mainly transposable elements.

The results presented here and those previously reported by our group allow us to hypothesize that there is a critical region conditioning apomixis, which would be absent in sexual tetraploid plants. This region could contain repetitive elements and gene redundancy that might be silencing sexuality in apomictic plants. Under certain circumstances, such as long stress periods, the control could be relaxed, allowing an increase in the proportion of sexual processes.

INTRODUCCIÓN

Las plantas y el estrés

El estrés, por definición, es cualquier factor externo que ejerce una influencia desventajosa en una planta (Frankham *et al.*, 2004). Asimismo, está compuesto por un conjunto de respuestas bioquímicas o fisiológicas que definen un estado particular del organismo diferente al observado bajo un rango de condiciones óptimas. En general, las situaciones de estrés originan en el vegetal una serie de cambios fisiológicos compensatorios que van encaminados a mantener las condiciones vitales del organismo.

Debido a su naturaleza sésil, las plantas han desarrollado respuestas metabólicas sofisticadas para hacer frente y sobrevivir, en lugar de evitar las condiciones de estrés como lo hacen los organismos móviles (Madlung y Comai, 2004). Esto, lleva a que se vean expuestas a condiciones adversas o estreses que perturban su crecimiento y desarrollo normal (Umezawa *et al.*, 2006). Como resultado de ello, las plantas han desarrollado mecanismos complejos de ajuste a estreses a distintos niveles (anatómicos, morfológicos, celulares, bioquímicos y moleculares) para garantizar su supervivencia bajo condiciones adversas (Boyer, 1982).

En el transcurso de su evolución, numerosas plantas han sufrido adaptaciones estructurales y/o funcionales que les permiten sobrevivir en hábitats que presentan condiciones ambientales variadas. Las especies adaptadas a dichos hábitats han desarrollado una serie de estrategias destinadas a contrarrestar las condiciones de estrés. Estos conceptos no se aplican por igual a todas las especies, ya que muchas plantas se desarrollan y crecen normalmente en situaciones aparentemente desfavorables, cumpliendo la totalidad de sus ciclos vitales sin ningún tipo de alteración. Ante esta situación, se propuso que una planta se halla en situación de estrés cuando debe invertir energía extra en el mantenimiento de sus funciones vitales (Larcher, 1995).

El estrés, en cualquiera de sus formas, ejerce una fuerte presión evolutiva sobre todos los seres vivos. Para sobrevivir, cualquier organismo debe desarrollar tolerancia, resistencia o mecanismos para evitar un estrés determinado. La tolerancia le permite al organismo resistir a un estrés eventual sin sufrir daño alguno realizando pequeños ajustes fisiológicos. En cambio, la resistencia implica contramedidas activas que, de mantenerse en el tiempo podrían llevar a la planta a una situación de agotamiento, mientras que la evasión evita la exposición al estrés.

Del estrés ambiental al estrés genómico

A lo largo de la evolución las plantas han desarrollado diferentes modos de reconocimiento y respuesta que les permiten hacer frente a estreses ambientales. Paralelamente, han desarrollado y fijado vías metabólicas que les permiten contrarrestar dichas situaciones. Como ejemplos podemos citar la resistencia sistémica adquirida contra el estrés biótico o la activación de proteínas de choque térmico (Madlung y Comai, 2004). En las últimas décadas se ha adquirido un conocimiento considerable acerca de las respuestas fisiológicas que generan las plantas ante condiciones de estrés, sin embargo, los efectos del estrés en todo el genoma han sido menos estudiados.

Los estreses abióticos son los factores limitantes más importantes del crecimiento y la producción de los cultivos y tienen un rol fundamental en la dispersión ecológica de las plantas. Para adaptarse, las plantas necesitan una gran reprogramación de la expresión génica y su regulación es, en parte, dependiente de modificaciones tanto genéticas como epigenéticas (Arnholdt-Schmitt, 2005). Estas modificaciones pueden causar un aumento de la expresión génica, la síntesis y la acumulación de metabolitos que influyen en la tolerancia, cambios a niveles transcripcionales o postranscripcionales y reorganizaciones del genómicas que pueden o no ser hereditarias. Estas alteraciones pueden afectar el crecimiento de las plantas, el desarrollo y la respuesta al estrés ambiental, y dan cuenta de los esfuerzos realizados por las plantas para sobrevivir a los cambios ambientales (Arnholdt-Schmitt, 2005). Ejemplos de este tipo de comportamiento fueron reportados por numerosos autores: Hirochika (1993) realizando ensayos de cultivo *in vitro* en plantas de tabaco, Dellaporta *et al.*, (1984) analizando mutaciones reveló que infecciones virales tenían relación con el movimiento de transposones. Al igual que el estrés biótico, el estrés abiótico puede conducir a una serie de respuestas genéticamente programadas. Factores como la temperatura pueden desencadenar reestructuraciones del genoma (Coen *et al.*, 1986; Hashida *et al.*, 2003). Otro ejemplo del efecto del ambiente sobre el genoma son los llamados genotrofos del lino, que se producen cuando ciertas variedades de esta especie son expuestas a diferentes condiciones ambientales, produciendo progenie diferente, pero con modificaciones genéticas heredables reproducibles (Cullis, 1973).

En resumen, el estrés ejerce sus efectos sobre el organismo, no sólo a través de las vías de respuesta fisiológica, sino también a través de vías genéticas, y de hecho, hasta

respuestas epigenéticas. En las plantas, diferentes situaciones se encuentran entre las causas generadoras de estrés genómico, las más comunes son: el cultivo de tejidos, el ataque de patógenos, estreses abióticos y la hibridación interespecífica.

En la primera mitad del siglo XX, Barbara McClintock predijo cambios genómicos a gran escala como la activación de transposones y otras modificaciones estructurales en los cromosomas en respuesta a situaciones que causan estrés genómico. McClintock se refirió a distintos estreses que podrían causar reestructuración genómica generalizada facilitada por la activación de transposones, la transposición de elementos móviles y la rotura de cromosomas - fusión - puente (McClintock, 1984). Este tipo de alteraciones en el genoma se suceden ante situaciones estresantes como el cultivo de tejidos, ataque de patógenos, cruzamientos interespecíficos, frente a estreses abióticos y en la separación de la línea germinal de los tejidos somáticos durante el desarrollo temprano. Aunque aun se carece de evidencia molecular directa y concreta, estamos empezando a comprender las respuestas moleculares del genoma inducidas por el estrés.

La resistencia a un determinado tipo de estrés podría aportar co-resistencia a otros factores estresantes (Prassat, 1997; Leshem *et al.*, 1998). Este mecanismo inherente de resistencia al estrés múltiple sería muy ventajoso para el desarrollo, ya que las plantas, en la naturaleza se enfrentan a varios agentes estresantes a la vez (Prassat y Rengel, 1998). Como resultado, el estrés puede ocasionar desde cambios en el crecimiento hasta daño en células y/o tejidos, y modificar la expresión de genes generado, a su vez, un efecto de plasticidad fenotípica.

Un ejemplo de la plasticidad en plantas es el proceso de endoreduplicación, una variante del ciclo celular en el que la mitosis se interrumpe antes de la citocinesis (Francis, 2007). Mientras que en células animales este proceso es limitado, es considerablemente común en plantas (Galbraith *et al.*, 1991) y podría desempeñar un rol importante en la modulación de las respuestas al estrés. Mediante la manipulación de la expresión de *E2fe* (un represor de endoreduplicación en las plantas), se demostró que el aumento de la ploidía celular disminuye el impacto negativo de la sequía en el tamaño de las hojas (Cookson *et al.*, 2006). Teniendo en cuenta que el estilo de vida sésil de las plantas requiere una capacidad de adaptación a condiciones ambientales, es atractivo especular que la poliploidización generalizada contribuye a la plasticidad en los vegetales.

La variación fenotípica de las plantas sujetas a estrés fue clásicamente atribuida a variaciones en la secuencia del ADN, pero más recientemente se demostró que modificaciones epigenéticas pueden contribuir solas o en conjunto a definir el fenotipo regulando la expresión de genes en respuesta al estrés (Grativol *et al.*, 2012). Ante situaciones estresantes, las respuestas fisiológicas implican la acción de diversas proteínas, factores de transcripción y metabolitos asociados al estrés (Vinocur y Altman, 2005), mientras que existen otras respuestas que implican principalmente cambios epigenéticos, tales como la metilación del ADN, modificaciones en la cromatina e histonas y mecanismos basados en pequeños ARN que desempeñan un papel fundamental en la alteración de la expresión génica contra el estrés (Chinnusamy y Zhu, 2009). Estas modificaciones epigenéticas otorgan un nivel adicional de complejidad a la variación fenotípica y un gran potencial evolutivo.

La epigenética es el estudio de modificaciones en la expresión de genes que no obedecen a una alteración de la secuencia del ADN y que son heredables. Una de las fuentes de mayores modificaciones de los genes es el factor ambiental y puede afectar a uno o varios genes con múltiples funciones. Por medio de la regulación epigenética se puede observar cómo es la adaptación al medio ambiente dada por la plasticidad del genoma, la cual tiene como resultado la formación de distintos fenotipos según el medio ambiente al que sea expuesto el organismo. Estas modificaciones presentan un alto grado de estabilidad y, al ser heredables, se puedan mantener en un linaje celular por muchas generaciones (Grant-Downton y Dickinson, 2006).

Efecto del estrés sobre el modo reproductivo

La teoría predice que el estrés es un factor clave para explicar el papel evolutivo del sexo en los organismos de modo reproductivo facultativo. Son numerosos los casos en que ante determinadas condiciones de estrés, diferentes organismos cambian su modo reproductivo o la expresión del mismo. Aunque en muchos linajes el sexo es una parte obligatoria del ciclo de vida y se asocia con la reproducción, en procariontes y muchos eucariotes inferiores la reproducción sexual es facultativa, y se produce en respuesta al estrés (Merchan, 2001). Se ha observado en diferentes especies de hongos, como *Saccharomyces cerevisiae*, *Neurospora crassa* y *Candida albicans* que situaciones estresantes, como por ejemplo falta de nitrógeno en el medio de cultivo, inducen una vía sexual de esporulación (Gimeno *et al.*, 1992; Springer, 1993).

En el caso de *Candida albicans*, el hongo que más frecuentemente causa patologías en los seres humanos, está en constante desafío de supervivencia, no solo por las interacciones con el sistema inmunológico, sino también por la necesidad de sobrevivir en una amplia gama de nichos ecológicos dentro de su huésped humano. El ciclo parasexual de *C. albicans* genera diversidad, sin embargo, al parecer, ocurre muy raramente en la naturaleza. Estudios recientes han demostrado que el estrés facilita pasos fundamentales del ciclo parasexual aumentando la frecuencia de este modo reproductivo en condiciones de estrés (Berman y Hadany, 2012). De esta manera, se genera una progenie que tiene el potencial para adaptarse más fácilmente a condiciones de estrés.

En el alga multicelular *Volvox carteri*, Nedelcu y Michod (2003) informan que la reproducción sexual se desencadena ante situaciones de estrés ambiental (por ejemplo, un aumento en la temperatura del agua). De acuerdo a estos autores, ante un aumento de los niveles intracelulares de especies reactivas de oxígeno (es decir, ante una situación de estrés oxidativo) conduce a la activación de genes que participan en la inducción de la sexualidad del organismo a través de la expresión de una glicoproteína que sería la responsable de este cambio. En trabajos posteriores (Nedelcu *et al.*, 2004) estos investigadores informan el efecto inhibitorio de compuestos antioxidantes sobre la inducción y el desarrollo sexual en *V. carteri*, demostrando una relación causal inequívoca entre el estrés oxidativo y la reproducción sexual en esta especie.

El alga verde unicelular *Chlamydomonas reinhardtii* es otro ejemplo claro de la relación que existe entre las condiciones ambientales estresantes y el modo reproductivo del organismo. En este alga, la eliminación de una fuente de nitrógeno en el medio de cultivo inicia un programa de diferenciación sexual casi inexistente en condiciones normales de crecimiento (Treier *et al.*, 1989). Sorprendentemente, una familia multigénica altamente diversificada de feroforinas (glicoproteínas relacionadas con el inductor sexual de *V. carteri*) está presente en *C. reinhardtii* y se expresa bajo diversas condiciones de estrés. Estos hallazgos sugieren una conexión evolutiva entre el sexo y el estrés a nivel genético, a través de la duplicación y/o la pre-adaptación (Nedelcu *et al.*, 2005). Si bien los orígenes evolutivos de la reproducción sexual siguen sin estar claros, estos estudios podrían ser indicativos de una función ancestral del sexo como una respuesta adaptativa al estrés inducido por ROS.

Los ejemplos de inducción sexual a consecuencia del estrés no solo se limitan al reino vegetal. Las pulgas de agua (*Daphnia pulex*) se reproducen partenogénicamente, usualmente desde la primavera hasta el final del verano. Durante el invierno, en situaciones de sequía o cuando el ecosistema se vuelve nocivo para la supervivencia, la producción de generaciones de hembras cesa y comienza una producción de pulgas de agua macho por partenogénesis (Hiruta y Tochinai, 2012). En ese momento se produce el apareamiento, cesa la reproducción partenogenética y se origina una generación sexual ovípara. Adicionalmente a la estrategia de producción de huevos capaces de sobrepasar condiciones desfavorables, el mecanismo de reproducción sexual incrementa la variabilidad genética aumentando las posibilidades de adaptación a nuevas condiciones.

Basándonos en esta evidencia, es comprensible esperar que diferentes organismos facultativos se crucen más frecuentemente bajo situaciones de estrés y este cruzamiento dependiente del estrés facilitaría la adaptación a los ambientes cambiantes a los que deberán enfrentarse.

La apomixis en plantas

Las plantas con flores muestran una gran flexibilidad reproductiva siendo capaces de reproducirse sexual o asexualmente. Para que ocurra la reproducción sexual gametos de cada sexo, reducidos por meiosis, deben fusionarse para dar origen al embrión y demás partes de la futura semilla. Sin embargo, no todas las angiospermas se reproducen de esta forma, algunas plantas utilizan diferentes estrategias reproductivas y forman el embrión sin la fusión de gametos generando descendientes genéticamente idénticos a la planta madre. Estas formas alternativas de reproducción asexual por semilla son conocidas como apomixis (Koltunow, 1993). Una de las definiciones más claras de este término la formuló Gian Nogler quien en 1984 definió la apomixis como un modo de reproducción asexual (agámica) a través de semillas que conduce a la generación de progenies genéticamente idénticas a la planta madre. La palabra apomixis deriva del griego “apo” cuyo significado es falta o ausencia, y “mixis” que significa unión o mezcla, haciendo referencia a la falta de unión o falta de mezcla de gametas de origen sexual. El resultado de la apomixis es que el embrión es un perfecto clon, genéticamente idéntico a la madre (Koltunow 1993).

La apomixis fue descrita por primera vez en 1841 en la planta australiana *Alchornea ilicifolia* (sin. *Caelebogyne ilicifolia*) por John Smith cuando un ejemplar femenino de esta especie dioica fue introducido a los Jardines Botánicos de Kew en Londres desde Australia. La planta aislada floreció y produjo semillas en abundancia si bien no disponía de ninguna fuente de polen para polinizarse, poniendo en evidencia que ella misma había producido semilla asexualmente (Smith, 1841). Paradójicamente, los primeros experimentos con plantas apomícticas fueron realizados de forma involuntaria por Mendel usando plantas del género *Hieracium*. Éste, atribuyó erróneamente estas variaciones en sus resultados esperados a una supuesta “Frecuente Autopolinización” (Whitton, 2008).

La apomixis básicamente combina dos alteraciones en el desarrollo sexual: primero, la falta de meiosis (apomeiosis), y segundo, la falta de fertilización, es decir el desarrollo de un embrión a partir de la ovocélula no fecundada (partenogénesis). Esta combinación puede ser alcanzada por dos vías diferentes: la apomixis gametofítica o esporofítica. En la apomixis gametofítica se altera o evita la meiosis, resultando en un gametofito (saco embrionario) no reducido, ya sea a partir de la célula madre de la megaspora (diplosporía) o de una célula somática de la nucela (aposporía). Luego la ovocélula no reducida desarrolla partenogénicamente. En contraste, durante la apomixis esporofítica comienza el desarrollo del embrión directamente a partir de células no reducidas del óvulo, pudiendo ser estas, células de la nucela (embrionía nucelar) o del integumento (embrionía integumentaria). Dichos embriones normalmente desarrollan junto a los formados sexualmente, llevando generalmente a la formación de semillas poliembriónicas, y esta forma de apomixis se denomina embriogénesis adventicia (Koltunow, 1993). La fertilización de los núcleos polares (pseudogamia) para la formación del endosperma es retenida en cerca del 90 % de las especies apomícticas (Mogie, 1992), mientras que la formación del endosperma independiente del polen (endosperma autónoma) es rara y sobre todo está presente en especies de la familia Asteraceae (compuestas). La autopolinización es posible en las especies apomícticas pseudogamas, ya que usualmente son autofértiles (Hörandl, 2010). De esta manera, la diferencia fundamental entre la reproducción sexual y la apomixis en las plantas con flor no es la reproducción a través de uno o dos parentales, sino en que uno se basa en la meiosis y otro en el desarrollo apomeiótico. En forma interesante, la apomixis ocurre en

los mismos taxa que presentan sexualidad polispórica, es decir, la formación del saco embrionario a partir de más de una espora (Carman, 1997).

En la mayoría de los casos, la apomixis se presenta de manera facultativa, es decir, no solo existen procesos de reproducción asexual. En estos individuos, la reproducción sexual también puede ocurrir (Koltunow, 1993). En caso de carecer completamente de reproducción sexual, se suele decir que la especie posee una apomixis obligada. Estas clasificaciones han generado cierta controversia, donde hay quienes han postulado que, en realidad, todas las especies apomícticas serían facultativas, definiendo a la apomixis obligada como un artefacto generado por la observación insuficiente (Asker y Jerling, 1992). Análisis de progenies de plantas apomícticas facultativas revelan una mayoría de descendientes generados por apomixis ($2n+0$) y entre los fuera de tipo, una menor frecuencia de individuos $n+0$ comparado a $2n+n$ (Berthaud, 2001). En general, las especies apomícticas forman complejos agámicos o grupos en los cuales biotipos sexuales y apomícticos se encuentran a distintos niveles de ploidía (Hörandl y Hojsgaard, 2012).

Aunque a simple vista podría verse a la reproducción apomíctica como un perjuicio evolutivo ya que carece de las ventajas evolutivas de la reproducción sexual, la apomixis puede transmitir caracteres fortuitos para la aptitud evolutiva. Los ejemplares apomícticos en realidad han descubierto la eficacia de la producción en masa mucho antes de que Henry Ford la aplicase a la producción del automóvil. En primera instancia, podría creerse que las plantas apomícticas están destinadas a permanecer con el mismo genoma invariable a través de sucesivas generaciones, sin embargo, la apomixis facultativa no impide la variación, sino que multiplica ciertos productos varietales exitosos.

Es improbable que las características de la apomixis hayan evolucionado aleatoriamente ya que los mutantes para cada proceso muestran aptitud reducida y son rápidamente eliminados en las poblaciones (van Dijk *et al.*, 2009). El cambio hacia la apomixis funcional requiere de la combinación de tres pasos: la falta de meiosis, el desarrollo partenogénico de la ovocélula y alteraciones en el nivel de ploidía del endosperma. Como fuera mencionado por Margulis y Sagan (1986) y más específicamente para plantas por Van Dijk y Vijverberg (2005), cada uno de estos pasos puede ser potencialmente deletéreo. Por ejemplo la falta de meiosis manteniendo la fecundación

resulta en un aumento de la ploidía ($2n+n$; híbridos BIII), lo cual es limitante por desventajas a nivel celular al incrementarse el contenido de ADN y por problemas citológicos de división celular (Comai, 2005). El mantenimiento de la meiosis junto con partenogénesis ($n+0$) lleva a una continua reducción del nivel de ploidía y por lo tanto en la expresión de alelos recesivos enmascarados. En poblaciones naturales de *Ranunculus kuepferi* se observó que existe una selección contra los individuos $n+0$ (Cosendai y Hörandl, 2010) al igual que en líneas hexaploides apomícticas facultativas de *Panicum maximum* (Kaushal *et al.*, 2008).

En sistemas naturales, la apomeiosis se debe a una desregulación temporal o espacial de los genes que controlan la vía de reproducción sexual más que a un carácter independiente (Sharbel *et al.*, 2009; Baubec *et al.*, 2010). Esta desregulación es muy probable que se deba a la poliploidía ya que la gran mayoría de las plantas apomícticas naturales son poliploides. No obstante, la sexualidad también es común en plantas poliploides, por lo tanto la poliploidía en sí misma no es suficiente para desencadenar la apomixis. Sin embargo, la poliploidía puede alterar globalmente los patrones de expresión génica (Chen, 2007). La apomeiosis y la partenogénesis pueden resultar más probablemente de mecanismos epigenéticos, como del silenciamiento de vías de la reproducción sexual por un grupo de genes los cuales son heredados como una unidad (Grimanelli, 2012).

Aunque en la apomixis no se produce meiosis en la megaspora, si existe en la micróspora, es decir que los granos de polen de las plantas apomícticas son reducidos (n). Este polen es funcional y necesario en la gran mayoría de las plantas apomícticas, ya que son pseudógamas (Koltunow, 1993). 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). Como se mencionara previamente, algunas especies apomícticas no requieren de la fertilización de la célula central y el endosperma se

desarrolla de manera autónoma, como sucede en especies de la familia Asteraceae (Noyes, 2007).

Mecanismos de apomixis

Los procesos de desarrollo por los que se obtiene una semilla apomíctica pueden dividirse en tres: la diplosporía, la aposporía y la embriogénesis adventicia (Figura I.1). A los dos primeros se los clasifica como apomixis gametofítica y a la última también se la conoce como apomixis esporofítica. La apomixis esporofítica involucra la formación directa de uno o más embriones a partir de células del ovulo diploides, denominadas células iniciales del embrión, las cuales se hallan adyacentes a un gametofito femenino sexual en desarrollo y se desdiferencian (Koltunow *et al.*, 2013). Esto es común en mango y *Citrus* y ha sido denominado embriogénesis adventicia (Figura I.1). Análisis en *Citrus* muestran que células iniciales del embrión son especificadas temprano en el desarrollo del óvulo durante la mitosis de la megaspóra para la formación del saco embrionario. Si el saco embrionario reducido adyacente es fertilizado, el embrión cigótico puede o no sobrevivir a la competencia por recursos asociada al crecimiento de embriones múltiples en la semilla (García *et al.*, 1999; Nakano *et al.*, 2008a y b; Kepiro y Roose 2010).

La apomixis gametofítica resulta en la formación de uno o más gametófitos no reducidos ya que la meiosis es evitada por diferentes procesos que en conjunto son denominados apomeiosis (Figura I.1). La ovocélula que se diferencia en el saco embrionario no reducido desarrolla un embrión en ausencia de fertilización y este proceso es denominado partenogénesis. La formación del endosperma puede o no necesitar de la fertilización (pseudogamia o endosperma autónomo, respectivamente). La apomeiosis puede ocurrir por dos caminos principales, diplosporía (Figura I.1c) o aposporía (Figura I.1d), que se diferencian por el origen de la célula precursora que da lugar al saco embrionario no reducido. En la diplosporía, la célula madre de la megaspóra (CMM) permanece no reducida ya sea porque nunca ingresa en la meiosis (diplosporía mitótica, tipo *Antennaria*), forma en la que se presenta generalmente, o porque falla la meiosis y la CMM vuelve al estado original (diplosporía meiótica, tipo *Taraxacum*). En algunos casos se ha observado recombinación en formas que presentan diplosporía meiótica (van Baarlen *et al.*, 2000). Luego por divisiones mitóticas de la CMM se genera un saco embrionario (Figura I.1c). En la aposporía, la CMM sufre

meiosis y se genera la megaspora funcional reducida. Adicionalmente uno o más células de la nucela cercanas a la CMM, llamadas iniciales apospóricas, sufren mitosis sucesivas y producen sacos embrionarios no reducidos. El momento de aparición y la cantidad de las iniciales apospóricas varía en las diferentes especies, pero típicamente aparecen pronto luego del alargamiento de la CMM o durante la formación de la tétrada (Figura I.1d). En algunos géneros apospóricos como *Pennisetum* y *Hieracium*, la vía sexual termina pronto luego de que las iniciales apospóricas se alargan o entran en mitosis (Snyder, 1955; Peel *et al.*, 1997; Koltunow *et al.*, 2011), mientras que en otros, ambos sacos embrionarios, reducidos y no reducidos, coexisten en el mismo óvulo (Figura I.1d).

Muchos sacos embrionarios no reducidos contienen ocho núcleos luego de la celularización, rememorando el saco embrionario sexual típico, tipo *Polygonum*. Estos sacos embrionarios octonucleados no reducidos son denominados tipo *Hieracium*. Los tipo *Panicum*, son tetranucleados y se forman por dos rondas de mitosis generando típicamente una ovocélula, dos sinérgidas y una célula central uninucleada. Sacos embrionarios tetranucleados con una célula central uninucleada pueden ser una adaptación para mantener la relación entre genomas materno: paterno (2m:1p) en la formación del endosperma pseudogamo (Koltunow y Grossniklaus, 2003).

Al final del proceso, 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 (Koltunow *et al.*, 2013).

Si bien estos procesos están claramente diferenciados, la presencia de uno no implica necesariamente la exclusión de otro. 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). Otro caso particular es el de la orquídea australiana *C. apostasioides*. En ella la célula madre de la megaspora central presenta apomixis diplospórica, mientras que en la nucela o el tegumento se forman embriones adicionales por apomixis esporofítica (Sorensen *et al.*, 2009).

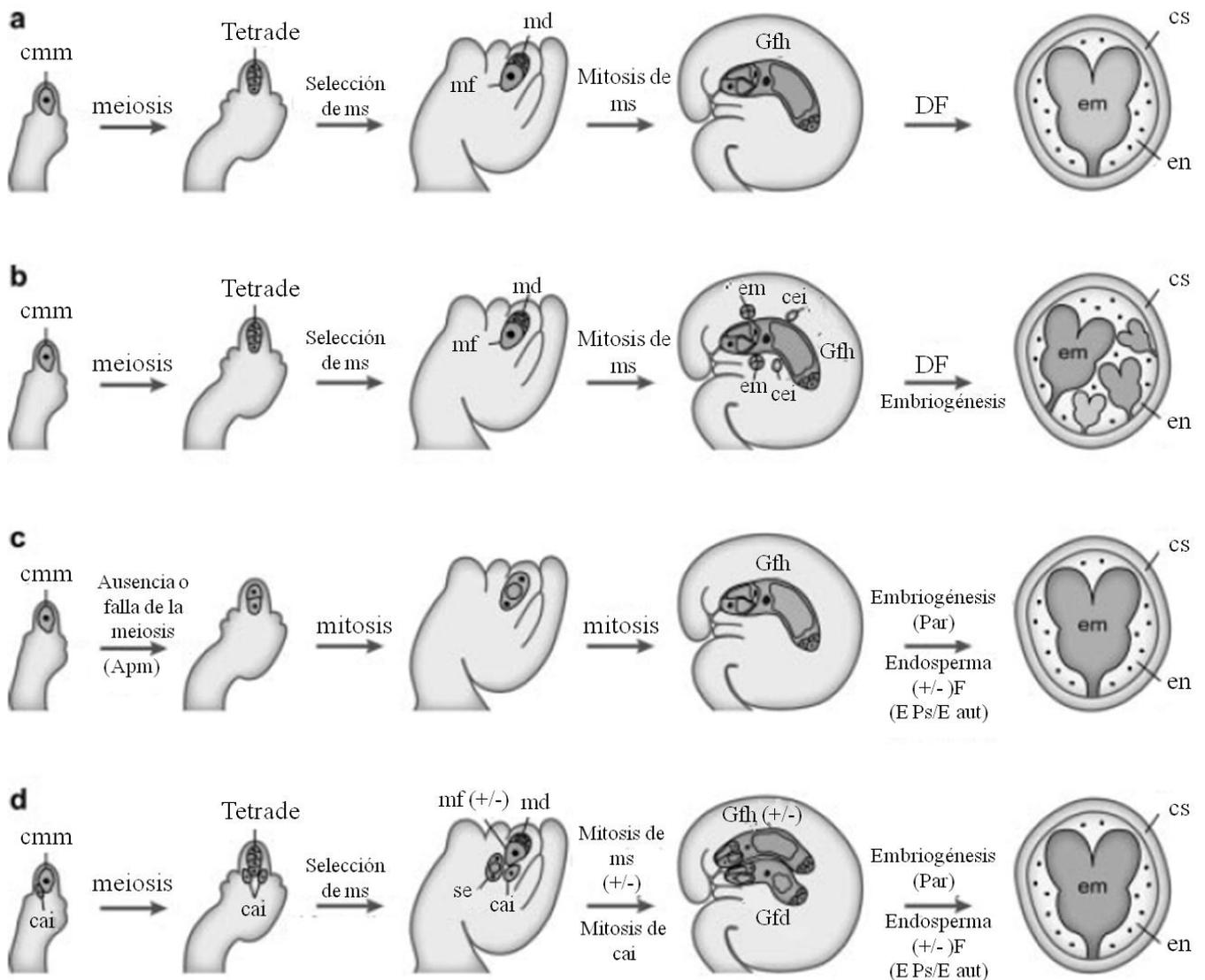


Figura I.1: Mecanismos de apomixis (diplosporía, aposporía y embriogénesis adventicia) comparados con los eventos de la reproducción sexual de plantas. A, Proceso sexual. B, apomixis esporofítica. C, apomixis diplospórica y D, apomixis apospórica, donde la formación del endosperma puede o no requerir fertilización. Apm, apomeiosis; cai, células apospóricas iniciales; cei, célula embrionaria inicial; cmm, célula madre de la megaspora; cs, cubierta seminal; DF, doble fertilización; E aut, endosperma autónomo; E ps, el endosperma pseudogamo requiere fertilización; em, embrión; en, endosperma; F, fertilización; Gfd, gametofito femenino diploide; Gfh, gametofito femenino haploide; md, megasporas degenerantes; mf, megaspóra funcional; ms, megaspóra; Par, partenogénesis, (+/-), presente o ausente (Adaptado de Koltunow *et al.*, 2013).

Control genético de la apomixis

La apomixis en angiospermas es heredable, pero la base genética es inesperadamente compleja. La herencia de la apomixis ha sido estudiada en muchas especies. En *Citrus*, un único locus de 300 kb esta fuertemente asociado con la poliembrionía (Nakano *et al.*, 2012). El mapeo genético de la aposporía y la diplosporía ha confirmado la herencia dominante tanto ligada como no ligada de la apomeiosis y la partenogénesis. En muchos de los estudios de mapeo se ha observado estrecha vinculación de múltiples marcadores y la supresión de la recombinación de por lo menos uno de los dos loci (Ozias-Akins y van Dijk, 2007; Albertini *et al.*, 2010; Pupilli y Barcaccia, 2012). En las gramíneas apospóricas *Pennisetum/Cenchrus* (Ozias-Akins *et al.*, 1998; Roche *et al.*, 1999), *Brachiaria* (Pessino *et al.*, 1998), *Paspalum* (Labombarda *et al.*, 2002) y en la diplospórica *Tripsacum* (Grimanelli *et al.*, 1998), la evidencia actual apoya la hipótesis de que un solo locus controla ambos componentes. En *Poa* (Albertini *et al.*, 2001), *Taraxacum* (van Dijk y Bakx-Schotman, 2004), *Hypericum* (Schallau *et al.*, 2010), *Erigeron* (Noyes y Rieseberg, 2000) y *Hieracium* (Catanach *et al.*, 2006), apomeiosis y partenogénesis están controlados por loci distintos, los cuales en algunos casos, están genéticamente ligados. En la Tabla I.1 se presentan las características de herencia de algunas de las especies apomícticas modelo más estudiadas (Tomado de Koltunow *et al.*, 2013).

Entre 1965-80, en el Laboratorio de Suelos y Aguas de Grassland (USDA, ARS, Temple, Texas, EEUU) Paul 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. 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. 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. Este 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.

Tabla I.1: Características de los modelos de apomixis gametofítica más estudiados (Adaptado de Koltunow *et al.*, 2013).

Especie	Tipo de apomixis ^a	Caracteres mapeados ^b	Loci	Referencias
<i>Taraxacum officinale</i>	Dip AutE	Apm/Par/AutE	2-3	Tas y van Dijk, 1999; Van Dijk <i>et al.</i> , 1999; Vijverberg <i>et al.</i> , 2004
<i>Ranunculus auricomus</i>	Apo PsE	Apm/Par	1-2	Nogler, 1984b, 1995
<i>Erigeron annuus</i>	Dip AutE	Apm/Par-AutE	2	Noyes y Rieseberg, 2000; Noyes <i>et al.</i> , 2007
<i>Boechera divaricarpa</i>	Dip PsE	Clonal progeny	nd ^c	Schranz <i>et al.</i> , 2006
<i>Hieracium spp</i>	Apo AutE	Par; Apm/Par-AutE	1 (Par); 2 (Apm/Par-AutE)	Bicknell <i>et al.</i> , 2000; Catanach <i>et al.</i> , 2006; Koltunow <i>et al.</i> , 2011; Okada <i>et al.</i> , 2011
<i>Hypericum perforatum</i>	Apo PsE	Apm/Par	2	Schallau <i>et al.</i> , 2010
<i>Tripsacum dactyloides</i>	Dip PsE	Apm	1	Leblanc <i>et al.</i> , 1995; Grimanelli <i>et al.</i> , 1998
<i>Pennisetum squamulatum</i>	Apo (4-nucl)f PsE	Apm	1	Ozias-Akins <i>et al.</i> , 1993, 1998; Goel <i>et al.</i> , 2006; Huo <i>et al.</i> , 2009; Zeng <i>et al.</i> , 2011
<i>Cenchrus ciliaris</i>	Apo (4-nucl) PsE	Apm or Apm-Par	1	Sherwood <i>et al.</i> , 1994; Gustine <i>et al.</i> , 1997; Roche <i>et al.</i> , 1999; Jessup <i>et al.</i> , 2002; Dwivedi <i>et al.</i> , 2007
<i>Paspalum simplex</i>	Apo (8-nucl)h PsE	Apm-Par	1	Pupilli <i>et al.</i> , 2001; Labombarda <i>et al.</i> , 2002
<i>Brachiaria brizantha</i>	Apo (4-nucl) PsE	Apm	1	do Valle y Savidan, 1996; Pessino <i>et al.</i> , 1997, 1998
<i>Brachiaria humidicola</i>	Apo (4-nucl) PsE	Apm	1	Zorzatto <i>et al.</i> , 2010
<i>Panicum maximum</i>	Apo (4-nucl) PsE	Apm	1	Hanna <i>et al.</i> , 1973; Savidan, 1980; Ebina <i>et al.</i> , 2005
<i>Paspalum notatum</i>	Apo (4-nucl) PsE	Apm	1	Martinez <i>et al.</i> , 2001, 2003; Stein <i>et al.</i> , 2007; Acuna <i>et al.</i> , 2009, 2011
<i>Poa pratensis</i>	Apo (8-nucl) PsE	Par; Apm/Par; Apm/Par	1 (Par); 2 (Apm/Par); 5 (Apm/Par)	Barcaccia <i>et al.</i> , 1998; Albertini <i>et al.</i> , 2001; Matzk <i>et al.</i> , 2005

^a diplospórico (Dip), apospórico (Apo), endosperma autónomo (AutE), endosperma pseudogamo (PsE), sacos embrionarios no reducidos tetranucleados tipo *Panicum* (4-nucl), sacos embrionarios no reducidos octonucleados tipo *Panicum* (8-nucl)

^b apomeiosis (Apm), partenogénesis (Par), endosperma autónomo (AutE)

^c no determinado

Apomeiosis y partenogénesis están probablemente bajo control génico independiente, pero esta independencia no puede ser fácilmente probada en algunas especies por su fuerte ligamiento. Hasta el momento, existe poca evidencia del control génico independiente de la formación del endosperma autónomo (Koltunow *et al.*, 2013).

Si bien estos mecanismos comparten algunas características en la formación de la estructura megagametofítica, hasta el momento, no se ha encontrado una correspondencia entre los marcadores moleculares asociados a la aposporía y a la diplosporía (Leblanc *et al.*, 1995, Pessino *et al.*, 1997, Pupilli *et al.*, 2001, Pupilli *et al.*, 2004), indicando que ambas formas de apomixis están gobernadas por genes diferentes (Grimanelli *et al.*, 2001a).

Apomixis y poliploidía

La poliploidía se puede definir como la existencia de más de dos complementos genómicos completos en el núcleo celular. La poliploidización es habitual en el reino vegetal y es uno de los principales mecanismos que colabora en la evolución de los genomas. Se estima que en las angiospermas la proporción de especies poliploides es de aproximadamente el 70 % (Masterson, 1994). Sin embargo, investigaciones recientes han revelado que muchas especies de plantas diploides poseen orígenes poliploides, demostrando la frecuencia de la poliploidía a lo largo de la historia de las plantas (Blanc y Wolfe, 2004; Cui *et al.*, 2006). Esta ubicuidad de la poliploidía implica que ésta debe conferir ventajas selectivas sobre el nivel diploide, las cuales son, de hecho evidentes, ya que se manifiestan a menudo como aumento del vigor de los fenotipos poliploides, aumento de la resistencia a la sequía, resistencia a plagas y enfermedades, cambios en el tiempo de floración, en el tamaño de órganos y en la proporción de biomasa (Osborn *et al.*, 2003; Adams y Wendel, 2005; Comai, 2005; Chen y Ni, 2006; Udall y Wendel, 2006).

Sin lugar a dudas, existe una relación estrecha entre apomixis y poliploidía, ya que la manifestación de la misma depende fuertemente del nivel de ploidía, tanto que los genotipos diploides ($2n=2x$) son generalmente sexuales y los correspondientes poliploides ($2n=4x$ o mayores) son apomícticos (Asker y Jerling, 1992; Pessino *et al.*, 1999; Savidan, 2000). Sin embargo, la apomixis por embriogénesis adventicia es común en plantas diploides 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). 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; Ortiz *et al.*, 2013).

Kashin (2012), basándose en las peculiaridades de la variabilidad cariotípica, llega a la conclusión de que la apomixis gametofítica se acompaña naturalmente con fenómenos de poli-, aneu- y mixoploidía y que las plantas apomícticas manifiestan la inestabilidad de su genoma a nivel de células meristemáticas. Con respecto de esto, hipotetiza que la apomixis es causada por la modificación de los sistemas de control del ciclo celular después de procesos de hibridación y/o poliploidización. Además, concluye que la inestabilidad del sistema de reproducción en la apomixis gametofítica se manifiesta no sólo en la etapa de elección de una vía de reproducción de la futura semilla, sino también en todos los ciclos de reproducción de las células de una línea germinal en la ontogénesis de una planta.

Filogenia y distribución geográfica de la apomixis

El análisis más reciente y completo de la distribución filogenética de la apomixis fue realizado por Carman (1997). De las 460 familias de angiospermas descritas (Judd *et al.*, 1994), 33 contienen especies con apomixis gametofítica y están distribuidas entre los linajes más primitivos como Ranunculales y Piperales a los más avanzados como Poales y Asterales (Carman, 1997). La distribución de las especies apomícticas no es uniforme entre las distintas familias de angiospermas, ya que familias como Poaceae (gramíneas) y Asteraceae (compuestas) poseen el mayor número de géneros con especies apomícticas (al menos 38 y 35, respectivamente) (Ozias-Akins, 2006).

La apomixis no es el modo reproductivo prevaleciente en la evolución (Rollins, 1967). Dada su amplia distribución en las angiospermas, aunque con una ocurrencia infrecuente, la apomixis gametofítica es considerada polifilética y los apomícticos existentes actualmente o bien derivaron recientemente o presentan alguna ventaja adaptativa. La reproducción asexual puede ser favorecida en hábitats marginales donde la reproducción sexual tiene una tasa menor de éxito (Silvertown, 2008).

No obstante, la distribución geográfica de la apomixis no puede ser explicada sólo por fuerzas evolutivas como la hibridación, la poliploidía, la función masculina, nichos de diferenciación o interacciones bióticas (Hörandl, 2006). Aunque la apomixis se

considera evolutivamente un callejón sin salida, la mayoría de las investigaciones de distribución no tienen en cuenta que generalmente la apomixis se presenta en forma facultativa, quedando un margen de reproducción sexual que genera cierta variabilidad, un fenómeno bien documentado en *Ranunculus*, *Taraxacum* (Hörandl y Paun, 2007) y *Hieracium* (Fehrer *et al.*, 2007). La mayoría de las especies apomícticas son facultativas, lo que permite que se produzca un nivel variable de reproducción sexual, esta apomixis facultativa le confiere flexibilidad y capacidad evolutiva a algunas especies vegetales (Mazzucato *et al.*, 1996). Clausen (1961) explica esta adaptabilidad evolutiva por la doble capacidad de las especies facultativas para saltar de vez en cuando a la reproducción sexual y multiplicar las combinaciones exitosas asexualmente.

La mayoría de las especies apomícticas son poliploides y heterocigotas, implicando un origen híbrido del carácter (Carman, 1997). La poliploidía y la heterocigosidad funcionan como reservorio de diversidad de alelos. La reproducción clonal completa (apomixis obligada) es rara en la naturaleza (Asker y Jerling, 1992), aunque sea lo buscado para la transferencia a los cultivos. En las poblaciones naturales de especies apomícticas se ha encontrado más variación de la esperada por su modo reproductivo (Ellstrand y Roose, 1987; Campbell y Dickinson, 1990; Asker y Jerling, 1992; Hörandl y Paun, 2007).

Apomixis en pasto llorón

Los primeros estudios sobre el modo 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 progenie 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; Busey y Wright, 1978) 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 progenie 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 del apomíctico diplospórico presenta peculiaridades que lo hacen distinto a otros por lo que se considera como un modelo particular, tipo *Eragrostis* (Crane, 2001).

En el proceso sexual (Figura I.2), 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 megasporas micropilares degeneran, quedando sólo la megaspora 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 (Voigt y Bashaw, 1972, Meier *et al.*, 2011).

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 megaspora funcional elongada, tras dos divisiones mitóticas sucesivas, forma el saco embrionario tetranucleado no reducido, que se compone de una ovocélula, dos sinérgidas y un núcleo polar (Figura I.2). 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 nucelares, por lo que se ha descartado la aposporía como mecanismo reproductivo en pasto llorón (Streetman, 1963; Voigt y Bashaw, 1972; Meier *et al.*, 2011). Otra particularidad de este modelo reproductivo, es que, a diferencia de lo observado en estudios previos en especies diplospóricas que demostraban la presencia de calosa en la pared de la célula madre de la megaspora (CMM) solo en procesos sexuales, en *Eragrostis* se halló calosa en ambos genotipos. Sin embargo, el patrón de disposición en la megasporogénesis asexual se diferencia notablemente del visto en procesos sexuales (Meier *et al.*, 2011).

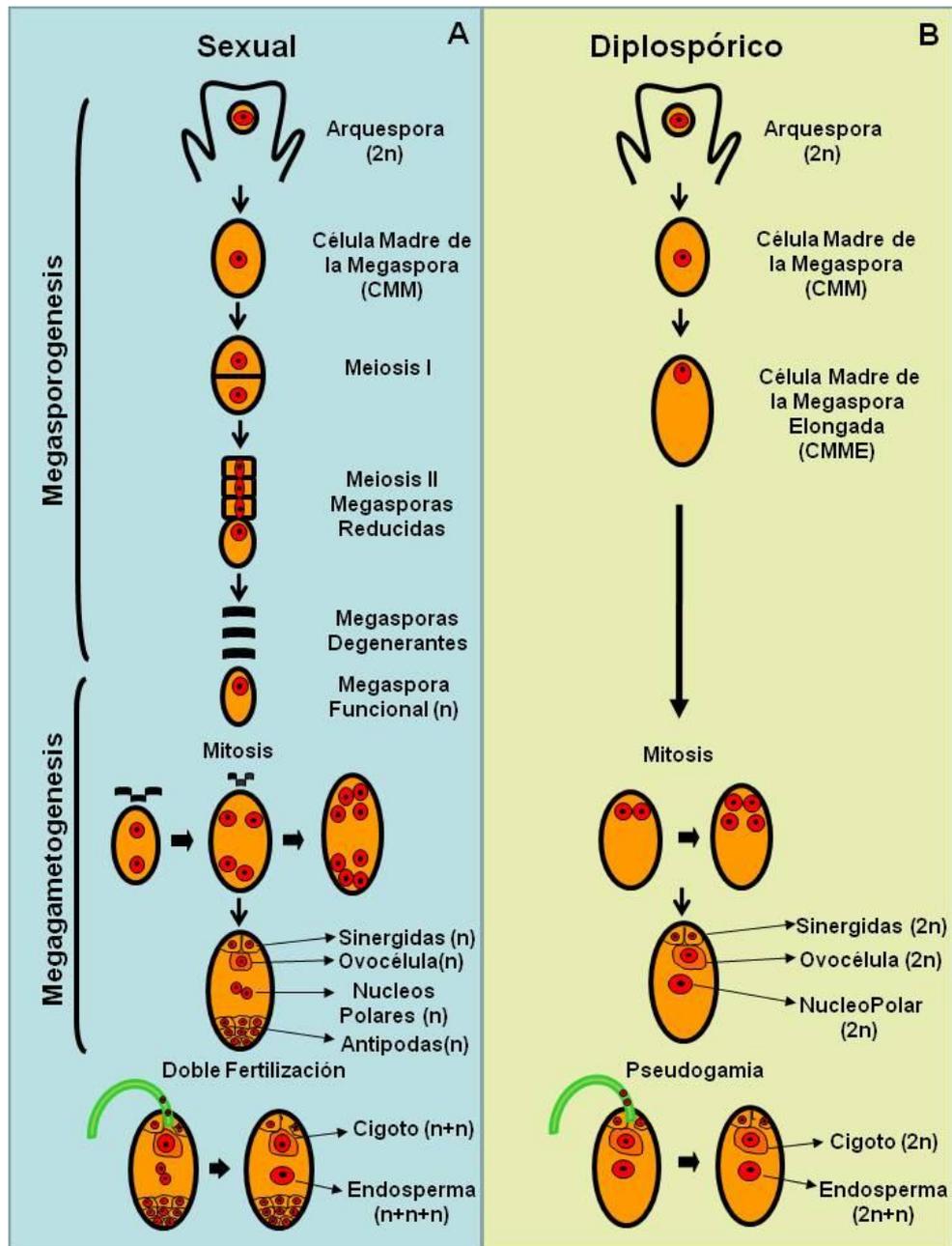


Figura I.2: Megasporogénesis y megagametogénesis en pasto llorón. Proceso sexual (izq.) y apomítico diplospórico, tipo *Eragrostis* (der.).

La expresión de la apomixis diplospórica en pasto llorón ha sido estudiada por nuestro grupo y se identificaron *in silico* 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, 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.*, 2008; Selva *et al.*, 2012).

Importancia de la Apomixis en la Agricultura

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 como *Poa pratensis* y *Brachiaria decumbens* (Carneiro *et al.*, 2006), la mandioca, la manzana, los cítricos, el mango y la frutilla (Ortiz y Pessino, 2002).

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 semilla. Una de las grandes ventajas de la incorporación de la apomixis a especies cultivadas es la posibilidad de fijar el vigor híbrido (heterosis), el cual, en cultivos como el maíz, lleva a incrementos de producción superiores al 20 % (Siddiqi *et al.*, 2009). En la mayoría de los cultivos, el vigor híbrido no es estable y declina sostenidamente con cada generación por la segregación de los alelos benéficos en la reproducción sexual. Por lo tanto, por lo menos teóricamente, la apomixis podría permitir la fijación y propagación por semilla de híbridos elite (Hwa y Yang, 2008; Siddiqi *et al.*, 2009).

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

- Rápido desarrollo de nuevas variedades híbridas. 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. La incorporación de la apomixis en dichos cultivos garantizaría la homogeneidad genética en las semillas y brindaría grandes ventajas frente a la propagación vegetativa en materia de conservación, transporte, siembra y transmisión de enfermedades.
- Facilitaría el uso 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.

Un punto a tener en cuenta, es que, para tener un impacto importante en la producción, genotipos apomícticos obligados y facultativos tienen que ser debidamente identificados (Sorensen *et al.*, 2009). 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 los siguientes caminos:

- Introgresión. Típicamente implica la hibridación entre un cultivo y una especie apomíctica relacionada, seguida por un programa de retrocruzamiento 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 aestivum* (trigo) (Liu *et al.*, 1994), desde *Tripsacum dactyloides* a *Zea mays* (maíz) (Grimanelli *et al.*, 2001b) o entre diferentes variedades del complejo *Ranunculus auricomus* (Hörandl y Temsch, 2009).
- 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). Este enfoque también ha sido aplicado a la mostaza salvaje y al arroz.
- Transgénesis: El mapeo e identificado de los genes que regulan la apomixis, con el objetivo de la transferencia de ellos a los cultivos a través de la ingeniería genética es actualmente la vía más prometedora para lograr este objetivo. Los esfuerzos de mapeo de genes han encontrado que la apomixis está estrechamente relacionada con un grupo de genes que son transmitidos siempre juntos como un paquete. La producción de cultivos transgénicos apomícticos son, hasta la fecha, uno de los muchos proyectos de base biotecnológica que permanecen en fase de

investigación. Si bien aun no se ha logrado la transferencia completa del carácter apomixis la transgénesis es actualmente una poderosa herramienta para el estudio de vías de regulación de posibles genes candidatos (Tucker *et al.*, 2012).

- Ingeniería de apomixis *de novo* manipulando los procesos sexuales (Crismani *et al.*, 2013). El primer paso es modificar la meiosis y convertirla en una división mitótica mediante la alteración de genes específicos (dyad, MiMe, ago104, ago9). El segundo paso es producir semillas a partir de estos gametos no reducidos, sin ninguna contribución genética de otro gameto. Ensayos de este tipo se han logrado en una línea de *A. thaliana* en la cual se puede eliminar parte de su genoma luego de la fertilización cuando se cruzan con cualquier otro genotipo (Ravi y Chan, 2010). Esto estableció que es posible imitar la apomixis jugando con los procesos sexuales (Marimuthu *et al.*, 2011).

Estrategias para el desarrollo de cereales apomícticos

Varias especies de gramíneas (Poaceae) presentan reproducción apomíctica y estas incluyen varias muy relacionadas filogenéticamente a especies cultivadas. Spielman *et al.* (2003) describen cuatro vías para el desarrollo de plantas apomícticas: I) transferencia de genes o alelos de la apomixis desde especies silvestres apomícticas relacionadas a plantas cultivadas, II) identificación de mutaciones que lleven al desarrollo de semillas independiente de la fertilización, III) identificación, clonación y transferencia por transformación genética a especies cultivadas de genes o alelos desde especies apomícticas no relacionadas y IV) desarrollo de nuevos sistemas apomícticos a través del conocimiento detallado de los procesos de megagametogénesis, megasporogénesis y formación del grano. En cereales los esfuerzos se han orientado a la primera de las estrategias y han llevado a una evaluación intensiva y análisis de especies cercanas a las cultivadas. Un primer paso en esta estrategia es el conocimiento de la herencia de la apomixis en gramíneas y el desarrollo de estrategias de transferencia de genes o alelos asociados a este carácter.

La conclusión general de trabajar con la apomixis en gramíneas es que la genética es más compleja que la pensada previamente. La simple transferencia por cruzamiento ha fallado en producir cereales comerciales apomícticos. Hoy se ve que se necesita un conocimiento más detallado del control genético y de la biología molecular de la apomixis. De esta manera, la investigación se ha desviado al análisis de los procesos

tempranos de desarrollo con el propósito de identificar los genes involucrados en controlar los pasos críticos en los cambios del programa de desarrollo que existen en las especies apomícticas. En el pasado el pequeño tamaño de los tejidos involucrados en este proceso y la relativa inaccesibilidad a ellos retraso los estudios, pero actualmente existen nuevas tecnologías (análisis de expresión en células individuales, microdissección, etc.) que pueden superar estos inconvenientes. Se espera que estos nuevos estudios arrojen luz sobre el control genético de los estadios tempranos del desarrollo y permitan finalmente desarrollar nuevos sistemas apomícticos artificiales.

Una vez que se hayan identificado y aislado los genes claves de la apomixis, van a necesitarse nuevas tecnologías de mejoramiento para desarrollar y capitalizar este conocimiento, ya que el mejoramiento convencional no ha sido exitoso en la creación de cultivos apomícticos.

***Eragrostis curvula* (pasto llorón, weeping lovegrass)**

El género *Eragrostis* es uno de los más grandes y difundidos de la familia Poaceae, el mismo está integrado por más de 350 especies que se distribuyen principalmente en las regiones tropicales y templado-cálidas de todo el mundo, 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 (Figura I.3), donde existen varias especies de interés económico, entre las que sobresale *E. curvula* como especie forrajera.

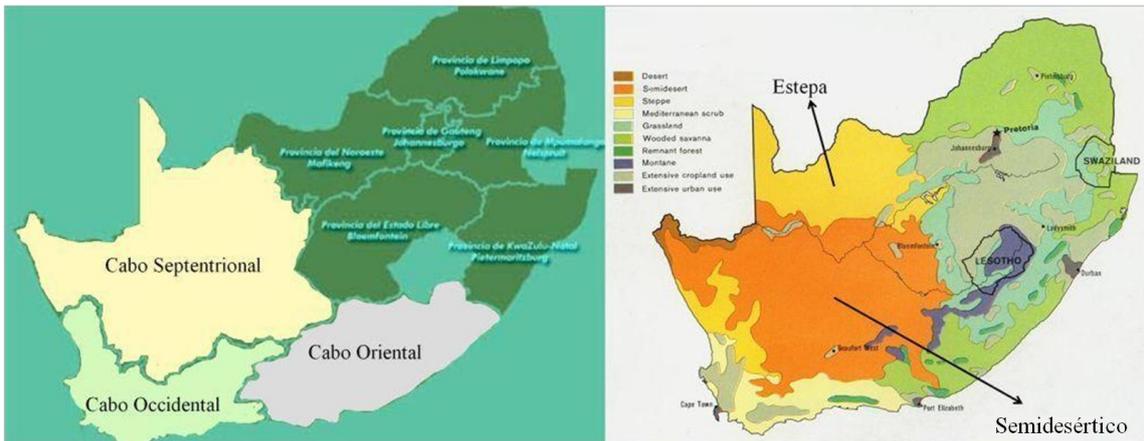


Figura I.3: Mapa de la República de Sudáfrica. A la izquierda se indican las principales provincias en las que se distribuye el pasto llorón: Cabo Occidental, Cabo Oriental y Cabo Septentrional. A la derecha se representan los biomas predominantes del área de presencia de *Eragrostis*: semidesértico y estepa.

La especie de nuestro interés, *E. curvula* (Schrad.) Nees (Figura I.4), conocida vulgarmente como “pasto llorón” o *weeping lovegrass* (en inglés), es una especie forrajera. La posición taxonómica del pasto llorón de acuerdo a la clasificación de Engler (1941) es la siguiente (Departamento de Agronomía de los Estados Unidos - <http://plants.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 (Gramíneas)

Subfamilia Chloridoideae

Tribu Eragrostideae

Género *Eragrostis* von Wolf

Especie *Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees (pasto llorón)

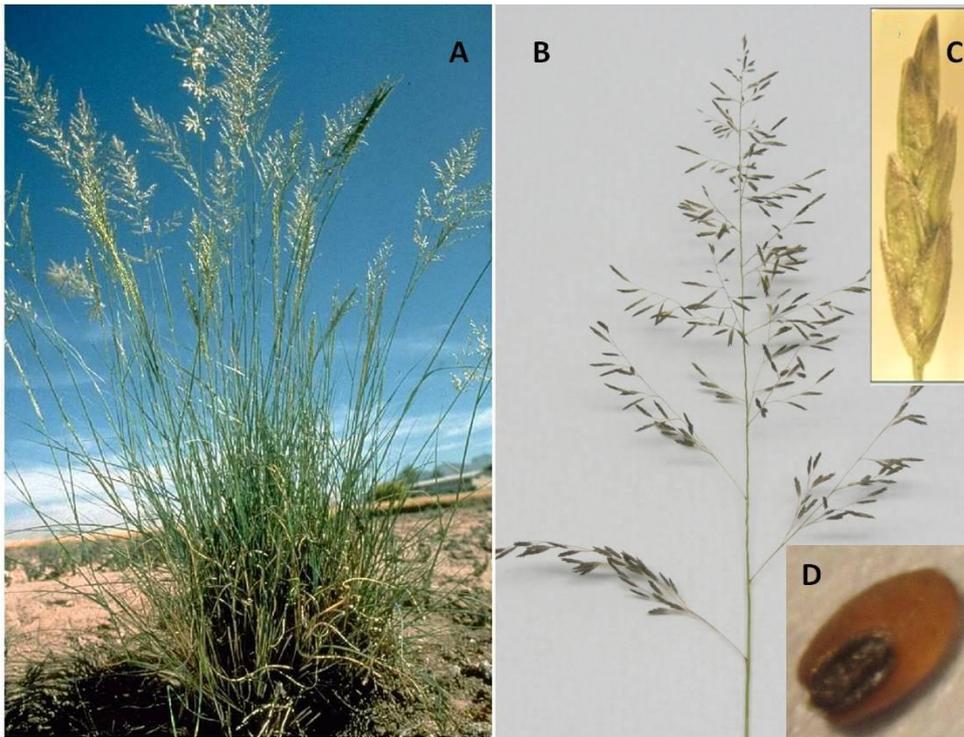


Figura I.4: A) Planta adulta de pasto llorón, B) Detalle de una panoja, C) de una espiguilla y D) de una semilla.

El pasto llorón es una de las fuentes más importantes 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. Actualmente, es considerada una de las gramíneas perennes más extensamente cultivada en Argentina (Tabla I.2), con la perspectiva de que en el futuro la superficie sembrada se extienda considerablemente, ya que pueden 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).

Tabla I.2: Superficie implantada con forrajeras perennes, discriminada por cultivo, según provincia. INDEC, Censo Nacional Agropecuario 2002.

Provincia	Superficie implantada de forrajeras perennes							Alfalfa consociada
	Total	Alfalfa pura	Pasto llorón	Gatton panic	Agoproiro	Buffel grass	Otras perennes puras	
Hectáreas								
Total del país	7.883.597	1.296.522	786.749	329.781	296.036	77.528	330.482	2.405.211
Buenos Aires	2.986.768	40.650	136.571	-	216.227	-	43.372	1.015.481
Catamarca	74.238	3.366	86	42.281	-	27.732	406	205
Córdoba	1.580.746	687.806	71.504	-	37.923	-	101.119	423.940
Corrientes	42.731	5	-	200	-	-	30.776	-
Chaco	86.481	7.116	-	60.932	-	-	2.997	73
Chubut	17.778	4.260	1	-	1.320	-	1.051	1.382
Entre Ríos	275.884	23.395	-	-	7	-	3.024	54.646
Formosa	70.070	225	-	6.042	-	-	8.387	46
Jujuy	6.289	983	2.448	1.685	-	172	774	70
La Pampa	992.383	144.341	300.709	-	28.825	-	10.666	434.111
La Rioja	23.142	1.165	1	38	-	21.761	18	109
Mendoza	15.792	8.557	426	-	1.024	-	76	2.551
Misiones	75.617	2	-	3	-	-	31.237	37
Neuquén	6.031	2.719	36	-	83	-	80	206
Río Negro	24.320	7.204	220	-	4.375	-	327	8.063
Salta	102.958	10.927	98	73.867	-	9.060	5.908	524
San Juan	3.623	3.492	2	-	4	4	64	40
San Luis	485.681	65.360	274.401	-	2.547	-	49.680	37.578
Santa Cruz	9.251	2.350	-	-	2.321	-	25	20
Santa Fe	747.166	228.758	110	-	1.382	-	16.576	424.115
Santiago del Estero	234.166	50.814	65	140.232	-	13.493	15.715	1.775
Tierra del Fuego	77	-	-	-	-	-	-	-
Tucumán	22.403	3.028	73	4.502	-	5.307	8.207	239

Fuente: INDEC, Censo Nacional Agropecuario 2002.

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 $2n=8x=80$). 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 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 alopoloides segmentales. Estos procesos no parecen recientes,

ya que ninguna de las accesiones mostró el comportamiento típico de los híbridos de primera generación (Poverene, 1988).

En general la viabilidad del polen de 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 pseudogama (el desarrollo del endosperma requiere de la fertilización del núcleo polar), la producción de semilla no se encontraría comprometida.

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).

Apomixis y estrés

La teoría predice que el estrés es un factor clave en explicar el rol evolutivo de la reproducción sexual en organismos capaces de reproducirse tanto sexual como asexualmente (facultativos), incluyendo microorganismos (Hadany y Otto, 2009). Se espera que los organismos facultativos se crucen más frecuentemente bajo situaciones de estrés y este cruzamiento dependiente del estrés facilitaría la adaptación. Esto puede observarse en *Candida albicans*, el hongo que más frecuentemente causa patología en humanos. Este patógeno cuando se encuentra en situaciones de estrés como al ser expuesto a sustancias antifúngicas, evoluciona generando resistencia, en algunos casos muy rápidamente. Esta rápida evolución surge a pesar de la naturaleza clonal de la estructura poblacional y de la aparente ausencia de meiosis. Se logró confirmar que esta especie presenta parasexualidad que implica la unión de células somáticas diploides para formar tetraploides que luego se reducen a través de procesos no meióticos de pérdida de cromosomas restableciendo el nivel diploide con altos niveles de aneuploidía y homocigosis. En los últimos años se relacionó el aumento en la parasexualidad con situaciones de estrés (Berman y Hadany, 2012).

En muchos organismos sexualmente facultativos, la probabilidad de reproducción sexual no es uniforme bajo todas las circunstancias (Bell, 1982). Más bien, en condiciones de estrés es más probable que los individuos se reproduzcan sexualmente. En particular, la falta de alimento induce un cambio de la reproducción asexual a la sexual en varios organismos como bacterias (Dubnau, 1991; Jarmer *et al.*, 2002; Foster,

2005), levaduras (Kassir *et al.*, 1988; Mai y Breeden, 2000), algas (Harris, 1989) y crustáceos (Kleiven *et al.*, 1992). Ambientes estresantes como la sequía o la alta salinidad resultan en mayor frecuencia de reproducción sexual en hongos del suelo y un aumento de la reproducción por semilla en lugar de por estolones en *Hieracium pilosella*, especie vegetal que también presenta apomixis (Bruun *et al.*, 2007). También se ha demostrado que el estrés competitivo incrementa la dedicación de recursos para la reproducción sexual. Esto se demuestra en especies como *Ranunculus reptans* y *Potentilla anserina* donde ante una situación de estrés competitivo se incrementa la producción de individuos por medio de procesos sexuales (van Kleunen *et al.*, 2001; Rautiainen *et al.*, 2004). Estos datos indican que una variedad de señales relacionadas con el estrés pueden inducir el cambio a la reproducción sexual, aunque se necesita más investigación para determinar con qué frecuencia y por qué este fenómeno ha evolucionado.

En estudios previos de nuestro grupo de trabajo se hallaron evidencias en relación a cambios en el modo reproductivo del pasto llorón en situaciones de estrés. Echenique *et al.* (1987) encontraron progenies variables en plantas sometidas a estrés osmótico inducido con soluciones de PEG 6000 en estado reproductivo. 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. También se observó que luego de ser cultivadas *in vitro* se incrementó la variabilidad tanto en las plantas regeneradas, generación R0, como en las progenies de estas plantas, generación R1 (Polci, 2000). Sin embargo cuando se evaluó la variabilidad por isoenzimas en la generación R2, no se observaron polimorfismos, indicando el restablecimiento de altos niveles de apomixis en la R1 y evidenciando efectos epigenéticos (Polci, 2000).

Posteriormente nuestro grupo obtuvo por cultivo *in vitro* de inflorescencias de plantas tetraploides del cv. Tanganyika una planta diploide (UNST1122) que demostró ser de reproducción sexual (Cardone *et al.*, 2006). Posteriormente semillas de una hija de esta planta fueron tratadas con colchicina y se obtuvieron dos plantas tetraploides (UNST1112 y UNST1131) que en un primer momento mostraron progenies solo

generadas por reproducción sexual (Cardone *et al.*, 2006). Esta serie euploide (4x-2x-4x) nos permitió realizar estudios de expresión y genotecas de ESTs donde se pudo comparar distintos modos reproductivos y distintas ploidías (Cervigni *et al.*, 2008a, 2008b; Selva *et al.*, 2012). Cuatro años después de la generación de la serie euploide se reanalizó el modo reproductivo de las plantas de la serie utilizando citoembriología y se confirmó la completa sexualidad de UNST1122 (diploide). Sin embargo, al analizar las plantas tetraploides obtenidas por duplicación cromosómica del diploide (UNST1112 y UNST1131) se encontró que el porcentaje de procesos sexuales era entre 10-15 % (Meier *et al.*, 2011). Estudios comparativos de AFLP y MSAP entre los distintos materiales de la serie en el tiempo mostraron cambios tanto en el genoma como el epigenoma (Mecchia *et al.*, 2007; Ochogavia *et al.*, 2009). Otros autores también han informado cambios en la expresión de la sexualidad en 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 reducidos de tipo *Polygonum* (4 al 13 %). Estos autores postulan que el estrés salino cambia las prioridades en el desarrollo: a- del saco embrionario nucelar al de la megaspora en apospóricos (apomíctico a sexual) y b- de la megaspora calazal a las otras megasporas en procesos sexuales. Esto permite el cambio a reproducción sexual en plantas apomícticas y que más de una megaspora 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 *P. 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, sin embargo al evaluar solo el loci de la apomixis no pueden asegurar que las plantas provengan solo de reproducción clonal. Resultados similares fueron obtenidos por Taliaferro *et al.*, (1989) en plantas aneuploides de *Bothriochloa sp.*

Lo anterior permite plantear algunas preguntas que se intentaran responder durante el desarrollo de esta tesis: ¿pueden diversas situaciones de estrés modificar la expresión del modo reproductivo en pasto llorón?, ¿existe plasticidad y/o adaptabilidad en los sistemas reproductivos?, ¿cuál sería la base molecular del o los mecanismos que regulan esta plasticidad?

HIPÓTESIS

El modo reproductivo en *Eragrostis curvula* (apomixis diplospórica) está genéticamente controlado, tiene una expresión variable y puede verse afectado por factores ambientales que generan estrés genómico.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar el efecto de diferentes factores que generan estreses genómicos sobre la expresión de la apomixis diplospórica en pasto llorón, como el estrés hídrico, el cultivo *in vitro*, el ácido abscísico (considerado la hormona de estrés) y la hibridación intraespecífica. Se analizarán los sacos embrionarios de plantas de distintos genotipos de pasto llorón luego de haber sido sometidas a estas condiciones, se realizarán pruebas de progenie con marcadores moleculares y se analizará el nivel de metilación del genoma luego de los diferentes tratamientos.

Objetivos particulares

- 1) Analizar la estabilidad del modo reproductivo de *Eragrostis curvula* a lo largo de todo el periodo de floración.
- 2) Caracterizar el desarrollo sexual y apomítico para relacionar antesis y posición del antecio en la espiguilla con grado de desarrollo
- 3) Estudiar el efecto de estresores como el cultivo *in vitro* y sequía y la acción del ácido abscísico (ABA), considerado la hormona del estrés, sobre la expresión del carácter apomixis.
- 4) Evaluar el comportamiento a través del tiempo del carácter apomixis en una población híbrida obtenida a partir de materiales contrastantes.
- 5) Evaluar si cambios en la expresión de la apomixis están asociados a cambios en la metilación del ADN.

**CAPÍTULO I – “Expresión de la
apomixis en pasto llorón durante el
periodo de floración.”**

Introducción

La mayoría de las especies de plantas que se reproducen por apomixis conservan cierta capacidad de hacerlo también por reproducción sexual (apomixis facultativa). La frecuencia con que se observa esta reproducción sexual varía incluso dentro de una misma especie y a menudo se le ha atribuido este efecto al medio ambiente (Houliston *et al.*, 2006). Se ha informado que los cambios estacionales en los regímenes de temperatura y luz pueden afectar el modo reproductivo en poblaciones naturales (Asker y Jerling, 1992).

En gramíneas, se ha observado que el fotoperiodo y la temperatura ejercen una influencia sobre el número de sacos embrionarios no reducidos. Los primeros estudios tendientes a analizar el efecto de estas variables sobre la expresión del modo reproductivo fueron realizadas en *Dichanthium aristatum* (Knox y Heslop-Harrison, 1963, Knox, 1967). Estos autores compararon la variación en la relación de sacos apomícticos y sexuales de esta especie en concordancia con las variaciones de temperatura, precipitación y fotoperiodo ocurridas en un gradiente latitudinal de 27 °. El análisis citológico de dos variedades de *D. aristatum* permitió establecer que la disminución de las precipitaciones y de la temperatura coincide con un aumento en la producción de semillas generadas por procesos apomícticos. Este estudio también estableció que el acortamiento de las horas de luz aumenta significativamente el porcentaje de sacos embrionarios apospóricos. Estudios similares se realizaron en *Calamagrostis purpurea* y *D. annulatum* y, al igual que con las especies anteriores, se observó una disminución en la producción de sacos apomícticos cuando la duración del día se incrementaba (Nygren, 1951; Knox, 1967). Por otro lado, Evans y Knox (1969) informan un patrón similar para el control de la aposporía en *Themeda australis* (pasto canguro). En esta especie, una disminución del fotoperiodo afecta la cantidad de semillas producidas por aposporía, registrándose, al igual que en las especies anteriores, incrementos en la cantidad de las mismas (Knox y Heslop-Harrison, 1963; Knox, 1967).

Quarín (1986) analizó la incidencia del fotoperiodo 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 un mayor número de sacos apospóricos durante la primavera y el verano, coincidiendo con un fotoperiodo de 14 hs de luz y 10 hs de oscuridad (día largo). Este mismo autor encuentra que condiciones de día corto (12 hs de luz y 12 de oscuridad) conducen a una mayor incidencia de sacos de origen meiótico. Observaciones similares fueron realizadas en *E. curvula* donde la exposición a condiciones experimentales de día corto disminuyen el porcentaje de sacos embrionarios no reducidos (Brix, 1977). Estos resultados se contraponen a los descriptos anteriormente para el género *Dichanthium*, pero aportan evidencia de que existe un componente ambiental que afecta la expresión de la apomixis.

Sin embargo, otros estudios mostraron evidencias de que el fotoperiodo no afecta la expresión de la apomixis. McWilliam *et al.* (1970) no encuentran efectos significativos del fotoperiodo sobre la proporción de semillas producidas por vías apomícticas en cuatro de cinco variedades de *Hyparrhenia hirta* y concluyen que el fotoperiodo no afecta el grado de expresión de la apomixis. Tampoco Burton (1982) observa efectos del ambiente sobre el sistema de reproducción de *Paspalum notatum* (bahiagrass). Hussey *et al.* (1991) informan resultados similares acerca de dos accesiones de pasto salinas (*Cenchrus ciliaris*) con fotoperiodos de 8, 12 y 16 hs de luz.

En la región semiárida templada en la cual el pasto llorón se cultiva preferentemente, el crecimiento reproductivo se inicia a principios de octubre y la floración tiene lugar a fines de octubre o noviembre y se extiende hasta diciembre. Bajo condiciones favorables se puede observar una segunda floración a fines de febrero y principios de marzo (Fernández *et al.*, 1991). En función de lo anterior y teniendo presente la existencia de un estado reproductivo extenso con dos periodos de floración, es necesario conocer si existen diferencias en la expresión de la apomixis a lo largo de los mismos, ya que esta variación podría introducir errores en la interpretación de los resultados experimentales.

Técnicas para la determinación del modo reproductivo

Existen varios indicadores de la existencia de reproducción apomíctica en una especie, como elevada frecuencia de poliembriónía (embriones múltiples), 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 detectar, como suele suceder en el caso de materiales naturales y siempre se requieren análisis exhaustivos para establecer el tipo de apomixis presente y el nivel de expresión de este carácter.

Un requisito fundamental cuando se quiere estudiar el modo reproductivo de una especie, la herencia de la apomixis o incluso su estabilidad a través del tiempo, es contar con métodos simples cuali o cuantitativos que permitan la caracterización fenotípica de este carácter. 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 conjuntamente para garantizar precisión en este aspecto.

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

Estudios Citoembriológicos: Estos se basan en la observación de las diferencias en la megasporogénesis y megagametogénesis entre procesos sexuales y apomícticos (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 procesos sexuales o apomícticos. 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. La citoembriología se ha utilizado para diferenciar con éxito procesos sexuales de apomícticos en muchas poblaciones, como *P. procurrens* (Hojsgaard *et al.*, 2011), híbridos de *Brachiaria* (Pessino *et al.*, 1998) y *P. notatum* (Acuña *et al.*, 2010), entre otros.

Prueba de auxina: Este análisis estima el potencial de reproducción asexual que puede alcanzar una planta y se puede utilizar para estimar la frecuencia de apomixis. La

prueba se basa en la premisa de que los óvulos producidos a través de aposporía o diplosporía deberían estar mejor capacitados para desarrollarse partenogenéticamente que los producidos a través de desarrollo sexual, debido a la aparente relación entre las dos etapas de desarrollo apomítico. Se utilizan auxinas sintéticas (2,4-D, 2,4,5-T o dicamba) colocadas en las inflorescencias antes de la antesis induciendo la formación de semillas que contienen embriones maduros pero sin endosperma en el caso de los procesos partenogenéticos y cariopses sin endosperma ni embrión en el caso de los procesos sexuales. La diferencia en la frecuencia entre los dos tipos de semillas permite la estimación de la capacidad de apomixis en los individuos evaluados (Matzk, 1991). Esta prueba proporciona un método rápido, simple y preciso para estimar la frecuencia de apomixis en una población. Mazzucato *et al.* (1996) realizaron estudios con este método para estimar el grado de partenogénesis en varios genotipos de *Poa pratensis* encontrando baja variación entre años y entornos demostrando la confiabilidad del método.

Citometría de flujo: basada 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 apomítica (Matzk *et al.*, 2000). Se realiza un macerado de la semilla en solución tampón conteniendo un colorante para ADN (ej. DAPI). El citómetro indica cuales son las ploidías más frecuentes de los núcleos. Como fue señalado en la Introducción General, la relación de ploidías embrión/endosperma frecuentemente varía entre procesos sexuales y apomíticos, ya que el endosperma se forma por la unión de tres núcleos de ploidía n , dos polares (maternos) y uno espermático (paterno) en los procesos sexuales, mientras que en varios procesos apomíticos los núcleos polares son $2n$, dando una relación embrión/endosperma para la semilla sexual de $2/3$ y para la semilla apomítica de $2/5$. Este método fue utilizado exitosamente en la evaluación de poblaciones de *Boechera holboellii* (Sharbel *et al.*, 2009) y de *P. plicatulum* (Sartor *et al.*, 2009).

Pruebas de progenie: originalmente fueron realizadas utilizando caracteres morfológicos, comparando las progenies con la planta materna. Dado que las plantas apomíticas producen progenie uniforme, la identidad de los descendientes con la planta madre indica un posible origen apomítico. Con la aparición de los marcadores

moleculares, éstos fueron utilizados para realizar estas pruebas. Cuando existen, también se pueden usar marcadores ligados a la apomixis, tales como RFLPs, SSRs, AFLPs, SCARs, 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 *P. notatum* (Ortiz *et al.*, 1997; Stein *et al.*, 2007).

De acuerdo a la facilidad de ejecución de las técnicas y a la información que aportan, Naumova (1997) realizó una comparación de las distintas metodologías. En primer lugar se encuentran las técnicas de 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 del desarrollo reproductivo. Estas técnicas requieren de mucho tiempo, pero brindan información fundamental para el conocimiento de los mecanismos involucrados en la apomixis.

Como se mencionó previamente, 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).

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 General 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:

Proceso sexual	Proceso apomítico
Célula Madre de la Megaspora no elongada	Célula Madre de la Megaspora elongada
<u>Meiosis</u>: tétrada y/o megasporas degenerantes	<u>Sin meiosis</u>
Posición de núcleos durante las divisiones mitóticas en el saco embrionario:	Posición de núcleos durante las divisiones mitóticas en el saco embrionario:
Saco binucleado con los núcleos en polos opuestos.	Saco binucleado con los núcleos en polo micropilar.
Saco tetranucleado con dos núcleos en cada polo.	Saco tetranucleado con cuatro núcleos en polo micropilar.
Saco embrionario maduro con ocho o más núcleos (proliferación de antípodas).	Saco embrionario maduro generalmente con cuatro núcleos (sin antípodas).

Otra particularidad de la diplosporía en *Eragrostis* es que al poseer un saco embrionario con un sólo núcleo polar no reducido 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 apomíticos (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 de pentaploide, es decir $5x$ (relación embrión/endosperma $2x/5x$). Lamentablemente, esta ventaja que posiciona al pasto llorón como un excelente modelo de estudio conlleva la desventaja de no poder ser utilizado en ensayos de citometría de flujo dada la incapacidad del análisis para discernir materiales sexuales de apomíticos. 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 pasto llorón ya se han evaluado cuatro técnicas para analizar el modo reproductivo de los distintos genotipos (Zappacosta, 2009; Meier *et al.*, 2011). Las técnicas evaluadas fueron la prueba de calosa, la citoembriología clásica con la tinción de safranina-fast

green, las pruebas de progenie con marcadores moleculares y los análisis de ploidía con citometría de flujo. Los estudios citoembriológicos (presencia de calosa y tinción con safranina-fast green) y las pruebas de progenie con marcadores RAPDs demostraron ser los más adecuados para el análisis del modo de reproductivo, permitiendo la caracterización de plantas apomícticas obligadas, apomícticas facultativas y sexuales.

Análisis del desarrollo de la inflorescencia

La inflorescencia de *E. curvula* es una panoja terminal de 15 a 40 cm. de longitud, amplia y laxa o estrecha y compacta (tipo conferta) con ramas en general rígidas, no capilares, dispuestas en forma alterna o subverticiladas, con pelos axilares al menos en las ramas basales y con numerosas espiguillas con lemas enteras y glabras. El desarrollo de la panoja de *E. curvula* es típicamente heterocrónico, dentro de la panoja, las raquillas superiores presentan estadios más avanzados en el desarrollo que las de la base de la panoja. Dentro de la raquilla las espiguillas superiores están menos desarrolladas que las basales. Por último, dentro de cada espiguilla, las flores basales se encuentran más desarrolladas que las superiores (Figura 1.1).

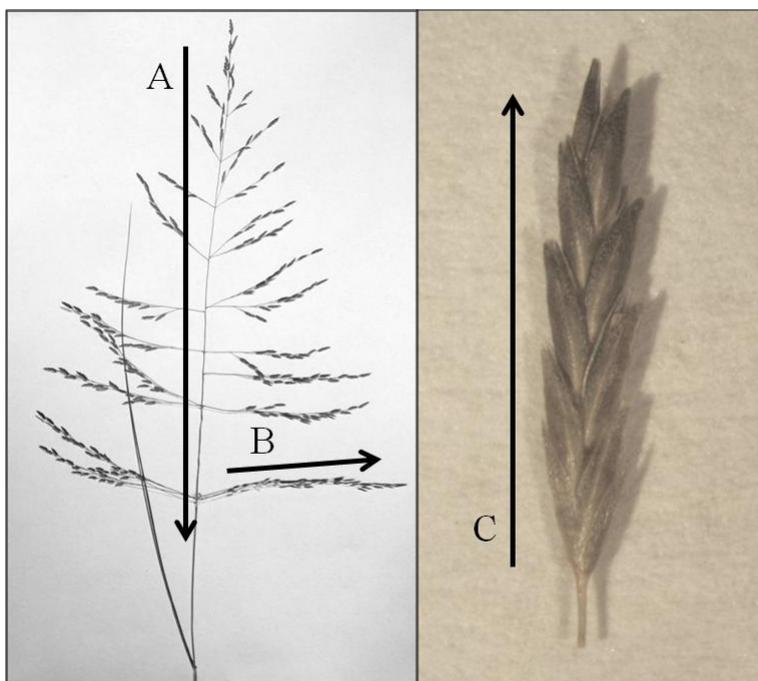


Figura 1.1: Desarrollo de la inflorescencia en plantas de pasto llorón. Las flechas indican la dirección de desarrollo de las flores dentro de la panoja. A) De raquillas superiores a inferiores dentro de la panoja. B) De espiguillas basales a apicales dentro de la raquilla. C) De flores basales a superiores dentro de cada espiguilla.

Cada una de las espiguillas puede contener de 3 a 10 flores, el androceo es un único verticilo con tres estambres y el gineceo unicarpelar posee dos estilos con estigmas plumosos (Figura 1.2); el cariopse unicarpelar es globoso a elipsoide, con superficie finamente estriado-reticulada.

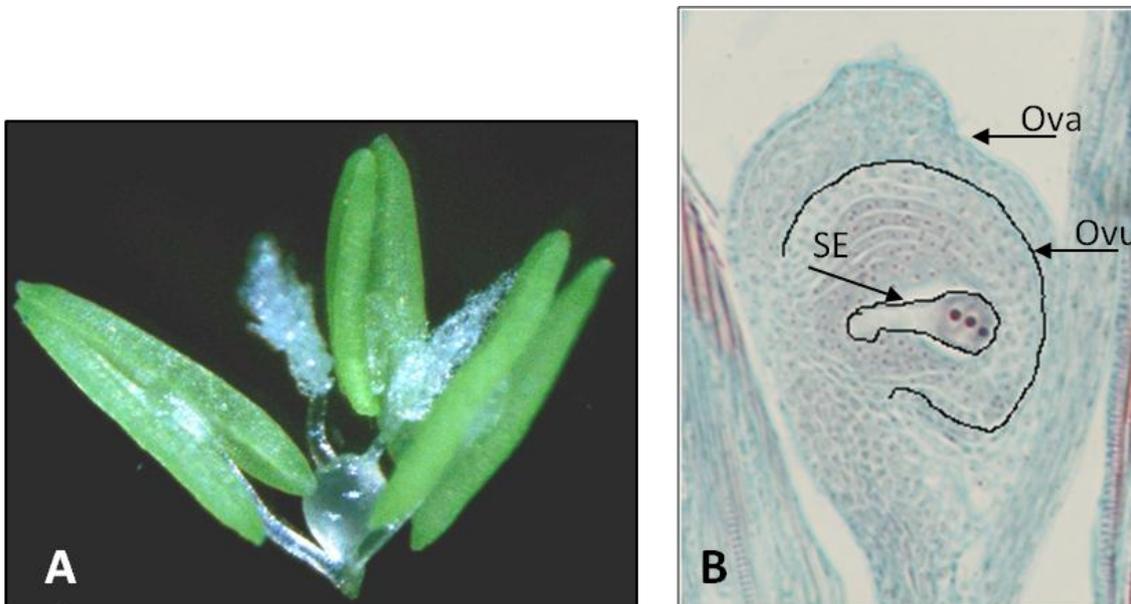


Figura 1.2: Flor de pasto llorón A) Piezas fértiles de la flor de *E. curvula*, androceo de tres estambres y gineceo globoso con estigma bífido plumoso. B) Corte longitudinal del ovario, Ova: Ovario unicarpelar; Ovu: Ovulo; SE: Saco embrionario.

Nuevas técnicas para el estudio de la expresión de genes, como la hibridación *in situ* y la microdissección permiten evaluar la expresión de genes a nivel celular partiendo de muy pocas células. La aplicación de estas técnicas al pasto llorón demanda un conocimiento más complejo del que se dispone actualmente acerca del desarrollo de las inflorescencias. Un análisis preciso acerca de la frecuencia de aparición, el lugar y duración relativa de cada uno de los estadios de la megagametogénesis dentro de la inflorescencia sería una herramienta de gran valor a fin de coleccionar el material para realizar estudios destinados a comprender las vías moleculares de la apomixis. En estos casos, cuando se comparan estadios y genotipos, es indispensable poder distinguir de manera precisa el estadio de desarrollo en que se encuentra el tejido fuente para la extracción de ARN.

Hipótesis

En cultivares apomícticos de pasto llorón las vías moleculares de apomixis y sexualidad coexisten, estando la sexualidad reprimida o expresada a muy bajo nivel. No obstante, ante determinados cambios estacionales, la expresión de la apomixis puede verse afectada.

Objetivo

El objetivo de este capítulo fue analizar, por métodos citoembriológicos, el modo reproductivo del cv. apomíctico Tanganyika a lo largo de todo el periodo de floración. También se realizó un análisis del desarrollo de la inflorescencia a fin de asociar características morfológicas de las mismas con estadios de desarrollo del saco embrionario.

Materiales y métodos

Material Vegetal

Los materiales vegetales (*E. curvula*) evaluados en esta tesis se mantuvieron en invernáculo durante todo el año creciendo en macetas de 10 L bajo fotoperiodo natural (38°43'0"S 62°16'0"O) y temperatura de 25 ± 2 °C a excepción de la estación invernal donde fueron retiradas del invernáculo y colocadas a la intemperie dado que, por tratarse de pastos de altura, requieren vernalización para florecer.

Para el estudio de la expresión del carácter apomixis a lo largo del periodo de floración, se utilizaron plantas del cv. apomíctico Tanganyika INTA ($2n=4x=40$), uno de los cultivares de mayor implantación en el país.

Para el análisis del desarrollo de la inflorescencia se utilizaron plantas del mismo cultivar, a fin de caracterizar las inflorescencias típicas de plantas apomícticas. Para caracterizar las inflorescencias de plantas sexuales se utilizaron progenies sexuales provenientes de la cruce controlada entre el cv. sexual OTA (USDA) ($2n=4x=40$) como progenitor femenino y el cv. apomíctico Tanganyika USDA ($2n=4x=40$) como donante de polen. Estas plantas forman parte de la colección existente en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal (CERZOS-UNS).

Estudios citoembriológicos

Con el fin de determinar los niveles de expresión de la apomixis y sexualidad en plantas del cv. Tanganyika INTA a lo largo del periodo de floración se colectaron periódicamente espiguillas entre los meses de septiembre a marzo durante dos años no consecutivos. Las panojas se colectaron en el momento de presentar los primeros signos de anthesis, tiempo en el cual es posible encontrar todo el rango del desarrollo del saco embrionario, desde la célula arqueospórica hasta la posible fertilización (Meier *et al.*, 2011). 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) y su montaje y corte utilizando un micrótopo. Secciones de 10 μ m de espesor fueron teñidas con safranina-fast green (Johansen, 1940). Los preparados fueron observados en un microscopio óptico Nikon Eclipse TE300. Las observaciones se

agruparon en procesos apomíticos (megaspóra elongada, sacos embrionarios binucleados y tetranucleados) o procesos sexuales (tétrada, megasporas degenerantes, sacos embrionarios binucleados, tetranucleados y octonucleados) se acuerdo a presencia de evidencias de meiosis o a la posición y número de los núcleos en el saco embrionario (Meier *et al.*, 2011).

Para el análisis del desarrollo se utilizaron inflorescencias en antesis temprana (no más del 10 % de estambres por fuera de la flor) y se cuantificó el total de estadios para cada modo reproductivo. En ambos casos, los estadios de arqueospora y célula madre de la megaspóra se agruparon en una sola categoría debido a la dificultad para distinguir entre estos dos estadios. En el genotipo sexual, los estadios de díada, tríada y tétrada también se agruparon en una sola categoría debido a la baja frecuencia observada.

Análisis estadístico

A partir de los datos obtenidos, se realizaron análisis estadísticos. Se evaluaron las diferencias entre las medias entre periodos de floración mediante el Test t de Student para muestras apareadas planta a planta e independientes en el total de los datos.

Resultados y discusión

Estudios citoembriológicos

En las secciones de espiguillas del cv. Tanganyika INTA teñidas con safranina-fast green colectadas a lo largo del periodo de floración (Figura 1.3) se observaron, en su mayoría, procesos típicos del desarrollo de un saco diplospórico como lo son las células madres de la megaspóra elongadas (Figura 1.3 M) y sacos binucleados y tetranucleados con los núcleos en el polo micropilar (Figura 1.3 N y O). Además, se observó una pequeña proporción (alrededor del 2 %, Tabla 1.1) de estadios del desarrollo del saco embrionario típico del proceso sexual, como son las células de una tétrada lineal de megasporas (Figura 1.3 E) y la megaspóra funcional con las megasporas degenerantes (Figura 1.3 F). Los sacos sexuales fueron identificados por la disposición de los núcleos en el saco embrionario en los estadios binucleados (Figura 1.3 G y H), tetranucleados (Figura 1.3 I y J), octonucleados (Figura 1.3 K) y aquellos sacos con proliferación de antípodas.

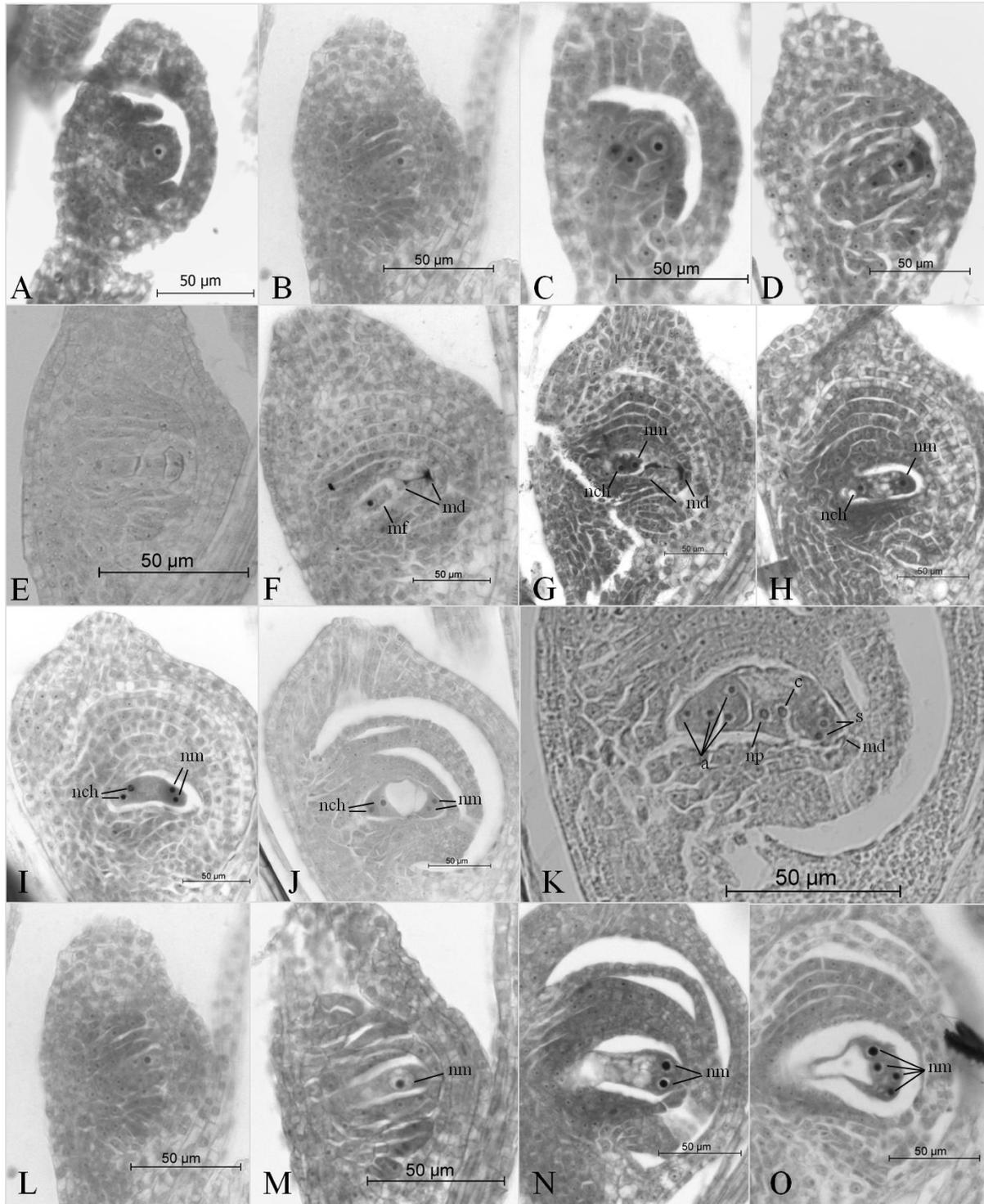


Figura 1.3: Desarrollo del saco embrionario sexual (A - K) y diplospórico (L - O) en plantas de pasto llorón cv. Tanganyika INTA. (A) Arquespora. (B) Célula madre de la megaspóra. (C) Diada (primer división meiótica). (D) Tres células de de una tétrada lineal de megasporas. (E) Tétrada formada. (F) Megaspóra funcional calazal y megasporas degenerantes. (G) Saco binucleado con presencia de megasporas degenerantes. (H) Saco binucleado desarrollado. (I) Saco tetranucleado. (J) Saco tetranucleado desarrollado con vacuola central. (K) Saco octonucleados. (L) Célula madre de la megaspóra. (M) Célula madre de la megaspóra elongada. (N) Saco binucleado. (O) Saco tetranucleado. a: antípoda, nch: núcleos calazales, md: megasporas degenerantes, c: ovocélula, mf: megaspóra funcional, nm: núcleo micropilar, np: núcleo polar, s: sinérgidas.

Este trabajo permitió determinar que el cv. Tanganyika INTA, mencionado anteriormente como apomítico obligado (Poverene 1988), es en realidad un cultivar facultativo donde apomixis y sexualidad no son procesos mutuamente excluyentes. En el mismo pueden observarse simultáneamente sacos reducidos (meióticos) y no reducidos (provenientes de apomixis) en una misma planta, en una misma inflorescencia y, aún, en pistilos contiguos (Figura 1.4).

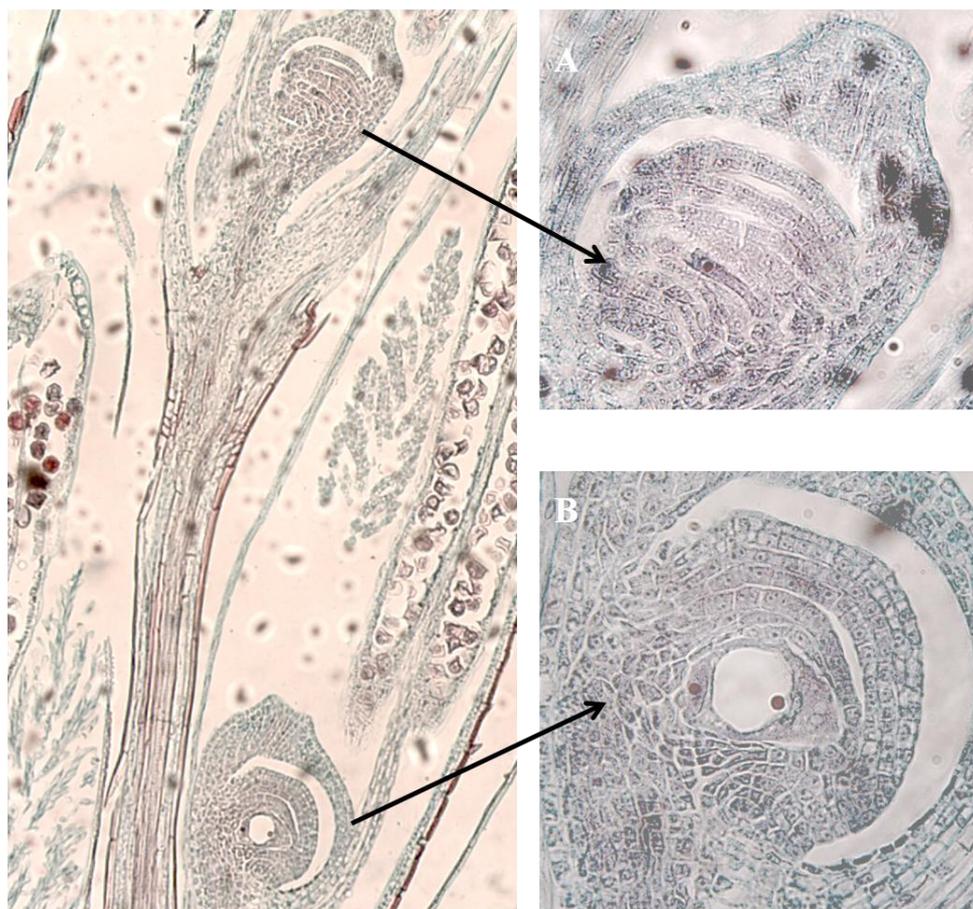


Figura 1.4: Corte longitudinal de una espiguilla del cv. Tanganyika INTA de pasto llorón con detalle de un proceso apomítico y uno sexual en pistilos contiguos. Secciones teñidas con safranina-fast green. (A) Célula madre de la megaspóra elongada (apomítica) y (B) saco tetranucleado con núcleos de disposición típica de procesos sexuales.

Los resultados obtenidos a partir de las observaciones mensuales del primer periodo de floración analizado se resumen en la Tabla 1.1.

El análisis de 565 pistilos en estadio óptimo de observación permitió determinar que la proporción de sacos apomíticos es estable durante el periodo de floración en condiciones controladas. Se observó, además, que en las condiciones en que se llevó a cabo el ensayo, el cultivar presenta un nivel de sexualidad promedio del 1,4 %, evidenciando un efecto de sexualidad residual presente en el cultivar.

Tabla 1.1: Número de pistilos apomícticos y sexuales observados en diferentes plantas de pasto llorón, cv. Tanganyika INTA, entre los meses de septiembre 2009 a marzo 2010. Pistilos sexuales (díadas, tétradas, megasporas funcional y degenerantes, sacos embrionarios 2N, 4N y 8N); pistilos apomícticos (célula madre de la megaspóra elongada, sacos embrionarios 2N y 4N). NC: no hay colección.

Temporada 2009/10	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre	Enero	Febrero	Marzo
Pistilos Apomícticos	96	98	100	89	NC	69	105
Pistilos sexuales	1	1	3	2	NC	0	1

En 2011, Rebozzio *et al.*, observaron un aumento en la proporción de sacos sexuales sobre el final del periodo de floración. A fin de determinar si la misma ocurre en pasto llorón se realizó un nuevo análisis durante el periodo de floración 2011/12. En este nuevo análisis se individualizaron los ejemplares y se duplicó el número de observaciones a fin de realizar un estudio más preciso. Estos resultados se exhiben en la Tabla 1.2.

Tabla 1.2: Número de pistilos apomícticos y sexuales observados en diferentes plantas de pasto llorón, cv. Tanganyika INTA, entre los meses de septiembre 2011 a marzo 2012. Pistilos sexuales (díadas, tétradas, megasporas funcionales con degenerantes, sacos embrionarios 2N, 4N y 8N); pistilos apomícticos (célula madre de la megaspóra elongada, sacos embrionarios 2N y 4N). De la planta T4 en el primer periodo de floración se analizaron dos panojas diferentes

Primer período de floración (Sep. - Dic.)					
2011/12	Número de pistilos analizados	Número de pistilos		Porcentaje	
Planta		Apo	Sex	Apo	Sex
T 4 (1)	104	102	2	98,1%	1,9%
T 4 (2)	75	74	1	98,7%	1,3%
T 6	150	145	5	96,7%	3,3%
T 20	87	84	3	96,6%	3,4%
T 23	152	150	2	98,7%	1,3%
Total	568	555	13	97,7%	2,3%

Segundo período de floración (Feb. - Mar.)					
2011/12	Número de pistilos analizados	Número de pistilos		Porcentaje	
Planta		Apo	Sex	Apo	Sex
T 4	150	147	3	98,0%	2,0%
T 6	91	89	2	97,8%	2,2%
T 20	126	121	5	96,0%	4,0%
T 23	113	111	2	98,2%	1,8%
Total	480	468	12	97,5%	2,5%

El análisis de 568 pistilos pertenecientes al primer periodo de floración y 480 al segundo reforzaron los resultados analizados en la campaña anterior. Es decir que en condiciones controladas de temperatura (invernáculo) no se observaron diferencias en la expresión de la sexualidad en plantas del cv. Tanganyika. Estudios previos conducentes a la caracterización de genotipos del complejo *E. curvula* realizados con isoenzimas de peroxidasas (Poverene, 1988) no arrojaron evidencias de variabilidad natural en el cv. Tanganyika. Las pruebas de pro genie realizadas en el mencionado estudio, indican la presencia de pro genie uniforme. Los resultados mostrados en esta tesis indican que este cultivar, catalogado como apomítico obligado, posee, a lo largo de todo el año un pequeño porcentaje de sacos embrionarios provenientes de procesos sexuales. Estos resultados estarían indicando que las semillas que darán origen a nuevas plántulas provienen de procesos apomíticos o que, en el estudio de Poverene, el número de plantas analizadas no fue suficiente como para detectar este bajo nivel de sexualidad. Por otro lado, las isoenzimas no son marcadores lo suficientemente sensibles para detectar estos bajos niveles de sexualidad. La sexualidad residual promedio de cada periodo fue del 2,3 % y 2,5 % respectivamente y no se observaron diferencias significativas entre los mismos (tanto en la comparación entre las mismas plantas en diferentes periodos como periodos entre sí) ni con los datos de la campaña 2009/10. Estos resultados indicarían que, en condiciones de crecimiento controladas, el modo reproductivo del cv. Tanganyika INTA presenta una expresión estable de la sexualidad durante todo el periodo de floración. Estos resultados no implican que no ocurra una variación en las proporciones de procesos apomítico/sexuales influenciados por variables como la temperatura, o factores externos a las condiciones de invernáculo, como podría suceder en las poblaciones naturales con condiciones estacionales más marcadas. Rebozzio *et al.*, (2011) en *Paspalum notatum*, observaron una expresión más baja de la sexualidad residual en el periodo de máxima floración. Sin embargo, se debe tener en cuenta que los ensayos realizados en esta especie fueron llevados a cabo a campo, con condiciones ambientales cambiantes y periodos estacionales definidos, mientras que los ensayos en *E. curvula* se realizaron en condiciones controladas.

Estos análisis son la base fundamental para la continuidad de los estudios que se pretenden realizar, ya que sientan las bases de un comportamiento estable del carácter apomixis en este cultivar en las condiciones de crecimiento en las que se realizarán los

posteriores ensayos de esta tesis y nos dan la seguridad de un entorno estable donde analizar las próximas variables.

Análisis del desarrollo de la inflorescencia

El análisis de las secciones teñidas con safranina-fast green permitió estimar la frecuencia de aparición de cada estadio para cada modo reproductivo. Este tipo de estudio, combinado con estudios acerca de la frecuencia relativa a la posición dentro de la inflorescencia permite calcular la duración relativa de cada estadio en el proceso de megagametogénesis. En la Figura 1.5 se muestran las frecuencias de aparición de cada estadio en un genotipo apomíctico (cv. Tanganyika INTA) y uno sexual (híbridos de la cruce controlada entre OTA (USDA) y Tanganyika (USDA))

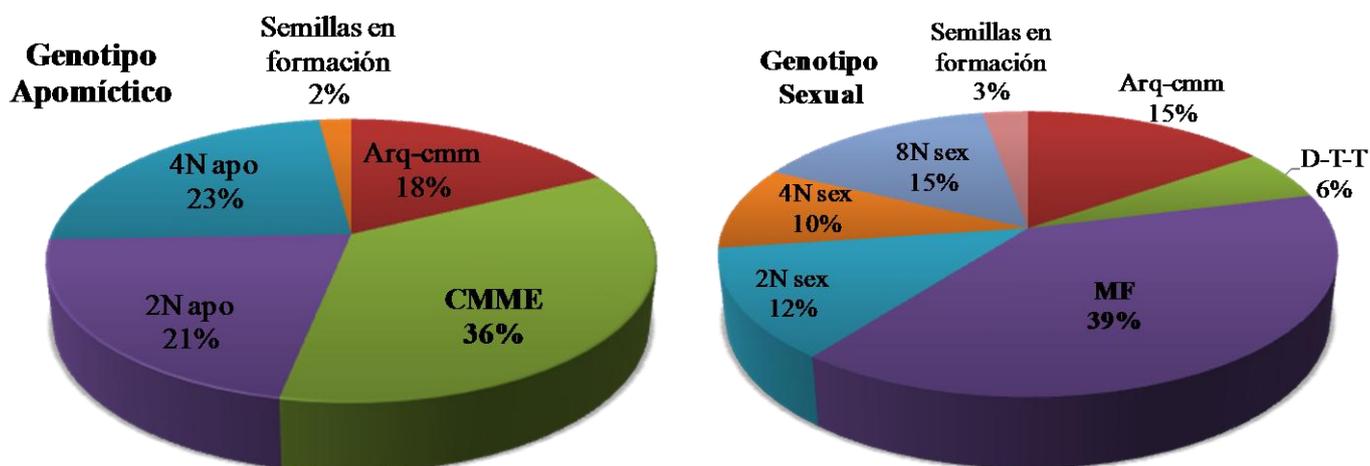


Figura 1.5: Frecuencia de aparición de los diferentes estadios de la megagametogénesis en el genotipo apomíctico Tanganyika (INTA) (izq.) y en el sexual OTA (USDA) (der.) de pasto llorón. Arq-cmm: arqueporas y células madres de la megaspóra; CMME: células madres de la megaspóra elongadas; D-T-T: díadas, tríadas y tétradas; MF: megasporas funcionales; 2N apo y 4N apo: sacos embrionarios apomícticos bi y tetranucleados; 2N sex, 4N sex y 8N sex: sacos embrionarios sexuales bi, tetra y octonucleados.

En el caso del genotipo apomíctico, el análisis de 1556 ovarios permitió determinar que el estadio de célula madre de la megaspóra (CMME) es el predominante con una frecuencia de observación del 36 %. Los estadios de arquepora y célula madre de la megaspóra (Arq-cmm), y sacos embrionarios bi y tetranucleados mantuvieron frecuencias de observación similares (18, 21 y 23 %, respectivamente) mostrando una distribución homogénea de los diferentes estadios del proceso apomíctico. En el

genotipo sexual, el análisis de 1175 ovarios, mostró al estadio de megaspora funcional como el de mayor frecuencia de aparición (39 % de los casos), mientras que los estadios Arq-cmm y los sacos embrionarios bi, tetra y octonucleados mostraron porcentajes de aparición similares. No obstante, el grupo conformado por díadas, tríadas y tétradas (D-T-T) una menor frecuencia de aparición (6 %). Este bajo porcentaje obtenido entre los tres estadios (D-T-T) demostraría que el proceso de meiosis, que tiene lugar en la megagametogénesis sexual, ocurriría en un lapso muy estrecho en comparación con los otros estadios. En ambos genotipos se encontró una pequeña proporción (2 y 3 %) de sacos embrionarios ya fecundados y con formación de tejidos propios de una semilla en formación.

Con una fracción de los datos del estudio anterior (872 ovarios en el genotipo apomítico y 689 en el sexual) se calculó la frecuencia de ocurrencia relativa a la posición de cada estadio dentro de la inflorescencia.

Dentro de los tres grados de desarrollo observados de la panoja (ver Figura 1.1), el heterocronismo más evidente y predominante se observó en el desarrollo de las flores dentro de cada espiguilla, donde las basales se encuentran notoriamente más desarrolladas que las superiores. La variación ocurrida dentro de los otros dos ejes de desarrollo (a lo largo del raquis principal y raquillas secundarias) podría considerarse despreciable en comparación a la que se observó dentro de las espiguillas. Por ello, el estudio se centró principalmente en el análisis del desarrollo de las espiguillas (Figura 1.6).

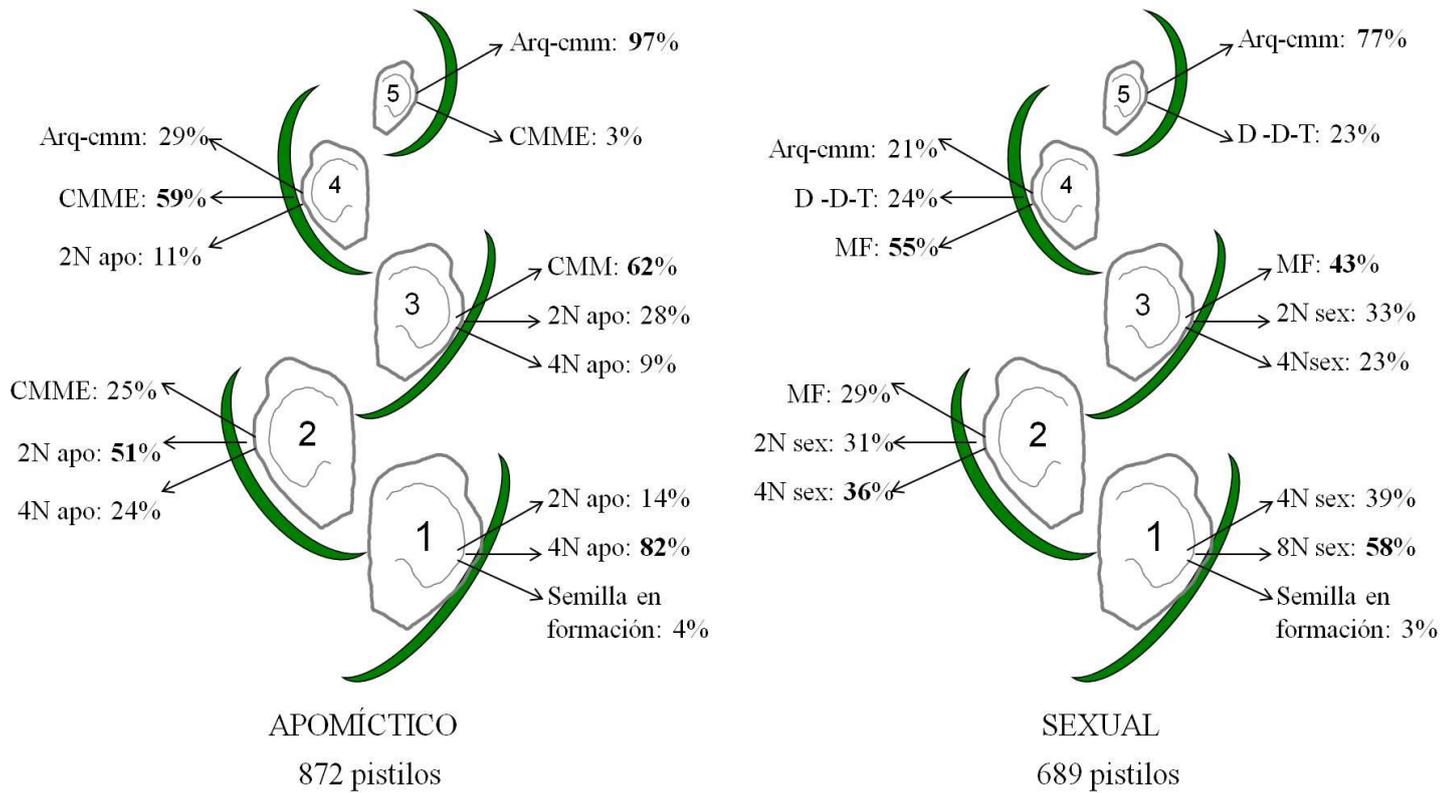


Figura 1.6: Frecuencia de ocurrencia de cada estadio en relación a la posición dentro de la espiguilla en inflorescencias de genotipos apomícticos (izq.) y sexuales (der.) de pasto llorón.

En el genotipo apomíctico casi el total de antecios apicales (antecio 5) observados presentó estadios arquesporales o de cmm. Si bien las estructuras propias del ovario no mostraron anomalías, es posible que los estadios preembrionarios de este antecio no lleguen a formar semilla en el total de los casos, ya que rara vez se colectan tantas semillas por espiguilla, pudiéndose tratar de un antecio apical estéril. En los antecios siguientes (3 y 4), el estadio de CMME se muestra, marcadamente, como el de mayor ocurrencia (62 y 59 % respectivamente). Es importante destacar que, en este estadio, la determinación del modo reproductivo que tomará la futura semilla ya ha ocurrido, por lo que, de ser necesario colectar material para estudios previos al proceso de determinación, sería necesario colectar solamente ovarios pertenecientes al antecio 5 cuyos ovarios tienen un diámetro de aproximadamente 50 μm . En el antecio 2, el estadio dominante fue el de saco embrionario binucleado, mientras que en el antecio 1 se observó una fuerte dominancia de sacos embrionarios tetranucleados. En esta posición se observó también una pequeña proporción (4 %) de estructuras propias de una semilla en formación, como sacos fecundados, paredes seminales desarrolladas y formación de embriones.

En el genotipo sexual tres cuartos del total de los antecios apicales observados presentó estadios arqueosporiales (77 %), mientras que la cuarta parte restante perteneció al grupo conformado por díadas, tríadas y tétradas (23 %). A diferencia de lo observado en el genotipo apomítico, la colección de ovarios apicales no asegura la obtención de estadios previos a la determinación visual del modo reproductivo. Este efecto podría deberse simplemente a que la diferenciación de los procesos sexuales se visualiza cronológicamente antes que los procesos apomíticos, ya que, una cmm solo se considera CMME una vez alcanzado un grado de desarrollo considerable. En los antecios siguientes (2 y 3), el estadio de megaspora funcional (MF) se muestra, marcadamente, como el de mayor ocurrencia (43 y 55 % respectivamente) e inclusive tiene una gran participación en el antecio siguiente (29 %), donde el estadio tetranucleado es predominante (36 %). Los porcentajes de ocurrencia y la predominancia en varios antecios se condicen con los resultados detallados en la Figura 1.5, donde el estadio de MF se encontró en el 39 % de los casos observados, indicando que este sería el estadio de mayor ocurrencia y posiblemente el de mayor duración. Esto podría deberse al hecho de que este estadio comprende todo el proceso de degeneración de las megasporas no funcionales y, por ese motivo, su ocurrencia puede ser prolongada en el tiempo. En el antecio basal (1), el estadio predominante fue el saco embrionario octonucleados (58 %), donde al igual que en el genotipo apomítico se encontró una baja proporción de procesos y estructuras típicas de sacos fecundados y semillas en formación.

Estos análisis evidenciaron una distribución marcadamente heterocrónica dentro de la espiguilla. También demostraron la dificultad que conlleva obtener estadios previos a la determinación del modo reproductivo en genotipos facultativos (si es que este factor no se resolviera aún con mayor anterioridad, es decir, que la señal molecular determinante podría ya haber sido recibida mucho antes de su visualización). Posiblemente, para este tipo de estudios, sea necesario realizar la colección de material en estadios anteriores a la antesis, como por ejemplo, mientras la panoja aún se encuentra dentro de la hoja bandera.

Este ensayo permitirá mejorar la toma de decisiones cuando sea necesario realizar estudios relacionados con la expresión de genes en ensayos de hibridación *in situ* y selección de tejido para la extracción de ARN en estos cultivares.

En la especie modelo utilizada en esta tesis, *E. curvula*, pudieron observarse dentro de una misma espiguilla antecios en muy diferente grado de desarrollo. Esto representa una complicación cuando se quieren realizar estudios comparativos de expresión de genes entre plantas sexuales y apomícticas. Esto se debe a que en una espiguilla la expresión del/los genes determinantes del modo reproductivo teóricamente se encuentra en los estadios de desarrollo más tempranos (arquespora a CMM) y en nuestro caso la presencia de estadios más avanzados de desarrollo en la misma espiguilla diluiría la presencia de los genes buscados. Existen técnicas que permiten el estudio de la expresión diferencial de genes a partir de muy pequeñas muestras de material biológico, como el análisis de células disectadas con laser, la hibridación in situ, etc. (Wuest *et al.*, 2013). Actualmente, nuestro grupo está comenzando un proyecto con la utilización de estas técnicas en colaboración con el grupo del Dr. Timothy Sharbel (IPK, Gatersleben, Alemania). Por lo tanto, conocer el grado de desarrollo de los distintos antecios a lo largo de una espiguilla y su relación con la antesis es crucial, ya que este último carácter es el más visible y el que nos señala el momento oportuno para la toma de la muestra. El paso previo a esta tarea es realizar una disección de la espiguilla y en base a los resultados hallados en la presente tesis se seleccionan los antecios superiores, que son los más tempranos y donde la CMM no está diferenciada o lo ha hecho recientemente. Por ejemplo, un estudio realizado en distintas especies de *Boechera* analizan óvulos con la CMM diferenciada y separan el ovulo por microdisección (Corral *et al.*, 2013).

CAPÍTULO II –“Expresión de la apomixis bajo diferentes situaciones que provocan estrés genómico.”

Las plantas y el estrés

El estrés es el efecto producido por un factor ambiental externo que dista del óptimo y actúa sobre la planta generando una respuesta. Las diferentes especies o variedades difieren en sus requerimientos óptimos y, por lo tanto, en su susceptibilidad a un determinado estrés (Levitt, 1980). Además, hay períodos o etapas del desarrollo, como el estadio de plántula o el periodo de floración, donde los individuos pueden ser particularmente más sensibles a un estrés determinado (Hsiao, 1973).

La resistencia de las plantas a un estrés puede dividirse en estrategias de escape, evasión y tolerancia (Levitt, 1972). Estas estrategias no son mutuamente excluyentes y, en la práctica, las plantas pueden combinar una gama de tipos de respuesta (Ludlow, 1989). Las estrategias de escape suponen una reproducción exitosa antes de la aparición de un estrés severo. Esto es importante en regiones áridas, donde plantas anuales pueden combinar los ciclos de vida cortos con altas tasas de crecimiento, utilizando el máximo de recursos disponibles, mientras dure la humedad en el suelo (Maroco *et al.*, 2000). Las plantas también pueden soportar condiciones de estrés con estrategias de evasión, evitando exponerse a los estreses. Ejemplos de esto son la reducción en la pérdida de agua mediante el cierre de estomas o el enrollamiento de las hojas ante intensidades lumínicas elevadas. Por último, existen estrategias de tolerancia son aquellos mecanismos que permiten a una planta soportar un estrés sin que se vea afectada la fisiología de la planta. Ejemplos de esto son el ajuste osmótico a bajo potencial hídrico (Morgan 1984), paredes celulares más rígidas, o células más pequeñas (Wilson *et al.*, 1980).

Básicamente, la dinámica del estrés en las plantas (Figura 2.1), consiste en una desestabilización inicial de las funciones, seguidas de un estado de normalización y mejoramiento de la resistencia. Si se exceden los límites de tolerancia y se sobrepasa la capacidad de adaptación, el resultado puede resultar en un daño permanente (Larcher, 1987; Sharma *et al.*, 2012). Sin embargo, si el agente estresante cesa, las plantas sobrevivientes pueden recuperarse, alcanzando nuevos estándares de resistencia (Lichtenthaler, 1996).



Figura 2.1: Dinámica del estrés en plantas: los individuos que sobrevivan a un estrés prolongado posiblemente alcancen nuevos estándares de resistencia (Adaptado de Lichtenthaler, 1996).

Plasticidad vegetal en respuesta estrés

El crecimiento de las plantas se ve severamente afectado por estreses bióticos y abióticos. Para hacer frente a estas presiones externas, las plantas han adquirido la capacidad de generar respuestas adaptativas durante su evolución. Estas respuestas se basan en un conjunto de procesos complejos que involucran varios genes y factores de señalización (Yokotani *et al.*, 2013).

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). En condiciones de estrés, las plantas sufren daños que afectan la cantidad y calidad del crecimiento vegetativo, afectando procesos esenciales como la fotosíntesis (Colom y Vazzana, 2001) y el crecimiento foliar (Cabuslay *et al.*, 2002), desencadenando reducciones en el rendimiento (Blumwald *et al.*, 2004). Estos daños también pueden afectar uno de los periodos más sensible de las plantas, el estadio reproductivo provocando, por ejemplo, esterilidad floral (Tang *et al.*, 2008).

Ante estímulos ambientales las plantas activan múltiples vías de señalización celular que llevan a interacciones sumamente complejas. Estas interacciones probablemente evolucionaron como mecanismos que permiten a los sistemas vivos responder al estrés

con procesos biológicos mínimos y apropiados (Figura 2.2). La detección del estrés biótico y abiótico induce cascadas de señalización que activan canales de iones, cascadas de quinasas, producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y acumulación de hormonas tales como el ácido salicílico (SA), etileno (ET), ácido jasmónico (JA) y ácido abscísico (ABA). Estas señales, en última instancia, inducen la expresión específica de subconjuntos de genes que llevan al ensamblado de una reacción general de defensa (Fraire Velázquez *et al.*, 2011).

Como se mencionara anteriormente, en la introducción general, se han realizado diversos estudios que indicarían que situaciones particulares como el cultivo *in vitro* y el estrés hídrico podrían afectar la expresión del carácter apomixis debido al estrés que generan en la planta. Conocer el efecto de situaciones que causan estrés genómico sobre la expresión de la apomixis es importante para determinar el grado en que el ambiente regula la expresión de este carácter y sus posibles implicancias, sobre todo en el caso de que, en el futuro, se pueda transferir a especies de interés agronómico. Por otro lado, el estudio del efecto de diferentes situaciones estresantes sobre la expresión de este carácter puede proporcionar una idea de las posibles presiones de selección que actúan sobre este modo reproductivo en condiciones de campo. También, fundamentalmente, ayudaría a dilucidar posibles mecanismos de control del mismo.

Varios autores han sugerido que un sistema reproductivo facultativo, como el que se encuentra en *E. curvula*, es indicativo de una estrategia óptima para la reproducción y supervivencia de una especie (Howard y Lively, 1994; Green y Noakes, 1995). Como una primera aproximación al problema, es menester analizar la expresión de la apomixis/sexualidad bajo diferentes regímenes ambientales que podrían generar un estrés en la planta.

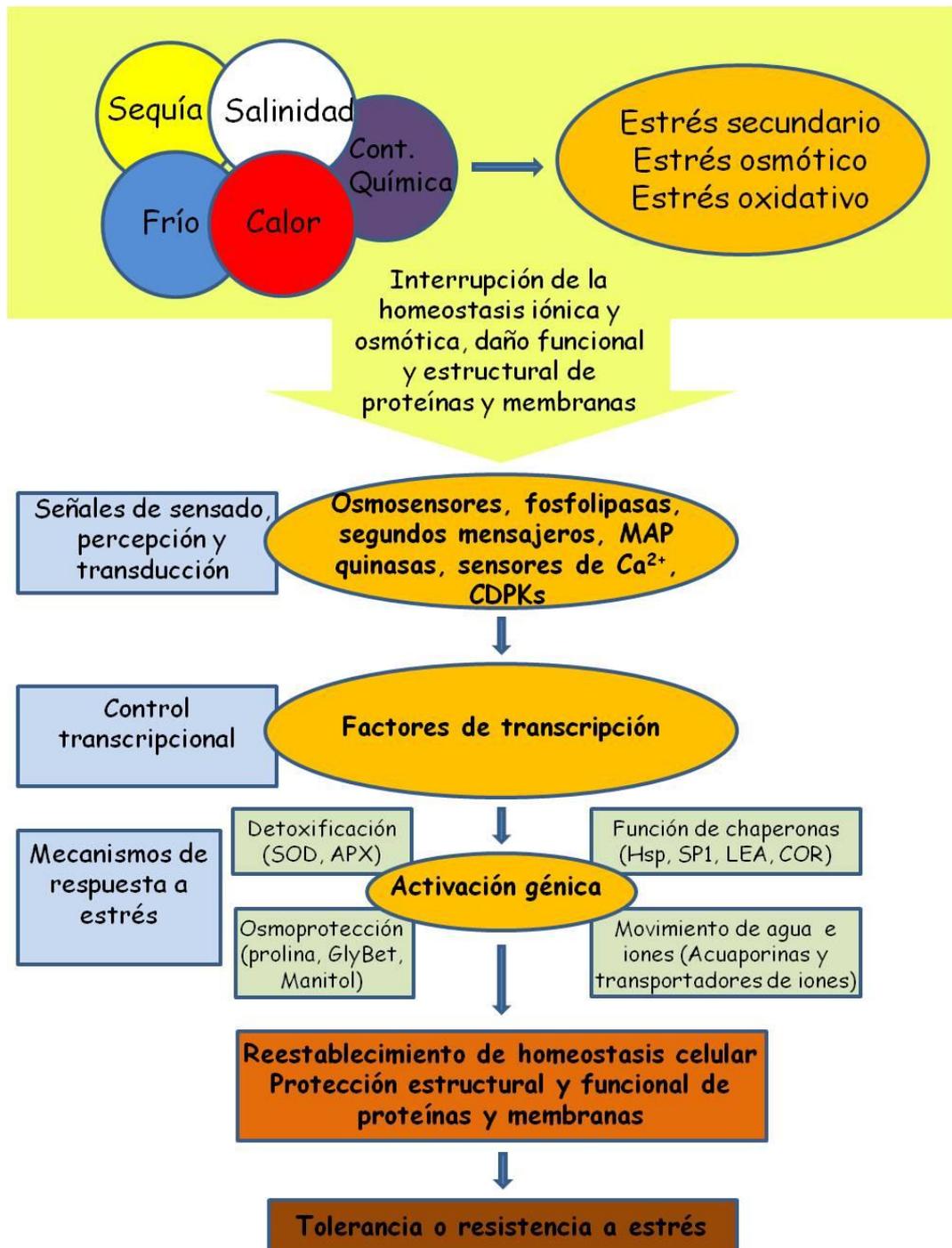


Figura 2.2: Complejidad de las respuestas de las plantas a estreses abióticos (Adaptado de Vinocur y Altman, 2005).

El análisis del efecto de estos estreses o estresores sobre la expresión de la apomixis es de vital importancia para comprender el origen de la apomixis, sus mecanismos de regulación y desarrollar herramientas para su manejo y aprovechamiento.

Estrés hídrico

En términos globales, la sequía y el déficit hídrico limitan el crecimiento y la productividad de los cultivos, más que cualquier otro factor ambiental (Boyer, 1982). La mayoría de las plantas están expuestas a distintos grados y tipos de estrés en algún momento de su desarrollo, pero sin duda la falta de agua es la fuente de estrés más común y frecuente. Muchas plantas han desarrollado respuestas que les permiten tolerar diferentes niveles de déficit de agua, que van desde un estrés hídrico leve, causado por la disminución del potencial hídrico al mediodía, hasta aquellas que les permiten sobrevivir en hábitats desérticos. Cuando el déficit hídrico se desarrolla lentamente, las plantas pueden presentar respuestas de aclimatación que tienen efectos sobre el crecimiento, como la disminución de la expansión foliar y el aumento del crecimiento radical (Potters *et al.*, 2007; Shao *et al.*, 2008). Otro mecanismo de resistencia a nivel fisiológico es el cierre de estomas, estructuras responsables de la mayor proporción de pérdida de agua en las plantas (Taiz y Zeiger, 2006). Esta respuesta está mediada por la hormona ácido abscísico (ABA), que migra desde la raíz, para ejercer su efecto en las células oclusivas de los estomas (Leung y Giraudat, 1998; Zhang y Outlaw, 2001). Si bien la mayoría de estas respuestas están reguladas por el ABA, se han descrito vías de regulación independientes de esta hormona (Chandler y Robertson, 1994). Esto podría sugerir la presencia de factores adicionales involucrados en la modulación de algunos genes durante periodos de estrés.

La exposición al estrés hídrico severo durante un corto periodo de tiempo tendría diversos efectos sobre el desarrollo de la planta, según su estado ontogénico. Si ocurriese durante el periodo reproductivo, podría ser crítico, debido a que abarca una serie de procesos irreversibles y no compensatorios que son diferencialmente sensibles al estrés (Namuco y O'Toole, 1986).

Las plantas también responden al estrés por déficit hídrico a nivel celular y molecular. Una de las principales respuestas al estrés hídrico es la modificación de la expresión génica (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2007), relacionada con la producción de enzimas clave en la vía de síntesis de osmolitos, proteínas con función protectora, enzimas antioxidantes, factores de transcripción y otras proteínas involucradas en las respuestas al estrés hídrico (Bray, 1997; Zhu *et al.*, 2002). Durante el déficit hídrico, diferentes tipos celulares responden incrementando o disminuyendo la expresión de

algunos genes (Guo *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2011). A su vez, se ha visto que muchos genes que no se expresan en condiciones de irrigación óptima pueden empezar a hacerlo bajo déficit hídrico.

Basándonos en los resultados obtenidos por nuestro grupo de trabajo, anteriormente detallados en la introducción de esta tesis, y en las características que aquí se describen, el estrés hídrico es un excelente modelo para realizar un análisis del comportamiento del carácter apomixis en situaciones de estrés.

Ácido abscísico

La fitohormona ácido abscísico (ABA) se encuentra en todas las plantas superiores y en todos los tejidos vegetales y es una hormona reguladora de procesos importantes para el desarrollo de las plantas (López-Molina *et al.*, 2001). Esta fitohormona isoprenoide se sintetiza en los plástidos celulares, es móvil dentro de la hoja y puede ser rápidamente trasladada desde las raíces hasta las hojas a través del xilema.

Químicamente el ABA es un sesquiterpeno que cuenta con dos isómeros: uno cis y otro trans y en función de la orientación que presente el grupo carboxilo del C2 de estos isómeros será activa o no: sólo el cis se corresponde con la forma activa, aunque la planta puede interconvertir la molécula a cualquiera de ellos.

La síntesis del ABA se inicia con el precursor trans-violaxantina que, en condiciones de estrés, se convierte a cis-neoxantina. La molécula es cortada entonces por la enzima NCED, obteniéndose el xantosol. En condiciones de estrés hídrico la actividad de la enzima NCED aumenta considerablemente. Como otras hormonas vegetales, el ABA puede inactivarse y almacenarse en forma de conjugado o degradarse irreversiblemente por oxidación.

Baimiev *et al.* (2000) demostraron que el ABA tiene un efecto diferencial entre los cinco tipos de fitohormonas (abscisinas, auxinas, giberelinas, citoquininas y etileno) ya que es la única capaz de antagonizar la acción de otra hormona. El ABA es un intermediario esencial de la respuestas de las plantas a los estreses ambientales, tanto abióticos (sequía, salinidad, herida, frío) (Leung y Giraudat, 1998; Rock, 2000) como bióticos (Fujita *et al.*, 2006), siendo el principal mediador de respuestas a nivel de planta entera en situaciones de deshidratación. El rol principal del ABA es optimizar el

crecimiento vegetativo en condiciones adversas mediante el mantenimiento de la homeostasis osmótica. Para ello promueve respuestas de desarrollo (como la disminución del crecimiento), adaptaciones morfológicas (como el cierre de estomas) y cambios fisiológicos (como la disminución de la transpiración). Las raíces son probablemente los órganos que primero perciben el estrés hídrico y sintetizan el ABA, que posteriormente será transportado a otras partes de la planta, como las hojas, donde producirá el cierre de los estomas (Hwang y Goodman, 1995).

El estrés osmótico y las bajas temperaturas incrementan la concentración de ABA endógeno (Chandler y Robertson, 1994), afectando procesos no solo de respuesta momentánea sino también efectos a largo plazo, como la arquitectura de la raíz a través de la expresión de genes tales como *ABI3* que regula la generación de raíces laterales (De Smet *et al.*, 2006). De hecho, el ABA y el estrés por sequía tienen efectos similares y probablemente sinérgicos sobre la formación de raíces laterales (Xiong *et al.*, 2006). Aunque el papel del ABA en la abscisión del fruto y la latencia de las semillas no ha sido completamente dilucidado (Schwartz *et al.*, 2003), existen evidencias que demuestran los efectos de esta hormona en la mayoría de los procesos esenciales para las plantas, tales como maduración de la semilla, desecación, latencia y germinación. Algunos autores han propuesto que el ABA puede ser un inhibidor del crecimiento en condiciones de estrés, pero un promotor del crecimiento en ausencia del mismo (Cheng *et al.*, 2002; Sharp y LeNoble, 2002).

Además de limitar la pérdida de agua a través de la regulación de los estomas, el ABA también afecta los patrones de expresión de más de 1.000 genes (Skriver y Mundy, 1990; Hoth *et al.*, 2002; Seki *et al.*, 2002; Leonhardt *et al.*, 2004), muchos de los cuales tienen una implicancia, directa o indirecta, sobre el desarrollo del embrión, principalmente durante situaciones de estrés ambiental. Un ejemplo de ello, son los genes codificantes para proteínas abundantes en la embriogénesis tardía (LEA) que generan un refuerzo de la tolerancia a sequía en plantas (Aroca *et al.*, 2008).

Baimiev *et al.*, (2000) observaron que el ABA podría cumplir funciones de defensa y adaptación bajo determinadas condiciones ecológicas, siendo capaz de afectar, inclusive, el modo de reproducción. Diferentes autores han informado que hormonas como las auxinas, el etileno y las citocininas, juegan un papel importante en el desarrollo de estambres (Cecchetti *et al.*, 2008; Feng *et al.*, 2006) y carpelos

(Bencivenga *et al.*, 2011). Por otro lado, se ha demostrado que las auxinas tienen un papel muy definido en la especificación del destino celular del saco embrionario, generando un gradiente de señales que coordinan el desarrollo a nivel global (Sundaresan y Alandete-Saez, 2010). Sin embargo, no existen informes acerca de los efectos de los reguladores de crecimiento sobre el desarrollo de los ovarios durante el período de actividad de la ovocélula. Esto se debe a la dificultad de realizar estudios en estructuras tan pequeñas y cuya duración es efímera en el tiempo (Gusakovskaya y Blintsov, 2006). De esta manera, una deficiencia de datos experimentales no permite la construcción de un modelo de regulación hormonal del proceso reproductivo en el ovario durante el período de actividad de las ovocélulas. Por lo tanto, el análisis del efecto del ABA sobre la expresión del modo reproductivo en una especie facultativa podría aportar indicios acerca del funcionamiento de este complejo sistema.

Cultivo *in vitro*

El cultivo *in vitro* de tejidos consiste esencialmente en aislar una porción de la planta (explanto) y proporcionarle artificialmente las condiciones físicas y químicas apropiadas para que las células expresen su potencial intrínseco o inducido (Roca y Mroginski, 1991). En condiciones adecuadas, como las que brinda el cultivo *in vitro*, estas células desdiferenciadas tienen el potencial de originar una planta completa. Durante este proceso, las células deben desdiferenciarse del estado de desarrollo en que se encuentra el explanto para formar callo y luego volver a diferenciarse en nuevos tipos de tejidos. Esta reprogramación del genoma infringe a la célula una serie de experiencias traumáticas (McClintock, 1984).

El cultivo de tejidos es capaz de inducir cambios a distintos niveles, aun genómicos. De hecho se han encontrado varios mecanismos asociados con procesos mutagénicos (Lee y Phillips, 1988; Hirochika *et al.*, 1993; Kaeppler *et al.*, 2000). Hirochika (1993) fue el primero en informar el efecto inductor del cultivo de tejidos sobre la activación de retrotransposones *Tto1*, *Tto2* y *Tnt1* de tabaco. Más tarde, Hirochika *et al.*, (1996) informaron la activación de retrotransposones en arroz (*Tos10*, *Tos 17*, y *Tos 19*) luego de ser sometido a cultivo *in vitro* y Kikuchi *et al.* (2003) reportaron la activación de elementos transponibles miniatura con repeticiones invertidas (MITEs) durante el cultivo de anteras de arroz.

Entre los factores a tener en cuenta cuando se cultivan plantas *in vitro* son los reguladores de crecimiento, dado que ejercen un rol indirecto en la inducción de cambios en el metabolismo celular y tisular de plantas creciendo *in vitro*. A su vez, los reguladores de crecimiento pueden activar los promotores de ciertos transposones (Takeda *et al.*, 1999), que, a su vez pueden inducir mutaciones. Si bien no se ha encontrado una relación directa entre el cultivo de tejidos y la transposición, se ha observado una disminución en la metilación del ADN (Kubis *et al.*, 2003), proceso fundamental para que esta ocurra. En conclusión, es probable que el cultivo de tejidos comprometa la homeostasis epigenética de los vegetales y puede resultar en efectos genómicos secundarios. 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.

En el año 2000, Polci encontró que luego de ser regeneradas *in vitro* algunas plantas de *E. curvula* generaban progenies variables, considerandose las sexuales. Luego de nueve años estas mismas plantas generaban progenies totalmente clonales, con lo cual se las catalogó como completamente apomícticas (Zappacosta, 2009). En ese momento se hipotetizó que ante una situación de estrés, como en este caso el cultivo *in vitro*, se genera un aumento en la expresión de la sexualidad, pero, cesado ese estrés, existe una tendencia a regresar a los valores originales de expresión.

En muchas especies, la región condicionante de la apomixis se describe como una región multigénica con gran cantidad de elementos transponibles y de baja recombinación. En *Paspalum*, la reproducción apomíctica es controlada por un solo locus dominante que, cuando está presente, confiere casi 100 % de aposporía, un grado variable de partenogénesis y plena capacidad de formación de endosperma por pseudogamia (Pupilli *et al.*, 2004; Stein *et al.*, 2004). Estos tres componentes probablemente se hereden como un solo bloque, ya que hasta la fecha no se han informado casos de recombinación (Ortiz *et al.*, 2013). Un claro ejemplo del papel de la supresión de la recombinación es en *Pennisetum*, donde la apomixis es causada por la acción combinada de un conjunto de factores mapeados en la región telomérica del brazo de un cromosoma que ahora se conoce como región genómica específica de la aposporía (Ozias-Akins *et al.*, 2003). El mantenimiento de la recombinación en bloques

permite que la reproducción asexual tenga éxito, ya que, de perderse alguno de los genes necesarios para el proceso de apomixis (apomeiosis, partenogénesis y formación del endosperma) el proceso total en sí no podría ser llevado a cabo, imposibilitando la formación de semillas asexuales viables (Neiman *et al.*, 2014).

Técnicas para determinar el origen de la progenie

Las pruebas de progenie con marcadores RAPDs y los estudios citoembriológicos demostraron ser adecuados para determinar el modo reproductivo de pasto llorón, permitiendo la caracterización de plantas en apomícticas obligadas, apomícticas facultativas y sexuales con éxito en muchas especies, como *Paspalum procurrens* (Hojsgaard *et al.*, 2011), híbridos de *Brachiaria* (Pessino *et al.*, 1998) y *Paspalum notatum* (Acuña *et al.*, 2009) entre otros. Los marcadores genéticos derivan de pequeñas regiones de ADN que muestran polimorfismos de secuencia entre individuos dentro de una especie. Estos 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. Estos polimorfismos son ubicuos y abundantes en todos los organismos vivos y segregan, la mayoría de las veces, de manera mendeliana.

Según estudios anteriores de nuestro grupo de trabajo (Meier *et al.*, 2011), el mejor enfoque para corroborar y determinar el modo reproductivo en *E. curvula* es la técnica con tinción de safranina-fast green en conjunción con las pruebas de progenie. 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 que permite calcular el porcentaje de sacos embrionarios no reducidos. En cambio, las pruebas de progenie 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 20 % de sacos meióticos y un 80 % de sacos apomícticos, y será clasificada como apomíctica facultativa con 80 % de apomixis en las pruebas citoembriológicas, pero si los únicos que forman semillas viables son los sacos apomícticos la progenie será 100 % apomíctica en las pruebas de progenie pudiendo conducir a decisiones erróneas en la caracterización de los materiales. Por eso es necesario realizar los dos tipos de pruebas y compararlos. Esto también es importante para detectar desacoples entre la apomeiosis y la partenogénesis, es decir, plantas que experimentan apomeiosis pero no partenogénesis y viceversa.

Hipótesis

En pasto llorón, las vías moleculares relacionadas con la apomixis y sexualidad coexisten y su expresión puede verse afectada por condiciones ambientales que generan estrés genómico.

Objetivo

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de situaciones que provocan estreses genómicos como el cultivo *in vitro*, el ABA y la sequía sobre la expresión de la sexualidad en plantas apomícticas de pasto llorón.

Materiales y métodos

A) Tratamiento de estrés hídrico

A fin de determinar el efecto del estrés hídrico sobre el modo reproductivo, plantas adultas de los cvs. tetraploides apomícticos Tanganyika INTA, Tanganyika USDA y UNST1131 fueron expuestas a condiciones de estrés hídrico tres meses antes del inicio y hasta el final de la floración, con un riego semanal de 50-80 ml por maceta de 10 lts, con refuerzos periódicos en la época estival. Durante el periodo de floración se colectaron inflorescencias al comienzo del periodo de antesis a fin de establecer, a nivel citoembriológico, el efecto de este factor sobre el porcentaje de sacos embrionarios sexuales y apomícticos. Como control se utilizaron plantas del mismo cultivar y en el mismo estado de desarrollo que fueron mantenidas en condiciones óptimas de riego. También se colectaron semillas tanto de plantas control como del tratamiento para realizar pruebas de progenie con marcadores moleculares

Contenido relativo de agua (CRA)

A fin de determinar el estado hídrico de las plantas, se determinó el contenido relativo de agua (CRA) (Fritz, 1976). Para ello se colectaron tres muestras (réplicas técnicas) de hojas completamente expandidas de cada planta una vez cada quince días durante el periodo de floración y, tras las determinaciones del peso fresco, se hidrataron en tubos con agua destilada durante 3 hs a temperatura ambiente (aprox. 25 °C) en oscuridad a fin de determinar el peso turgente, que se registró después de secar suavemente la superficie de las hojas con papel absorbente. Luego, las hojas fueron secadas en estufa a 75 °C durante 72 hs y se volvieron a pesar para obtener el peso seco. El CRA se calculó utilizando la fórmula:

$$\text{CRA} = (\text{peso fresco} - \text{peso seco}) \times (\text{peso turgente} - \text{peso seco})^{-1} \times 100$$

B) Tratamiento con ácido abscísico (ABA)

Plantas adultas del cv. Tanganyika INTA, crecidas en condiciones óptimas de riego como se mencionara en el inciso A, fueron tratadas con aplicaciones foliares de ABA 10^{-4} M cada 48 hs desde tres meses antes del inicio y hasta el final del periodo de floración. Durante el periodo de floración se colectaron inflorescencias a comienzos del periodo de antesis. Como control se utilizaron plantas del mismo cultivar, en el mismo

estado de desarrollo, sin tratar y en condiciones óptimas de riego. A fin de determinar el estado hídrico de las plantas tratadas con ácido abscísico, se determinó el contenido relativo de agua del mismo modo que para las plantas del tratamiento de estrés hídrico y control.

Contenido endógeno de fitohormonas

Se realizó un análisis del contenido endógeno de fitohormonas sobre los materiales tetraploides sexuales (OTA (USDA)), tetraploides apomícticos (Tanganyika (USDA) y Tanganyika (INTA)) y diploides sexuales (Diplo Voigt, UNST1122 y D299919) para establecer posibles relaciones entre la concentración hormonal, la ploidía y el modo reproductivo en estos cultivares. Se colectaron hojas e inflorescencias en estadio de pre-antesis durante el mes de septiembre de 2012 en el intervalo de tiempo más breve posible (una semana) y a la misma hora cada día para evitar fluctuaciones propias de la variación hormonal en el tiempo. Las muestras se colectaron en nitrógeno líquido para evitar posibles procesos degradativos del material y se liofilizaron por 72 hs. Luego el material fue molido en morteros con nitrógeno líquido y almacenado a -80 °C para su posterior estudio.

La cuantificación del ácido abscísico (ABA), ácido jasmónico (JA) y ácido salicílico (SA) del tejido vegetal se realizó por el método modificado de Durgbanshi *et al.* (2005). Como estándares internos se adicionaron 50 ng de [²H₆]-ABA, [²H₆]-JA, y [²H₄]-SA. La separación cromatográfica se realizó con un HPLC Alliance 2695 (Waters, Inc., California, EEUU) equipado con una columna de fase reversa C18 (100 mm x 2,1 mm, 3- μ m), el cual se encuentra acoplado con un espectrómetro de masa con triple cuadrupolo (Quattro Ultima pt; Micromass, Manchester, Reino Unido), realizándose la ionización por electrospray (ESI).

La identificación y cuantificación se llevó a cabo por inyección de las muestras en modo MRM (Monitoreo de Reacciones Múltiples). La adquisición de datos por MRM se realizó por monitoreo de iones parentales y sus transiciones para ABA 263>153 y para su estándar interno 269>159, para JA, 209>59 y 215>59; y para SA, 137>93 y 141>97. El Software utilizado fue MassLynx TM v. 4.1, Micromass, Manchester, Reino Unido.

C) Cultivo *in vitro*

Como explanto se utilizaron inflorescencias y semillas provenientes de los cvs. apomícticos Tanganyika INTA ($2n=4x=40$) y Tanganyika USDA ($2n=4x=40$) creciendo en macetas de 10 lts. bajo condiciones estables de invernáculo.

El protocolo de inducción de callos y de regeneración de plantas utilizado fue informado por Echenique *et al.* (1996). Los explantos utilizados fueron inflorescencias inmaduras y semillas.

Medios de cultivo: Para la germinación de semillas se utilizó como medio básico el MS (Murashige y Skoog, 1962) sin suplementar. Para la inducción de callos se utilizó medio MS suplementado con 2 mg.l^{-1} de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), $0,01 \text{ mg.l}^{-1}$ de bencilaminopurina (BAP), 3 % (P/V) de sacarosa y 6 g.l^{-1} de agar como gelificante. Como medio de proliferación se utilizó MS suplementado con $1,5 \text{ mg.l}^{-1}$ de 2,4-D, 3 % (P/V) de sacarosa y 6 g.l^{-1} de agar como gelificante. Para la regeneración los callos se subcultivaron en medio MS suplementado con 3 % (P/V) de sacarosa y como gelificante 6 g.l^{-1} de agar. En todos los casos el pH fue ajustado a 5,8 antes de ser autoclavado por 20 min a 1 atmósfera.

I) Cultivo a partir de semillas: Semillas maduras del cv. Tanganyika INTA fueron esterilizadas superficialmente en etanol al 70 % (V/V) por 1 min, y posteriormente colocadas en lavandina comercial (8 % de cloro activo) con 2 gotas de Tween 20 por 20 min. Luego de ser enjuagadas tres veces con agua destilada estéril se dejaron en remojo durante 24 hs en agua estéril. Luego de una re-esterilización durante 20 min en lavandina comercial con 2 gotas de Tween 20, y tres enjuagues en agua destilada estéril, las mismas fueron colocadas en cajas de Petri de 100 x 15 mm (40 semillas/caja) con medio básico MS para inducir la germinación de las semillas. En el subcultivo siguiente, el epicotile emergente fue colocado en medio inductor obteniéndose masas callosas en las zonas de contacto con el medio de cultivo. A continuación los callos fueron transferidos al medio de proliferación y cultivados en oscuridad durante 15 días. Finalmente se colocaron bajo condiciones de luz normal ($66 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) en medio de regeneración con un fotoperiodo de 16 hs. Las plántulas se mantuvieron en este estadio por cinco y ocho meses con subcultivos y podas cada 15.

II) Cultivo de inflorescencias: Se tomaron las inflorescencias recién emergidas de la hoja bandera de plantas del cv. Tanganyika USDA creciendo en invernáculo. Las mismas fueron desinfectadas superficialmente sumergiéndolas durante 1 min en etanol al 70 % (V/V) seguido por 15 min en lavandina comercial (0,8 % de cloro activo) con dos gotas de Tween 20. Finalmente se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril. Segmentos de inflorescencias de 1 cm de longitud fueron cultivados en cajas de Petri de 100 x 15 mm, (5 explantos/caja) conteniendo 15 ml de medio de inducción durante cuatro semanas en oscuridad a 25 °C. A continuación los callos fueron transferidos al medio de proliferación manteniendo los explantos en estadio de callo por cinco y ocho meses con subcultivos cada 15 días. Finalmente se colocaron bajo condiciones de luz normal ($66 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) en medio de regeneración con un fotoperiodo de 16 hs para la obtención de plántulas.

III) Cultivo en medios selectivos: Semillas maduras del cv. Tanganyika INTA fueron esterilizadas superficialmente como se indicó en el tratamiento anterior. Una vez esterilizadas, el embrión fue dañado para fomentar la producción de callos y las semillas fueron inoculadas con *Agrobacterium tumefaciens*, cepa AGL1, que contiene el plásmido pPZP201BUGI con el gen de selección *bar*. El gen *bar* confiere resistencia al herbicida fosfinotricina. Previo a la inoculación se realizó un co-cultivo de dos días con 400 μM de acetosiringona a fin de incrementar la virulencia de la cepa. Las semillas fueron colocadas en cajas de Petri de 100 x 15 mm, (40 semillas/caja) con medio inductor de callos por dos días y luego se transfirieron a placas con el mismo medio de cultivo con el agregado de 160 mg.l^{-1} de timentina como agente bacteriostático. Luego de 30 días los callos se transfirieron a placas con medio de regeneración para inducir la formación de plántulas por el periodo de un mes. Las plántulas obtenidas pasaron por tres subcultivos de 30 días cada uno en un medio selectivo que contenía $2,5 \text{ mg.l}^{-1}$ de fosfinotricina, como agente selectivo, en el primer subcultivo selectivo y $3,5 \text{ mg.l}^{-1}$ en los dos posteriores. El material vegetal analizado en este ensayo en particular fue obtenido por la Ing. Agr. Claudia Terenti y forma parte de su proyecto de tesis doctoral, en desarrollo.

En todos los casos, las plántulas regeneradas se trasplantaron utilizando vasos plásticos de 250 ml con mezcla orgánica (Grow Mix-profesional; Terrafertil S.A., Moreno, Argentina). Durante los primeros 15 días posteriores al trasplante se colocó una cubierta

transparente sobre las plantas a fin de evitar la deshidratación. Las mismas fueron mantenidas en cuarto de cultivo durante un mes y posteriormente fueron trasladadas al invernadero y trasplantadas a macetas de 5 lts. Durante el periodo de floración se colectaron inflorescencias en estadio de antesis temprana. Como control se utilizaron plantas del mismo cultivar y en el mismo estado de desarrollo, sin tratar y creciendo en condiciones óptimas en el invernáculo.

Estudios citoembriológicos

Espiguillas de todos los tratamientos fueron fijadas en FAA, incluidas y seccionadas para su observación al microscopio como se indica en el Capítulo I.

Pruebas de progenie

Para corroborar por medio de marcadores moleculares los datos de los análisis citoembriológicos se seleccionaron panojas de cada tratamiento para realizar una prueba de progenie. 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 de almacenadas, las semillas se sembraron en almácigos con tierra estéril y luego de un mes las plantas se trasplantaron a macetas individuales. Se extrajo ADN de 40 progenies de cada planta control y tratada.

Extracción de ADN

Debido al volumen de muestras, se utilizó un protocolo de extracción rápida a partir de material fresco (Zappacosta *et al.*, 2011). El ADN genómico se extrajo utilizando la siguiente 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. 100 mg) de plantas de aprox. tres meses de edad. Se cortaron hojas en pequeñas porciones y se colocaron en un mortero con nitrógeno líquido y se homogeneizaron. El producto obtenido se transfirió a un tubo Eppendorf de 1,5 ml con 700 μ l de solución tamponada de extracción y se incubó durante 20 min a 65 °C con agitación lenta (estufa con agitador vertical). Posteriormente se agregaron 200 μ l de 5 M acetato de potasio 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 con alcohol absoluto. Luego el pellet se secó a estufa a 37 °C o en flujo laminar durante aproximadamente 30 min y se resuspendió en 100 µl de solución TE 1X.

La concentración y calidad de ADN se determinó en un espectrofotómetro Merk (Spectroquant Pharo 300, Alemania) con las lecturas de absorbancia a 260 y 280 nm. Para determinar la calidad de ADN se utilizó la relación A260/A280 y se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 1,5 %. La concentración de ADN se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$[\text{ADN}] (\mu\text{g/ml}) = A \times D \times C$$

Donde A es la lectura de absorbancia obtenida a 260 nm, D es el factor de dilución (generalmente 1:100) y C es una constante, con un valor de 50 µg/ml, igual a la concentración de ADN doble cadena que genera un valor de absorbancia de 1.

Marcadores RAPDs.

A fin de establecer el modo reproductivo de las plantas (grado de expresión de la apomixis / sexualidad) se analizaron progenies de tres plantas control y tres plantas del cv. Tanganyika INTA sometidas a estrés por déficit hídrico. Se analizaron de 40 a 43 progenies por plantas (245 individuos en total). Se utilizaron cuatro cebadores RAPDs en cada población de plantas analizada (Tabla 2.1). Las amplificaciones se llevaron a cabo en un volumen total de 25 µl, conteniendo 20 ng de ADN, 200 ng de primer, 2 unidades de Taq polimerasa (InVitroGen, Brasil), 62,5 mM de Cl₂Mg, 0,2 mM de cada uno de los dNTPs y 0,25 µl de BSA 100X y 2,5 µl buffer 10X. Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador Biorad (MyCycler, Estados Unidos), utilizando un programa que consistió en 6 min desnaturalización inicial a 94 °C, seguido de 40 ciclos de 15 s a 94 °C, 45 s a 36 °C y 1 min a 72 °C; además de un paso final de extensión de 6 min a 72 °C. Para chequear la amplificación, los productos de amplificación se

separaron mediante electroforesis en gel de agarosa 2 % y se tiñó con SyberSafe. Las bandas se visualizaron en un transiluminador de luz azul y se registraron con cámara digital. Para una mayor precisión del registro de las bandas la electroforesis se realizó en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 6 %. Se sembraron 7 µl del producto de cada amplificación y se corrió a una potencia de 40 W durante 30 min más 70 min a 50 W. Se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb (100 bp DNA Genbiotech, Brasil). Las bandas fueron visualizadas por tinción con nitrato de plata y escaneadas. El modo reproductivo por el que fueron generada cada individuo de la progenie (sexualidad o apomixis) fue determinado comparando los patrones de bandas amplificadas por la madre y cada una de sus progenies. Se consideró de origen sexual a los individuos que mostraron bandas polimórficas (diferentes) con respecto a la madre, y de origen apomíctico cuando la totalidad de las bandas amplificadas por la madre fueron compartidas por el hijo.

Tabla 2.1: Secuencias de los cebadores RAPD utilizados en las prueba de progenie.

Cebador	Secuencia
232	CGG TGA CAT C
245	CGC GTG CCA G
304	AGT CCT CGC C
331	CTA GAG GCC G

Análisis estadístico

A partir de los datos obtenidos, se realizaron análisis estadísticos. Se evaluaron las diferencias entre la medias entre controles y tratamientos mediante el Test t de Student para muestras independientes en la mayoría de los tratamientos y apareadas planta a planta en el caso del tratamiento de rehidratación.

Resultados y discusión

Estudios citoembriológicos en plantas en situaciones de estrés

En las secciones de inflorescencias teñidas con safranina-fast green se observaron todos los estadios de desarrollo del saco embrionario previamente descritos en el Capítulo I, los cuales fueron agrupados por modo reproductivo en apomícticos o sexuales (Apo y Sex respectivamente)

A) Tratamiento de estrés hídrico

En la Figura 2.3 se muestran plantas de ambos tratamientos (control y estrés hídrico) apreciándose el menor tamaño y grado de desarrollo y el enrollamiento foliar en la planta sometida a condiciones de sequia. También se aprecia que en esta condición el tamaño de las espiguillas y el número de antecios por espiguilla en las plantas bajo estrés fueron menores que en el correspondiente control.

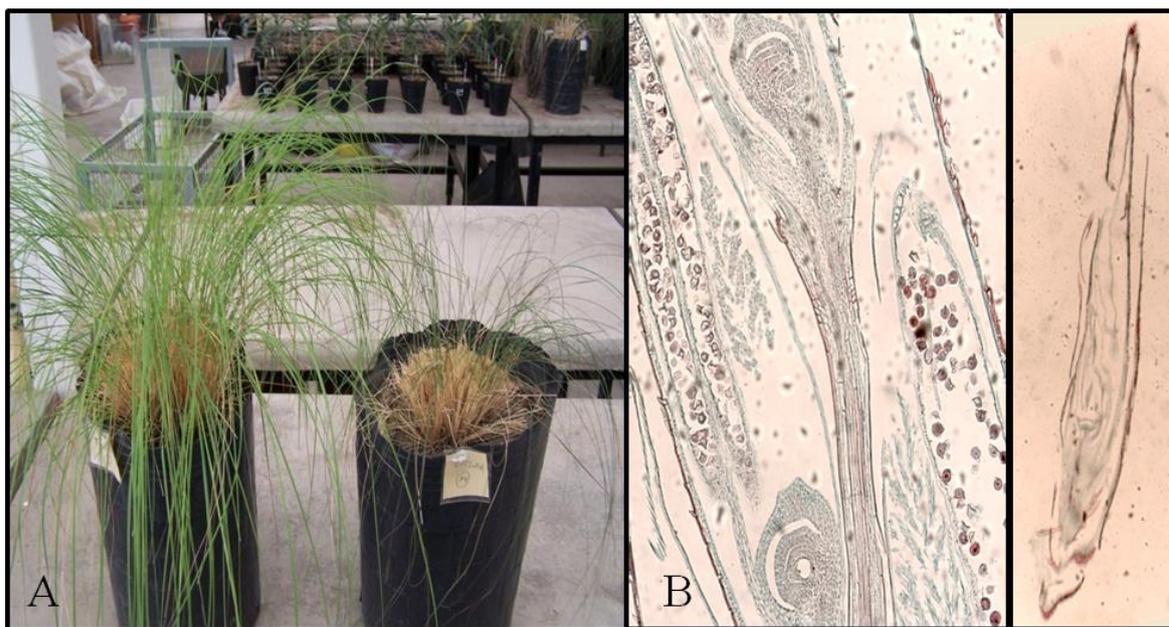


Figura 2.3: (A) Planta control (izq.) y sometida a estrés hídrico (der.) días previos a la etapa de floración y (B) corte histológico de espiguillas control (izq.) y bajo tratamiento (der.).

En la Tabla 2.2 se presentan los datos obtenidos de la evaluación de pistilos provenientes de plantas del cv. Tanganyika INTA, controles y sometidas a estrés hídrico. Las plantas control, con un CRA promedio del 89 % (Tabla 2.2), mostraron en el análisis citoembriológico 1,8 % de sacos provenientes de procesos sexuales, no encontrándose diferencias significativas con los valores obtenidos en el Capítulo I en los

ensayos de control de estabilidad del carácter a lo largo del periodo de floración. Esto refuerza los resultados presentados en el Capítulo I y demuestra la presencia de una sexualidad residual estable en este cultivar.

Tabla 2.2: Efecto del estrés hídrico sobre la expresión de la apomixis/sexualidad en plantas de *E. curvula* cv. Tanganyika INTA. CRA: contenido relativo de agua, Apo: pistilos observados con la tinción de safranina-fast green que presentaron procesos apomícticos típicos, Sex: pistilos con procesos sexuales típicos.

Tanganyika INTA #	CRA %	Número de pistilos analizados	Número de pistilos		Porcentaje	
			Apo	Sex	Apo	Sex
C 04	90	94	94	0	100,0%	0,0%
C 06	87	107	104	3	97,2%	2,8%
C 20	93	77	75	2	97,4%	2,6%
C 23	85	120	118	2	98,3%	1,7%
Total control		398	391	7	98,2%	1,8%
T 13	43	89	82	7	92,1%	7,9%
T 11	55	82	70	12	85,4%	14,6%
T 14	41	70	52	18	74,3%	25,7%
T 16	60	86	76	10	88,4%	11,6%
Total tratamiento		327	280	47	85,6%	14,4%

En las plantas del cv. Tanganyika INTA bajo condiciones de estrés hídrico (Tabla 2.2), donde el CRA promedio fue del 49,75 %, se observó un porcentaje de sacos sexuales del 14,4 %, lo cual fue significativamente diferente del control ($p \leq 0,05$). Esto indicaría que, en situaciones de estrés hídrico el nivel de sexualidad incrementa significativamente en plantas de pasto llorón.

Una particularidad de los pistilos observados en las plantas tratadas fue el elevado número de ovarios abortados que se detectaron en este tratamiento, donde se encontraron más de 40 procesos reproductivos interrumpidos, además de los 327 analizados. Basándonos en los tamaños relativos de los ovarios, los procesos abortados se observaron principalmente en estadios que corresponderían al de CMME en el caso de los eventos diplospóricos o megaspora funcional en el caso de los procesos sexuales. Esto indicaría que, ante los efectos del tratamiento, estas estructuras serían las primeras en detener su desarrollo, priorizando la planta la finalización de los estadios avanzados (sacos tetra u octonucleados) que podrían llegar a semilla frente a los estadios muy

tempranos (arquesporas) los cuales podrían quedar en un estado estacionario hasta la cesación del estrés.

A diferencia de lo ocurrido con el cv. Tanganyika INTA, la observación de pistilos en las plantas control del cv. Tanganyika USDA (Tabla 2.3) con un CRA promedio del 83 % no permitió detectar la presencia de sacos sexuales, observándose, en la totalidad de los casos analizados, pistilos con procesos apomícticos. En las plantas tratadas, con un CRA promedio del 49,75 %, la observación de 360 espiguillas redundó en solo 126 ovarios completos que solo presentaron procesos apomícticos. En la mayoría de las espiguillas observadas, solo el antecio basal presentaba evidencias de un desarrollo normal, mostrando, en el resto de las espiguillas, procesos generales de abortos o inexistencia de estructuras florales. La ausencia de procesos sexuales en condiciones de estrés tan intenso podría deberse a que este cultivar es uno de los pocos casos de apomixis obligada o que la sexualidad residual es tan pequeña que no alcanza a detectarse.

Tabla 2.3: Efecto del estrés hídrico sobre la expresión de la apomixis/sexualidad en plantas de *E. curvula* cv. Tanganyika USDA. CRA: contenido relativo de agua, Apo: pistilos observados con la tinción de safranina-fast green que presentan procesos apomícticos típicos, Sex: pistilos con procesos sexuales típicos.

Tanganyika USDA #	CRA %	Número de pistilos analizados	Número de pistilos		Porcentaje	
			Apo	Sex	Apo	Sex
C 01	90	112	112	0	100%	0%
C 02	84	131	131	0	100%	0%
C 03	82	94	94	0	100%	0%
C 04	76	143	143	0	100%	0%
Total control		480	480	0	100%	0%
T 01	42	65	65	0	100,0%	0%
T 02	46	52	52	0	100,0%	0%
T 03	38	27	27	0	100,0%	0%
Total tratamiento		144	144	0	100,0%	0%

Con el objetivo de complementar los resultados obtenidos en el cv. Tanganyika INTA, se evaluó el efecto del estrés hídrico en el genotipo apomíctico facultativo UNST1131. Este material posee un porcentaje de sacos sexuales cercano al 10 %, como fuera descrito por Meier *et al.* (2011). En la Tabla 2.4 se presentan los datos obtenidos de la evaluación de pistilos provenientes de plantas control y sometidas a estrés hídrico de este genotipo. Las plantas control, con un CRA promedio del 87 %, mostraron una

sexualidad residual promedio del 10 % en el análisis citoembriológico. Estos resultados, coinciden con los encontrados anteriormente por Meier *et al.* (2011) quienes encuentran una expresión de procesos sexuales significativamente mayor que el cv. Tanganyika INTA en condiciones libres de estrés.

Tabla 2.4: Efecto del estrés hídrico sobre la expresión de la apomixis/sexualidad en plantas de *E. curvula* genotipo UNST1131. CRA: contenido relativo de agua, Apo: pistilos observados con la tinción de safranina-fast green que presentan procesos apomícticos típicos, Sex: pistilos con procesos sexuales típicos.

UNST1131 #	CRA %	Número de pistilos analizados	Número de pistilos		Porcentaje	
			Apo	Sex	Apo	Sex
C 05	87	58	55	3	94,8%	5,2%
C 14	90	59	51	8	86,4%	13,6%
C 15	80	59	50	9	84,7%	15,3%
C 18	92	57	53	4	93,0%	7,0%
Total control		233	209	24	89,7%	10,3%
T 08	46	100	70	30	70,0%	30,0%
T 09	53	103	96	7	93,2%	6,8%
T 12	48	100	81	19	0,0%	19,0%
Total tratamiento		303	247	56	81,5%	18,5%

En condiciones de estrés hídrico, las plantas del genotipo UNST1131 con un CRA promedio del 49 %, presentaron una expresión de procesos sexuales del 18,5 %. Si bien se registra un incremento en la expresión de la sexualidad con respecto a las plantas control, este no resultó ser estadísticamente significativo. Esto se debe principalmente a la gran variabilidad observada en las plantas de este genotipo, que mostró valores de procesos sexuales que iban del 6,8 al 30 % mostrando una gran inestabilidad del carácter, aún, cuando todas las plantas evaluadas fueron obtenidas por división de macollos a partir de una única planta. Cabe aclarar que este material, que fue obtenido por cultivo *in vitro* y duplicación cromosómica por tratamientos con colchicina, presenta un nivel basal de procesos sexuales mayor que el cv. Tanganyika INTA original, del cual deriva (10 % aprox.). Si bien es interesante mostrar los datos de esta línea particular, de aquí en más los análisis presentados corresponden a plantas del cv. Tanganyika, el cual demostró una mayor estabilidad de respuesta tanto en las plantas control como en las tratadas, permitiendo así, obtener un análisis más preciso del efecto que produce el estrés sobre la expresión de la sexualidad en plantas apomícticas.

Una vez finalizado el estudio del efecto del estrés hídrico sobre la expresión de la apomixis en plantas del cv. Tanganyika INTA, las plantas fueron mantenidas en condiciones de estado hídrico óptimo desde tres meses antes y durante todo el periodo de floración. A fin de evaluar el comportamiento del carácter una vez cesado el efecto del tratamiento se colectaron inflorescencias y se analizaron como en los casos anteriores. Los resultados obtenidos del análisis citoembriológico se detallan en la Tabla 2.5.

Tabla 2.5: Efecto de la rehidratación sobre el número de sacos embrionarios apomícticos o sexuales en las plantas del cv. Tanganyika INTA que fueran sometidas a estrés hídrico. CRA: contenido relativo de agua, Apo: pistilos observados con la tinción de safranina-fast green que presentan procesos apomícticos típicos, Sex: pistilos con procesos sexuales típicos.

Tanganyika INTA #	CRA %	Número de pistilos analizados	Número de pistilos		Porcentaje	
			Apo	Sex	Apo	Sex
T 13	92	0	0	0		
T 11	87	106	100	6	94,3%	5,7%
T 14	90	117	109	8	93,2%	6,8%
T 16	88	118	114	4	96,6%	3,4%
Total tratamiento		341	323	18	94,7%	5,3%

Luego de un periodo de rehidratación de tres meses (Tabla 2.5), los valores de CRA promedio de las plantas tratadas resultaron similares a los de las plantas control (89 % de promedio). Sin embargo, los pistilos colectados en la temporada de floración siguiente mostraron una sexualidad residual del 5,3 %, indicando que los procesos sexuales disminuyeron significativamente ($p \leq 0,05$) luego de la rehidratación. No obstante ello, a pesar del tiempo transcurrido, no resultaron ser iguales a los valores de las plantas control, mostrando diferencias significativas con las mismas ($p \leq 0,05$). Es decir, que la rehidratación logró disminuir el efecto del tratamiento, pero se estableció un nuevo estándar de expresión de la sexualidad. Esta situación concuerda con el modelo de comportamiento anteriormente descrito en la explicación de la dinámica de los estreses (Figura 2.1) en la introducción de este capítulo.

Estos resultados indicarían que un déficit hídrico previo y durante la etapa de floración podría estar regulando la expresión de la sexualidad en genotipos apomícticos de pasto llorón. En concordancia con lo mencionado en el Capítulo I, el ambiente puede afectar el modo reproductivo, aumentando la sexualidad en algunos cultivares de *E. curvula*.

Resultados similares fueron encontrados en otras gramíneas. Estudios en buffelgrass (*C. ciliaris*) demostraron que la presencia de sales inorgánicas altera el desarrollo del saco embrionario en plantas tanto apomíticas como sexuales (Gounaris *et al.*, 1991). La adición de sales inorgánicas conduce a la formación de una mayor proporción de sacos embrionarios de tipo *Polygonum* (sexuales) en individuos apomíticos apospóricos. Estos autores concluyen que probablemente la escasez de agua a nivel celular, inducida por el aumento de sales, afecta el crecimiento celular y la diferenciación y, en última instancia, el desarrollo embrionario.

B) Tratamiento con ácido abscísico (ABA)

Dado que el ABA es una de las hormonas vegetales más afectadas por el estrés, incrementando los niveles de la misma en cantidades apreciables en condiciones de sequía (Jiang y Zhang, 2002) se planteó la hipótesis de un efecto de la misma en la expresión de la apomixis, o, que los efectos derivados a la sequia sobre la expresión de la apomixis podrían estar mediados por ABA.

El tratamiento con ABA sólo se realizó en plantas del cv. Tanganyika INTA normalmente regadas. El análisis citoembriológico no permitió detectar diferencias significativas en el número de sacos sexuales en relación con el control, manteniendo valores de sexualidad residual similares a los anteriormente descritos en los ensayos anteriores. Los resultados obtenidos del análisis citoembriológico se detallan en la Tabla 2.6.

Estos resultados concuerdan con los informados por Ma *et al.* (2004), quienes observaron que la aplicación foliar de una solución acuosa de de ABA 0,05 g.l⁻¹ a inflorescencias inmaduras de *Apluda mutica* no modifica significativamente la frecuencia de procesos apomíticos y sexuales.

Aunque la aspersión de ABA es un tratamiento típico en varios ensayos de fisiología vegetal (Morgan, 1980; Hussain *et al.*, 2013), algunos autores consideran que la vía de censado de esta hormona es mayormente a nivel radical (Ikeda *et al.*, 2002). En virtud de esto se planea realizar nuevos ensayos en condiciones de hidroponia incorporando la hormona a la solución.

Tabla 2.6. Pistilos de inflorescencias de diferentes plantas de *E. curvula* cv. Tanganyika INTA observados con la tinción de safranina-fast green para evaluar el efecto del ácido abscísico sobre la expresión de la apomixis. Las plantas fueron tratadas con aplicaciones de ABA 10^{-4} M cada 48 hs.

Tanganyika INTA #	CRA %	Número de pistilos analizados	Número de pistilos		Porcentaje	
			Apo	Sex	Apo	Sex
C 04	90	94	94	0	100,0%	0,0%
C 06	87	107	104	3	97,2%	2,8%
C 20	93	77	75	2	97,4%	2,6%
C 23	85	120	118	2	98,3%	1,7%
Total control		398	391	7	98,2%	1,8%
T 05	92	104	102	2	98,1%	1,9%
T 07	90	113	112	1	99,1%	0,9%
T 17	80	97	96	1	99,0%	1,0%
Total tratamiento		314	310	4	98,7%	1,3%

Contenido endógeno de fitohormonas

Los ensayos de contenido endógeno de fitohormonas realizados en hojas e inflorescencias de materiales tetraploides apomícticos Tanganyika (INTA) y Tanganyika (USDA), tetraploide sexual OTA (USDA) y diploides sexuales Diplo Voigt y UNST1122 (Tabla 2.7) mostraron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) en cuanto a la concentración de ABA en las diferentes partes de la planta, llegando a encontrarse en la inflorescencia valores cinco veces mayor a los obtenidos en la hoja de la misma planta.

Tabla 2.7: Contenido de ABA en hojas e inflorescencias de cultivares tetraploides (apomícticos y sexuales) y diploides de pasto llorón. Los valores de concentración son expresados en $\text{pmol} \cdot \text{gr}^{-1}$ de peso seco.

Cultivar	[ABA] hoja	(DE)	[ABA] panoja	(DE)
Tanganyika (INTA): 4X apo	243,4	48,4	1192,1	260,4
Tanganyika (USDA): 4X apo	204,6	141,6	1097,8	246,7
OTA (USDA) 4X sex	747,9	48,2	2418,7	247,7
Diplo Voigt: 2X sex	264,6	139,8	786,2	83,8
UNST1122: 2X sex	333,6	195,3	660,5	234,4

Los resultados obtenidos en cuanto a contenido de ácido jasmónico (JA) y ácido salicílico (SA) fueron erráticos y no presentaron tendencias claras por lo que los datos no son presentados en este trabajo.

Al comparar las concentraciones de ABA endógeno en relación a ploidía y modo reproductivo no fue posible establecer diferencias concretas ya que, como se trataba de un ensayo preliminar, solo se evaluó un individuo por cultivar. Sin embargo, este ensayo permitió apreciar algunas tendencias que podrían relacionar el modo reproductivo y la ploidía a la concentración de ABA. En primer lugar, estos resultados muestran una menor concentración de ABA en los materiales diploides en comparación con los tetraploides y dentro del grupo de tetraploides, los de reproducción sexual duplican la concentración de ABA tanto en hoja como en inflorescencia.

Con el objetivo de elucidar estos interrogantes, se decidió ampliar el estudio empleando una mayor cantidad de individuos por cultivar. Se realizaron nuevos análisis utilizando como material de muestreo solamente inflorescencias en estado de pre antesis ya que sería el momento de definición del modo reproductivo y por lo tanto el más indicado para relacionar los datos al modo reproductivo. El nuevo estudio se realizó sobre tres inflorescencias por planta de los materiales tetraploides sexuales OTA (USDA) (once plantas), tetraploides apomícticos Tanganyika (USDA) (ocho plantas) y diploides sexuales D299919 (cuatro plantas). Los valores de concentración de ABA endógenos obtenidos se detallan en la Figura 2.4.

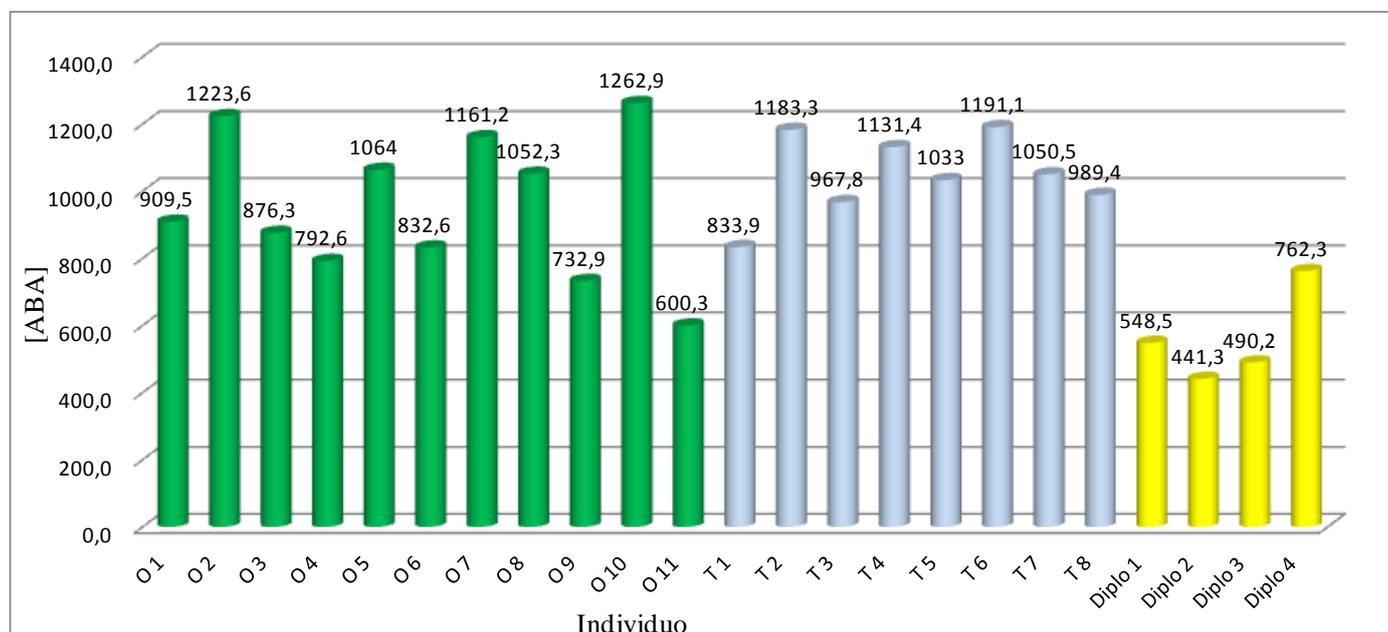


Figura 2.4. Contenido de ABA endógeno de inflorescencias del cultivar tetraploide sexual OTA (USDA), tetraploide apomíctico Tanganyika (USDA) y diploide sexual D299919. Los valores promedio de contenido de ABA endógeno fueron expresados en pmol.gr^{-1} de peso seco.

El análisis de este nuevo ensayo permitió resolver los interrogantes surgidos durante el ensayo preliminar. Se observaron diferencias altamente significativas ($p \leq 0,01$) en la concentración de ABA entre los materiales diploides y tetraploides, tanto en su conjunto como por separado (tetraploide - diploide; OTA (USDA) - diploide y Tanganyika (USDA) - diploide). En cuanto a la comparación entre materiales tetraploides (OTA (USDA) - Tanganyika (USDA)) no se encontraron diferencias estadísticas, por lo que, una relación entre la concentración de ABA y el modo reproductivo no pudo ser demostrada. Sin embargo, en los cultivares sexuales se observó una mayor variación en los valores de concentración que en el cultivar apomíctico. Este efecto posiblemente se deba a la variación propia de los organismos de reproducción sexual.

Estos resultados difieren parcialmente con los reportados por Gerashchenkov *et al.* (2007), quienes intentaron demostrar la presencia de diferencias en los niveles de fitohormonas endógenas (ABA, ácido indol-3-acético (IAA) y citoquininas) en accesiones de *Boechea* con reproducción apomíctica y sexual y distintos niveles de ploidía. Estos autores realizaron estudios sobre siete formas del complejo apomíctico de *B. holboellii* con ejemplares diploides y triploides y tres formas de *B. stricta* diploides de reproducción sexual. Para ello tomaron muestras simultáneamente en hojas superiores e inflorescencias. A diferencia de los resultados obtenidos en *E. curvula*, los estudios en *Boechea* no revelaron la existencia de una relación entre el contenido de estas fitohormonas y el nivel de ploidía de los genotipos investigados. Sin embargo, los resultados obtenidos en *E. curvula*, coinciden con la falta de relación entre el nivel de las hormonas endógenas y el tipo de modo de reproductivo informado por estos autores.

La falta de correlación entre el contenido endógeno de ABA y el modo reproductivo no estaría indicando necesariamente la falta de un rol de esta hormona en la determinación del carácter. Estudios realizados sobre la dormición de semillas demostraron que, los efectos no solo pueden deberse a diferencias en el contenido endógeno de la hormona, sino en la sensibilidad del genotipo a la misma. Este trabajo fue realizado sobre dos líneas de sorgo granífero que presentan respuestas contrastantes al brotado pre-cosecha, mostrando que el contenido de ABA de los embriones, medido durante la incubación de los granos, no está relacionado con su nivel de dormición (Gualano *et al.*, 2007; Rodríguez *et al.*, 2009). Sin embargo, si bien las concentraciones endógenas no diferían, cambios en la sensibilidad de los embriones al ABA sí se correlacionaron con el patrón

de salida de la dormición de granos enteros durante el desarrollo, y con la diferente respuesta entre ambas líneas (Steinbach y col 1995; Gualano *et al.*, 2007). Este tipo de comportamiento también podría estar regulando la relación de procesos apomícticos-sexuales en los materiales facultativos.

Ya que en *E. curvula* se cuenta con información de secuencias del transcriptoma de inflorescencias de materiales sexuales y apomícticos (OTA (USDA) (sexual) y Tanganyika (USDA) (apomíctico)) se realizó una búsqueda en estas bibliotecas de los genes que participan en la percepción diferencial del ABA en diferentes líneas de sorgo granífero citados por Rodríguez *et al.* (2009). A su vez se evaluó la expresión diferencial de estos genes en los cultivares sexual y apomíctico con el objetivo de evaluar respuestas similares a las encontradas en sorgo. Los genes citados y sus valores de expresión diferencial se detallan en la Tabla 2.8.

Tabla 2.8: Genes de proteínas receptoras y de la vía de transmisión de señales de ABA y su expresión diferencial en materiales sexual y apomíctico de pasto llorón. Para este análisis del valor P se utilizó un paquete R EdgeR.

Gen	Isotig	N° de lecturas en OTA	N° de lecturas en Tanganyika (USDA)	Valor P
ABI4	44424	3	5	0.507910
ABI5	26784	20	17	0.999999
PKABA1	37941	38	23	0.367014

No se encontraron diferencias significativas entre los valores de expresión de estos genes en las bibliotecas de cDNA de pasto llorón. La ausencia de diferencias en la expresión de estos transcritos no invalida el posible rol de esta hormona sobre la expresión del modo reproductivo por medio de otras vías relacionadas.

C) Cultivo *in vitro***I) Cultivo a partir de semillas:**

En la Figura 2.5 se observa el proceso de inducción de callos y regeneración de plantas utilizando semillas como explanto. Se realizaron dos tratamientos, manteniendo las plántulas en cultivo *in vitro* durante cinco y ocho meses.

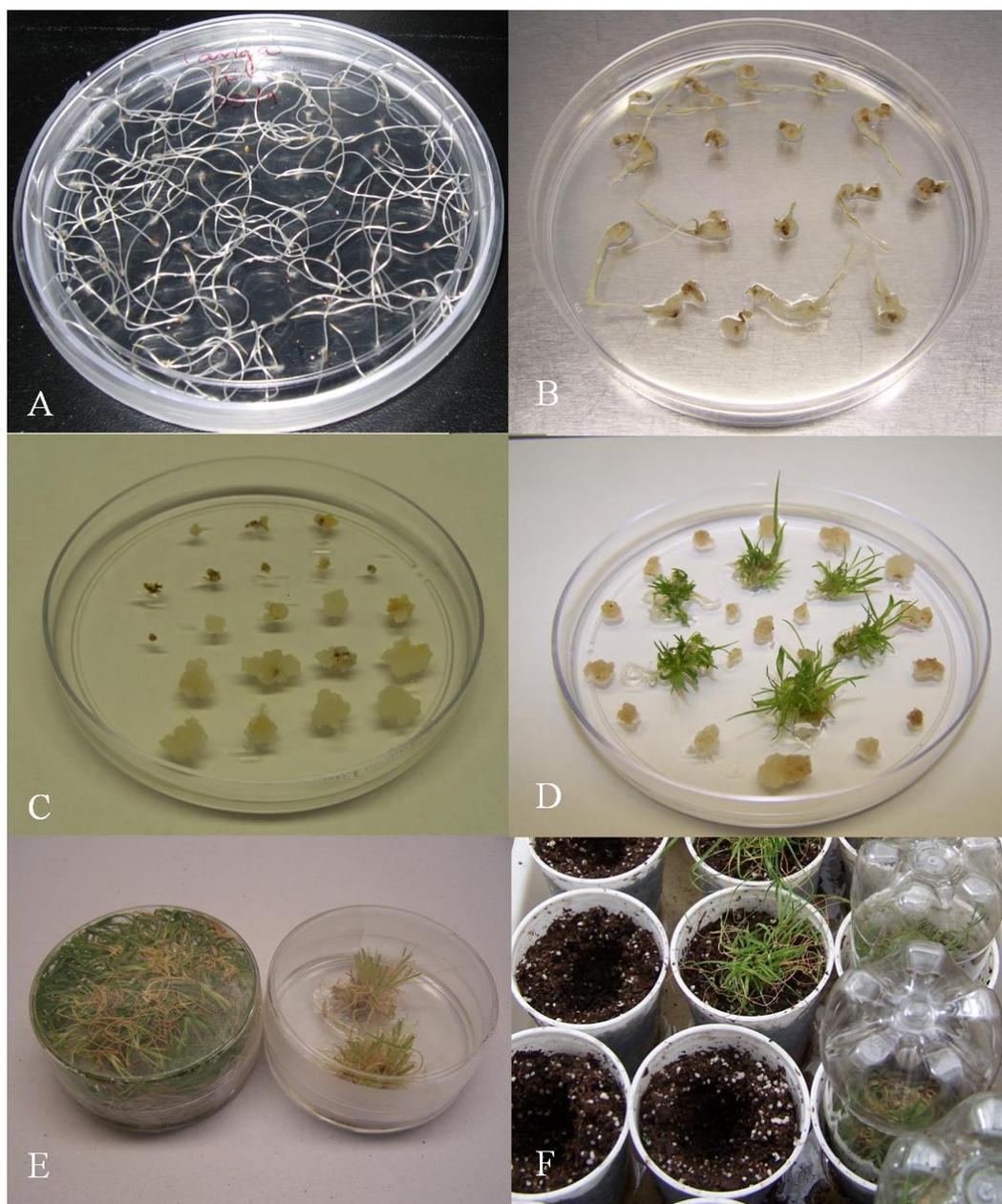


Figura 2.5: Inducción de callos a partir de semillas y regeneración de plantas de *E. curvula* cv. Tanganyika INTA. A) Semillas germinando en medio MS, B) Inducción de callos a partir del epicotile, C) Crecimiento de los callos en medio de proliferación, D) Callos regenerantes en medio MS, E) Poda periódica de los tratamientos de cinco y ocho meses en estadio de planta y F) Rusticación de las plantas en invernadero.

De los tratamientos en cultivo *in vitro* utilizando semillas del cv. Tanganyika INTA como explanto y mantenimiento de plántulas durante cinco y ocho meses en cultivo se obtuvo un gran número de plantas que, al alcanzar el estado adulto no florecieron luego de dos temporadas en el invernáculo. Posiblemente, el largo periodo en cultivo *in vitro* puede haber inhibido la floración. Se han observado mutaciones durante el cultivo *in vitro* que podrían ser responsables de este efecto (Wang *et al.*, 2013). Sin embargo, este efecto contrasta con el comportamiento encontrado por Polci (2000), quien observó que plantas regeneradas por cultivo *in vitro* mostraron una floración muy temprana. De cualquier manera, ambos resultados muestran que el tratamiento *in vitro* altera el normal desarrollo reproductivo en esta especie. Si bien no se pudieron utilizar para estudios citoembriológicos, las plantas no fueron descartadas y se colectó material vegetal para estudios de metilación del ADN utilizando la técnica de Amplificación de Polimorfismos Sensibles a Metilación (MSAP).

II) Cultivo de inflorescencias:

En la Figura 2.6 se observa el proceso de inducción de callos y regeneración de plántulas utilizando inflorescencias inmaduras como explanto. Se realizaron dos tratamientos, manteniendo el estadio de callo en cultivo *in vitro* durante cinco y ocho meses para inducir estrés.

Solo se observó la regeneración de plantas a partir de callos mantenidos en cultivo durante cinco meses en plantas del cv. Tanganyika USDA. El tratamiento de ocho meses no permitió la regeneración de plantas, perdiendo en este periodo la capacidad de morfogénesis. Este efecto pudo deberse a la pérdida de totipotencia que suelen experimentar los callos en períodos prolongados de cultivo debido a la acumulación de mutaciones y a la alteración de los genes que son responsables de la regeneración.

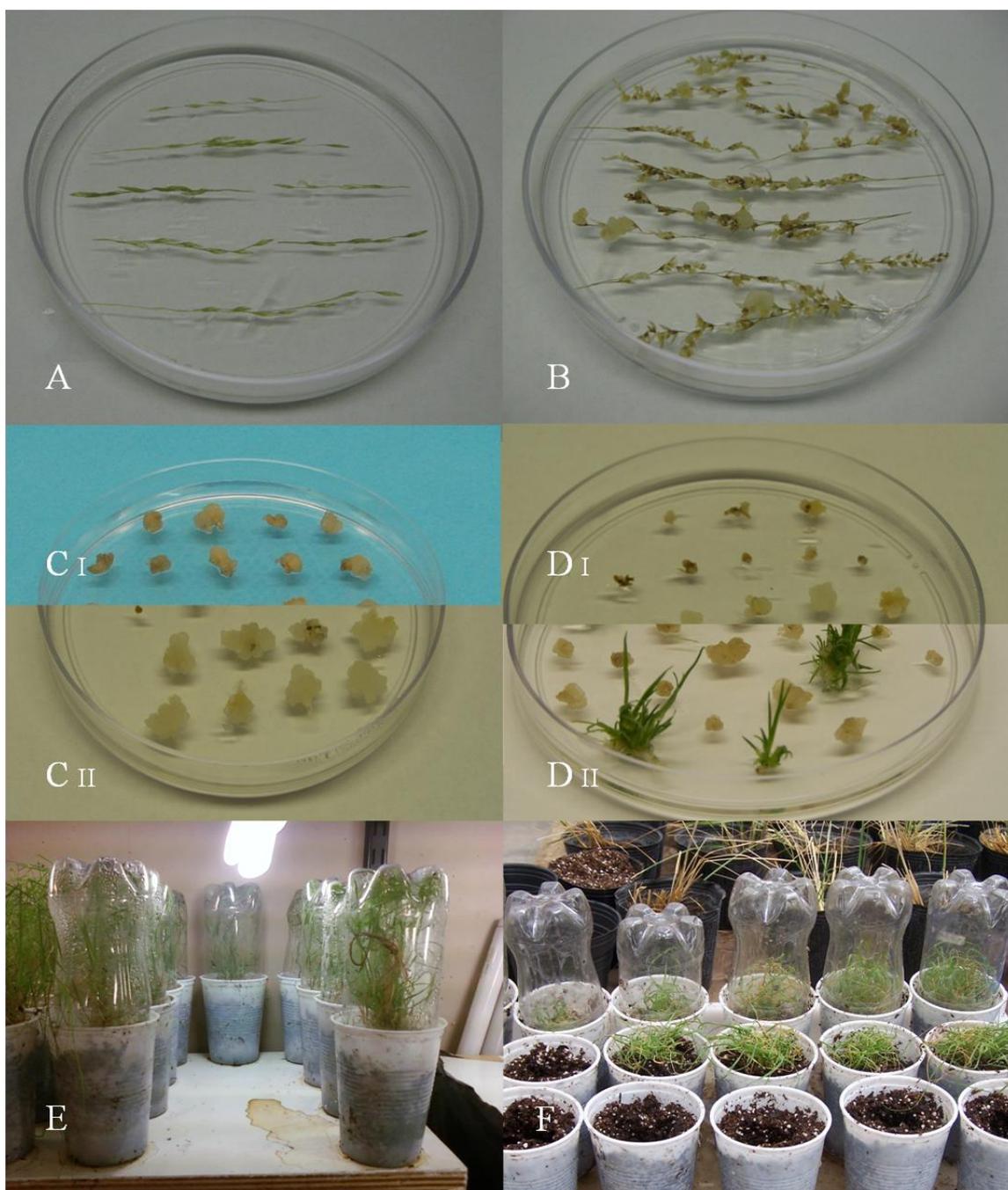


Figura 2.6: Inducción de callos a partir de inflorescencias y regeneración de plantas de *E. curvula* cv. Tanganyika USDA. A) Inflorescencias inmaduras en medio de inducción de callos, B) Proliferación de callos, C) Callos de ocho (I) y cinco (II) meses en medio de proliferación, D) Regeneración de callos luego de ocho (I) y cinco meses (II) de cultivo *in vitro*, E) Rusticación de las plantas en cámara de cultivo y F) Rusticación de las plantas en el invernáculo.

En la Tabla 2.9 se detalla el análisis citoembriológico de inflorescencias de las plantas regeneradas a partir de callos de cinco meses del cv. Tanganyika USDA.

Tabla 2.9: Efecto del cultivo *in vitro* sobre la expresión de la apomixis en diferentes plantas de *E. curvula* cv. Tanganyika (USDA) obtenidas a partir de inflorescencias inmaduras. Apo: pistilos observados con la tinción de safranina-fast green que presentan procesos apomícticos típicos, Sex: pistilos con procesos sexuales típicos.

Tanganyika USDA #	Número de pistilos analizados	Número de pistilos		Porcentaje	
		Apo	Sex	Apo	Sex
C 01	112	112	0	100,0%	0,0%
C 02	131	131	0	100,0%	0,0%
C 03	94	94	0	100,0%	0,0%
C 04	143	143	0	100,0%	0,0%
Total control	480	480	0	100,0%	0,0%
T 03	123	123	0	100,0%	0,0%
T 04	94	94	0	100,0%	0,0%
T 07	102	102	0	100,0%	0,0%
Total tratamiento	319	319	0	100,0%	0,0%

Las observaciones de procesos reproductivos realizadas en pistilos de plantas regeneradas a partir de callos con cinco meses de cultivo *in vitro* mostraron procesos diplospóricos en el total de los pistilos (Tabla 2.9), no encontrando diferencias con las plantas control. Estos resultados indican la ausencia de procesos sexuales en el cv. Tanganyika USDA y que el estrés no parece desreprimir la sexualidad en este material. La observación de más de mil pistilos en el material proveniente del USDA evidenció la ausencia total de procesos sexuales. Como conclusión, podemos decir que existen materiales apomícticos obligados y facultativos de pasto llorón y el cv. Tanganyika USDA sería un ejemplo de los primeros, mientras que el cv. Tanganyika INTA lo es de los segundos.

Si bien el cv. Tanganyika USDA no parece ser el indicado para este tipo de ensayos, donde una pequeña variación en el modo reproductivo sería muy difícil de detectar, nos muestra un material valioso para ensayos donde se necesite tener seguridad en el modo reproductivo que va a expresar la planta. Por este motivo, sería un excelente cultivar

para ser utilizado en ensayos de transformación genética o como parental masculino para la obtención de mapas de ligamiento para el carácter apomixis.

Si bien ambos materiales poseen el mismo nombre, Tanganyika, deben provenir de diferentes selecciones realizadas por investigadores de INTA y USDA.

III) Cultivo en medios selectivos:

De un total de 350 semillas heridas se obtuvieron 346 callos a partir de los cuales se lograron tres plantas luego de pasar por las etapas de selección (Figura 2.7).



Figura 2.7: Cultivo *in vitro* de plantas del cv. Tanganyika INTA en medio selectivo. A la izquierda se observa el individuo regenerante utilizado para estudios citoembriológicos, a la derecha, individuos que no superaron el medio selectivo.

Luego de ser transferidas a tierra, una de las plantas produjo una inflorescencia pequeña que se colectó y la mitad se destinó a realizar estudios citoembriológicos. Los resultados obtenidos se detallan en la Tabla 2.10.

Tabla 2.10: Efecto del cultivo *in vitro* (transformación con *A. tumefaciens*, inducción de callo, regeneración y cultivo en medio selectivo) sobre la expresión de la sexualidad en *E. curvula* cv. Tanganyika INTA. Apo: pistilos observados con la tinción de safranina-fast green que presentan procesos apomícticos típicos, Sex: pistilos con procesos sexuales típicos.

Tanganyika INTA #	Número de pistilos analizados	Número de pistilos		Porcentaje	
		Apo	Sex	Apo	Sex
T16	66	44	22	66,7%	33,3%

Si bien se trata de una única inflorescencia, este estudio mostró un notable incremento de los procesos sexuales en relación a los valores normales de plantas del cv. Tanganyika INTA (1,8 %). Estos resultados indican que, la combinación de cultivo de tejidos con la utilización de medios selectivos induce la expresión de la sexualidad, de manera semejante a lo observado en el caso de situaciones de estrés hídrico. Las heridas producidas en el embrión, la infección con *A. tumefaciens*, los periodos prolongados *in vitro* en estadio de callo y plántula y las altas concentraciones de herbicidas en los medios de selección generan niveles de estrés capaces de incrementar la expresión de sexualidad.

Pruebas de progenie con marcadores RAPDs en plantas sometidas a estrés hídrico.

El análisis de las progenies de tres plantas control del cv. Tanganyika INTA con marcadores RAPDs (Figura 2.8), no permitió detectar polimorfismos con ninguno de los cebadores utilizados. Esto estaría indicando la ausencia de procesos sexuales en el origen de estas plantas o la falta de poder resolutivo de la técnica.

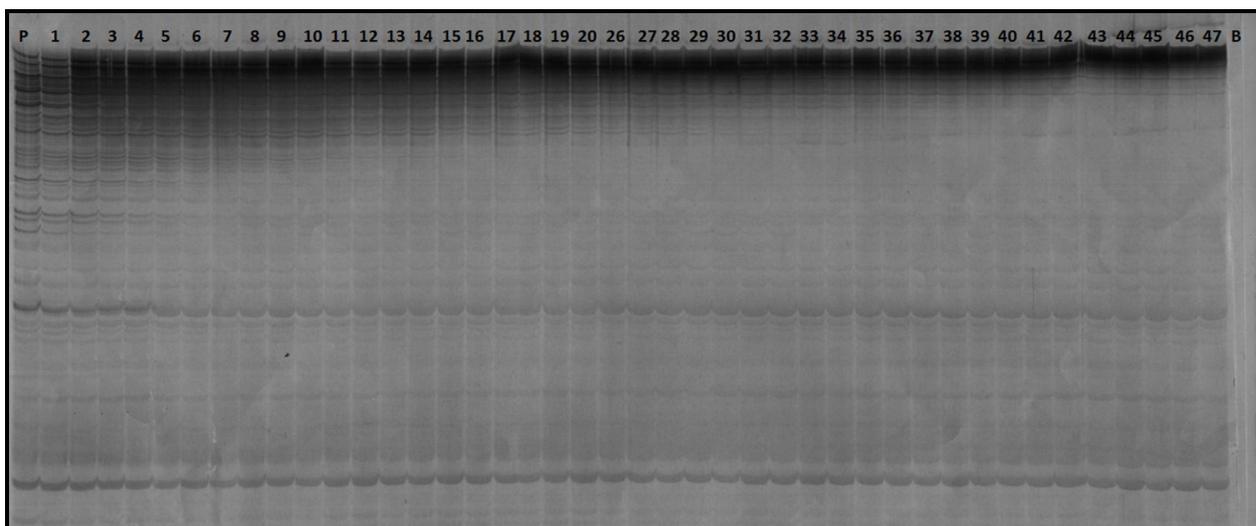


Figura 2.8: Patrones de amplificación de marcadores RAPDs en la progenie de la planta 6 (Control) del cv. Tanganyika INTA con el iniciador 245. Se muestran 43 individuos de la progenie de esta planta. P: planta madre, B: blanco.

Las pruebas de progenie realizadas en las plantas sometidas a estrés hídrico mostraron la presencia de polimorfismos, aunque en bajo nivel (Figura 2.9 y Tabla 2.11), indicando la presencia de procesos sexuales, aunque en una proporción menor a la esperada (entre aprox. 0 y 5 %) según lo observado en los estudios citoembriológicos (14,4 %). Solo en los individuos 14 y 16 (sometidos a sequía) se observaron procesos

sexuales (4,6 y 2,5% respectivamente), mientras que en el tercer individuo analizado (11) no se observaron procesos de este tipo. Esto estaría indicando que no todos los sacos embrionarios sexuales detectados por citoembriología dan lugar a plantas viables, ya sea por problemas relacionados con el desarrollo embrionario mismo o por problemas relacionados con la germinación de las semillas producto de estos procesos sexuales. También hay que tener en cuenta que estas plantas fueron sometidas a un estrés hídrico severo y la cantidad de semilla obtenida de ellas fue muy inferior a la obtenida en las plantas control.

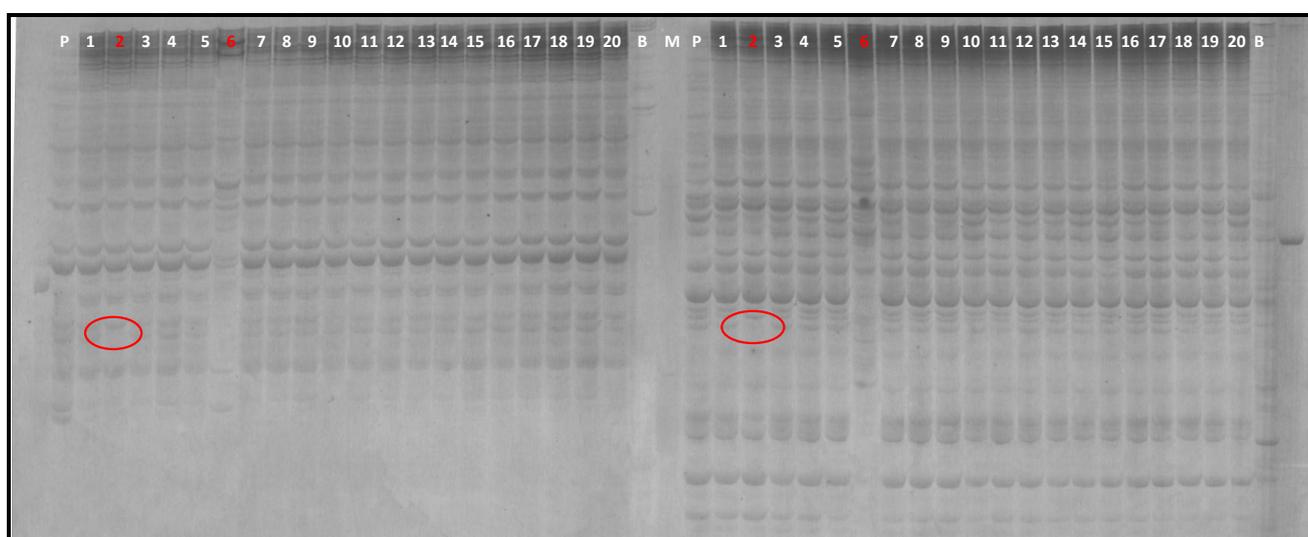


Figura 2.9: Patrones de amplificación de marcadores RAPDs en la progenie de la planta 14 (sometida a estrés hídrico) del cv. Tanganyika INTA con los cebadores 232 (izq.) y 245 (der.). Se muestran solo 20 de los 43 individuos de la progenie amplificados con cada cebador. En color rojo se muestran los marcadores polimórficos (origen sexual). P: planta madre, B: blanco.

Tabla 2.11: Nivel de polimorfismo de los individuos polimórficos.

	Descendiente #	Proporción de polimorfismos por iniciador				
		232	245	304	331	Total
Sequia 14	2	2/26	3/28	1/19	2/35	8/108
	6	10/26	11/28	5/19	4/35	30/108
Sequia 16	37	10/34	8/37	7/27	11/43	36/141

Como se desprende de la Tabla 2.11, los datos obtenidos en las pruebas de progenie difieren de aquellos obtenidos por citoembriología, indicando que no todos los procesos sexuales derivan en plantas viables. No obstante ello, los eventos sexuales, aunque están presentes en baja proporción son importantes para proporcionar diversidad genética a la

población. Houliston *et al.* (2006) trabajando con *Hieracium pilosella*, informaron que los eventos sexuales, que aunque constituyen sólo entre un 0,2 - 6 % de la progenie, son importantes en este sentido. Es posible que no todos los procesos sexuales observados en los tratamientos lleguen a formar semillas y se transformen en plantas adultas. Sin embargo, en una población donde la producción de semillas y nuevos individuos se produce a gran escala, este efecto podría tener consecuencias significativas en la variabilidad y evolución de la especie. Ambos resultados son igualmente válidos, los obtenidos por estudios citoembriológicos nos exponen el potencial que posee cada genotipo para expresar sexualidad ante una condición dada, mientras que los análisis de progenie revelan cuanto de ese potencial finalmente logra manifestarse. Estos resultados resaltan la importancia de la utilización de métodos citoembriológicos en este tipo de análisis, ya que sin ellos es más complicado y laborioso detectar el efecto del estrés sobre la expresión del carácter.

Situaciones similares fueron observadas en *Paspalum notatum* (Hojsgaard *et al.*, 2012; Rebozzio *et al.*, 2011), donde los estudios comparativos de ambas técnicas para determinar el modo reproductivo permitieron concluir que la sexualidad residual medida por pruebas de progenie era menor a la detectada por los estudios citoembriológicos. Hojsgaard *et al.* (2012) indican que el saco embrionario apospórico se desarrolla más rápido que el sexual, ya que evita la meiosis, y sugieren que ambos modos reproductivos son inestables en el comienzo del desarrollo y solo los apomícticos permanecen funcionales. De acuerdo a estos autores, el factor clave que determinaría la reducción en el número de progenie derivada de procesos sexuales sería el crecimiento más rápido de los embriones derivados de partenogénesis por la vía apospórica.

En plantas apospóricas, apomixis y sexualidad pueden coexistir en el mismo óvulo y pueden competir llevando en general a la reducción de la frecuencia de progenies sexuales a lo largo del desarrollo (Hojsgaard *et al.*, 2013). En plantas diplospóricas, la sexualidad residual es menos frecuente, ya que la misma arqueospora es la que toma una vía u otra (Hörandl y Hadacek, 2013) y en muchos casos requiere de la evaluación de un gran número de semillas para encontrar alguna generada por vía sexual (Aliyu *et al.*, 2010). En general, estos eventos sexuales ocasionales producen suficiente variabilidad genética en poblaciones naturales para responder a cambios ambientales

(Cosendai *et al.*, 2013; Hörandl y Paun, 2007; Lushai *et al.*, 2003; Paule *et al.*, 2011; Paun *et al.*, 2006).

Existen distintos modelos propuestos para estudiar el rol ecológico y evolutivo de la reproducción sexual. Uno de ellos, el modelo de recombinación asociada a aptitud (fitness-associated recombination) postula que un organismo invierte más en la reproducción sexual en ambientes donde no está bien adaptado y su aptitud para sobrevivir es baja (Hadany y Otto, 2009; Otto, 2009). El modelo toma en cuenta que muchos eucariotas sexualmente facultativos (principalmente algas y levaduras) muestran un mayor índice de reproducción sexual bajo condiciones de estrés (Schoustra *et al.*, 2010). Una visión similar es la que expresan Houliston *et al.* (2006), quienes opinan que esta inducción de la sexualidad por estrés se podría interpretar también en términos ecológicos y evolutivos. La existencia de estrategias reproductivas flexibles indica que ambas vías reproductivas son beneficiosas. El mantenimiento de la reproducción sexual, especialmente de una manera inducible, otorga la posibilidad de generar variación genética poblacional en condiciones en donde es más requerida, por ejemplo, bajo situaciones de estrés. Sin embargo, no todas las opiniones concuerdan en este modelo. Hörandl y Hadacek (2013) relacionan la inducción de la reproducción sexual a situaciones de estrés, e hipotetizan que la meiosis cumpliría fundamentalmente un rol reparador del ADN más que una función en la generación de variabilidad. Estos autores basan este concepto en el hecho de que la sequía, al igual que otros tipos de estrés abiótico, ocurre regularmente y periódicamente en la naturaleza, provocando un estrés oxidativo en los organismos que podría llevar a la acumulación de mutaciones. La única vía de reparación de esas mutaciones sería la utilización de mecanismos reparadores que utilicen ADN no homólogo y la meiosis es el mecanismo más eficiente en la reparación del ADN ya que utiliza un segundo cromosoma que ha sido expuesto a una historia de estreses diferente.

Se podría especular con que la presencia de una sexualidad residual podría estar actuando como una reserva interna para el desarrollo de nuevas variantes genéticas que se expresarían ante la ocurrencia de condiciones ambientales menos favorables. Lo anterior demuestra que éste carácter tiene expresividad variable y puede verse afectado por factores ambientales que generan estrés genómico, base fundamental para la continuidad de nuestro estudio.

Analizando los resultados expuestos, es evidente que en los cvs. Tanganyika USDA, Tanganyika INTA y UNS1131 existe una tendencia definida hacia la apomixis con diferentes grados de expresión de la sexualidad. En el cv. Tanganyika INTA, se ha demostrado una clara tendencia al aumento de expresión de sexualidad ante situaciones de estrés, la cual se acentúa a medida que el estrés es mayor. Sin embargo, este efecto no es tan marcado en otros genotipos como el cv. Tanganyika USDA y UNS1131.

Estas observaciones concuerdan con otros estudios realizados en otras plantas apomícticas (Savidan *et al.*, 2001; Hörandl y Paun, 2007 y Krahulcová *et al.*, 2013). Estos autores determinaron porcentajes de reproducción sexual que van desde valores muy bajos a casi la mitad de toda la progenie resultante. Otros autores (Albertini *et al.*, 2001; Matzk *et al.*, 2005) observaron variaciones considerables en el grado de la apomixis entre los diferentes genotipos dentro de una misma especie. Es por ello que muchos autores concuerdan en que la expresión real de la reproducción apomíctica puede ser modificada por el medio ambiente (Nogler 1984; Asker y Jerling 1992; Koltunow 1993; Richards 1997).

Todo esto evidencia que, además de los factores genéticos que estarían controlando el carácter, existe también un importante componente epigenético. Varios autores han informado que vías regulatorias dependientes de pequeños ARNs pueden inducir cambios cuali y cuantitativos en la expresión de genes que causan variaciones morfológicas, heterosis y versatilidad reproductiva, mecanismos que llevan finalmente a un incremento en el potencial adaptativo (Vielle Calzada *et al.*, 2012).

Dado el comportamiento dependiente del ambiente que se observó en el cv. Tanganyika INTA, podría especularse que sobre el carácter apomixis actúa un sistema de control epigenético. En numerosos casos se ha indicado el efecto que tiene la metilación del ADN (o desmetilación) en procesos como la fertilización, el desarrollo de semillas y la inducción de embriogénesis somática (Viejo *et al.*, 2010).

Otros autores han propuesto que, en sistemas naturales, la apomeiosis se debería a una des-regulación temporal o espacial de genes que controlan las vías sexuales más que un carácter independiente (Albertini *et al.*, 2004; Curtis y Grossniklaus, 2007; Grimanelli, 2012; Grimanelli *et al.*, 2001; Koltunow y Grossniklaus, 2003).

Estos datos, en conjunto con observaciones realizadas por nuestro grupo de trabajo (Cardone *et al.*, 2006; Mecchia *et al.*, 2007, Cervigni y col 2008 a y b; Selva *et al.*, 2012; Zappacosta *et al.*, 2011 y 2014), además de los trabajos previos de Voigt *et al.*, (1971, 1972, 1973, 1976, 1992, 2004) nos permiten generar un modelo hipotético de regulación de la apomixis en pasto llorón. En este modelo se sugiere la existencia de una región genética (Voigt y Burson, 1992), o más de una (Zappacosta *et al.*, 2011), condicionante del carácter; afectada por ploidía y sujeta a control epigenético. Esta región estaría presente en las plantas tetraploides apomícticas y, muy probablemente, en los diploides, solo que en estas últimas no se expresaría. Prueba de ello es el caso de la serie informada por Cardone *et al.* (2006), donde a partir de un tetraploide apomíctico se obtuvo un diploide sexual que por duplicación con colchicina generó un nuevo tetraploide apomíctico. Esto indicaría que a nivel diploide la región, si bien reprimida, también estaría presente. La existencia de un tetraploide sexual como (OTA (USDA) evidenciaría la ausencia de la región en esta planta.

Los resultados de otros autores (Ortiz *et al.*, 2013) indican que el apo-locus sería una región de baja recombinación y con gran abundancia de elementos repetitivos. Es sabido que existen mecanismos de control en las eucariotas destinados a mantener estos elementos en un estado silenciado. Es probable que dicha región contenga alguna redundancia génica con aquella condicionante de la sexualidad y se establezca una señal de silenciamiento a partir de la misma que silencie alguna vía relacionada con el desarrollo sexual. El estrés podría disturbar o interrumpir esta señal, permitiendo la expresión de la sexualidad, que luego del cese del estrés, restablecerá nuevamente la red de silenciamiento

Muchas pueden ser las bases moleculares que regulan el cambio de reproducción asexual a modo sexual bajo situaciones de estrés. En *Schizosaccharomyces pombe*, la base molecular de la regulación de este cambio ha sido estudiada y se ha observado que genes involucrados en la reproducción sexual 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 ARN de interferencia (ARNi) causa la liberación de la represión transcripcional de los genes adyacentes a los LTRs, permitiendo que la meiosis tenga lugar. Esto concuerda con nuestro modelo planteado

en el que la sexualidad se encuentra reprimida en condiciones normales y ante condiciones estresantes se desreprimiría.

La regulación de procesos dependientes del ambiente, como el control de la expresión del modo reproductivo, sería una regulación extremadamente compleja, que podría tener más de un nivel de regulación. Esta regulación podría incluir cambios permanentes en el genoma del individuo generados por sitios de mutación inducibles y/o movimientos de elementos transponibles cuyo grado de movilidad podría estar regulada por microARNs; o cambios temporales, más flexibles, como podría ser un control epigenético de los genes que se expresarán ante determinadas situaciones, el cual, a su vez, podría tener diferentes grados de regulación a niveles transcripcionales y post transcripcionales. Nuestro sistema modelo, al igual que otros sistemas, ofrece la oportunidad de investigar problemas de desarrollo relacionados a la versatilidad reproductiva que es común en muchas angiospermas, contribuyendo de esta manera a establecer los mecanismos que subyacen en la determinación de la variabilidad reproductiva, la evolución y la diversidad de las plantas. La elucidación de estos procesos, o de alguno de los posibles pasos involucrados, aportarían información fundamental para conocer el origen, funcionamiento y función de este sistema reproductivo dual.

CAPÍTULO III – “Efecto del estrés genómico producido por hibridación sobre la expresión de la apomixis.”

La inestabilidad híbrida como estrés genómico

El concepto de especie biológica propuesto por Dobzhansky (1937) y popularizado por Mayr (1942) considera que todas las especies han desarrollado mecanismos de aislamiento reproductivo altamente eficaces que permiten mantener la unidad genética de las mismas evitando introducir variación genética externa. Sin embargo, el cruzamiento entre grupos o taxones genéticamente diferenciados es un hecho comprobado. Actualmente existen evidencias que suponen que al menos un 25 % de las especies de plantas pueden estar involucradas en eventos de hibridación en la naturaleza (Mallet, 2005).

Los híbridos con frecuencia presentan inestabilidad genética producto de la interacción de los dos genomas parentales divergentes. Esta inestabilidad se expresa en los híbridos como incompatibilidades genéticas (Johnson, 2010) o disfunciones genéticas que pueden ser observadas a nivel fenotípico: variaciones, atrofia de gónadas (Rahman y Uehara, 2004) y cromosómico: reordenamientos cromosómicos, inversiones, poliploidías, etc. (Hegarty *et al.*, 2006; Hegarty *et al.*, 2009). A nivel genético y epigenético también se observan alteraciones como elevadas tasas de mutación, metilación del ADN y alteraciones de los patrones de expresión y regulación génica (Michalak y Noor, 2003; Salmon *et al.*, 2005).

En el caso de la hibridación en plantas, se ha observado que una de las principales causas de la inestabilidad del genoma de los híbridos es la poliploidía. Después de la hibridación, los híbridos poliploides sufren rearrreglos cromosómicos y restructuración de secuencias de ADN. Por ejemplo, en alotetraploides de *Brassica*, la comparación de los genomas desde la segunda hasta la quinta generación de híbridos demostró la pérdida o ganancia de segmentos de ADN de origen paterno y la aparición de nuevos segmentos, probablemente derivados de re-arreglos (Pires *et al.*, 2004). En otros casos, como por ejemplo en poliploides de *Arabidopsis* (Madlung *et al.*, 2005) y *Gossypium* (Zhao *et al.*, 1998) se ha observado el incremento de la expresión y/o transposición de secuencias repetitivas. En el género *Helianthus* se logró obtener linajes de híbridos fértiles después de tan solo cinco generaciones, demostrando que la reorganización del genoma en los híbridos puede ser muy rápida y, además, reproducible (Fontdevila, 2011).

La hibridación y la poliploidización representan dos procesos importantes en la evolución de la apomixis en las angiospermas. Sin embargo la contribución relativa de ambos procesos no está claramente definida. Erns (1918) sostenía que todos los apomícticos son de origen híbrido y Stebbins (1941) agregó que la gran mayoría de los apomícticos son probablemente aloploidos de origen híbrido. De la misma manera, Nogler (1984a) considera que la alopoliploidía es tan típica en la apomixis como el origen híbrido. Más recientemente, estos conceptos fueron enunciados como la “teoría de la hibridación” para explicar la aparición de la apomixis (Carman, 1997). Este autor postula que la hibridación de dos ecotipos con diferentes caracteres reproductivos puede contribuir a la inducción de la apomixis. Así, la expresión desincronizada de los dos sets de genes parentales que están involucrados en el desarrollo del saco embrionario y la embriogénesis pueden llevar a problemas en el inicio de estos procesos causando una desviación de la reproducción sexual a la apomixis. Resultados de estudios citogenéticos, análisis de comportamiento en cruzamientos, híbridos interespecíficos, análisis de segregación, y la inducción artificial de tetraploides apomícticos a partir de diploides sexuales en varias especies apoyan parcialmente esta teoría. Por ejemplo, trabajos realizados en *Boechnera holboellii* avalan el modelo de Carman (Sharbel *et al.*, 2009; Lovell *et al.*, 2013). Desde esta perspectiva, no habría *per se* un factor de la apomixis, en lugar de ello, la apomixis sería inducida por la perturbación en la expresión de genes requeridos para la reproducción sexual (Neiman *et al.*, 2014). Evidencias para esta teoría provienen de la heterosincronicidad en la formación de las células madres de la megaspora en *Tripsacum* (Grimanelli *et al.*, 2003) y en el patrón global de expresión en el desarrollo de óvulos de *Boechnera* (Sharbel *et al.*, 2010). Recientemente se ha confirmado el rol de la hibridación en la inducción de la asexualidad en *Daphnia pulex* (Tucker *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2013). Sin embargo, serían necesarios aún más estudios para confirmar estas correlaciones. Aunque es muy probable que la hibridación sea capaz de generar algunas nuevas líneas de reproducción asexual, la evidencia indica que el éxito en la generación de híbridos asexuales varía entre los distintos taxa y que sólo ciertas combinaciones de genomas son capaces de generar líneas exitosas de reproducción asexual (Moritz *et al.*, 1989; Simon *et al.*, 2003; Avise, 2008; Neaves y Baumann, 2011).

Carman (1997) también propuso que la apomixis podría surgir recurrentemente como resultado de “choques genómicos”, es decir, cambios a nivel epigenético en todo el

genoma luego de eventos tales como la poliploidización o hibridaciones interespecíficas. Si bien esto solo es una hipótesis que nunca fue completamente corroborada, se han realizado diferentes trabajos en los que se observan cambios en los patrones de expresión y fenotipos reproductivos en cruzas interespecíficas o después de la formación de aloploidos (Chen, 2010; Gaeta *et al.*, 2009). Por lo tanto, uno podría interpretar que la formación de híbridos interespecíficos podría resultar en un entorno epigenético permisivo para la aparición de rasgos apomícticos o variaciones atípicas en la expresión de genes relacionados con el modo reproductivo. Curiosamente, se ha propuesto que los pequeños ARNs producidos durante la hibridación interespecífica o poliploidización sirven como un amortiguador frente a los choques genómicos, contribuyendo a la estabilidad del genoma en los híbridos (Ha *et al.*, 2009).

Estudios realizados en el género *Paspalum* señalan que la poliploidía parece ser un prerrequisito para la expresión efectiva de la apomixis (Quarín y Hanna 1980; Quarín *et al.*, 2001), sin embargo no necesariamente está acompañada de hibridación. El apoyo a estas afirmaciones proviene de estudios citogenéticos en varias especies poliploides, de análisis de segregación llevados a cabo en especies tetraploides apomícticas y de la inducción de tetraploides apomícticos sintéticos. Estos estudios han revelado que una alta proporción de cromosomas forman asociaciones multivalentes en apomícticos, sugiriendo un origen autopoliploide (Norrman *et al.*, 1989; Hojsgaard *et al.*, 2008). Por otro lado, análisis genéticos han revelado herencia tetrasómica en tetraploides apomícticos, lo cual también es típico de autopoliploidía (Pupilli *et al.*, 1997; Stein *et al.*, 2004). Más aún, autotetraploides obtenidos por duplicación cromosómica de diploides sexuales se reproducen por apomixis (Quarín y Hanna 1980; Quarín *et al.*, 2001). Estos últimos estudios son solo ejemplos, entre muchos otros, que sostienen la hipótesis que la mayoría de las especies de *Paspalum* apomícticas se originaron por autopoliploidía a partir de genotipos sexuales.

Existen algunas especies de *Paspalum* para las cuales está documentado su origen híbrido, como en el caso de los citotipos tetraploides (biotipos postrados), pentaploides y hexaploides de *P. dilatatum* (Bennett y Bashaw 1966; Burson 1983, 1991). Sin embargo, la mayoría de las especies apomícticas de *Paspalum* pertenecen a un modelo caracterizado por taxas diploides-autopoliploides co-específicos.

Modelo de estrés híbrido

En 1992 Voigt y Burson proponen un modelo genético simple para la herencia de la apomixis en pasto llorón, donde la apomixis es dominante sobre la sexualidad y es controlada por un solo gen. Este 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. Este análisis 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.

Con estos antecedentes, nuestro equipo de trabajo intenta generar una población de mapeo de *E. curvula* a nivel tetraploide para estudiar la segregación del carácter y desarrollar un mapa genético de la especie basado en microsatélites y AFLPs donde posicionar la/s región/es determinantes de la apomixis (Meier, tesis doctoral en elaboración). Para obtener una población de este tipo debe utilizarse siempre un parental femenino completamente sexual y un donante de polen apomictico. Para ello se seleccionó el cv. OTA (USDA) como progenitor femenino de la población de mapeo. Esto se debe a que dicho material vegetal presenta reproducción exclusivamente sexual, sin indicios de apomixis (Meier, tesis doctoral en elaboración). Como donante de polen se seleccionó al cv. Tanganyika (USDA), de reproducción apomictica (Figura 3.1).

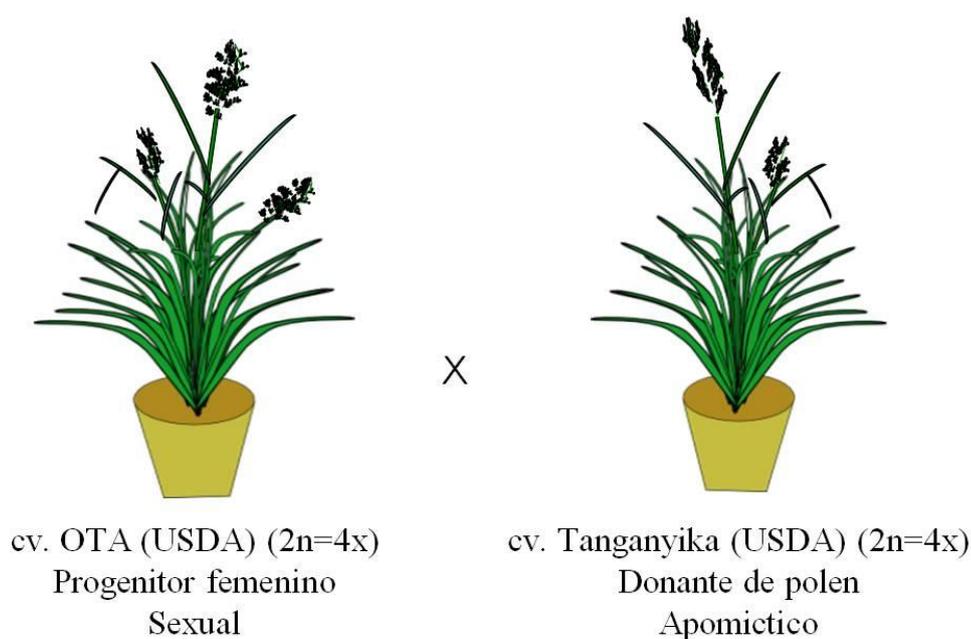


Figura 3.1: Esquema de la cruce controlada de genotipos contrastantes para el modo reproductivo para la obtención de una población de mapeo.

Esta cruce dio origen a un gran número de semillas de las cuales solo germinó un bajo porcentaje y, en general, las plantas obtenidas fueron débiles y poco vigorosas y murieron poco después de la germinación. Por otro lado, más del 50 % de las plántulas presentaron problemas de crecimiento, tanto de tallos como de raíz o se tornaron necróticas a los pocos días de germinar. Un gran número de las restantes se perdieron en el proceso de rusticación en el cuarto de cultivo o se tornaron débiles, de lento crecimiento y finalmente murieron (Meier, tesis doctoral en elaboración). De las plantas obtenidas y analizadas por marcadores moleculares, sólo se detectaron seis de naturaleza híbrida, es decir, que presentaban marcadores paternos. Las plantas restantes resultaron ser producto de la autofecundación del progenitor femenino, inducidas, probablemente, por un efecto mentor del polen donante el cual rompe las barreras esporofíticas de autoincompatibilidad.

Estos inconvenientes en la obtención de la progenie podrían deberse a problemas genéticos letales para el desarrollo del embrión, algo que se ha observado en otras especies como *Paspalum notatum* o problemas de incompatibilidad entre los parentales. El genotipo materno y el paterno corresponden a distintos tipos agronómicos de pasto llorón. El primero es un conferta y el segundo es de tipo curvula (Voigt 1971, Voigt y Bashaw 1972, Covas, 1991, Burson y Voigt 1996). Además, aunque ambos progenitores presentan el mismo nivel de ploidía, la distancia genética entre ambos grupos es significativa (Zappacosta *et al.*, 2011), por lo que la hibridación de estos genotipos podría ser una fuente de estrés capaz de alterar la expresión del modo reproductivo de la progenie.

Hipótesis

Las plantas híbridas obtenidas por cruzamientos entre progenitores sexuales y apomícticos de *E. curvula* presentan diferentes niveles de expresión del carácter, que tienden a incrementar con el tiempo.

Objetivo

Evaluar la expresión de la apomixis a través del tiempo en plantas obtenidas a partir de la cruce entre materiales tetraploides de pasto llorón contrastantes para el modo reproductivo.

Materiales y métodos

Material vegetal

Las plantas que se evalúan en este capítulo provienen de la labor experimental desarrollada en la tesis doctoral del Lic. Mauro Meier. Se trata de plantas híbridas provenientes de la cruce controlada entre el cv. tetraploide sexual OTA (USDA) como progenitor femenino y el cv. tetraploide apomíctico obligado Tanganyika (USDA). Las plantas fueron obtenidas en el año 2010 y se encuentran desde ese momento en macetas en el invernadero del CERZOS, CCT - Bahía Blanca bajo condiciones de fotoperiodo natural y temperatura controlada de 25 ± 3 °C bajo condiciones de polinización libre.

Estudios citoembriológicos

Espiguillas de cada híbrido fueron fijadas en FAA, incluidas y seccionadas para su observación al microscopio de la forma indicada en el Capítulo I. Estos estudios se repitieron por tres periodos de floración en tres años consecutivos.

Pruebas de progenie

Los datos obtenidos por estudios citoembriológicos se contrastaron con pruebas de progenie con marcadores RAPDs utilizando las mismas técnicas descriptas en el Capítulo II.

Se analizaron 37 individuos provenientes de un pool de semillas derivado de inflorescencias de las mismas plantas utilizadas para los estudios citoembriológicos. Se utilizaron tres cebadores RAPDs cuya secuencia se informa en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1: Secuencias de los cebadores RAPD utilizados en las prueba de progenie.

Cebador	Secuencia
232	CGG TGA CAT C
245	CGC GTG CCA G
296	CCG CTG GGA G

Análisis estadístico

A partir de los datos obtenidos, se realizaron análisis estadísticos. Se evaluaron los promedios obtenidos en análisis citoembriológicos entre las panojas de los diferentes periodos de floración mediante el Test t de Student para muestras independientes.

Resultados y discusión

Estudios citoembriológicos

La cruce entre el cultivar sexual OTA (USDA), utilizado como progenitor femenino, y el cultivar Tanganyika (USDA) condujo a la obtención de 2713 semillas (Figura 3.2A).

Cuando las mismas se sembraron en medio MS, sin reguladores de crecimiento, se observó que el 59 % de las semillas no germinó. Si bien no es posible establecer con certeza la causa de este bajo índice de germinación, podría atribuirse a problemas genéticos inherentes a incompatibilidades genéticas, como fuera mencionado previamente para el género *Paspalum* (Rebozzio *et al.*, 2009).

Del 41 % de semillas germinadas, aproximadamente un tercio (38 %) dio origen a plantas normales. Otro tercio (39 %) (Figura 3.2B) dio origen a plantas necróticas y un 23 % a plantas con anomalías en el desarrollo, como ausencia de tallo o raíz. Estas últimas (necróticas y anómalas), finalmente murieron y no pudieron ser analizadas. Las plantas sobrevivientes (38 %) (Figura 3.2C), fueron trasferidas al invernáculo. De estas, el 39 % no sobrevivió (Figura 3.2C) y el 61 % (270 plantas, Figura 3.2D) fueron analizadas con marcadores SSR y AFLP para determinar la presencia de marcadores paternos, y de esta manera su origen híbrido. Este análisis demostró la presencia de solo seis plantas híbridas. Las 264 restantes eran de origen materno y su origen parece recaer en autopolinización del parental femenino debido a un efecto mentor del polen del donante apomítico.

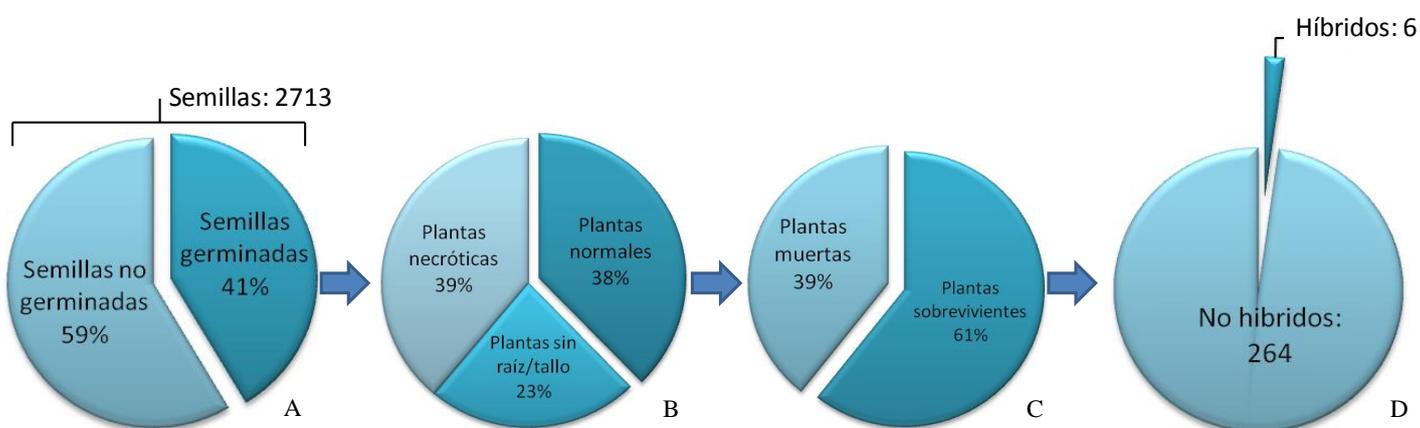


Figura 3.2: Causas y porcentajes de pérdida de plantas obtenidas de la cruce OTA (USDA) X Tanganyika (USDA).

Estos resultados, sumados a las fallas observadas en la germinación y a las malformaciones de las plántulas podrían atribuirse a los efectos nocivos de la homocigosis como fuera señalado por Voigt y Bashaw (1972) para *E. curvula*, ya que un elevado porcentaje de las plantas obtenidas y evaluadas por marcadores moleculares parecen haberse originado por autofecundación del progenitor femenino. Sin embargo, es probable que este no sea el motivo de las fallas en la germinación ya que se trata de materiales tetraploides. A su vez, es posible que también pueda haber habido muerte de plántulas híbridas a causa de algún desequilibrio genético o incompatibilidades propias de la hibridación.

En la primera floración de estas plantas híbridas se colectaron inflorescencias para realizar los análisis citoembriológicos correspondientes a la temporada 2010 (entre septiembre y Diciembre) (Tabla 3.2.).

Tabla 3.2: Análisis de pistilos de híbridos F1 de la cruce entre OTA (USDA) y Tanganyika (USDA) del primer periodo de floración (temporada 2010 Sep.-Dic.), observados con la tinción de safranina-fast green.

2010 Híbrido #	Número de pistilos analizados	Numero de pistilos		Porcentaje	
		Apo	Sex	Apo	Sex
39	91	42	49	46,2%	53,8%
52	103	0	103	0,0%	100,0%
60	123	0	123	0,0%	100,0%
76	120	0	120	0,0%	100,0%
93	104	0	104	0,0%	100,0%
105	97	83	14	85,6%	14,4%

Como se desprende de la Tabla 3.2, de las seis plantas analizadas en esta primera floración cuatro fueron clasificadas como sexuales y dos, apomícticas. Estas dos últimas plantas, si bien ambas fueron clasificadas como apomícticas, presentaron distintos niveles de expresión del carácter. Una de ellas presentó una proporción de 46,2 % de sacos diplospóricos y la otra 85,6 %. Esto significa que ambas plantas presentan la región condicionante del carácter pero lo expresarían a distintos niveles.

Estos resultados son insuficientes para estudiar la herencia del carácter, pero nos permitieron realizar otro tipo de análisis. Como se mencionara en el Capítulo I, estudios previos nos llevaron a clasificar una planta como sexual (Cardone *et al.*, 2006), dado

que el análisis con marcadores moleculares evidenció la presencia de progenie variable en una floración. En estudios posteriores en la misma planta se detectaron sacos diplospóricos (Meier *et al.*, 2011) que llevaron a su clasificación definitiva como apomíctica. Por ello es que se decidió re-analizar estas plantas en una segunda floración.

A esta segunda floración solo llegaron vivas tres plantas (Tabla 3.3) ya que las otras tres, débiles, no sobrevivieron (Híbrido apomíctico 39 y sexuales 52 y 76). Los resultados fueron similares a los observados en el primer año, clasificándose dos plantas como sexuales mientras que la restante presentó un elevado porcentaje de sacos apomícticos, no mostrando diferencias significativas con los valores expresados en la temporada anterior (aumentando el porcentaje de procesos apomícticos del 85,6 % al 88 %). Sin embargo, teniendo en cuenta los resultados de Rebozzio *et al.*, (2011) comentados en el Capítulo I, quienes informan un incremento en el porcentaje de procesos sexuales en las inflorescencias de finales de temporada de floración en *Paspalum*, se decidió ampliar el análisis de esta planta y se realizaron observaciones en pistilos pertenecientes al segundo periodo de floración (marzo 2012). En este caso, la ocurrencia de pistilos con procesos apomícticos sufrió un drástico descenso (del 88 % al 29,7 %) a pesar de estar creciendo en condiciones de invernáculo.

Tabla 3.3: Análisis de pistilos de híbridos F1 de la cruce entre OTA (USDA) y Tanganyika (USDA) observados con la tinción de safranina-fast green. Inflorescencias colectadas durante la temporada 2011/12. Entre paréntesis se indica la fecha de colección.

2011/12 Híbrido #	Número de pistilos analizados	Numero de pistilos		Porcentaje	
		Apo	Sex	Apo	Sex
60	108	0	108	0,0%	100,0%
93	123	0	123	0,0%	100,0%
105 (06/10/11)	108	95	13	88,0%	12,0%
105 (02/03/12)	101	30	71	29,7%	70,3%

Si bien sacar conclusiones acerca de las observaciones realizadas sobre un solo ejemplar es apresurado, podríamos especular diciendo que, en híbridos de reciente formación, la expresión del carácter apomixis no es estable y fluctúa durante el periodo de floración. También podría pensarse que habría una estacionalidad en la expresión, aunque, como mencionáramos en el Capítulo I el cv. Tanganyika (INTA) mantuvo los mismos porcentajes de sacos sexuales y apomícticos a lo largo de todo el periodo de floración.

Otra posibilidad, que explicaría este fenómeno, es la llamada inestabilidad híbrida, generada por la interacción de dos genomas parentales divergentes. Sería posible especular que tras el estrés generado por la hibridación, los genomas de las plantas aun estén en un estado de reorganización o adaptación y esto afecte la expresión de los niveles de sexualidad y apomixis.

A fin de realizar un análisis más exhaustivo del comportamiento de estos híbridos se decidió ampliar el análisis de los mismos (plantas 60 y 105) en la temporada 2012/13. En la tabla 3.4 se detalla el análisis de tres panojas del híbrido 60 (269 pistilos) y panojas del híbrido 105 (433 pistilos), colectadas durante los dos principales momentos de floración de la temporada.

Tabla 3.4: Análisis de pistilos de híbridos F1 de la cruce entre OTA (USDA) y Tanganyika (USDA) observados con la tinción de safranina-fast green. Inflorescencias colectadas durante la temporada 2012/13 (entre paréntesis se aclara la fecha de colección).

2012/13 Híbrido #	Número de pistilos analizados	Numero de pistilos		Porcentaje	
		Apo	Sex	Apo	Sex
60 (06/10/12)	94	0	94	0,0%	100,0%
60 (08/11/12)	107	1	106	0,9%	99,1%
60 (05/05/13)	68	2	66	2,9%	97,1%
105 (04/10/12)	76	48	28	63,2%	36,8%
105 (08/11/12)	88	52	36	59,1%	40,9%
105 (07/05/13)	65	28	37	43,1%	56,9%
105 (10/05/13)	88	49	39	55,7%	44,3%
105 (20/05/13)	116	76	40	65,5%	34,5%

Este análisis indica que el nivel de expresión de la apomixis en el híbrido 105 es fluctuante, con valores que oscilan entre el 45 % y 65 % de procesos diplospóricos. No obstante, el análisis estadístico no arrojó diferencias significativas entre periodos de floración. Como se desprende del análisis conjunto de las diferentes temporadas, los niveles de expresión de apomixis - sexualidad en el híbrido 105 mantienen un comportamiento errático tendiendo a estabilizarse en un 50 %.

Aliyu *et al.*, (2010) evaluaron 71 accesiones de *Boechera* encontrando especies que van desde sexuales obligadas a apomícticas obligadas. Además, estos autores encontraron que los apomícticos facultativos muestran una fuerte distribución bimodal, con especies mayormente sexuales y otras mayormente apomícticas. Al comparar el modo

reproductivo con el origen filogenético de las especies analizadas hipotetizan que bajos niveles de apomeiosis representan una condición ancestral en *Boechera*, mientras altos niveles de apomeiosis pueden ser inducidos por cambios en la regulación global de genes asociados a la hibridación. Si aplicamos esta hipótesis a los híbridos generados en pasto llorón, esperaríamos un nivel alto de apomixis en nuestra progenie F1. La tendencia observada en el híbrido 105 en ambos periodos de floración de la última temporada mostró un 50 % de sacos apomíticos. Si bien estos casos no son comunes en genotipos naturales, y se trata de un único individuo, es posible que estos valores de expresión solo sean parte de estadios temporales de estabilización del nuevo genoma híbrido. Futuros estudios determinarán si este comportamiento se mantiene en el tiempo, se estabiliza con una tendencia clara hacia un modo reproductivo en particular o se mantiene variable por factores que aún se desconocen.

En el híbrido 60, en el cual se esperaba simplemente confirmar su condición de híbrido sexual, se observaron tres procesos diplospóricos, con lo cual, debemos considerar que este ejemplar no debe ser caracterizado como sexual sino como apomítico. Esta aclaración no implica que en el material se hayan producido cambios en su genoma o epigenoma que permitieran el desarrollo de un modo reproductivo no existente en el organismo, sino que, dado los bajos porcentajes de expresión observados, es posible que este efecto no se haya observado en análisis previos por una deficiente intensidad de búsqueda. Aun así, los resultados obtenidos con el híbrido 60 durante el desarrollo de las tres temporadas nos plantean además un problema potencialmente importante que se generaría en estudios de mapeo de la apomixis en pasto llorón, ya que la caracterización fenotípica de la progenie podría ser errónea, sobre todo en el caso de individuos sexuales, donde podrían contabilizarse falsos positivos. Una forma de solucionar este problema sería realizar el fenotipeado a una escala mayor y en al menos tres años sucesivos.

Prueba de progenie

Con la intención de aclarar los interrogantes generados por los estudios citoembriológicos y a su vez respaldar los resultados observados, se realizaron pruebas de progenie utilizando semillas colectadas de distintas inflorescencias del híbrido 105 durante el tercer año de estudio. En total se analizaron 37 individuos con tres iniciadores. En la Figura 3.3 se observa un gel de acrilamida típico con los patrones de

amplificación de la progenie del híbrido 105. Los resultados de las pruebas de progenie se detallan en la Tabla 3.5.

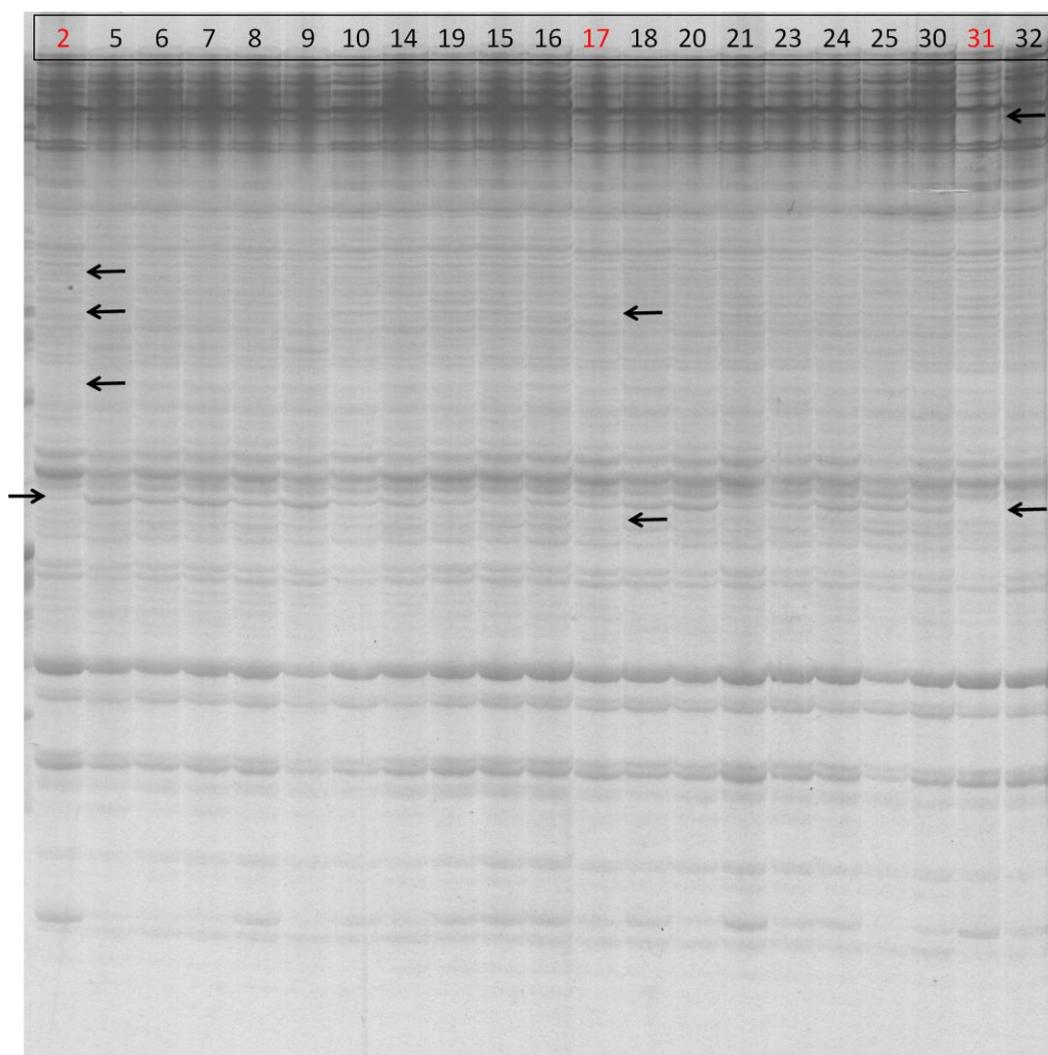


Figura 3.3: Patrones de amplificación de RAPDs de descendientes del híbrido 105 con el iniciador 245. Se muestran solo 20 de los 37 individuos de la progenie. En color rojo se muestran los individuos con marcadores polimórficos (origen sexual).

Tabla 3.5: Polimorfismos discriminados por marcador en individuos descendientes del híbrido 105 durante la tercera temporada de estudio.

Cebador	Individuos que presentaron bandas polimórficas							
	2	11	12	13	17	28	31	36
232	5,3%	5,3%	0,0%	2,6%	5,3%	2,6%	0,0%	10,5%
245	7,5%	5,7%	3,8%	5,7%	3,8%	7,5%	3,8%	7,5%
296	6,4%	8,5%	6,4%	4,3%	6,4%	10,6%	6,4%	12,8%
Total	6,5%	6,5%	3,6%	4,3%	5,1%	7,2%	3,6%	10,1%

Al igual que lo hallado en las pruebas de progenie de las plantas sometidas a estrés hídrico, el porcentaje de sexualidad calculado con marcadores RAPDs fue inferior al calculado a partir del análisis citoembriológico. Con los cebadores utilizados se encontró que solo ocho individuos, de los 37 evaluados (21,5 %), presentaron diferentes porcentajes de polimorfismos. Aunque este porcentaje de sexualidad es menor al esperado (entre el 35 y 55 % en el estudio citoembriológico), las pruebas de progenie realizadas en otras descendencias y presentadas en el Capítulo II también difieren de los resultados obtenidos con el estudio citoembriológico, mostrando siempre porcentajes inferiores de sexualidad, como se mencionara anteriormente. La explicación de este fenómeno podría residir en ciertos problemas existentes en la vía sexual para llegar a la formación de semillas y luego de que estas semillas prosperen como plántulas viables.

Lo expuesto tiende a demostrar que la apomixis en pasto llorón es un carácter de expresividad variable y el estrés genómico generado por la hibridación y otros estreses induce los cambios en dicha expresividad. En el caso de la hibridación, al menos en etapas recientes luego de la formación del híbrido. Esta hipótesis concuerda con lo expresado por otros autores quienes sostienen que la expresión de la apomixis / sexualidad, particularmente en los híbridos de un apomíctico y un padre sexual, puede variar entre los genotipos híbridos individuales, lo que refleja las interacciones entre los genomas de los padres (Curtis y Grossniklaus, 2007; Charbel *et al.*, 2009; Krahulcová *et al.*, 2011).

En el caso de pasto llorón, se observa entonces que las las plantas se encuentran en un rango de expresión que va desde el full apomíctico (Tanganyika (USDA)), donde la represión de la sexualidad es absoluta hasta los valores expresados en los híbridos de este estudio y en los poliploides de reciente formación (Cardone *et al.*, 2006; Meier *et al.*, 2011)

La hibridación interespecífica es conocida por desencadenar cambios genéticos y epigenéticos, tales como modificaciones en los patrones de metilación del ADN impactando sobre la plasticidad fenotípica y adaptación ecológica de los individuos (Salmon *et al.*, 2005; Marfil *et al.*, 2006). Por lo tanto realizar un estudio que analice el comportamiento de los genomas híbridos a través del periodo analizado es un requisito fundamental para comprender el efecto que este estrés produce.

**CAPÍTULO IV - “Análisis del metiloma
en plantas de pasto llorón sometidas a
estrés.”**

Las modificaciones que alteran la actividad del ADN sin alterar su secuencia de nucleótidos son llamadas modificaciones epigenéticas e incluyen alteraciones químicas del ADN o histonas, generalmente con grupos metilos y acetilos (Madlung y Comai, 2004). La regulación epigenética se puede dar por cambios en la conformación de la cromatina de acuerdo a las modificaciones que presenten las histonas (código de histonas). Este es un nivel clave de regulación ya que el estado en el que se encuentre la cromatina determina el momento, el lugar y la forma en que un gen puede ser expresado. Si la cromatina se encuentra en un alto grado de compactación, los factores de transcripción no pueden acceder a las regiones regulatorias de los genes y, por lo tanto, se inhibe la transcripción; es decir el gen es silenciado. En contraste, si la cromatina no se encuentra condensada, los activadores de transcripción se pueden unir a las regiones promotoras para que ocurra la transcripción del gen, siendo esta es una de las formas en que se regula la actividad génica. Se ha determinado que hay tres procesos epigenéticos de regulación: metilación del ADN, modificación de las histonas y por último el efecto de los ARN pequeños no codificantes (Figura 4.1).

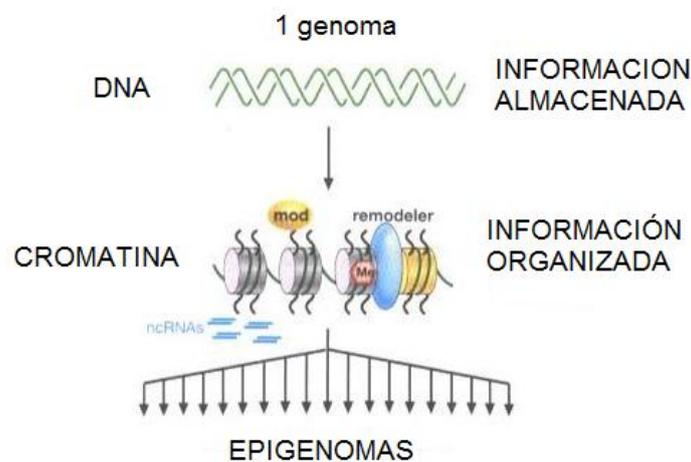


Figura 4.1: Proceso de establecimiento de los epigenomas a través de alteraciones en la estructura de la cromatina en respuesta a señales ambientales (adaptado de: Epigenetics, CSHL Press 2007).

De este modo, los cambios epigenéticos son capaces de generar grandes cambios a nivel de expresión génica (Grant-Downton y Dickinson, 2006), otorgando un nivel adicional de complejidad a la variación fenotípica y un gran potencial evolutivo. Esto último se basa en el concepto de que la variabilidad generada por mecanismos epigenéticos

amplía la variabilidad genética, ya que aparecen nuevos epialelos (alelos generados por diferencias en el estado de metilación, aunque portan la misma secuencia de ADN), que pueden ser seleccionados en poblaciones naturales. Este estado de metilación puede heredarse por varias generaciones, por lo tanto, estas variantes epialelicas son potencialmente reversibles y generarían fenotipos más flexibles, capaces de permitir la adaptación en ambientes cambiantes (Masuelli y Marfil, 2011).

El mecanismo más frecuente de “marcado” epigenético en plantas es la metilación en la posición 5' del anillo de citosina (5mC). En este proceso, las enzimas ADN metiltransferasas catalizan la formación de 5mC por transferencia del grupo metilo de la S-adenosil metionina a las citosinas del ADN (Colot y Rossignol, 1999). La metilación del ADN es un proceso dinámico, las secuencias no metiladas pueden ser metiladas y los grupos metilo pueden perderse, por lo que los patrones de metilación son el resultado de ambas actividades, metilación y desmetilación. (Figura 4.2). Las plantas tienen, en comparación con el reino animal, altos niveles de 5mC. Dependiendo de las especies, estos valores van del 6 al 25% de las citosinas totales (Steward *et al.*, 2000).

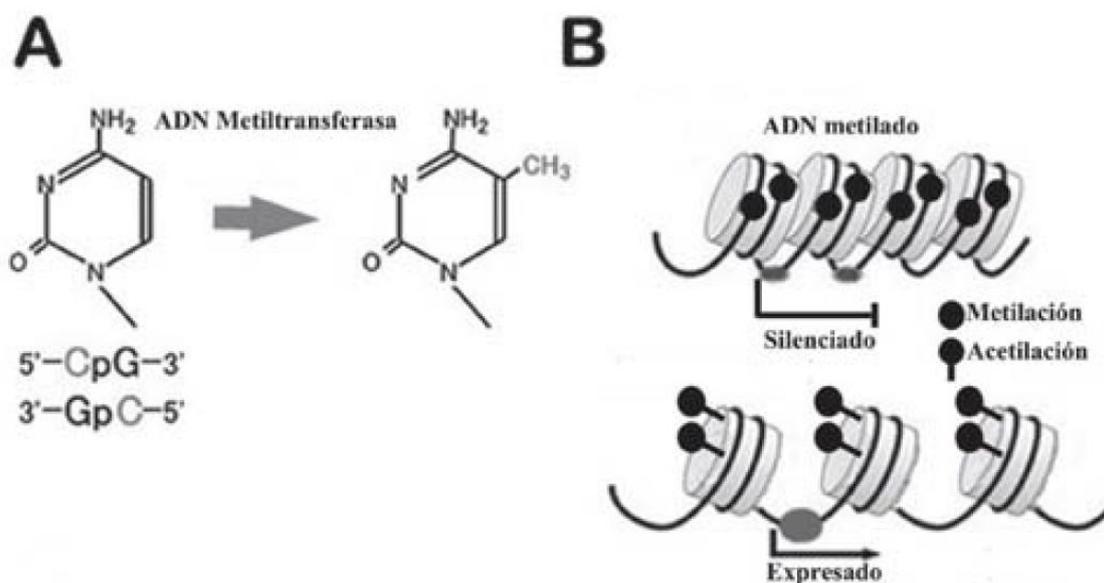


Figura 4.2: Metilación del ADN. A) Agregado de un grupo metilo al carbono 5' de la citosina B) Pasaje del estado de la cromatina condensada y silenciada por metilación del ADN al estado descondensado y activado por desmetilación (Adaptado de Masuelli y Marfil, 2011).

De esta manera, el ADN puede estar metilado en el promotor así como en las regiones codificantes de los genes. Cuando un gen se encuentra metilado se encuentra transcripcionalmente reprimido. Por lo tanto, una disminución en el nivel de metilación

es probable que provoque un aumento en la expresión de los mismos (Finnegan *et al.*, 1998). Este estado de metilación y desmetilación del genoma genera un código que puede restablecerse o cambiar dependiendo del ambiente o la situación en la que se encuentre el organismo. Esta memoria epigenética acumulada por las plantas durante su fase vegetativa bajo la influencia del ambiente podría ser transmitida a la generación siguiente a través de la línea germinal.

Control epigenético de la gametogénesis femenina

Nuevas evidencias en especies sexuales indicarían que la regulación de la gametogénesis femenina y la formación de semillas están reguladas por mecanismos epigenéticos, transformando la visión actual de cuáles son las etapas clave de la megagametogénesis y de los cambios que se presentan en las distintas formas del desarrollo reproductivo (Rodríguez-Leal y Vielle-Calzada, 2012).

Mientras que la función de los genes de la meiosis en las formas apomícticas naturales requiere de mayor investigación, hallazgos recientes indican que los mecanismos dependientes de pequeños ARN (sRNA) juegan un papel esencial en la diferenciación de las células reproductivas. García-Aguilar *et al.* (2010) demostraron recientemente en maíz que la inactivación de las metiltransferasas de ADN DMT102 y DMT103, que se expresan en el óvulo, dan lugar a fenotipos muy similares al desarrollo apomíctico, incluyendo la producción de gametas no reducidas y la formación de sacos embrionarios múltiples. Presumiblemente la actividad de DMT102 en el óvulo de maíz regula negativamente la competencia transcripcional de la cromatina en el tejido arqueosporial, una condición que debe ser esencial para el correcto desarrollo sexual (García-Aguilar *et al.*, 2010). Sin embargo, las ovocélulas o sacos embrionarios extranumerarios en las mutantes ago9 y dmt103 no forman gametas femeninas no reducidas funcionales, y ninguna de dichas mutantes produce progenie apomíctica (García-Aguilar *et al.*, 2010). En conjunto, los fenotipos mutantes ago9 en *A. thaliana* y dmt103 en maíz sugieren que las vías de generación de ARN pequeños y la regulación de la metilación del ADN en las células precursoras de las gametas femeninas podrían controlar el pasaje de la reproducción sexual a la apomíctica. Sin embargo, se requieren más estudios para elucidar la vía epigenética involucrada con mayor detalle. Esto daría una mayor complejidad al sistema, abriendo nuevos desafíos para la investigación de este peculiar modo reproductivo.

Las células germinales poseen la capacidad extraordinaria y única para dar lugar a un nuevo organismo y crear un enlace duradero entre todas las generaciones. Para adquirir esta propiedad, las células germinales primordiales (CGP) atraviesan un programa sin precedentes de eventos epigenéticos secuenciales que culmina en un estado basal epigenómico que es la base de la totipotencialidad. Este proceso se basa en la desmetilación del ADN de todo el genoma, lo que puede ocurrir a través de varias vías superpuestas, incluyendo la conversión de 5-hidroximetilcitosina. Hackett *et al.* (2012) proponen que el programa epigenético en las CGPs opera a través de múltiples mecanismos paralelos para asegurar la robustez y al mismo tiempo ser flexible a través de la redundancia funcional para garantizar una alta fidelidad del proceso.

Epigenética y estrés

Las plantas han desarrollado intrincados mecanismos de regulación génica para adaptarse a situaciones de estrés. La variación fenotípica de las plantas sujetas a estrés fue clásicamente atribuida a variaciones en la secuencia del ADN, pero más recientemente se demostró que modificaciones epigenéticas pueden contribuir solas o en conjunto a definir el fenotipo regulando la expresión de genes en respuesta al estrés (Grativol *et al.*, 2012; Sahu *et al.*, 2013). Es decir que cuando las plantas experimentan estrés, muestran una multitud de respuestas, entre las que se puede incluir la variación epigenética (Molinier *et al.*, 2006)

Los mecanismos epigenéticos han sido implicados en la regulación de la expresión de genes relacionados al estrés. Estos mecanismos regulan casi todas las funciones génicas, incluyendo procesos como transcripción, replicación, reparación del ADN, transposición de genes y diferenciación celular (Chinnusamy y Zhu, 2009). Se ha demostrado que modificaciones en la cromatina y la generación de pequeños ARNs se encuentran involucrados en el control transcripcional y postranscripcional de genes, proceso crítico para las respuestas al estrés (Madlung y Comai, 2004; Angers *et al.*, 2010). Estas modificaciones en el ADN o en las histonas son específicas para cada especie, tejido, órgano y edad (Vanyushin y Ashapkin, 2011).

Muchos son los estudios que hacen referencia al rol de la metilación del ADN en situaciones de estrés. Las alteraciones en la metilación se han informado en respuesta a la deficiencia de agua (Labra *et al.*, 2002), el estrés osmótico (Kovarik *et al.*, 1997),

presencia de metales pesados (Aina *et al.*, 2004), en cultivo de tejidos y altas temperaturas (Baránek *et al.*, 2010), etc. Bajo estas condiciones se observó que algunos loci experimentan silenciamiento epigenético, mientras otros aumentan su expresión. Investigaciones a nivel genómico en arroz revelaron variaciones reversibles en las citosinas en sitios específicos del genoma asociadas a la adaptación a la sequía (Wang *et al.*, 2011). El déficit hídrico también conduce a la hipermetilación de citosinas en el genoma de arveja (Labra *et al.*, 2002). También se identificaron cambios epigenéticos en cultivares de arroz de tierras bajas y cultivares tolerantes a la sequía (Suji y John, 2010). Resultados similares fueron informados en manglares para estrés salino (Lira-Medeiros *et al.*, 2010), en arroz (Karan *et al.*, 2012) y tabaco (Kovarík *et al.*, 1997) para estrés por elevadas temperaturas (Correia *et al.*, 2013) y frío (Steward *et al.*, 2000), indicando la existencia de una asociación directa entre el estrés ambiental y los niveles de metilación en las plantas.

Las plantas también pueden aclimatarse y modular la fisiología de procesos como el desarrollo de los órganos reproductivos en situaciones de estrés. Yaish *et al.* (2011) informaron la existencia de una regulación epigenética del tiempo de floración bajo condiciones desfavorables. Como se mencionara anteriormente, estos cambios en el epigenoma pueden perdurar en el tiempo, más allá del individuo mismo. Esto se conoce como la herencia transgeneracional de los patrones de metilación del ADN y se ha observado en plantas que crecen bajo condiciones de estrés (Hauser *et al.*, 2011; Feng *et al.*, 2012). Esta plasticidad epigenética inherente juega un papel importante tanto en la respuesta inmediata de los organismos como en el establecimiento de adaptaciones a largo plazo al estrés (Mirouze y Paszkowski, 2011).

La metilación del ADN es controlada por flujos hormonales, que a su vez están influenciados por diferentes factores abióticos y bióticos (Zhang *et al.*, 2012) resultando así en la adaptación de la planta (Mirouze y Paszkowski, 2011). Por lo tanto, descifrar la forma en que la maquinaria epigenética actúa para adaptarse a ambientes cambiantes proporcionará una valiosa plataforma para aplicaciones potenciales, entre ellas, el desarrollo de ingeniería epigenética hacia una mayor tolerancia a estreses ambientales.

Antecedentes en nuestro grupo de trabajo relacionaron el cambio en la expresión de la apomixis en el genotipo UNST1131 a cambios en la metilación de su genoma. Como se mencionara previamente, este genotipo se logró cuando se trataron semillas del genotipo

diploide UNST1122 con colchicina (Cardone *et al.*, 2006). Aunque en un principio este genotipo fue catalogado como de reproducción sexual, cuatro años más tarde nuevos estudios demostraron que se trata de un apomíctico, con una expresión del carácter del 90% (Meier *et al.*, 2011). Estudios comparativos de AFLP y MSAP durante los primeros años luego de su obtención (2003-2007), periodo en el que también se encontraron diferencias en la expresión de la apomixis, mostraron cambios importantes a nivel genético y epigenético, asociando ambos aspectos a dicho cambio (Zappacosta *et al.*, 2014).

Uso de marcadores AFLPs para el análisis genético

La técnica AFLPs, se basa en la amplificación selectiva de fragmentos de restricción digeridos a partir de ADN genómico total, seguido por amplificación por PCR (Williams *et al.*, 1990). Los AFLPs pueden producir patrones de complejidad variada de acuerdo al tipo de enzimas de restricción y la longitud de los cebadores utilizados en la PCR. Los AFLPs son marcadores que segregan de forma mendeliana, igual que los RFLPs. Sin embargo, los RFLPs no logran detectar la cantidad de loci que se pueden encontrar mediante la técnica de AFLPs. El ensayo de AFLP combina la especificidad, resolución y poder de muestreo de la digestión con enzimas de restricción con la velocidad y practicidad de la detección de polimorfismos mediante PCR, sin necesidad de disponer de información previa del genoma a estudiar.

Estos marcadores presentan un alto poder de detección de la variabilidad genética, ya que se explora simultáneamente el polimorfismo de ausencia/presencia de sitios de restricción (como lo hacen los RFLP) y la ocurrencia o no de amplificación a partir de secuencias arbitrarias (como lo hacen los RAPDs).

Estudio de variaciones en los patrones de metilación

Existen distintas técnicas para el estudio de la metilación en el ADN. Una de las más difundidas es la técnica de Amplificación de Polimorfismos Sensibles a Metilación (MSAP) que 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. Esta técnica es comúnmente usada para estudiar el estado global de metilación del ADN de un organismo y por lo tanto, de distinguir entre dos individuos. Además, es un método útil

para realizar estudios de cartografía de metilación del ADN y clonación posicional de genes diferencialmente metilados. En esta técnica, el ADN genómico se digiere primero con una enzima de restricción sensible a la metilación tales como *HpaII*, y a continuación, los fragmentos de ADN se ligan a adaptadores con el fin de facilitar su amplificación. La digestión usando un isoesquizómero insensible a metilación de *HpaII*, *MspI* se utiliza en una reacción de digestión paralelo como control de carga en el experimento. 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.

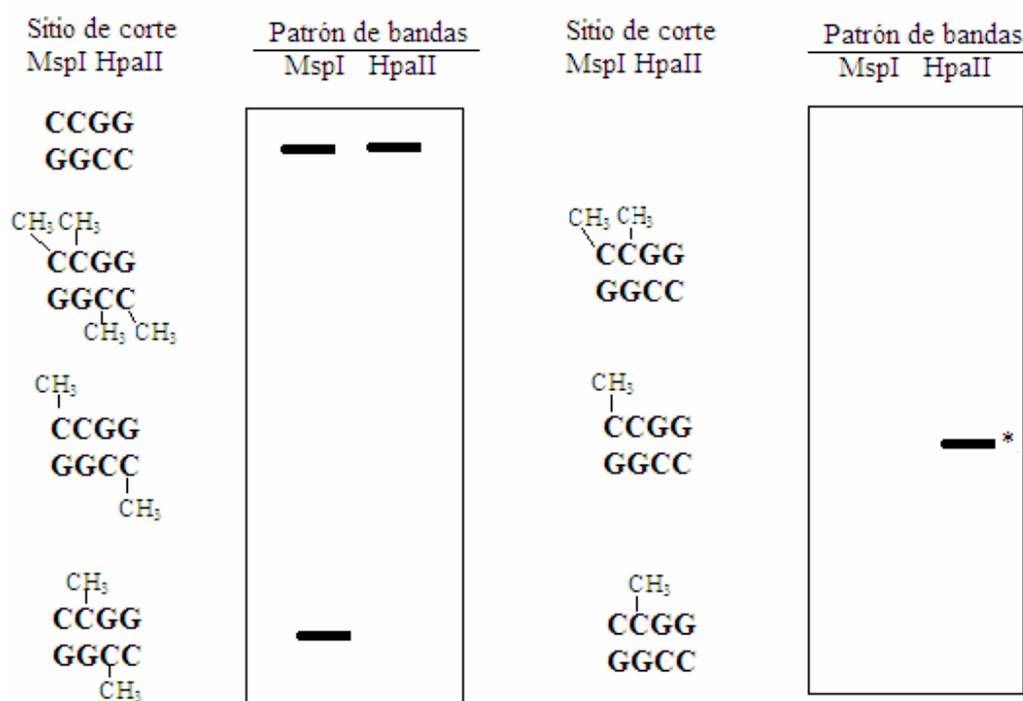


Figura 4.3: Esquema de los patrones de metilación posibles en el sitio de corte de los isoesquizómeros *MspI* y *HpaII* con sus respectivos patrones de bandas observado en geles de poliacrilamida por MSAP. El corte con *HpaII* cuando el sitio se encuentra hemimetilado en la citosina externa se produce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

El uso comparativo de técnicas de AFLP y MSAP permitirá realizar una evaluación acerca del origen de la variación (genética o epigenética) en plantas de pasto llorón sometidas a estrés y evaluar el estado de metilación de las mismas. Si bien es difícil, con esta información, establecer una relación entre estrés-metilación-expresión de la apomixis, algunas consideraciones pueden realizarse.

Hipótesis

El metiloma de pasto llorón se ve afectado por situaciones de estrés genómico generando, en el tiempo, polimorfismos en las plantas. Estos cambios podrían estar asociados a la expresión del carácter apomixis o regiones reguladoras del mismo.

Objetivo

Analizar el estado de metilación de plantas de pasto llorón sometidas a estrés por déficit hídrico, hibridación y cultivo *in vitro* seguido de duplicación cromosómica e identificar genes diferencialmente afectados por tal condición

Materiales y métodos

Material vegetal

Se realizaron análisis comparativos utilizando las técnicas de AFLP y MSAP en plantas de pasto llorón a fin de investigar el efecto de situaciones de estrés sobre el genoma y el metiloma. Para ello se utilizaron los siguientes materiales vegetales:

- a) Plantas tratadas por estrés hídrico (4 ejemplares) y plantas control (2 ejemplares) del cv. Tanganyika INTA, que fueron descriptas en el Capítulo II, con un CRA promedio respectivo del 49 % y 89 %. Las muestras se colectaron durante el periodo de estrés y luego de que este cesara (plantas re-hidratadas).
- b) Planta híbrida 60 y 105 obtenidas del cruzamiento OTA (USDA) x Tanganyika USDA. La obtención de estas plantas fue detallada en el Capítulo III. Se utilizó ADN extraído en el 2010 (primer año de análisis) y luego de tres años (2013).
- c) Planta UNST1131 obtenida por duplicación con colchicina a partir de un material diploide (Cardone *et al.*, 2006). Esta planta mostró un notable cambio en la expresión de la apomixis en el periodo 2003-2007. En la presente tesis se compararon ADNs de la planta control (cv. Tanganyika INTA) y de UNST1131 de los años 2007, 2011 y 2013 y se compararon los resultados obtenidos con los previos.

Extracción de ADN

Las extracciones de ADN genómico se realizaron mediante un método CTAB (CIMMYT 2006) modificado. Se partió con 50 mg de tejido liofilizado y molido en un tubo de 2 ml. El ADN genómico obtenido fue cuantificado utilizando un espectrofotómetro y leyendo absorbancia a longitudes de onda de 260 y 280 nm. Para determinar la calidad de ADN se utilizó la relación A260/A280 y se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 1,5 %. La concentración de ADN se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$[\text{ADN}] (\mu\text{g/ml}) = A \times D \times C$$

Donde A es la lectura de absorbancia obtenida a 260 nm, D es el factor de dilución y C es una constante, con un valor de 50 $\mu\text{g/ml}$, igual a la concentración de ADN doble cadena que genera un valor de absorbancia de 1.

AFLP y MSAP

Los estudios de AFLP y MSAP fueron realizados, para cada planta con ADN. Para aumentar la confiabilidad de los datos, cada reacción de amplificación analizada se realizó por duplicado.

Perfiles de AFLP

Para la obtención de los perfiles de AFLP se siguió el protocolo de Vos *et al.* (1995) con algunas modificaciones. Alícuotas de 500 ng de ADN genómico fueron simultáneamente digeridas con las enzimas de restricción *Pst*I y *Mse*I. Los fragmentos fueron ligados a adaptadores para *Pst*I y *Mse*I y constituyeron las plantillas para las siguientes amplificaciones. Las secuencias de los adaptadores y cebadores utilizados se encuentran en la Tabla 4.1. Los productos de la pre-amplificación fueron diluidos (1:6) 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, P+3 y M+3, respectivamente.

Tabla 4.1: Secuencia de los adaptadores y cebadores utilizados en AFLPs

Nombre	Secuencia 5'- 3'
Adaptador <i>Pst</i> I superior	GAC TGC GTA GGT GCA
Adaptador <i>Pst</i> I inferior	CCT ACG CAG TCT ACG AG
Adaptador <i>Mse</i> I superior	GAC GAT GAG TCC TGA G
Adaptador <i>Mse</i> I inferior	ATG AGT CCT GAG TA
Cebador preamplificación <i>Pst</i> I +1	GAC TGC GTA CAT GCA GA
Cebador preamplificación <i>Mse</i> I +1	GAT GAG TCC TGA GTA AA
Cebador amplificación final <i>Pst</i> I +3 P36	GAC TGC GTA CAT GCA GACC
Cebador amplificación final <i>Pst</i> I +3 P37	GAC TGC GTA CAT GCA GACG
Cebador amplificación final <i>Pst</i> I +3 P40	GAC TGC GTA CAT GCA GAGC
Cebador amplificación final <i>Mse</i> I +3 M31	GAT GAG TCC TGA GTA AAAA
Cebador amplificación final <i>Mse</i> I +3 M38	GAT GAG TCC TGA GTA AACT
Cebador amplificación final <i>Mse</i> I +3 M39	GAT GAG TCC TGA GTA AAGA
Cebador amplificación final <i>Mse</i> I +3 M43	GAT GAG TCC TGA GTA AATA
Cebador amplificación final <i>Mse</i> I +3 M45	GAT GAG TCC TGA GTA AATG

Se utilizaron 8 cebadores AFLPs en diferentes combinaciones para cada grupo de plantas a analizar. Los programas utilizados para la amplificación fueron los indicados por Vos *et al.* (1995). Luego de las amplificaciones, los productos de PCR fueron mezclados con solución de siembra (98 % (v/v) formamida, 10 mM EDTA, 0,025 % (p/v) azul de bromofenol y 0,025 % (p/v) xilencianol) en proporción 6:1,

desnaturalizados a 95 °C durante 5 min e inmediatamente llevados a hielo. Siete microlitros de las muestras desnaturalizadas fueron cargadas en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 6 % (p/v). Los productos de amplificación fueron visualizados con coloración de plata y digitalizados para el posterior análisis.

Polimorfismos sensibles a metilación

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. Las secuencias de los adaptadores y cebadores utilizados se encuentran en la Tabla 4.2. 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). Las secuencias de los cebadores utilizados se encuentran en la Tabla 4.2. 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 polimerasa GoTaq (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 6 %. Los geles fueron teñidos con plata, secados y digitalizados para su posterior análisis.

Tabla 4.2: Secuencia de los adaptadores y cebadores utilizados en MSAP

Nombre	Secuencia 5´- 3´
Adaptador <i>EcoRI</i> superior	CTC GTA GAC TGC GTA CC
Adaptador <i>EcoRI</i> inferior	TTA ACC ATG CGT CAG
Adaptador <i>HpaII-MspI</i> superior	GAC GAT GAG TCT AGA A
Adaptador <i>HpaII-MspI</i> inferior	CGT TCT AGA CTC ATC
Cebador preamplificación <i>EcoRI</i> +1	GAC GGC GTA CCA ATT CA
Cebador amplificación final <i>HpaII-MspI</i> +0	GAT GAG TCT AGA ACG G
Cebador amplificación final <i>EcoRI</i> +3 E32	GAC GGC GTA CCA ATT CAA C
Cebador amplificación final <i>EcoRI</i> +3 E37	GAC GGC GTA CCA ATT CAC G
Cebador amplificación final <i>EcoRI</i> +3 E40	GAC GGC GTA CCA ATT CAG C
Cebador amplificación final <i>HpaII-MspI</i> +3 H-M4	GAT GAG TCT AGA ACG GAG T
Cebador amplificación final <i>HpaII-MspI</i> +3 H-M5	GAT GAG TCT AGA ACG GAG C
Cebador amplificación final <i>HpaII-MspI</i> +3 H-M6	GAT GAG TCT AGA ACG GAC A
Cebador amplificación final <i>HpaII-MspI</i> +3 H-M7	GAT GAG TCT AGA ACG GAC T

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 el método de electroforesis capilar por la Unidad de Genómica del INTA Castelar.

Análisis de las secuencias obtenidas

El análisis de secuencias fue realizado a través del análisis de similitud utilizando las herramientas de BLAST (Altschul *et al.*, 1997), disponibles en bases de datos de los sitios de Internet: NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), MIPS (Repeat Element Database, <http://mips.helmholtz-muenchen.de/plant/recat/>) y Gramene (<http://www.gramene.nlm.nih.org/>).

Resultados y discusión

a) Plantas tratadas por estrés hídrico y plantas control del cv. Tanganyika INTA

Se analizaron cuatro plantas que fueron sometidas a estrés por déficit hídrico (11, 13 14 y 16) y dos plantas control (4 y 20), ya mencionadas en el Capítulo II. Se utilizó ADN de muestras de tejido foliar colectadas en dos tiempos diferentes: durante el periodo de tratamiento por estrés hídrico y luego de la rehidratación, tal como se indica en el Capítulo II. En adelante las muestras se indicarán con el número de la planta, cuando corresponda al tratamiento de estrés hídrico, y con el número de planta y un asterisco cuando corresponda al tratamiento posterior de rehidratación.

El análisis de siete combinaciones de cebadores AFLPs (M31-P36, M31-P37, M31-P40, M39-P36, M39-P37, M39-P40 y M43-P40) permitió obtener un total de 294 marcadores que resultaron monomórficos. Esto demostró la ausencia de diferencias genéticas entre los clones (11, 13, 14, 16, 4 y 20) y entre un mismo genotipo durante y post tratamiento (11-11*, 13-13*, 14-14*,16-16*, 4-4*, 20-20*). Un ejemplo de gel con perfiles de marcadores AFLP se muestra en la Figura 4.4.

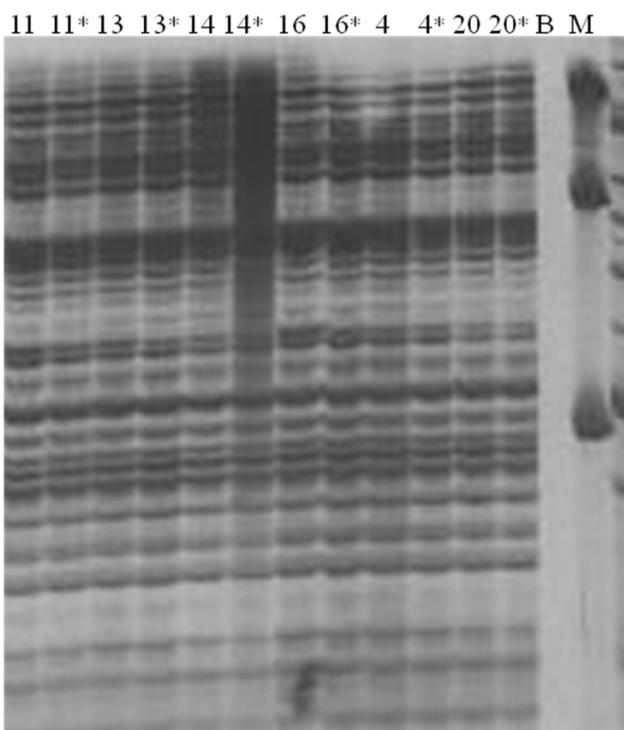


Figura 4.4: Patrones de amplificación de AFLPs de plantas de pasto llorón, cv. Tanganyika INTA, durante el periodo de tratamiento por estrés hídrico y luego de la rehidratación. Combinación de marcadores M31-P36.

Con el ADN de la misma extracción utilizado en los análisis de AFLP se realizaron los análisis de MSAP comparando las mismas plantas y en los mismos momentos de muestreo. Se realizaron amplificaciones con seis combinaciones de cebadores (HM6-E37, HM6-E40, HM4-E32, HM4-E37, HM4-E40, HM7-E37; HM7-E40). Un ejemplo de patrón de amplificación con marcadores MSAP se muestra en la Figura 4.5.

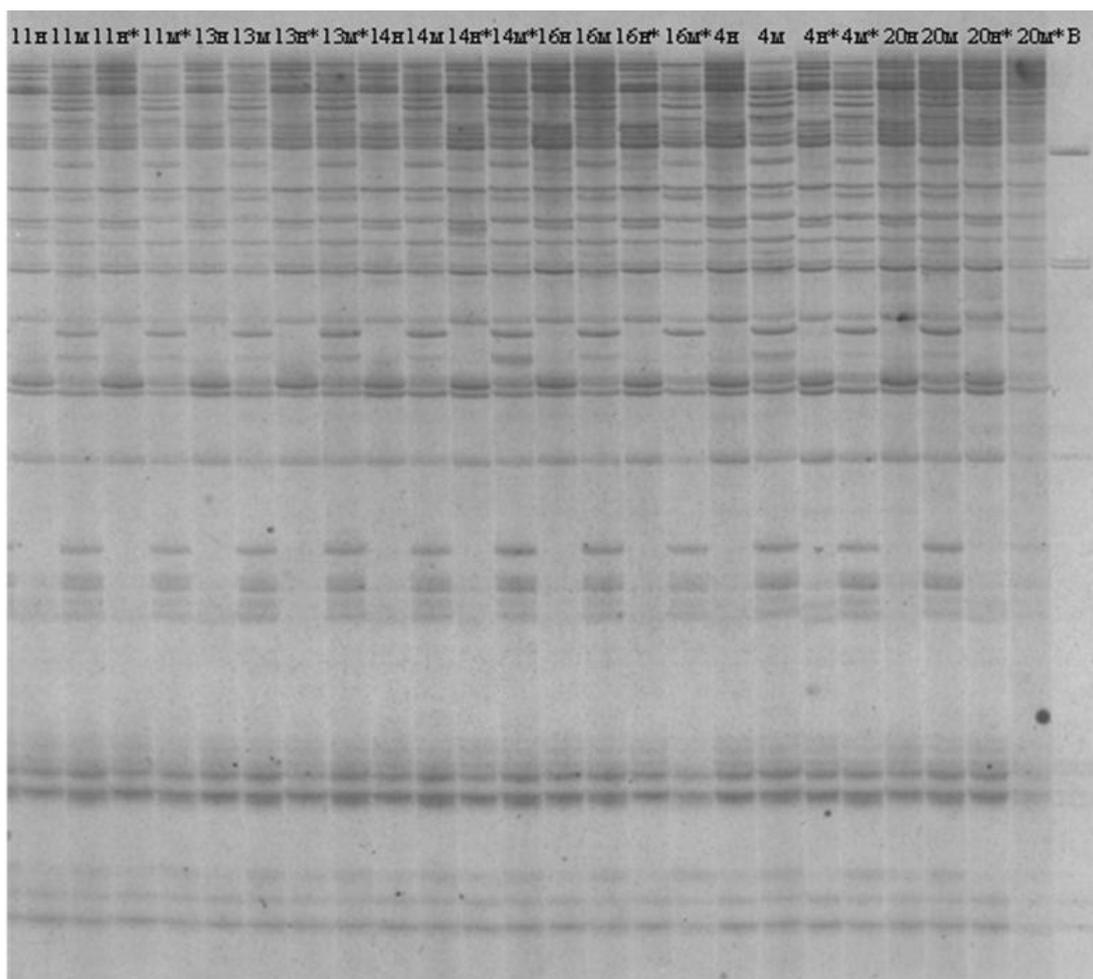


Figura 4.5: Patrones de amplificación de MSAP de plantas de pasto llorón, cv. Tanganyika INTA, durante el periodo de tratamiento por estrés hídrico y luego de la rehidratación. Combinación de marcadores HM6-E40.

La comparación del metiloma de plantas de pasto llorón, cv. Tanganyika INTA, durante el periodo de tratamiento por estrés hídrico y luego de la rehidratación, mostró un gran número de marcadores polimórficos en la misma planta, entre los dos tiempos de muestreo, debidos a procesos de metilación y desmetilación del ADN.

Para evaluar el efecto del estrés hídrico sobre el metiloma se realizó un análisis de la variación de los perfiles MSAP comparando individualmente las plantas expuestas al tratamiento y las plantas control. Los resultados obtenidos de la comparación en el tiempo de los perfiles epigenéticos de cada planta individualmente se detallan en la Tabla 4.3.

Tabla 4.3. Variación de los perfiles MSAP de plantas individuales (plantas tratamiento 11, 13, 14 y 16 y control 4 y 20) de pasto llorón, cv. Tanganyika INTA. Las muestras de ADN fueron tomadas durante (ej.:11) y después (ej.:11*) del periodo de tratamiento (plantas rehidratadas). Las muestras de ADN de las plantas control fueron tomadas en la misma fecha que las plantas tratadas

Perfil	11-11*		13-13*		14-14*		16-16*	
Ausencia de cambios en el tiempo	320	87,9%	346	95,1%	317	87,1%	339	93,1%
Metilaciones ocurridas	16	4,4%	12	3,3%	26	7,1%	10	2,7%
Desmetilaciones ocurridas	28	7,7%	6	1,6%	21	5,8%	15	4,1%
Marcadores totales	364	100%	364	100%	364	100%	364	100%

Perfil	4-4*		20-20*	
Ausencia de cambios en el tiempo	350	96,2%	354	97,25%
Metilaciones ocurridas	6	1,6%	4	1,10%
Desmetilaciones ocurridas	8	2,2%	6	1,65%
Marcadores totales	364	100%	364	100%

De las seis combinaciones de marcadores MSAP utilizados se identificaron un total de 364 marcadores. La gran mayoría de estos fueron monomorficos en el tiempo en un rango del 88 % al 97 %. Con respecto a los polimorfismos, las plantas tratadas (11, 13, 14 y 16) mostraron, tanto en su conjunto como individualmente, un mayor número de procesos de metilación y desmetilación que las plantas control (4 y 20), evidenciando una mayor actividad de este tipo de procesos en situaciones de condiciones variables (de estrés a cese del mismo). El análisis individual de cada planta no muestra una tendencia fija hacia alguno de los dos procesos en particular (metilación o desmetilación), ya que, en algunos individuos hay una tendencia general hacia la desmetilación (individuos 11, 16, 4 y 20) y en otros, los procesos de metilación ocurren con mayor frecuencia (individuos 13 y 14).

Del total de polimorfismos observados, solo un 8 % se observaron en más de una planta tratada pero ninguno se encontró en al menos tres individuos, la gran mayoría de

polimorfismos no se repitieron entre individuos mostrando aleatoriedad en los sitios metilados.

En cuanto a la sumatoria de procesos de metilaciones y desmetilaciones ocurridas durante este periodo, si bien no existe una diferencia estadística entre la suma de cambios ocurridos en el tiempo entre el grupo de plantas control y tratadas (debido al bajo número de plantas control analizado), se observó un alto grado de correlación ($R^2=0,7949$) entre los porcentajes de cambios ocurridos en el tiempo en las plantas tratadas (Tabla 4.3) y los porcentajes de sexualidad expresados por cada individuo (detallados en el Capítulo II, Tabla 2.2). Los resultados de esta correlación se muestran en la Figura 4.6.

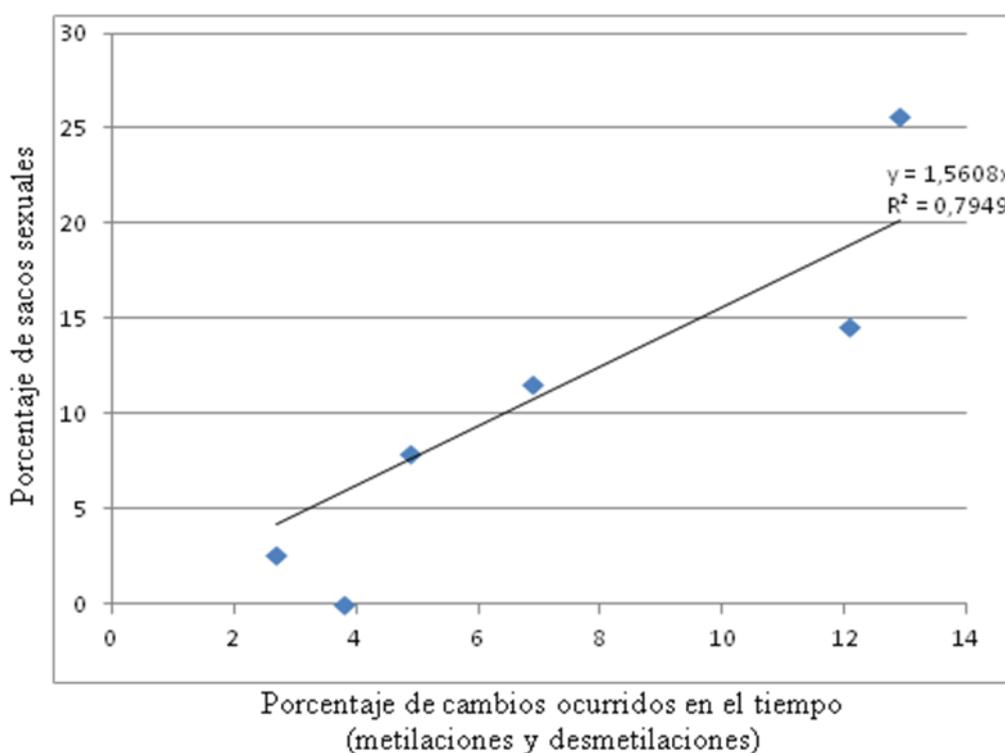


Figura 4.6: Correlación entre los porcentajes de cambios de metilación ocurridos en cada planta (Tabla 4.3 de este capítulo) y los porcentajes de expresión de sexualidad en esas plantas (Capítulo II, Tabla 2.2).

Esta correlación, junto con el análisis de datos anteriormente discutidos en este capítulo, revela una fuerte relación entre el estrés censado por la planta, los niveles de sexualidad expresados y la cantidad de cambios ocurridos por metilaciones y desmetilaciones en el tiempo. Este análisis permitiría evidenciar la existencia de una relación entre los

cambios epigenéticos, situaciones de estrés en los genomas vegetales y en cierta medida, nivel de expresión de la apomixis. Algunos autores especulan acerca de la persistencia y éxito ecológico de algunos linajes asexuales y las variaciones epigenéticas señalando una relación causal entre ambas situaciones. Estas últimas actuarían como fuente de plasticidad fenotípica y fuente de variación heredable (Latzel y Klimesova, 2010; Castonguay y Angers, 2012; Massicotte y Angers 2012; Richards *et al.*, 2012).

b) Estrés por hibridación

En el Capítulo III se detalló el origen de estas plantas y la evolución de su modo reproductivo en los primeros años luego de su obtención. La planta 60 mostró sólo reproducción sexual en las primeras evaluaciones y la aparición de un bajo porcentaje (1-3 %) de pistilos apomícticos en las últimas muestras evaluadas. En cambio, el híbrido apomíctico 105, presentó un amplio rango de variaciones en la relación apomixis-sexualidad entre las fechas de muestreo consideradas.

Se compararon muestras de ADN de las plantas 60 y 105 obtenidas durante el primer año (2010, ej: 60 y 105) y después de tres años (2013, ej: 60* y 105*) del establecimiento de las mismas. Se realizaron amplificaciones con siete combinaciones de cebadores AFLP (P40-M39, P40-M43, P40-M45, P37-M38, P37-M39, P37-M43, y P37-M45) sobre las plantas híbridas 60 (2010), 60* (2013), 105 (2010) y 105* (2013). En la comparación 60-60* se encontraron solo marcadores monomórficos (243), mientras que en la comparación de los perfiles 105-105* se observaron 295 marcadores monomórficos y 16 polimórficos (siguiendo la línea de tiempo, diez apariciones y seis desapariciones). Un ejemplo de amplificación típico se observa en la Figura 4.7.

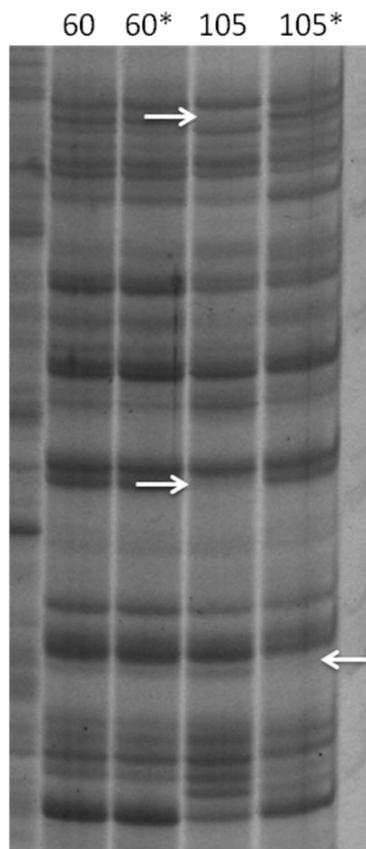


Figura 4.7: Patrones de amplificación de AFLP de las plantas híbridas de pasto llorón 60-60* y 105-105*. Las flechas indican polimorfismos, los cuales solo se observaron en la comparación 105-105*.

Este análisis mostró una gran estabilidad genómica de la planta 60 cuando se comparó el ADN del primer año de vida y luego de tres años. Respecto al híbrido 105, como se mencionara anteriormente, presentó elevado número de polimorfismos (5 %) evidenciando cambios pronunciados en su genoma en el mismo periodo. Estos datos podrían tener una relación directa con el comportamiento errático que se observó en los estudios citoembriológicos mostrados en el Capítulo III. Es posible que, ante la hibridación, los diferentes individuos de la progenie sobreviviente hayan sufrido reordenamientos genómicos de diferente magnitud que podrían afectar, en diferente medida, la expresión de varios genes, entre ellos los relacionados con el modo reproductivo. Es posible que algunos cambios en los perfiles genómicos sean puntuales mientras que zonas no son afectadas. Estudios realizados en *Hordeum vulgare* creciendo en medios de cultivo de alta salinidad demostraron que el estrés generado por el tratamiento provocó variaciones de nucleótidos en la zona de las raíces, pero no afectó

el ADN foliar (Demirkiran *et al.*, 2013). Con respecto a la planta 60, es posible que haya sido menos afectada por el estrés generado por esta cruce. Es difícil establecer la causa por la cual dos individuos provenientes de la misma cruce se vieran afectados de diferente manera en este sentido.

El análisis realizado con marcadores MSAP utilizando seis combinaciones de cebadores (HM6-E32, HM6-E37, HM6-E40, HM7-E32, HM7-E37 y HM7-E40) sobre los mismos ADNs utilizados en los análisis de AFLP. Arrojó los resultados detallados en la Tabla 4.4.

Con las seis combinaciones de marcadores MSAP utilizados se identificaron un total de 254 marcadores en el híbrido 60 y 287 en el híbrido 105. La gran mayoría de estos resultaron ser monomórficos en el tiempo en un rango del 92 % al 94 %.

Tabla 4.4. Variación de los perfiles MSAP en cada planta individual (híbridos 60 y 105) entre 2010-2013.

Perfil	Híbrido 60		Híbrido 105	
Ausencia de cambios en el tiempo	239	94,1%	265	92,3%
Metilaciones ocurridas en el tiempo	11	4,3%	5	1,7%
Desmetilaciones ocurridas en el tiempo	4	1,6%	17	5,9%
Marcadores totales	254	100%	287	100%

El híbrido 60, cuyo modo reproductivo se mantuvo más estable (entre 100 y 97 % sexual; Capítulo III, Tablas 3.2, 3.3 y 3.4) durante el periodo analizado muestra una mayor proporción de procesos de metilación, los cuales están asociados a generar un estado más estable del genoma (Sahu *et al.*, 2013). Sin embargo, los polimorfismos observados en el híbrido 105, quien mantuvo un comportamiento errático de su modo reproductivo (Capítulo III, Tablas 3.2, 3.3 y 3.4), tienen una tendencia mayoritaria hacia la desmetilación del ADN permitiendo una inestabilidad mayor en el genoma, que permitiría, este tipo de comportamiento reproductivo tan variante. Estos resultados muestran una posible relación entre el perfil de metilaciones y desmetilaciones de cada híbrido en comparación con el modo reproductivo. Además, sugieren que, después del evento de hibridación, un nuevo patrón epigenético fue rápidamente establecido, lo que podría influir en la plasticidad fenotípica y adaptación del híbrido a nuevos entornos.

c) Colchiploide UNST1131 y control (cv. Tanganyika INTA).

En trabajos anteriores se habían analizado las modificaciones genéticas y epigenéticas concurrentes en el genotipo UNST1131 en 2003 y 2007, periodo en el que se observó cambio en los niveles de apomixis. Tal como se mencionara en la introducción de esta tesis, este cultivar, obtenido por duplicación cromosómica, en un primer momento mostró progenies solo generadas por reproducción sexual y cuatro años después expresó un porcentaje de procesos sexuales de entre 10-15%. En el Capítulo II se analizó el modo reproductivo de este cultivar en años sucesivos (periodo 2009-2010) mostrando una expresión de sexualidad estable en estos valores.

En la presente tesis, se realizó un nuevo análisis comparativo de marcadores AFLP y MSAP en UNST1131 y el control cv. Tanganyika INTA durante los años 2007, 2011 y 2013.

De las siete combinaciones de cebadores AFLP utilizados (P40-M39, P40-M43, P40-M45, P37-M38, P37-M39, P37-M43, y P37-M45), se obtuvieron un total de 241 marcadores. Se observó una única banda polimórfica que significó una variación en el tiempo en la planta control (ausencia de banda en el año 2007 y presencia en 2011 y 2013). Los 240 marcadores restantes fueron monomórficos, evidenciando una gran estabilidad genética de los genotipos a través del tiempo durante este periodo.

El análisis de marcadores MSAP se realizó con seis combinaciones de cebadores (HM4-E37, HM4-E40, HM6-E32, HM6-E40, HM7-E32 y HM7-E40). De los 240 marcadores obtenidos, 26 fueron polimórficos entre plantas o entre años (Tabla 4.5). El análisis de los polimorfismos se realizó teniendo en cuenta si ocurrieron aumentos o disminuciones en la metilación con respecto a la muestra del año anterior, es decir que las comparaciones fueron 2011 vs. 2007 y 2013 vs. 2011. La aparición de polimorfismos ocurridos solo en el año 2011 se consideró como una variación doble ya que el perfil genético de la planta se modificó entre 2007 y 2011 pero también entre 2011 y 2013 revirtiéndose al estado inicial del año 2007.

Tabla 4.5: Variación en los perfiles de MSAP en el genotipo UNST1131 y en el control cv. Tanganyika entre 2007-2011 y 2011-2013.

Perfil	cv. Tanganyika		UNST1131	
	2007-2011	2011-2013	2007-2011	2011-2013
Metilaciones	9	6	1	3
Desmetilaciones	2	8	1	6

De 240 loci detectados, la planta UNST1131 en el periodo 2007-2011 sufrió una metilación y una desmetilación y en el periodo 2011-2013 sufrió tres metilaciones y seis desmetilaciones. Con respecto a la planta Tanganyika, en el periodo 2007-2011 sufrió nueve metilaciones y dos desmetilaciones y en el periodo 2011-2013 sufrió seis metilaciones y ocho desmetilaciones. Estos valores son muy inferiores a los hallados en el periodo 2003-2007 (17% en Tanganyika y 15% en UNST1131). Si asociamos que en el periodo 2003-2007 hubo un cambio importante en la expresión del carácter apomixis y en el periodo evaluado en la presente tesis el modo reproductivo se mantuvo estable se puede advertir que hay una asociación entre la cantidad de cambios de metilación en el genoma y alteraciones en el modo reproductivo.

Las comparaciones entre las plantas mostraron que cinco loci fueron metilados en Tanganyika en 2011, pero no se vieron afectados en UNST1131. Los mismos cinco loci fueron desmetilados en Tanganyika en 2013. El resto de los loci polimórficos se vieron afectados en las dos plantas de la siguiente manera: un locus fue desmetilado en 2011 y dos loci en 2013 tanto en la planta Tanganyika como en UNST1131. En relación a las metilaciones, un locus fue metilado en Tanganyika y UNST1131 (2013), un locus en Tanganyika (2011) y el mismo locus en UNST1131 dos años más tarde (2013). Otro locus experimento la misma situación, pero en UNST1131 (2011) y más tarde en Tanganyika (2013). Otras metilaciones y desmetilaciones también ocurrieron en loci independientes.

Con los marcadores AFLPs y MSAPs obtenidos de los perfiles genéticos y epigenéticos se construyeron matrices de similitud para los periodos 2003-2007 y 2007-2011-2013. Los resultados obtenidos se observan en la Figura 4.8.

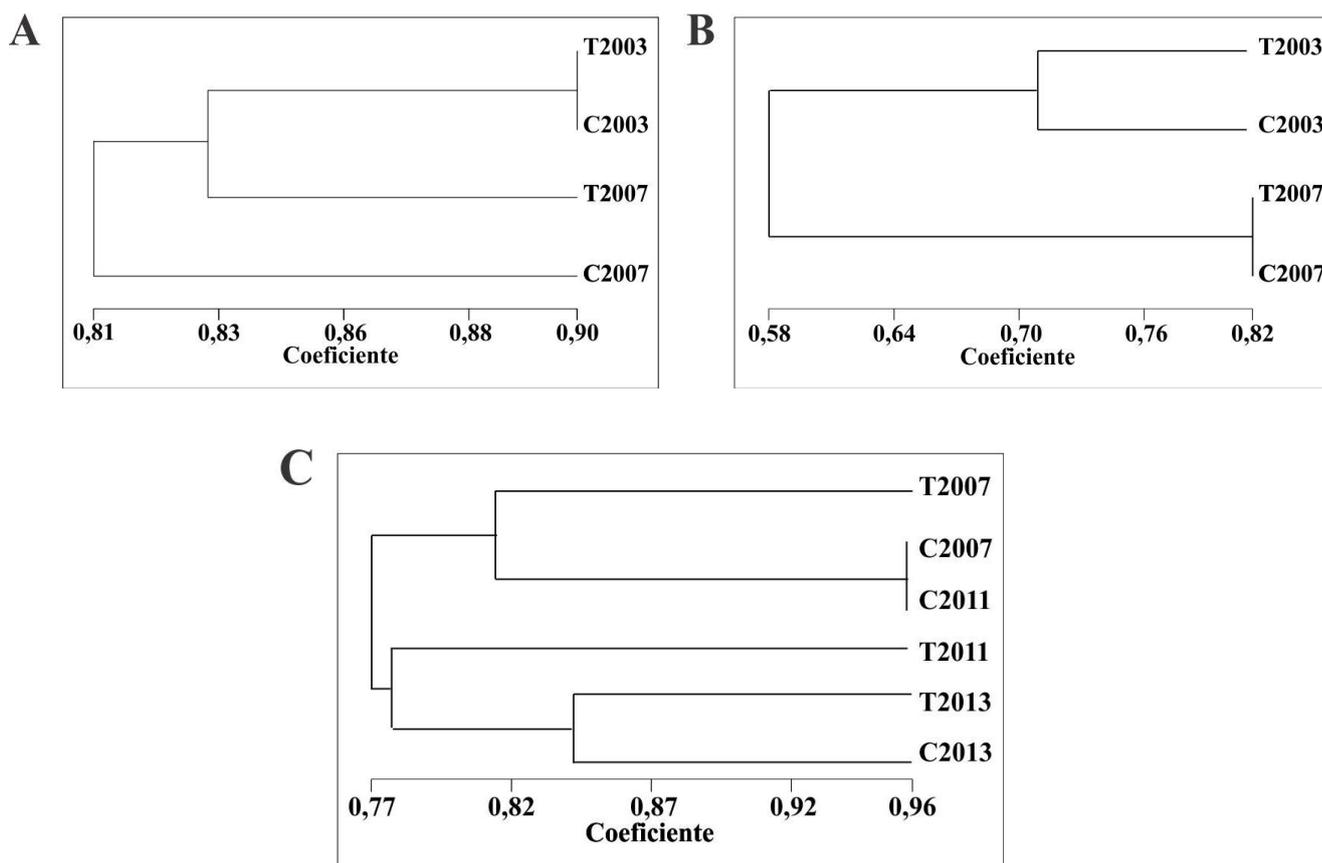


Figura 4.8: Dendrogramas de marcadores genéticos y epigenéticos en el genotipo UNST1131 (C) y en el control cv. Tanganyika INTA (T). Dendrogramas obtenidos por AFLP (A) y MSAPs (B) a partir de muestras recogidas en los años 2003 y 2007 y MSAPs (C) a partir de muestras recogidas en los años 2007, 2011 y 2013.

La comparación de los coeficientes de similitud obtenidos a partir de los marcadores MSAP permitió evidenciar que el nivel de variación ocurrido durante el periodo 2007-2011-2013 fue menor que el sucedido durante el periodo 2003-2007 mostrando diferencias menores en sus niveles de metilación. Este análisis demostró que con el tiempo las plantas tienden a estabilizar sus epigenomas llegando a un estado de metilación similar. Estos resultados concuerdan con los informados por varios autores (Smulders y Klerk, 2011, Kovarik *et al.*, 1997) quienes también observan una disminución en los niveles de metilación a medida que el estrés cesa.

Análisis de secuenciación

Una muestra representativa de los polimorfismos obtenidos por MSAP y AFLP en los ensayos a) y b) de este capítulo fueron secuenciados con el objetivo de caracterizar las regiones que sufrían cambios en su epigenoma y genoma respectivamente.

En el caso del ensayo a), se analizaron polimorfismos en los patrones de metilación pertenecientes a las comparaciones en el tiempo de los clones durante la situación de estrés hídrico y luego de que este cesara. En el ensayo b) se analizaron los polimorfismos en el tiempo entre los patrones genómicos del híbrido 105 expresados al comienzo (2010) y final (2013) del ensayo. Los análisis de secuenciación de polimorfismos en el tiempo se detallan en la tabla 4.6.

Tabla 4.6: Análisis de polimorfismos en el tiempo en plantas del cv. Tanganyika INTA tratadas por estrés hídrico y luego de cesado el estrés (MSAP) y plantas híbridas 105 al momento de su obtención y al finalizar el ensayo luego de tres años (AFLP).

# de polimorfismo ^a	Proceso en el tiempo	pb ^b	Blast	Base de datos ^c	N° de accesión	Score	Valor E
MSAP 2	Desmetilación	376	---NA---				
MSAP 4	Desmetilación	192	---NA---				
MSAP 5	Polimorf. entre individuos	184	putative senescence-associated protein [<i>Pisum sativum</i>]	nt	BAB33421.1	115	1e ⁻²⁹
MSAP 13	Desmetilación	314	retrotransposon protein, putative, unclassified [<i>Oryza sativa</i> Japonica Group]	nt	AAP53315.2	100	5e ⁻²²
MSAP 14	Desmetilación	310	LTR_AC194187.3_3806 [<i>Zea mays</i>]	MIPS	RLX_43579	168	2e ⁻⁴⁰
MSAP 15	Desmetilación	300	retrotransposon protein, putative, unclassified [<i>Oryza sativa</i> Japonica Group]	nt	AAP53315.2	107	1e ⁻²⁴
MSAP 20	Desmetilación	197	---NA---				
MSAP 22	Metilación	272	---NA---				
MSAP 23	Metilación	167	---NA---				
AFLP 2	Aparición	178	---NA---				
AFLP 8	Desaparición	266	---NA---				
AFLP 9	Aparición	220	Photosystem I reaction center subunit XI, chloroplast precursor [<i>Oryza sativa</i>]	nt	ABG21996.1	80.1	1e ⁻¹⁶

^a: Número del polimorfismo clonado.

^b: Longitud del fragmento secuenciado (en pares de bases).

^c: Base de datos utilizadas para realizar el análisis de blast. nt: NCBI (National Center for Biotechnology Information) ; MIPS: Repeat Element Database.

La comparación de polimorfismos epigenéticos en el tiempo demostró una alta proporción (55 %) de secuencias sin homología con regiones codificantes demostrando una alta tasa de procesos de metilación y desmetilación en regiones no codificantes o secuencias del genoma aun no reportadas. De las secuencias con homología se observaron tres secuencias homólogas a elementos transponibles. Dos de ellas presentaron alta identidad (97 %) entre sí, indicando que podría tratarse de regiones repetitivas conservadas. De los polimorfismos secuenciados por marcadores AFLP en el híbrido 105 solo en un caso se halló homología con una proteína, las otras secuencias no produjeron match con las secuencias de las bases de datos indicando modificaciones en el tiempo en regiones no codificantes del genoma.

Los datos anteriores muestran gran similitud a estudios previos de MSAP en la planta UNST1131, que fue obtenida por duplicación cromosómica, donde gran parte de los polimorfismos encontrados y clonados tuvieron homología con secuencias repetitivas (Zappacosta et al., 2014). Otro trabajo comparativo de nuestro grupo de trabajo (Romero *et al.*, en elaboración) sobre las librerías de ESTs obtenidas de panojas de la planta UNST1131, del diploide UNST1122 y de panojas y hojas de la planta control del cv. Tanganyika mostraron resultados similares. En dicho estudio se analizaron y caracterizaron las secuencias repetitivas hallándose que el porcentaje de ellas fue mayor en la librería de hoja, la cual estuvo compuesta relativamente por un mayor porcentaje de retrotransposones de tipo Copia. Las librerías de inflorescencias presentaron un mayor porcentaje relativo de retrotransposones de tipo Gypsy y entre ellas las panojas de la planta UNST1131 presentaron mayor cantidad que las otras panojas.

Estos análisis comparativos, en su conjunto, sugieren la existencia de cambios en el genoma y epigenoma de estas plantas en el tiempo que evidenciarían la existencia de una cierta plasticidad en sus genomas. Dado su carácter perenne, es probable que esta plasticidad les permita reacomodarse y enfrentar situaciones ambientales cambiantes. Estos resultados, en su conjunto, coinciden con los estudios realizados por Verhoeven *et al.* (2010) sobre los perfiles de metilación del ADN en clones apomícticos de diente de león (*Taraxacum officinale*) sometidos a estreses ambientales los cuales revelaron que la fracción de loci alterada en grupos estresados era mucho más alto que en el grupo control.

Si bien los cambios epigenéticos son a menudo temporales y las plantas pueden revertir al fenotipo normal de forma relativamente fácil, algunos de estos cambios pueden ser de larga duración, e incluso pueden ser transferidos a la progenie (Brettell y Dennis 1991). 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 resultados similares a los hallados en la presente tesis. 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 *A. thaliana* (Ruiz-García *et al.*, 2005).

CONSIDERACIONES FINALES

A lo largo de su vida, las plantas deben enfrentar una serie de situaciones ambientales cambiantes que generan situaciones de estrés. Para sobrevivir ante tales situaciones han desarrollado estrategias que les permiten sobrevivir y asegurar descendencia para perpetuar la especie. Poder dejar descendencia y generar variabilidad para hacer frente a condiciones cambiantes del ambiente es crucial.

Los resultados expuestos en esta tesis demuestran la existencia de una relación entre situaciones que generan estreses genómicos y la expresión de la apomixis en materiales tetraploides de *E. curvula*. Se pudo demostrar que diferentes situaciones que generan estrés genómico (estrés por déficit hídrico, cultivo in vitro, poliploidización e hibridación), producen incrementos en el número de sacos embrionarios del tipo *Polygonum* en plantas apomícticas tetraploides de pasto llorón. Resultados similares fueron informados por otros autores, como por ejemplo Ceplitis (2001), quien trabajando en *Allium vineale* encontró que la proporción de semilla sexual y apomíctica parece resultar de una compleja relación entre genes y ambiente y que la variación genética entre diferentes cultivares afecta directamente esta proporción en condiciones de campo. Resultados similares fueron hallados en diferentes especies, por lo cual podría considerarse que estos son mecanismos generalizados en los organismos con capacidad de “optar” por diferentes sistemas reproductivos. Más aún, Carman *et al.* (2011) postulan la existencia de una correlación entre el modo reproductivo de plantas facultativas con situaciones de estrés. Aliyu *et al.* (2010) realizaron trabajos en *Boechera* y también concuerdan en que la asignación de una vía sexual o asexual en plantas facultativas está determinada, en gran medida, por interacciones genotipo-ambiente.

Al igual que en las plantas apomícticas facultativas, en animales, la sexualidad suele predominar en condiciones desfavorables en función del ciclo asexual. El deterioro de las condiciones ambientales que los rodean (por ejemplo, condiciones ambientales extremas, agotamiento de recursos y/o aglomeración) suelen desencadenar en la producción de machos y hembras por vías sexuales (Snell y Boyer, 1988; Simon *et al.*, 2010), demostrando que esta estrategia reproductiva no se trata de un carácter exclusivo del reino vegetal.

La presencia de modificadores que afectan la expresión de la apomixis, sugerida por Bicknell *et al.* (2000) y Koltunow *et al.* (2000), pueden afectar no sólo a genotipos

apomícticos para mantener un cierto nivel de reproducción sexual, sino también a la plasticidad de este carácter (Houliston *et al.*, 2006). De acuerdo a estos autores, 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).

Estudios de expresión de genes en plantas apomícticas y sexuales de *E. curvula* (Cervigni *et al.*, 2008; Selva *et al.*, 2012) mostraron que algunos de los genes diferencialmente expresados por modo reproductivo y/o ploidía están asociados a respuestas a estrés. Estos autores señalan entre los genes diferenciales, por ejemplo: elementos repetitivos, proteínas quinasas, proteínas ribosomales, factores de transcripción, entre otros. Resultados similares fueron hallados en otras especies como *Poa pratensis* (Albertini *et al.*, 2004), *Paspalum notatum* (Laspina *et al.*, 2008), *Pennisetum squamulatum* (Conner *et al.*, 2008), *Cenchrus ciliare* (Conner *et al.*, 2008), *Panicum maximum* (Yamada-Akiyama *et al.*, 2009) y *Paspalum simplex* (Polegri *et al.*, 2010; Calderini *et al.*, 2011).

Los resultados presentados en esta tesis, junto con datos previos obtenidos por nuestro grupo de trabajo, indicarían que las plantas de *E. curvula* que se reproducen por apomixis facultativa, ante circunstancias que parecen ocasionar estrés genómico, aumentan la proporción de reproducción sexual. Además, en tres de los modelos, si se retorna a la condición previa al estrés, la sexualidad baja a niveles más cercanos al control. Estos resultados demuestran, de manera contundente, una relación estrecha entre las condiciones ambientales y la expresión de la apomixis-sexualidad en pasto llorón. Aunque se desconoce el mecanismo que regula esta expresión, pueden citarse numerosos ejemplos de caracteres que son regulados por el ambiente y que esta regulación esta mediada, generalmente, por mecanismos epigenéticos como los pequeños ARNs (Massuelli y Marfil, 2011).

Los pequeños ARNs son una clase de ARNs reguladores que controlan una amplia variedad de procesos biológicos en plantas y animales. En plantas, varias clases de pequeños ARNs han sido descritos, pero las más abundantes son los microARNs (miRNAs) y los pequeños ARNs de interferencia (siRNAs). Además de participar en el crecimiento, desarrollo y en procesos de control de la integridad del genoma, los pequeños ARNs son componentes importantes en la respuesta de las plantas a factores

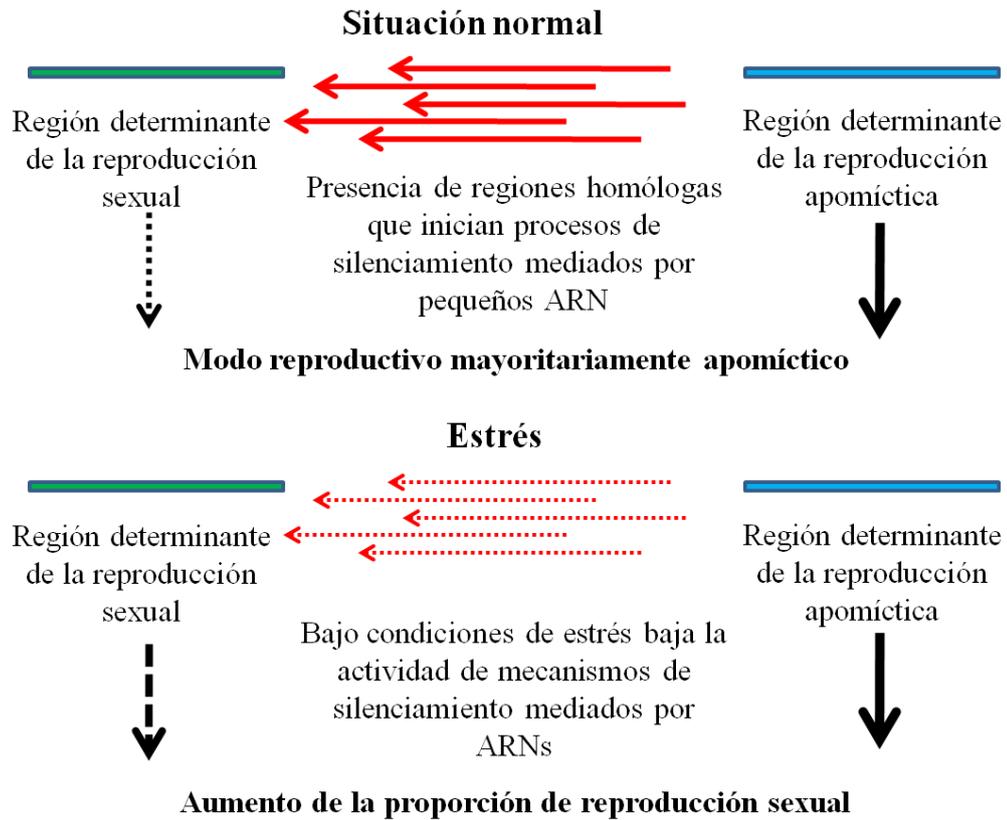
de estrés abiótico como la sequía, temperaturas elevadas o bajas, deficiencia o exceso de nutrientes, salinidad y altas concentraciones de CO₂ (Tuteja *et al.*, 2014). Una de las vías que las plantas poseen para responder a estreses es por la modificación de la expresión génica (metilación del ADN, modificación de histonas) a través de pequeños ARNs. Los miRNAs actúan postranscripcionalmente a través de la degradación de ARN mensajeros o la represión transcripcional, mientras que los siRNAs funcionan transcripcionalmente o postranscripcionalmente a través de la metilación del ADN, modificación de histonas y degradación de ARNm (Guleria *et al.* 2011).

Los miRNAs se unen a regiones codificantes de proteínas en su ARNm blanco e inducen la degradación de este vía mecanismos donde las proteínas ARGONAUTA (AGO) cortan la doble hebra formada por el miRNA y el ARNm y de esta forma reprimen la expresión del ARNm blanco (Rhoades *et al.*, 2002). Varios estudios recientes vinculan a los miRNAs con mecanismos como el crecimiento radicular, repuestas a estrés biótico y abiótico, diferenciación de órganos florales, control de la formación de las gametas y desarrollo reproductivo (Subramanian *et al.*, 2009, Olmedo-Monfil *et al.*, 2010; Jones-Rhoades y Bartel, 2004, Amiteye *et al.*, 2011).

Dada la relación entre la apomixis y el ambiente, podría especularse que los genes involucrados en el modo reproductivo son controlados por factores epigenéticos como la metilación del ADN. En el caso del modo reproductivo, se han hallado factores epigenéticos que participan en las interacciones intercelulares que llevan al establecimiento del número y destino de las células reproductivas. En *A. thaliana*, en lugar de una sola CMM como sucede en el genotipo salvaje, en el mutante ago9 se forman múltiples CMM (Durán-Figueroa y Vielle-Calzada, 2010; Olmedo-Monfil *et al.*, 2010). AGO9 se expresa solo en tejidos reproductivos y es homólogo a AGO4 (Le Trionnaire *et al.*, 2011), el cual es expresado constitutivamente en el esporofito y está asociado a pequeños ARNs de interferencia que dirigen la metilación de ADN basada en ARN, RdDM (Simon y Meyers, 2011). Es de destacar que AGO9 no se expresa en la CMM, sino en las células somáticas que la rodean, esto lleva a proponer que los siRNAs se transfieren a la CMM desde las células de la nucela restringiendo su proliferación por mitosis (Olmedo-Monfil *et al.*, 2010). Varios autores (Aravin y Bourchis, 2008; Juliano *et al.*, 2011) indican un rol de las ARN polimerasas dependientes de ARN en la regulación de la diferenciación de la CMM, en donde participan mecanismos de

silenciamiento de elementos transponibles. El silenciamiento de elementos transponibles y/o el establecimiento de un estado específico en la heterocromatina pueden ser esenciales para la progresión de la meiosis en eucariotas multicelulares y quizás sean los determinantes del desencadenamiento de un desarrollo sexual o apomítico (Feng *et al.*, 2013).

Como se ha mencionado previamente, existe una estrecha vinculación entre la reproducción sexual y apomítica y el *switch* entre ambos sistemas reproductivos estaría en mecanismos regulatorios mediados por procesos epigénéticos. Los resultados aquí presentados y los previos obtenidos por el grupo de trabajo nos permiten hipotetizar que existe una región determinante de la apomixis, que estaría ausente en las plantas tetraploides sexuales. La misma podría contener regiones repetitivas y con redundancia génica que estarían silenciando la sexualidad en plantas apomíticas, es decir que, esta región y la región condicionante de la sexualidad tendrían características estructurales comunes. Otros autores han mapeado una región de estas características en los géneros apomíticos *Pennisetum* y *Paspalum* (Ozias-Akins *et al.*, 2003; Calderini *et al.*, 2006, Ortiz *et al.*, 2013), es decir, con abundancia de elementos repetitivos y baja recombinación. Existen numerosas evidencias sobre el control mediado por pequeños ARNs en el silenciamiento de regiones repetitivas y elementos transponibles (Guleria *et al.*, 2011). De acuerdo a nuestra hipótesis, ante determinadas circunstancias, como condiciones de estrés prolongado, esta represión de la región de la apomixis sobre la sexualidad se desregularía, permitiendo un aumento en la proporción de procesos sexuales. En base a lo anteriormente discutido, la Figura CF 1 plantea un modelo hipotético del control de la expresión de la reproducción apomítica / sexual en pasto llorón:



— Nivel de expresión

Figura CF 1: Modelo hipotético del control de la expresión de la reproducción apomítica / sexual en plantas apomíticas facultativas de pasto llorón

Nuestro grupo de trabajo se halla abocado al análisis cuali-cuantitativo de los pequeños ARNs presentes en inflorescencias de plantas apomíticas y sexuales de pasto llorón y sus posibles transcritos blanco. Para ello, hemos realizado una secuenciación del transcriptoma (plataforma 454 Roche) y de pequeños ARNs (Plataforma Illumina). Esperamos que la información recopilada y analizada nos permita confirmar esta hipótesis.

BIBLIOGRAFÍA

- Acuña CA, Blount AR, Quesenberry KH, Kenworthy KE, Hanna WW (2009). Bahiagrass tetraploid germplasm: reproductive and agronomic characterization of segregating progeny. *Crop Science* 49:581-588.
- Acuña CA, Blount AR, Quesenberry KH, Kenworthy KE, Hanna WW (2011). Tetraploid bahiagrass hybrids: breeding technique, genetic variability and proportion of heterotic hybrids. *Euphytica* 179:227-235.
- Adams KL, Wendel JF (2005). Novel patterns of gene expression in polyploid plants. *Trends in Genetics* 21:539-543.
- Aina R, Sgorbati S, Santagostino A, Labra M, Ghiani A, Citterio S (2004). Specific hypomethylation of DNA is induced by heavy metals in white clover and industrial hemp. *Physiologia Plantarum* 121:472-480.
- Albertini E, Barcaccia G, Mazzucato A, Sharbel TF, Falcinelli M (2010). Apomixis in the era of biotechnology. En: Pua EC, Davey MR (eds) *Plant developmental biology-Biotechnological perspectives*, vol 1. Springer, Berlin, pag. 405-436.
- Albertini E, Marconi G, Barcaccia G, Raggi L, Falcinelli M (2004). Isolation of candidate genes for apomixis in *Poa pratensis* L. *Plant Molecular Biology* 56:879-894.
- Albertini E, Porceddu A, Ferranti F, Reale L, Barcaccia G, Falcinelli M (2001). Apospory and parthenogenesis may be uncoupled in *Poa pratensis* L: cytological and genetic evidences. *Sexual Plant Reproduction* 14:213-217.
- Aliyu O, Schranz M, Sharbel T (2010). Quantitative variation for apomictic reproduction in the genus *Boechera*. *American Journal of Botany* 97:1719-1731.
- Altschul S, Madden T, Schäffer A, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman D (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*. 25:3389-3402.
- Amiteye S, Corral J, Vogel H, Sharbel T (2011). Analysis of conserved microRNAs in floral tissues of sexual and apomictic *Boechera* species. *BMC Genomics*, 12:500.
- Angers B, Castonguay E, Massicotte R (2010). Environmentally induced phenotypes and DNA methylation: how to deal with unpredictable conditions until the next generation and after. *Molecular Ecology* 19:1283-1295.
- Aravin A, Bourc'his D (2008). Small RNA guides for de novo DNA methylation in mammalian germ cells. *Genes & Development* 22:970-975.
- Arnholdt-Schmitt B (2000). RAPD analysis: a method to investigate aspects of the reproductive biology of *Hieracium perforatum*. *Theoretical and Applied Genetics* 100:906-911.

- Aroca R, Vernieri P, Ruiz-Lozano JM (2008). Mycorrhizal and non-mycorrhizal *Lactuca sativa* plants exhibit contrasting responses to exogenous ABA during drought stress and recovery. *Journal of Experimental Botany* 59:2029-2041.
- Asker S, Jerling L (1992). *Apomixis in plants*. CRC Press, Boca Raton, USA.
- Avise JC (2008). *Clonality: The Genetics, Ecology and Evolution of Sexual Abstinence in Vertebrate Animals*. Oxford University Press, Oxford.
- Baimiev AKh, Matniyazov RT, Gimalov FR (2000). Dynamics of abscisic acid content in cabbage seedlings during cold acclimation, Immunoanaliz regulyatorov rosta v reshenii problem fiziologii rastenii, rastenievodstvai biotekhnologii (Immunoassay of Growth Regulators for Plant Physiology, Plant Industry, and Biotechnology), Ufa, pag. 223.
- Baránek M, Krizan B, Ondrusíková E, Pidra M (2010). DNAmethylation changes in grapevine somaclones following *in vitro* culture and thermotherapy. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 101:11-22.
- Barcaccia G, Mazzucato A, Albertini E, Zethof J, Gerats A, Pezzotti M, Falcinelli M (1998). Inheritance of parthenogenesis in *Poa pratensis* L.: auxin test and AFLP linkage analyses support monogenic control. *Theoretical and Applied Genetics* 97:74–82.
- Baubec T, Dinh HQ, Pecinka A, Rakic B, Rozhon W, Wohlrab B, Scheid OM (2010). Cooperation of multiple chromatin modifications can generate unanticipated stability of epigenetic states in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 22:34-47.
- Baulcombe D (2004). RNA silencing in plants. *Nature* 431:356-363.
- Bell G (1982). *The masterpiece of nature: the evolution and genetics of sexuality*. California Press, Berkely, CA.
- Bencivenga S, Colombo L, Masiero S (2011). Cross talk between the sporophyte and the megagametophyte during ovule development. *Sexual Plant Reproduction* 24:113-121.
- Bennett HW, Bashaw EC (1966). Interspecific hybridization with *Paspalum* spp. *Crop Science* 6:52-58
- Berman J, Hadany L (2012). Does stress induce (para)sex? Implications for *Candida albicans* evolution. *Trends in Genetics* 28:197-203.
- 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. 2:8-23.

- Bicknell RA, Bicknell K (1999). Who will benefit from apomixis? *Biotechnology and Development Monitor* 37:17-20.
- Bicknell RA, Borst NK, Koltunow AM (2000). Monogenic inheritance of apomixis in two *Hieracium* species with distinct developmental mechanisms. *Heredity* 84:228-237.
- Blanc G, Wolfe KH (2004). Widespread paleopolyploidy in model plant species inferred from age distributions of duplicate genes. *Plant Cell* 16:1667-1678.
- Blumwald E, Grover A, Good AG (2004). Breeding for abiotic stress resistance: challenges and opportunities. In *New directions for a diverse planet*?. Proceedings of the 4th International Crop Science Congress, Brisbane, Australia.
- Bonilla J, Quarin C (1997). Disporous and aposporous apomixis in a pentaploid race of *Paspalum minus*. *Plant Science* 127:97-104.
- Boyer J (1982). Plant productivity and environment. *Science* 218:443-448.
- Bradshaw AD (1965). Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants. *Advances in Genetics* 13:115-155.
- Bray EA (1997). Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Science* 2:48-54.
- Brix K (1974). Sexual reproduction in *Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees. *Z. Pflanzenzuchtg* 71:25-32.
- Brown W, Emery W (1958). Apomixis in the Gramineae: Panicoideae. *Amer. J. Bot.* 45:253-263.
- Bruun HH, Scheepens JF, Tyler T (2007). An allozyme study of sexual and vegetative regeneration in *Hieracium pilosella*. *Canadian Journal of Botany* 85:10-15.
- Burson BL (1983). Phylogenetic investigations of *Paspalum dilatatum* and related species. In: Smith JA, Hays VW (eds) *Proceedings of the 14th International Grassland Congress*. Westview, Boulder, pag. 170–173
- Burson BL (1991). Genome relationships between tetraploid and hexaploid biotypes of dallisgrass *Paspalum dilatatum*. *Botanical Gazette* 152:219-223
- Burson B, Tischler C (1993). Regeneration and somaclonal variation in apomictic *Paspalum dilatatum* Poir. *Euphytica* 67:71-8.
- Burson BL, Voigt PW (1996). Cytogenetic Relationships between the *Eragrostis curvula* and *E. lehmanniana* complexes. *International Journal of Plant Sciences*, 632-637.

- Burton GW (1982). Effect of environment on apomixis in bahiagrass. *Crop Science* 22:109-111.
- Busey P, Wright N (1978). Sexual reproduction expressed in *Eragrostis curvula*. *Journal of Arizona-Nevada Academic Science* 13:62-64.
- Cabuslay GS, Ito O, Alejar AA (2002). Physiological evaluation of responses of rice (*Oryza sativa* L.) to water deficit. *Plant Science* 163:815-827.
- Calderini O, Chang S, de Jong H, Busti A, Paolocci F, Arcioni S, de Vries S, Abma-Henkens M, Klein Lankhorst R, Donnison I, Pupilli F (2006). Molecular cytogenetics and DNA sequence analysis of an apomixis-linked BAC in *Paspalum simplex* reveal a non pericentromere location and partial microcollinearity with rice. *Theoretical and Applied Genetics* 112:1179-1191.
- Calderini O, Donnison I, Polegri L, Panara F, Thomas A, Arcioni S, Pupilli F (2011). Partial isolation of the genomic region linked with apomixis in *Paspalum simplex*. *Molecular Breeding* 28:265-276.
- Campbell CS, Dickinson TA (1990). Apomixis, patterns of morphological variation, and species concepts in subfam. Maloideae (Rosaceae). *Systematic Botany* 15:124-135.
- Capy P, Gasperi G, Biéumont C, Bazin C (2000). Stress and transposable elements: co-evolution or useful parasites?. *Heredity* 85:101-106.
- Cardone S, Polci P, Selva JP, Mecchia M, Pessino S, Hermann P, Cambi V, Voigt P, Spangenberg G, Echenique V (2006). Novel genotypes of the subtropical grass *Eragrostis curvula* the study of apomixis. *Euphytica* 151:263-272.
- Carman JG (1997). Asynchronous expression of duplicate genes in angiosperms may cause apomixis, bispory, tetraspory, and polyembryony. *Biological Journal of the Linnean Society* 61:51-94.
- Carneiro V, Dusi D, Ortiz JP (2006). Apomixis: advances, applications and improvements. En: *Advances in Floriculture, Ornamentals and Plant Biotechnologies*. Teixeira Da Silva J (Ed). Global Science Publisher, Japan.
- Castonguay E, Angers B (2012). The key role of epigenetics in the persistence of asexual lineages. *Genetics Research International* 2012:534289.
- Catanach AS, Erasmuson SK, Podivinsky E, Jordan BR, Bicknell R (2006). Deletion mapping of genetic regions associated with apomixis in *Hieracium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 103:18650-18655.
- Cecchetti V, Altamura MM, Falasca G, Costantino P, Cardarelli M (2008). Auxin regulates *Arabidopsis* anther dehiscence, pollen maturation, and filament elongation. *Plant Cell* 20:1760-1774.

- Ceplitis A (2001). Genetic and environmental factors affecting reproductive variation in *Allium vineale*. *Journal of Evolutionary Biology* 14:721-730.
- Cervigni GD, Paniego N, Pessino S, Selva JP, Zappacosta D, Spangenberg G, Echenique V (2008b). Gene expression in diplosporous and sexual *Eragrostis curvula* genotypes with differing ploidy levels. *Plant Molecular Biology* 67:11-23
- Cervigni GD, Paniego N, Diaz M, Selva JP, Zappacosta D, Zanazzi D, Landerreche I, Felitti S, Pessino S, Spangenberg G, Echenique V (2008a). 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.
- Chandler PM, Robertson M (1994). Gene expression regulated by abscisic acid and its relation to stress tolerance. *Annual Review of Plant Biology* 45:113-141.
- Chen ZJ (2007). Genetic and epigenetic mechanisms for gene expression and phenotypic variation in plant polyploids. *Annual Review of Plant Biology* 58:377-406.
- Chen ZJ (2010). Molecular mechanisms of polyploidy and hybrid vigor. *Trends in Plant Science* 15:57-71.
- Chen ZJ, Ni ZF (2006). Mechanisms of genomic rearrangements and gene expression changes in plant polyploids. *Bio-Essays* 28:240-52.
- Cheng W, Endo A, Zhou L, Penney J, Chen H, Leon P, Nambara E, Asami T, Seo M, Koshiba T, Sheen J (2002). A unique shortchain dehydrogenase/reductase in *Arabidopsis* glucose signaling and abscisic acid biosynthesis and functions. *Plant Cell* 14:2723-2743.
- Chinnusamy V, Zhu JK (2009). Epigenetic regulation of stress responses in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 12:1-7.
- CIMMYT (2006). Protocolos de laboratorio: Laboratorio de genética molecular aplicada del CIMMYT. Tercera edición, CIMMYT, Méjico D. F., Méjico.
- Coen ES, Carpenter R, Martin C (1986). Transposable elements generate novel spatial patterns of gene expression in *Antirrhinum majus*. *Cell* 47:285-296.
- Colom M, Vazzana C (2001). Drought stress effects on three cultivars of *Eragrostis curvula*: photosynthesis and water relations. *Plant Growth Regulation* 34:195-202.
- Colot V, Rossignol JL (1999). Eukaryotic DNA methylation as an evolutionary device. *Bioessays* 21:402-411.
- Comai L (2005). The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nature Reviews Genetics* 6:836-846.

- Conner JA, Goel S, Gunawan G, Cordonnier-Pratt MM, Johnson VE, Liang C, Wang H, Pratt LH, Mullet JE, DeBarry J, Yang L, Bennetzen JL, Klein PE, Ozias-Akins P (2008). Sequence analysis of bacterial artificial chromosome clones from the apospory-specific genomic region of *Pennisetum* and *Cenchrus*. *Plant physiology* 147:1396-1411.
- Cookson S, Radziejwoski A, Granier C (2006). Cell and leaf size plasticity in *Arabidopsis*: what is the role of endoreduplication?. *Plant, Cell & Environment* 29:1273-1283.
- Correia B, Valledor L, Meijon M, Rodriguez JL, Dias MC, Santos C, Canal MJ, Rodriguez R, Pinto G (2013). Is the interplay between epigenetic markers related to the acclimation of cork oak plants to high temperatures? *PLoS ONE* 8:e53543.
- Corral JM, Vogel H, Aliyu OM, Hensel G, Thie, T, Kumlehn J, Sharbel TF (2013). A conserved apomixis-specific polymorphism is correlated with exclusive exonuclease expression in premeiotic ovules of apomictic *Boechera* species. *Plant Physiology* 163:1660-1672.
- Cosendai AC, Hörandl E (2010). Cytotype Stability, Facultative Apomixis and Geographical Parthenogenesis in *Ranunculus kuepferi* (Ranunculaceae). *Annals of Botany* 105:457-470.
- Cosendai AC, Wagner J, Ladinig U, Rosche C, Hörandl E (2013). Geographical parthenogenesis and population genetic structure in the alpine species *Ranunculus kuepferi* (Ranunculaceae). *Heredity* 110:560-569.
- 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, Cairnie A (1985). El Pasto Llorón. Manual con Información Básica y Normas para su Cultivo y Utilización. Editorial Hemisferio Sur, Buenos Aires, Argentina, 76 pag.
- 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) 3:24-43.
- Crismani W, Girard C, Mercier R (2013). Tinkering with meiosis. *Journal of Experimental Botany* 64:55-65.
- Cui LY, Wall PK, Leebens-Mack JH, Lindsay BG, Soltis DE (2006). Widespread genome duplications throughout the history of flowering plants. *Genome Research* 16:738-749.

- Cullis CA (1973). DNA differences between flax genotrophs. *Nature* 243:515-516.
- Cullis CA (2003). The environment as an active generator of adaptive genomic variation. En: *Plant Adaptations to Stress Environments*, Lerner H (Ed), pag. 149-160.
- Curtis MD, Grossniklaus U (2007). Amphimixis and apomixis: two sides of the same coin. En: Hörandl E, Grossniklaus U, Van Dijk P, Sharbel T (eds) *Apomixis: evolution, mechanisms and perspectives*. A.R.G. Gantner Verlag, Ruggell, Liechtenstein, pag. 37–62.
- Davies L, Cohen D (1992). Phenotypic variation in somaclones of *Paspalum dilatatum* and their seedling offspring. *Canadian Journal of Plant Science* 72:773-784.
- de Jong M, Leyser O (2012). Developmental plasticity in plants. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 77:63-73.
- De Smet I, Zhang H, Inzé D, Beeckman T (2006). A novel role for abscisic acid emerges from underground. *Trends in Plant Science* 11:434-439.
- Dellaporta SL, Chomet PS, Mottinger JP, Wood JA, Yu SM, Hicks JB (1984). Endogenous transposable elements associated with virus infection in maize. *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology* 49:321-328.
- Demirkiran A, Marakli S, Temel A, Gozukirmizi N (2013). Genetic and epigenetic effects of salinity on in vitro growth of barley. *Genetics and molecular biology* 36:566-570.
- do Valle CB, Savidan YH (1996). Genetics, cytogenetics, and reproductive biology of *Brachiaria*. In: Miles JW, Maass BL, do Valle CB (eds). *Brachiaria: Biology, Agronomy and Improvement*. CIAT, Cali, Colombia, pag. 147-163.
- Dobzhansky T (1937). *Genetics and the origin of species*. Columbia University Press.
- Dubnau D (1991). Genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Microbiological Reviews* 55:395-424.
- Durán-Figueroa N, Vielle-Calzada JP (2010). ARGONAUTE9-dependent silencing of transposable elements in pericentromeric regions of *Arabidopsis*. *Plant Signal Behav* 5:1476-1479.
- Durgbanshi A, Arbona V, Pozo O, Miersch O, Sancho JV, Gómez-Cadenas A (2005). Simultaneous determination of multiple phytohormones in plant extracts by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:8437-8442.

- Dwivedi KK, Bhat BV, Gupta MG, Bhat SR, Bhat V (2007). Identification of a SCAR marker linked to apomixis in buffelgrass (*Cenchrus ciliaris* L.). *Plant Science* 172:788-795.
- Ebina M, Nakagawa H, Yamamoto T, Araya H, Tsuruta S-I, Takahara M, Nakajima K (2005). Co-segregation of AFLP and RAPD markers to apospory in Guinea grass (*Panicum maximum* Jacq.). *Grassland Science* 51:71-78.
- 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, Polci P (1994). Efecto del estrés hídrico en el estado reproductivo en pasto llorón *Eragrostis curvula* (Schrad) Nees. *Turrialba* 44:189-204.
- Ellstrand NC, Roose ML (1987). Patterns of genotypic diversity in clonal plant-species. *American Journal of Botany* 74:123-131.
- Ernst A (1918). Bastardierung als Ursache der Apogamie im Pflanzenreich. Fischer, Jena
- Evans LT, Knox RB (1969). Environmental control of reproduction in *Themeda australis*. *Australian Journal of Botany* 17:375.
- Fehrer J, Gemeinholzer B, Chrtek J Jr, Bräutigam S (2007). Incongruent plastid and nuclear DNA phylogenies reveal ancient intergeneric hybridization in *Pilosella* hawkweeds *Hieracium*, *Cichorieae*, *Asteraceae*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 42:347-361.
- Feng XL, Ni WM, Elge S, Mueller-Roeber B, Xu ZH, Xue HW (2006). Auxin flow in anther filaments is critical for pollen grain development through regulating pollen mitosis. *Plant Molecular Biology* 61:215-226.
- Feng XL, Zilberman D, Dickinson H (2013). A Conversation across generations: Soma-germ cell crosstalk in plants. *Developmental Cell* 24:215-225.
- Fernández O, Brevedan R, Gargano A (1991). El pasto llorón su Biología y su Manejo. CERZOS y Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina, 393 pag.
- Finnegan EJ, Genger RK, Kovac K, Peacock WJ, Dennis ES (1998). DNA methylation and the promotion of flowering by vernalization. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 95:5824-5829.
- Fontdevila A (2011). The dynamic genome. A darwinian approach. Oxford University Press.

- Foster PL (2005). Stress responses and genetic variation in bacteria. *Mutation Research* 569:3-11.
- Fraire-Velázquez S, Rodríguez-Guerra R, Sánchez-Calderón L (2011). Abiotic and biotic stress response crosstalk in plants. En: *Abiotic stress response in plants - Physiological, biochemical and genetic perspectives*. Shanker A, Venkateswarlu B (Eds). InTech, Rijeka, Croatia, pag. 3-26.
- Francis D (2007). The plant cell cycle - 15 years on. *New Phytologist* 174:261-278.
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2004). *A Primer of Conservation Genetics*, Cambridge University Press.
- Fritz G (1976). Measurement of water status by water content methods. En: *Introductory plant physiology*. Noggle G, Fritz G (Eds.) Prentice-hall, inc. Englewood Cliffs, New Jersey, pag. 445-447.
- Fujita M, Fujita Y, Noutoshi Y, Takahashi F, Narusaka Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2006). Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Current Opinion in Plant Biology* 9:436-442.
- Gaeta RT, Yoo SY, Pires JC, Doerge RW, Chen ZJ, Osborn TC (2009). Analysis of gene expression in resynthesized *Brassica napus* allopolyploids using *Arabidopsis* 70mer oligo microarrays. *PLoS One* 4:e4760.
- Galbraith DW, Harkins KR, Knapp S (1991). Systemic endopolyploidy in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 96:985-989.
- Garcia R, Asins MJ, Forner J, Carbonell EA (1999). Genetic analysis in *Citrus* and *Poncirus* by genetic markers. *Theoretical and Applied Genetics* 99:511-518.
- Garcia-Aguilar M, Michaud C, Leblanc O, Grimanelli D (2010). Inactivation of a DNA methylation pathway in maize reproductive organs results in apomixis-like phenotypes. *Plant Cell* 22:3249-3267.
- Gerashchenkov G, Rozhnova N, Gorbunova V, Timirkaeva A (2007). The analysis of hormonal levels in top leaves and flower buds of the *Boecheira* accessions with asexual (apomictic) and sexual (amphimictic) reproduction. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B* 61:206-211.
- Gimeno CJ, Ljungdahl PO, Styles CA, Fink GR (1992). Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: Regulation by starvation and RAS. *Cell* 68:1077-1090.
- Goel S, Chen Z, Akiyama Y, Conner JA, Basu M, Gualtieri G, Hanna WW, Ozias-Akins P (2006). Comparative physical mapping of the apospory-specific genomic

region in two apomictic grasses: *Pennisetum squamulatum* and *Cenchrus ciliaris*. *Genetics* 173:389-400.

- Gounaris EK, Sherwood RT, Gounaris I, Hamilton RH, Gustine DL (1991). Inorganic salts modify embryo sac development in sexual and aposporous *Cenchrus ciliaris*. *Sexual Plant Reproduction* 4:188-192.
- Grant-Downton RT, Dickinson HG (2006). Epigenetics and its implications for plant biology 2. The 'epigenetic epiphany': epigenetics, evolution and beyond. *Annals of Botany* 97:11-27.
- Grativol C, Hemerly AS, Ferreira PC (2012). Genetic and epigenetic regulation of stress responses in natural plant populations. *Biochimica et Biophysica Acta* 1819:176-85.
- Green RF, Noakes DL (1995). Is a little bit of sex as good as a lot?. *Journal of Theoretical Biology* 174:87-96.
- Grimanelli D (2012). Epigenetic regulation of reproductive development and the emergence of apomixis in angiosperms. *Current Opinion in Plant Biology* 15:57-62.
- Grimanelli D, Leblanc O, Espinoza E, Perotti E, Gonzalez de Leon D, Savidan Y (1998). Mapping diplosporous apomixis in tetraploid *Tripsacum*: one gene or several genes?. *Heredity* 80:33-39.
- Grimanelli D, Leblanc O, Perotti E, Grossniklaus U (2001a). Developmental genetics of gametophytic apomixis. *Trends Genet.* 17:597-604.
- Grimanelli D, Garcia M, Kaszas E, Perotti E, Leblanc O (2003). Heterochronic expression of sexual reproductive programs during apomictic development in *Tripsacum*. *Genetics* 165:1521-1531.
- Grimanelli D, Garcia M, Perotti E, Leblanc O (2001b) Megasporogenesis in diplosporous *Tripsacum* and maize X *Tripsacum* hybrids. 2nd International Apomixis Conference, APO2001, Como, Italia, 24-28 de Abril, pag. 23.
- Gualano N, Carrari F, Veronica Rodriguez M, Perez-Flores L, Sanchez R, Iusem N, Benech-Arnold R (2007). Reduced embryo sensitivity to abscisic acid in a sprouting-susceptible sorghum (*Sorghum bicolor*) variety is associated with altered ABA signalling. *Seed Science Research* 17:81-90.
- Guleria P, Mahajan M, Bhardwaj J, Yadav SK (2011). Plant small RNAs: biogenesis, mode of action and their roles in abiotic stresses. *Genomics, proteomics & bioinformatics* 9:183-199.
- Guo P, Baum M, Grando S, Ceccarelli S, Bai G, Li R (2009). Differentially expressed genes between drought-tolerant and drought-sensitive barley genotypes in

response to drought stress during the reproductive stage. *Journal of Experimental Botany* 60:3531-3544.

- Gusakovskaya MA, Blintsov AN (2006). Spatial and temporal distribution of free and bound ABA in wheat and dandelion ovaries in the period of egg-cell activity. *Russian Journal of Plant Physiology*, 53:355-358.
- Gustafsson A (1946). Apomixis in higher plants. Part I. The mechanisms of apomixis. *Lunds Univ. årsskr. N. F. Avd.* 42:1-66.
- Gustine DL, Sherwood RT, Huff DR (1997). Apospory-linked molecular markers in buffelgrass. *Crop Science* 37:947-951.
- Ha M, Lu J, Tian L, Ramachandran V, Kasschau KD, Chapman EJ, Chen ZJ (2009). Small RNAs serve as a genetic buffer against genomic shock in *Arabidopsis* interspecific hybrids and allopolyploids. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 106:17835-17840.
- Hadany L, Otto S (2009). Condition-dependent sex and the rate of adaptation. *American Naturalist* 174:72-78.
- Hackett JA, Zylitz JJ, Surani MA (2012). Parallel mechanisms of epigenetic reprogramming in the germline. *Trends in Genetics* 28:164-174.
- Haluskova J, Cellarova E (1997). RFLP analysis of *Hypericum perforatum* somaclones and their progenies. *Euphytica* 95:229-235.
- Hanna WW, Powell JB, Millot JC, Burton GW (1973). Cytology of obligate sexual plants in *Panicum maximum* Jacq. and their use in controlled hybrids. *Crop Science* 13:695-697.
- Harris EH (1989). *The Chlamydomonas* sourcebook. Academic Press, New York.
- Hashida SN, Kitamura K, Mikami T, Kishima Y (2003). Temperature shift coordinately changes the activity and the methylation state of transposon Tam3 in *Antirrhinum majus*. *Plant Physiology* 132:1207-1216.
- Hauser MT, Aufsatz W, Jonak C, Luschnig, C (2011). Transgenerational epigenetic inheritance in plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms* 1809:459-468.
- Hegarty M, Barker G, Brennan A, Edwards K, Abbott R, Hiscock S (2009). Extreme changes to gene expression associated with homoploid hybrid speciation. *Molecular Ecology* 18:877-889.
- Hegarty M, Barker G, Wilson I, Abbott R, Edwards K, Hiscock S (2006). Transcriptome shock after interspecific hybridization in senecio is ameliorated by genome duplication. *Current Biology* 16:1652-1659.

- Hermsen 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. *American Journal of Botany* 58:785-790.
- Hirochika H (1993). Activation of tobacco retrotransposons during tissue culture. *The EMBO Journal* 12:2521.
- Hirochika H, Sugimoto K, Otsuki Y, Tsugawa H, Kanda M (1996). Retrotransposons of rice involved in mutations induced by tissue culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 93:7783-8.
- Hiruta C, Tochinai S (2012). How does the alteration of meiosis evolve to parthenogenesis? - Case study in a water flea, *Daphnia pulex*. In: *Meiosis - Molecular Mechanisms and Cytogenetic Diversity*, Andrew Swan (Ed.). InTech, Croacia, Cap. 6, pag. 109-22.
- Hojsgaard D, Martinez E, Quarin C (2013). Competition between meiotic and apomictic pathways during ovule and seed development results in clonality. *New Phytologist* 197:336-347.
- Hojsgaard DH, Martínez EJ, Acuña CA, Quarin CL, Pupilli F (2011). A molecular map of the apomixis-control locus in *Paspalum procurrens* and its comparative analysis with other species of *Paspalum*. *Theoretical and Applied Genetics* 123:959-971.
- Hojsgaard D, Martínez E, Quarin C (2013). Competition between meiotic and apomictic pathways during ovule and seed development results in clonality. *New Phytologist* 197:336-347.
- Hojsgaard DH, Schegg E, Valls JFM, Martinez EJ, Quarin CL (2008). Sexuality, apomixis, ploidy levels, and genomic relationships among four *Paspalum* species of the subgenus *Anachyris* (Poaceae). *Flora* 203:535-547.
- Hörandl E, Temsch EM (2009). Introgression of apomixis into sexual species is inhibited by mentor effects and ploidy barriers in the *Ranunculus auricomus* complex. *Annals of Botany* 104:81-89.
- Hörandl E (2010). The evolution of self-fertility in apomictic plants. *Sexual Plant Reproduction* 23:73-86.
- Höerandl E (2006). The complex causality of geographical parthenogenesis. *New Phytologist* 171:525-538.
- Hörandl E, Hadacek F (2013). The oxidative damage initiation hypothesis for meiosis. *Plant Reproduction* 26:351-367.

- Hörandl E, Hojsgaard D (2012). The evolution of apomixis in angiosperms: A reappraisal. *Plant Biosystems* 146:681-93.
- Hörandl E, Paun O (2007). Patterns and sources of genetic diversity in apomictic plants: implications for evolutionary potentials. In: Hörandl E, Grossniklaus U, Van Dijk P, Sharbel T (eds) *Apomixis: evolution, mechanisms, and perspectives*, A.R.G. Gantner Verlag, Ruggell, Liechtenstein, pag. 169-194.
- Hoth S, Morgante M, Sanchez J, Hanafey M, Tingey S, Chua N (2002). Genome-wide gene expression profiling in *Arabidopsis thaliana* reveals new targets of abscisic acid and largely impaired gene regulation in the *abi1-1* mutant. *Journal Cell Science* 115:4891-4900.
- Houlston G, Chapman H, Bicknell R (2006). The influence of genotype and environment on the fecundity and facultative expression of apomixis in *Hieracium pilosella*. *Folia Geobotanica* 41:165-181.
- Howard RS, Lively CM (1994). Parasitism, mutation accumulation and the maintenance of sex. *Nature*, 367:554-557.
- Hsiao T (1973). Plant responses to water stress. *Annual Review Plant Physiology* 24:519-570.
- Huo H, Conner JA, Ozias-Akins P (2009). Genetic mapping of the apospory-specific genomic region (ASGR) in *Pennisetum squamulatum* using retrotransposon-based molecular markers. *Theoretical and Applied Genetics* 119:199-212.
- Hussain S, Saleem MF, Ali A, Iqbal J, Shakir MA (2013). Yield and quality improvement of sunflower (*helianthus annuus* L.) Hybrid through aba application under water deficit conditions. *Journal of Animal and Plant Sciences* 23:1158-1165.
- Hussey MA, Bashaw EC, Hignight KW, Dahmer ML (1991). Influence of photoperiod on the frequency of sexual embryo sacs in facultative apomictic buffelgrass. *Euphytica*, 54:141-145.
- Hwa CM, Yang XC (2008). Fixation of hybrid vigor in rice: opportunities and challenges. *Euphytica* 160:287-293.
- Hwang I, Goodman HM (1995). An *Arabidopsis thaliana* root-specific kinase homolog is induced by dehydration, ABA, and NaCl. *The Plant Journal* 8:37-43.
- Ikeda A, Sonoda Y, Vernieri P, Perata P, Hirochika H, Yamaguchi J (2002). The slender rice mutant, with constitutively activated gibberellin signal transduction, has enhanced capacity for abscisic acid level. *Plant and Cell Physiology* 43:974-979.

- Iyer NJ, Jia X, Sunkar R, Tang G, Mahalingam R (2012). microRNAs responsive to ozone-induced oxidative stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signaling & Behavior* 7:484-491.
- Jaleel CA, Manivannan P, Wahid A, Farooq M, Al-Juburi HJ, Somasundaram R, Panneerselvam R (2009). Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition. *International Journal Agricultural Biology* 11:100-105.
- Jarmer H, Berka R, Knudsen S, Saxild HH (2002). Transcriptome analysis documents induced competence of *Bacillus subtilis* during nitrogen limiting conditions. *FEMS Microbiology Letters* 206:197-200.
- Jessup RW, Burson BL, Burow GB, Wang YWCC, Li Z, Paterson AH, Hussey MA (2002). Disomic inheritance, suppressed recombination, and allelic interactions govern apospory in buffelgrass as revealed by genome mapping. *Crop Science* 42:1688-1694.
- Johansen D (1940). *Plant microtechnique*. Mc Graw-Hill Book Company Inc, New York.
- Johnson N (2010). Hybrid incompatibility genes: remnants of a genomic battlefield? *Trends in Genetics* 26:317-325.
- Jones-Rhoades M, Bartel D (2004). Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Molecular Cell* 14:787-799.
- Joyce S, Cassells A, Jain S (2003). Stress and aberrant phenotypes *in vitro* culture. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 74:103-121.
- Jiang M, Zhang J (2002). Water stress-induced abscisic acid accumulation triggers the increased generation of reactive oxygen species and up-regulates the activities of antioxidant enzymes in maize leaves. *Journal of Experimental Botany* 53:2401-2410.
- Judd WS, Donoghue MJ, Sanders RW (1994). Angiosperm family pairs: preliminary phylogenetic analyses. *Harvard Papers in Botany* 5:1-51.
- Juliano C, Wang J, Lin H (2011). Uniting germline and stem cells: The function of Piwi proteins and the piRNA pathway in diverse organisms. *Annual review of genetics* 45:447-469.
- Kaeppler S, Kaeppler H, Rhee Y (2000). Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Molecular Biology* 43:179-88.

- Karan R, DeLeon T, Biradar H, Subudhi PK (2012). Salt stress induced variation in DNA methylation pattern and its influence on gene expression in contrasting rice genotypes. PLoS ONE 7:e40203.
- Kashin A (2012). Genesis of cells of apical meristems and realization of gametophytic apomixis in flowering plants. Russian Journal of Developmental Biology 43:101-14.
- Kassir Y, Granot D, Simchen G (1988). IME1, a positive regulator gene of meiosis in *S. cerevisiae*. Cell 52:853-862.
- Kaushal P, Malaviya DR, Roy AK, Pathak S, Agrawal A, Khare A, Siddiqui SA (2008). Reproductive pathways of seed development in apomictic guinea grass (*Panicum maximum* Jacq.) reveal uncoupling of apomixis components. Euphytica 164:81-92.
- Kepiro JL, Roose ML (2010). AFLP markers closely linked to a major gene essential for nucellar embryony (apomixis) in *Citrus maxima* × *Poncirus trifoliata*. Tree Genetics & Genomes 6:1-11.
- Kikuchi S, Satoh K, Nagata T, Kawagashira N, Doi K, Kishimoto N, Adachi J (2003). Collection, mapping, and annotation of over 28,000 cDNA clones from japonica rice. Science 301:376-379.
- Kim JS, Mizoi J, Yoshida T, Fujita Y, Nakajima J, Ohori T, Yamaguchi-Shinozaki K (2011). An ABRE promoter sequence is involved in osmotic stress-responsive expression of the DREB2A gene, which encodes a transcription factor regulating drought-inducible genes in *Arabidopsis*. Plant and Cell Physiology 52:2136-2146.
- Kleiven OT, Larsson P, Hobaek A (1992). Sexual reproduction in *Daphnia magna* requires three stimuli. Oikos 65:197-206.
- Knox RB (1967). Apomixis-seasonal and population differences in a grass. Science 157:325.
- Knox RB, Heslop-Harrison J (1963). Experimental control of aposporous apomixis in a grass of the Andropogoneae. Botaniska Notiser 116:127-141.
- Koltunow A (1993). Apomixis: embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. Plant Cell 5:1425-1437.
- Koltunow AM, Grossniklaus U (2003). Apomixis: a developmental perspective. Annual Review of Plant Biology 54:547-574.
- Koltunow AMG, Johnson SD, Rodrigues JCM, Okada T, Hu Y, Tsuchiya T, Wilson S, Fletcher P, Ito K, Suzuki G, Mukai Y, Fehrer J, Bicknell RA (2011). Sexual reproduction is the default mode in apomictic *Hieracium* subgenus *Pilosella*, in which two dominant loci function to enable apomixis. Plant Journal 66:890-902.

- Koltunow AMG, Ozias-Akins P, Siddiqi I (2013). Apomixis. Seed genomics. Wiley-Blackwell, Oxford, pag. 83-110.
- Kovarik A, Koukalova B, Bezdek M, Opatrny Z (1997). Hypermethylation of tobacco heterochromatic loci in response to osmotic stress. *Theoretical and Applied Genetics* 95:301-306.
- Krahulcová A, Krahulec F, Rosenbaumová R (2011). Expressivity of apomixis in $2n + n$ hybrids from an apomictic and a sexual parent: insights into variation detected in *Pilosella* (Asteraceae: Lactuceae). *Sexual Plant Reproduction* 24:63-74.
- Krahulcová A, Rotreklová O, Krahulec F (2013). The Detection, Rate and Manifestation of Residual Sexuality in Apomictic Populations of *Pilosella* (Asteraceae, Lactuceae). *Folia Geobotanica* 1-20.
- Kubis SE, Castilho AM, Vershinin AV, Heslop-Harrison JS (2003). Retroelements, transposons and methylation status in the genome of oil palm (*Elaeis guineensis*) and the relationship to somaclonal variation. *Plant Molecular Biology* 52:69-79.
- Labombarda P, Busti A, Cáceres ME, Quarín CL, Pupilli F, Arcioni S (2002). An AFLP marker tightly linked to apomixis reveals hemizyosity in a portion of the apomixis-controlling locus in *Paspalum simplex*. *Genome* 45:513-519.
- Labra M, Ghiani A, Citterio S, Sgorbati S, Sala F, Vannini C, Ruffini-Castiglione M, Bracale M (2002). Analysis of cytosine methylation pattern in response to water deficit in pea root tips. *Plant Biology* 4:694-699.
- Larcher W (1987). Stress bei pflanzen. *Naturwissenschaften* 74:158-167.
- Larcher W (1995). Physiological plant ecology. Ecophysiology and stress physiology of functional groups. Springer, Berlin.
- Laspina NV, Vega T, Seiyo G, González AM, Martelotto LG, Stein J, Podio M, Ortiz JPA, Echenique VC, Quarín CL, Pessino SC (2008). Gene expression analysis at the onset of aposporous apomixis in *Paspalum notatum*. *Plant Molecular Biology* 67:615-628
- Latzel V, Klimesová J (2010). Transgenerational plasticity in clonal plants. *Evolutionary ecology* 24:1537-1543.
- Lauter N, Kampani A, Carlson S, Goebel M, Moose SP (2005). microRNA172 down-regulates *glossy15* to promote vegetative phase change in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 102:9412-9417.
- Le Trionnaire G, Grant-Downton R, Kourmpetli S, Dickinson H, Twell D (2011). Small RNA activity and function in angiosperm gametophytes. *Journal of experimental botany* 62:1601-1610.

- Leblanc O, Grimanelli D, Gonzalez-de-Leon D, Savidan Y (1995). Detection of the apomictic mode of reproduction in maize- *Tripsacum* hybrids using maize RFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics* 90:1198-1203
- Leblanc O, Mazzucato A (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) 9:121-136.
- Lee M, Phillips RL (1988). The chromosomal basis of somaclonal variation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 39:413-437.
- Leigh J (1960). Some aspects of anatomy, ecology and physiology of *Eragrostis*. Tesis Ph. D., Universidad de Witwatersrand, Johannesburg, Sudáfrica.
- Leonhardt N, Kwak J, Robert N, Waner D, Leonhardt G, Schroeder J (2004). Microarray expression analyses of *Arabidopsis* guard cells and isolation of a recessive abscisic acid hypersensitive protein phosphatase 2C mutant. *Plant Cell* 16:596-615.
- Levitt J (1972)- *Responses of plants to environmental stresses*. (Academic Press: New York)
- Levitt J (1980). *Responses of plants to environmental stresses*. Volume II. Water, radiation, salt, and other stresses (No. Ed. 2). Academic Press: New York
- Leung J, Giraudat J (1998). Abscisic acid signal transduction. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49:199-222.
- Lichtenthaler HK (1996). Vegetation stress: an introduction to the stress concept in plants. *Journal of plant physiology* 148:4-14.
- Lichtenthaler HK, Burkart S (1999). Photosynthesis and high light stress. *Bulgarian Journal of Plant Physiology* 25:3-16.
- Lira-Medeiros CF, Parisod C, Fernandes RA, Mata CS, Cardoso MA, Ferreira PCG (2010). Epigenetic variation in mangrove plants occurring in contrasting natural environment. *PLoS ONE* 5:e10326.
- Liu Z, Wang R, Carman J (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. *Theoretical and Applied Genetics* 89:599-605.
- Lopez-Molina L, Mongrand S, Chua N H (2001). A postgermination developmental arrest checkpoint is mediated by abscisic acid and requires the ABI5 transcription factor in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 98:4782-4787.

- Lovell JT, Aliyu OM, Mau M, Schranz ME, Koch M, Kiefer C, B-H Song T Mitchell-Olds, Sharbel TF (2013). On the origin and evolution of apomixis in *Boechera*. *Plant Reproduction* 26: 309-315.
- Ludlow MM (1989). Strategies of response to water stress. In 'Structural and functional responses to environmental stresses'. (Eds KH Kreeb, H Richter and TM Hinckley) pag. 269-281.
- Lushai G, Loxdale HD, Allen JA (2003). The dynamic clonal genome and its adaptive potential. *Biol. J. Linn. Soc.* 79:193-208.
- Lv D-K, Bai X, Li Y, Ding X-D, Ge Y, Cai H, Ji W, Wu N, Zhu Y-M (2010). Profiling of cold-stress-responsive miRNAs in rice by microarrays. *Gene* 459:39-47.
- Ma SM, Wang YF, Ye XL, Liang CY (2004). Recent advances in the study on apomixis in plants. *Journal of Tropical and Subtropical Botany* 5:019.
- Madlung A, Comai L (2004). The effects of stress on genome regulation and structure. *Ann. Bot.* 94:481-495.
- Madlung A, Tyagi A, Watson B, Jiang H, Kagochi T, Doerge R., Martienssen R, Comai L (2005). Genomic changes in synthetic *Arabidopsis* polyploids. *Plant Journal* 41:221-230.
- Mai B, Breeden L (2000). *CLN1* and its repression by *Xbp1* are important for efficient sporulation in budding yeast. *Molecular and Cellular Biology* 20:478-487.
- Mallet J (2005). Hybridization as an invasion of the genome. *Trends in Ecology and Evolution* 20:229-237.
- Mallory AC, Bartel DP, Bartel B (2005). MicroRNA-directed regulation of *Arabidopsis* AUXIN RESPONSE FACTOR17 is essential for proper development and modulates expression of early auxin response genes. *Plant Cell* 17:1360-1375.
- Marimuthu MP, Jolivet S, Ravi M, Pereira L, Davda JN, Cromer L, Wang L, Nogue´ F, Chan SW, Siddiqi I, Mercier R (2011). Synthetic clonal reproduction through seeds. *Science* 331:876.
- Marfil CF, Masuelli RW, Davison J, Comai L (2006). Genomic instability in *Solanum tuberosum* x *Solanum kurtzianum* interspecific hybrids. *Genome* 49:104-113.
- Margulis L, Sagan D (1986). *Origins of sex: three billion years of genetic recombination*. New Haven: Yale University Press.
- Maroco JP, Pereira JS, Chaves MM (2000). Growth, photosynthesis and water-use efficiency of two C4 Sahelian grasses subjected to water deficits. *Journal of Arid Environments* 45:119-137.

- Martínez EJ, Hopp HE, Stein J, Ortiz JP, Quarin CL (2003). Genetic characterization of apospory in tetraploid *Paspalum notatum* based on the identification of linked molecular markers. *Molecular Breeding* 12:319-327
- Martínez E, Urbani M, Quarin C, Ortiz JP (2001). Inheritance of apospory, *Paspalum notatum*. *Hereditas* 135:19-25.
- Massicotte R, Angers B (2012). General-purpose genotype or how epigenetics extend the flexibility of a genotype. *Genetics research international* 2012:317175.
- Masterson J (1994). Stomatal size in fossil plants - Evidence for polyploidy in majority of Angiosperms. *Science* 264:421-424.
- Masuelli RW, Marfil CF (2011). Variabilidad epigenética en plantas y evolución. *BAG. Journal of Basic and Applied Genetics* 22:1-8.
- Matzk F (1991). New efforts to overcome apomixis in *Poa pratensis* L. *Euphytica* 55:65-72.
- Matzk F, Meister A, Schubert I (2000). An efficient screen for reproductive pathways using mature seeds of monocots and dicots. *Plant Journal* 21:97-108.
- Matzk F, Prodanovic S, Baumlein H, Schubert I (2005). The inheritance of apomixis in *Poa pratensis* confirms a five locus model with differences in gene expressivity and penetrance. *Plant Cell* 17:13-24.
- Mayr E (1942). *Systematics and the origin of species, from the viewpoint of a zoologist*. Harvard University Press.
- Mazzucato A, den Nijs A.P.M, Falcinelli M (1996). Estimation of parthenogenesis frequency in Kentucky bluegrass with auxin-induced parthenocarpic seeds. *Crop Science* 36:9-16.
- Mecchia M, Ochogavia A, Selva JP, Laspina N, Felitti S, Martelotto L, Spangenberg G, Echenique V, Pessino S (2007). Genome polymorphisms and gene differential expression in a 'back-and-forth' ploidy-altered series of weeping lovegrass (*Eragrostis curvula*). *Journal of Plant Physiology* 164:1051-1061.
- Meier M, Zappacosta D, Cervigni G, Echenique V (2006). Presencia de calosa en la megasporogénesis de plantas apomícticas y sexuales de pasto llorón. *Biocell* 30:518.
- Meier M, Zappacosta D, Selva JP, Pessino S, Echenique V (2011). Evaluation of different methods for assessing the reproductive mode of weeping lovegrass plants, *Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees. *Australian Journal of Botany* 59:253-261.
- Merchan F, van den Ende H, Fernandez E, Beck CF (2001). Low-expression genes induced by nitrogen starvation and subsequent sexual differentiation in

Chlamydomonas reinhardtii, isolated by the differential display technique. *Planta* 213:309-317.

- McClintock B (1984). The significance of responses of the genome to challenge. *Science* 26:792-801.
- McWilliam JR, Shanker K, Knox RB (1970). Effects of temperature and photoperiod on growth and reproductive development in *Hyparrhenia hirta*. *Crop and Pasture Science* 21:557-569.
- Michalak P, Noor M (2003). Genome-wide patterns of expression in *Drosophila* pure species and hybrid males. *Molecular Biology and Evolution* 20:1070-1076.
- Miles J (2007). Apomixis for cultivar development in tropical forage grasses. *Crop Science* 47:S238-S249.
- Mirouze M, Paszkowski J (2011). Epigenetic contribution to stress adaptation in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 14:267-274.
- Mogie M (1988). A model for the evolution and control of generative apomixes. *Biological Journal of the Linnean Society* 35:127-153.
- Molinari L, Busto A, Calderini O, Arcioni S, Pupilli F (2003). Plant regeneration from callus of apomictic and sexual lines of *Paspalum simplex* and RFLP analysis of regenerated plants. *Plant Cell Reports* 21:1040-1046.
- Molinier J, Ries G, Zipfel C, Hohn B (2006). Transgeneration memory of stress in plants. *Nature* 442:1046-1049.
- Morgan JM (1980). Possible role of abscisic acid in reducing seed set in water-stressed wheat plants. *Nature* 285:655-657.
- Morgan JM (1984) Osmoregulation and water stress in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 35:299-319.
- Moritz C, Brown WM, Densmore L, Wright J, Vyas D, Donnellan S (1989). Genetic diversity and the dynamics of hybrid parthenogenesis in *Cnemidophorus* (Teiidae) and *Heteronotia* (Gekkonidae). In: *Biology of Unisexual Vertebrates* (R. Dawley, J. Bogart, eds), pp. 87-112. New York Museum Press, Albany.
- Nakano M, Shimizu T, Fujii H, Shimada T, Endo T, Nesumi H, Kuniga T, Omura M (2008a). Marker enrichment and construction of haplotype-specific BAC contigs for the polyembryony genomic region in *Citrus*. *Breed Science* 58:375-383.
- Nakano M, Shimizu T, Kuniga T, Nesumi H, Omura M (2008b). Mapping and haplotyping of the flanking region of the polyembryony locus in *Citrus unshiu* Marcow. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 77:109-114.

- Nakano M., Shimada T, Endo T, Fujii H., Nesumi H, Kita M, Omura M (2012). Characterization of genomic sequence showing strong association with polyembryony among diverse *Citrus* species and cultivars, and its synteny with *Vitis* and *Populus*. *Plant Science* 183:131-142.
- Namuco O, O'Toole J (1986). Reproductive stage water stress and sterility. I. Effect of stress during meiosis. *Crop Science* 26:317-321.
- Naumova T (1997). Apomixis in tropical fodder crops: cytological and functional aspects. *Euphytica* 96:93-99.
- Naumova T, Hayward M, Wagenvoort M (1999). Apomixis and sexuality in diploid and tetraploid accessions of *Brachiaria decumben*. *Sexual Plant Reproduction* 12:43-52.
- Neaves WB, Baumann P (2011). Unisexual reproduction among vertebrates. *Trends in Genetics* 27:81-88.
- Nedelcu A (2005). Sex as a response to oxidative stress: stress genes co-opted for sex. *Proceeding Royal Society of London B* 272:1935-1940.
- Nedelcu A, Michod R. (2003). Sex as a response to oxidative stress: the effect of antioxidants on sexual induction in a facultatively sexual lineage. *Proceeding Royal Society of London B* 270:S136-S139.
- Nedelcu A, Marcu O, Michod R (2004). Sex as a response to oxidative stress: a twofold increase in cellular reactive oxygen species activates sex genes. *Proceeding Royal Society of London B*. 271:1591-1596.
- Neiman M, Sharbel TF, Schwander T (2014). Genetic causes of transitions from sexual reproduction to asexuality in plants and animals. *Journal of evolutionary biology* (en prensa).
- 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. *Botanica Helvetica* 92:411-423.
- Nogler GA (1995). Genetics of apomixis in *Ranunculus auricomus*. VI. Epilogue. *Botanica Helvetica* 105:111-115.
- Noirot M, Couvet D, Hamon S (1997). Main role of self-pollination rate on reproductive allocations in pseudogamous apomicts. *Theoretical and Applied Genetics* 95:479-483.

- Norrmann G, Quarin C, Burson B (1989). Cytogenetics and reproductive behavior of different chromosome races in six *Paspalum* species. *Journal of Heredity* 80:24-28.
- Noyes R (2007). Apomixis in the Asteraceae: diamonds in the rough. *Functional Plant Science and Biotechnology* 1:207-422.
- Noyes RD, Rieseberg LH (2000). Two independent loci control agamospermy (apomixis) in the triploid flowering plant *Erigeron annuus*. *Genetics* 155:379-390.
- Nygren A (1951). *Embryology of Poa*. Carnegie Institution of Washington. Yearbook 50:113-115.
- Ochogavía AC, Cervigni G, Selva JP, Echenique VC, Pessino SC (2009). Variation in cytosine methylation patterns during ploidy level conversions in *Eragrostis curvula*. *Plant Molecular Biology* 70:17-29.
- Okada T, Ito K, Johnson SD, Oelkers KO, Suzuki G, Houben A, Mukai Y, Koltunow AM (2011). Chromosomes carrying meiotic avoidance loci in three apomixtic eudicot *Hieracium* subgenus *Pilosella* species share structural features with two monocot apomicts. *Plant Physiology* 157:1327-1341.
- Olmedo-Monfil V, Duran-Figueroa N, Arteaga-Vazquez M, Demesa-Arevalo E, Autran D, Grimanelli D, Slotkin RK, Martienssen RA, Vielle-Calzada JP (2010). Control of female gamete formation by a small RNA pathway in *Arabidopsis*. *Nature* 464:628-632.
- Ortiz J, Pessino S (2002). Apomixis and its potential role in agriculture. *AgBiotechNet* 4:1-4.
- Ortiz J, Pessino S, Leblanc O, Hayward M, Quarin C (1997). Genetic fingerprinting for determining the mode of reproduction in *Paspalum notatum*, a subtropical apomictic forage grass. *Theoretical and Applied Genetics* 95:850-856.
- Ortiz J, Quarin C, Pessino S, Acuña C, Martínez E, Espinoza F, Hojsgaard D, Sartor ME, Cáceres ME, Pupilli F (2013). Harnessing apomictic reproduction in grasses: what we have learned from *Paspalum*. *Annals of Botany* 112:767-787.
- Osborn TC, Pires JC, Birchler JA, Auger DL, Chen ZJ, Lee HL, Comai L, Madlung A, Doerge RW, Colot V, Martienssen RA (2003). Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids. *Trends in Genetics* 19:141-47.
- Otto SP (2009) The evolutionary enigma of sex. *American Naturalist* 174:1-14.
- Ozias-Akins P (2006). Apomixis: Developmental characteristics and genetics. *Critical Review in Plant Science* 25:199-204.

- Ozias-Akins P, Akiyama Y, Hanna WW (2003). Molecular characterization of the genomic region linked with apomixis in *Pennisetum/Cenchrus*. *Functional & integrative genomics* 3:94-104.
- Ozias-Akins P, Lubbers EL, Hanna WW, McNay JW (1993). Transmission of the apomictic mode of reproduction in *Pennisetum*: co-inheritance of the trait and molecular markers. *Theoretical and Applied Genetics* 85:632-638.
- Ozias-Akins P, van Dijk PJ (2007). Mendelian genetics of apomixis in plants. *Annual Review of Genetics* 41:509-537.
- Ozias-Akins P, Roche D, Hanna WW (1998). Tight clustering and hemizygoty of apomixis-linked markers in *Pennisetum squamulatum* implies genetic control of apospory by a divergent locus that may have no allelic form in sexual genotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 95:5127-5132.
- Paule J, Sharbel TF, Dobes C (2011). Apomictic and sexual lineages of the *Potentilla argentea* L. group (Rosaceae): cytotype and molecular genetic differentiation. *Taxon* 60:721-732.
- Paun O, Greilhuber J, Temsch EM, Horandl E (2006). Patterns, sources and ecological implications of clonal diversity in apomictic *Ranunculus carpaticola* (*Ranunculus auricomus* complex, Ranunculaceae). *Molecular Ecology* 15:897-910.
- Peel MD, Carman JG, Leblanc O (1997). Megaspore callose in apomictic buffelgrass, Kentucky bluegrass, *Pennisetum squamulatum* Fresen, *Tripsacum* L, and weeping lovegrass. *Crop Science* 37:724-732.
- Pessino S, Evans C, Ortiz J, Armstead I, Do Valle C, Hayward M (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, Ortiz J, Hayward M, Quarin C (1999). The molecular genetics of gametophytic apomixis. *Hereditas* 130:1-11.
- Pessino SC, Ortiz JPA, Leblanc O, do Valle CB, Hayward MD (1997). Identification of a maize linkage group related to apomixis in *Brachiaria*. *Theoretical and Applied Genetics* 94:439-444.
- Pires J, Zhao J, Schranz M, Leon E, Quijada P, Lukens L, Osborn T (2004). Flowering time divergence and genomic rearrangements in resynthesized *Brassica* polyploids (Brassicaceae). *Biological Journal of the Linnean Society* 82:675-688.
- 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.

- Polegri L, Calderini O, Arcioni S, Pupilli F (2010). Specific expression of apomixis-linked alleles revealed by comparative transcriptomic analysis of sexual and apomictic *Paspalum simplex* Morong flowers. *Journal of experimental botany* 61:1869-1883.
- Potters G, Pasternak TP, Guisez Y, Palme KJ, Jansen MAK (2007). Stress-induced morphogenic responses: growing out of trouble?. *Trends in Plant Science* 12:99-105.
- 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, Curvetto N (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.
- Pupilli F, Barcaccia G (2012). Cloning plants by seeds: inheritance models and candidate genes to increase fundamental knowledge for engineering apomixis in sexual crops. *Journal of Biotechnology* 159:291-311.
- Pupilli F, Cáceres ME, Quarín CL, Arcioni S (1997). Segregation analysis of RFLP markers reveals a tetrasomic inheritance in apomictic *Paspalum simplex*. *Genome* 40:822-828.
- Pupilli F, Labombarda P, Cáceres ME, Quarín CL, Arcioni S (2001). The chromosome segment related to apomixis in *Paspalum simplex* is homoeologous to the telomeric region of the long arm of rice chromosome 12. *Molecular Breeding* 8:53-61.
- Pupilli F, Martínez EJ, Busti A, Calderini O, Quarín CL, Arcioni S (2004). Comparative mapping reveals partial conservation of synteny at the apomixis locus in *Paspalum* spp. *Mol. Genet. Genomics* 270:539-548.
- Quarín CL (1986). Seasonal changes in the incidence of apomixis of diploid, triploid, and tetraploid plants of *Paspalum cromoerhizon*. *Euphytica* 35:515-522.
- Quarín CL, Espinoza F, Martínez E, Pessino S, Bovo O (2001). A rise of ploidy level induces the expression of apomixis in *Paspalum notatum*. *Sexual Plant Reproduction* 13:243-249.
- Quarín CL, Hanna WW (1980). Effect of three ploidy levels on meiosis and mode of reproduction in *Paspalum hexastachyum*. *Crop Science* 20:69-75.
- Rabeau T, Longly B, Louant B (1986). Unreduced-embryo sac ontogenesis in *Eragrostis curvula*. *Canadian Journal of Botany* 64:1778-1785.

- Rahman S, Uehara T (2004). Interspecific and intraspecific variations in sibling species of sea urchin *Echinometra*. Comparative biochemistry and physiology - Part A. Molecular and Integrative Physiology 139:469-478.
- Rautiainen P, Koivula K, Hyvarinen M (2004). The effect of within-genet and between-genet competition on sexual reproduction and vegetative spread in *Potentilla anserina* ssp. *egedii*. Journal of Ecology 92:505-511.
- Ravi M, Chan SWL (2010). Haploid plants produced by centromeremediated genome elimination. Nature 464:615-618.
- Rebozzio R, Sartor M, Quarin C, Espinoza F (2011). Residual sexuality and its seasonal variation in natural apomictic *Paspalum notatum* accessions. Biologia Plantarum 55:391-395.
- Rhoades MW, Reinhart BJ, Lim LP, Burge CB, Bartel B, Bartel DP (2002). Prediction of plant microRNA targets. Cell 110:513-520.
- Richards AJ (1997) Plant breeding systems. Ed. 2. Chapman & Hall, London.
- Richards CL, Schrey AW, Pigliucci M (2012). Invasion of diverse habitats by few Japanese knotweed genotypes is correlated with epigenetic differentiation. Ecology letters 15:1016-1025.
- Roca W, Mroginski L (1991). Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. CIAT. Colombia.
- Roche D, Cong P, Chen Z, Hanna WW, Gustine DL, Sherwood RT, Ozias-Akins P (1999) An apospory-specific genomic region is conserved between Buffelgrass (*Cenchrus ciliaris* L.) and *Pennisetum squamulatum* Fresen. Plant Journal 19:203-208.
- Roche D, Chen Z, Hanna W, Ozias-Akins P (2001). Non-mendelian transmission of an apospory-specific genomic region in a reciprocal cross between sexual pearl millet (*Pennisetum glaucum*) and an apomictic F1 (*P. glaucum* x *P. squamulatum*). Sexual Plant Reproduction 13:217-223.
- Rock C D (2000). Tansley Review No. 120. New Phytologist, 148:357-396.
- Rodríguez MV, Mendiondo GM, Maskin L, Gudesblat GE, Iusem ND, Benech-Arnold RL (2009). Expression of ABA signalling genes and ABI5 protein levels in imbibed *Sorghum bicolor* caryopses with contrasting dormancy and at different developmental stages. Annals of Botany 104:975-985.
- Rodriguez-Leal D, Vielle-Calzada JP (2012). Regulation of apomixis: learning from sexual experience. Current Opinion in Plant Biology 15:549-555.

- Rollins RC (1967). Evolutionary fate of inbreeders and nonsexuals. *American Naturalist* 101:343-351.
- Roodt-Wilding R, Spies J (2006). Phylogenetic relationships in southern African chloridoid grasses (Poaceae) based on nuclear and chloroplast sequence data. *Systematic Biology* 4:401-15.
- Salmon A, Ainouche M, Wendel J (2005). Genetic and epigenetic consequences of recent hybridization and polyploidy in *Spartina* (Poaceae). *Molecular Ecology* 14:1163-1175.
- Sahu PP, Pandey G, Sharma N, Puranik S, Muthamilarasan M, Prasad M (2013). Epigenetic mechanisms of plant stress responses and adaptation. *Plant Cell Reports* 32:1151-1159.
- Sartor ME, Quarin CL, Espinoza F (2009). Mode of reproduction of colchicine-induced *Paspalum plicatulum* tetraploids. *Crop Science* 49:1270-1276.
- Savidan Y (1980). Chromosomal and embryological analyses in sexual X apomictic hybrids of *Panicum maximum* Jacq. *Theoretical and Applied Genetics* 57:153-156.
- Savidan Y (2000). Apomixis: genetics and breeding. *Plant Breeding Reviews* 18:13-86.
- Savidan Y, Carman JG, Dresselhaus T (eds) (2001) *The flowering of apomixis: from mechanisms to genetic engineering*. CIMMYT, IRD, European Commission DG VI (FAIR), Mexico, D.F.
- Schallau A, Arzenton F, Johnston AJ, Hähnel U, Koszegi D, Blattner FR, Altschmied L, Haberer G, Barcaccia G, Bäumlein H (2010). Identification and genetic analysis of the APOSPORY locus in *Hypericum perforatum* L. *Plant Journal* 62:773-784.
- Schoustra S, Rundle HD, Dali R, Kassen R (2010). Fitness-associated sexual reproduction in a filamentous fungus. *Current Biology* 20:1350-1355.
- Schramke V, Allshire R (2003). Hairpin RNAs and retrotransposon LTRs effect RNAi and chromatin-based gene silencing. *Science* 301:1069-1074.
- Schranz ME, Kantama L, de Jong H, Mitchell-Olds T (2006). Asexual reproduction in a close relative of *Arabidopsis*: a genetic investigation of apomixis in *Boechera* (Brassicaceae). *New Phytologist* 171:425-438.
- Schwartz SH, Qin X, Zeevaart JA (2003). Elucidation of the indirect pathway of abscisic acid biosynthesis by mutants, genes, and enzymes. *Plant Physiology* 131:1591-1601.

- Seki M, Ishida J, Narusaka M (2002). Monitoring the expression pattern of around 7,000 *Arabidopsis* genes under ABA treatments using a full-length cDNA microarray. *Functional and Integrative Genomic* 2:282-291.
- Selva JP, Pessino S, Meier M, Echenique V (2012). Identification of candidate genes related to polyploidy and/or apomixis in *Eragrostis curvula*. *American Journal of Plant Science*. 3:403-416.
- Shao HB, Chu LY, Jaleel CA, Zhao CX (2008). Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants. *Comptes Rendus Biologies* 331:215-225.
- Sharbel TF, Voigt ML, Corral JM, Galla G, Kumlehn J, Klukas C (2010). Apomictic and sexual ovules of *Boechera* display heterochronic global gene expression patterns. *Plant Cell* 22:655-671.
- Sharbel TF, Voigt ML, Corral JM, Thiel T, Varshney A, Kumlehn J, Vogel H, Rotter B (2009). Molecular signatures of apomictic and sexual ovules in the *Boechera holboellii* complex. *Plant Journal* 58:870-882.
- Sharma N, Sahu PP, Puranik S, Prasad M (2012). Recent advances in plant-virus interaction with emphasis on small interfering RNAs (siRNAs). *Molecular biotechnology*, 55:63-77.
- Sharp RE, LeNoble ME (2002). ABA, ethylene and the control of shoot and root growth under water stress. *Journal of Experimental Botany* 53:33-37.
- Sherwood R (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.
- Sherwood RT, Berg CC, Young BA (1994). Inheritance of apospory in buffelgrass. *Crop Science* 34:1490-1494.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2007). Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal Experimental Botany* 58:221-227.
- Siddiqi I, Marimuthu M, Ravi M (2009). Molecular approaches for the fixation of plant hybrid vigor. *Biotechnology Journal* 4:342-347.
- Siena L, Sartor M, Espinoza F, Quarin C, Ortiz JP (2008). Genetic and embryological evidences of apomixis at the diploid level in *Paspalum rufum* support recurrent auto-polyploidization in the species. *Sexual Plant Reproduction* 21:205-215.
- Silvertown J (2008). The evolutionary maintenance of sexual reproduction: evidence from the ecological distribution of asexual reproduction in clonal plants. *International Journal of Plant Science* 169:157-168.

- Simon JC, Delmotte F, Rispe C, Crease T (2003). Phylogenetic relationships between parthenogens and their sexual relatives: the possible routes to parthenogenesis in animals. *Biological Journal of the Linnean Society* 79:151-163.
- Simon JC, Stoeckel S, Tagu, D (2010). Evolutionary and functional insights into reproductive strategies of aphids. *Comptes Rendus Biologies* 333:488-496.
- Simon S, Meyers B (2011). Small RNA-mediated epigenetic modifications in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 14:148-155.
- Skriver K, Mundy J (1990). Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. *Plant Cell* 2:503-512.
- Smith J (1841). Notice of a plant which produces perfect seeds without any apparent action of pollen. *Transactions of the Linnaean Society of London* 18:509-512.
- Smulders MJM, De Klerk GJ (2011). Epigenetics in plant tissue culture. *Plant Growth Regulation*, 63:137-146.
- Snell TW y Boyer EM (1988). Thresholds for mictic female production in the rotifer *Brachionus plicatilis* (Muller). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 124:73-85.
- Snyder LA, Hernandez AR, Warmke HE (1955). The mechanism of apomixis in *Pennisetum ciliare*. *Botanical Gazette* 116:109-221.
- Sorensen A, Rouse D, Clements M, John P, Perotti E (2009). Description of a fertilization-independent obligate apomictic species: *Corunastylis apostasioides* Fitzg. *Sexual Plant Reproduction* 22:153-165.
- Spielmann M, Vinkenoog R, Scott RJ (2003). Genetic mechanisms of apomixis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 358:1095-1103.
- Springer M L (1993). Genetic control of fungal differentiation: the three sporulation pathways of *Neurospora crassa*. *Bioessays* 15:365-374.
- Stalker H, Wright N (1975). Reproduction of *Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees. *Journal of Arizona Academic Science* 10:106-10.
- Stebbins GL (1941). Apomixis in the angiosperms. *Botanical Reviews* 7:507-542.
- Stein J, Quarin CL, Martinez EJ, Pessino SC, Ortiz JPA (2004) Tetraploid races of *Paspalum notatum* show polysomic inheritance and preferential chromosome pairing around the aposporycontrolling locus. *Theoretical and Applied Genetics* 109:186-191.

- Stein J, Pessino SC, Martínez EJ, Rodriguez MP, Siena L, Quarin CL, Ortiz JP (2007). A genetic map of tetraploid *Paspalum notatum* Flüggé (bahiagrass) based on single-dose molecular markers. *Molecular Breeding* 20:153-166.
- Steward N, Kusano T, Sano H (2000). Expression of ZmMET1, a gene encoding a DNA methyltransferase from maize, is associated not only with DNA replication in actively proliferating cells, but also with altered DNA methylation status in cold-stressed quiescent cells. *Nucleic Acids Research* 28:3250-3259.
- 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.
- Subramanian S, Fu Y, Sunkar R, Barbazuk WB, Zhu JK, Oliver Y (2009). Novel and nodulation-regulated microRNAs in soybean roots. *BMC Genomics* 9:160.
- Suji KK, John A (2010). An epigenetic change in rice cultivars under water stress conditions. *Electronic Journal of Plant Breeding* 1:1142-1143.
- Sultan SE (2000). Phenotypic plasticity for plant development, function and life history. *Trends in Plant Science* 5:537-542.
- Sundaresan V, Alandete-Saez M (2010). Pattern formation in miniature: the female gametophyte of flowering plants. *Development* 137:179-189.
- Sunkar R, Chinnusamy V, Zhu J, Zhu JK (2007). Small RNAs as big players in plant abiotic stress responses and nutrient deprivation. *Trends in Plant Science* 12:301-309.
- Takeda S, Sugimoto K, Otsuki H, Hirochika H (1999). A 13-bp cis-regulatory element in the LTR promoter of the tobacco retrotransposon Tto1 is involved in responsiveness to tissue culture, wounding, methyl jasmonate and fungal elicitors. *Plant Journal* 18:383-393.
- Taliaferro C, Dabo S, Mitchell E, Johnson B, Metzinger B (1989). Morphologic, cytogenetic, and enzymatic variation in tissue culture regenerated plants of apomictic old-world bluestem grasses (*Bothriochloa* sp.). *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 19:257-266.
- Tang R, Zheng J, Jin Z, Zhang D, Huang Y, Chen L (2008) Possible correlation between high temperature-induced floret sterility and endogenous levels of IAA, GAs and ABA in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Growth Regulators*. 54:37-43.
- Tas ICQ, van Dijk PJ (1999). Crosses between sexual and apomictic dandelions (*Taraxacum*). I. The inheritance of apomixis. *Heredity* 83:707-714.
- Taiz L y Zeiger E (2006). *Plant Physiology*. 4th ed. Sinauer Associates, Sunderland, MA.

- Treier U, Fuchs S, Weber M, Wakarchuk WW, Beck CF (1989). Gametic differentiation in *Chlamydomonas reinhardtii*: light dependence and gene expression patterns. *Archives of microbiology* 152:572-577.
- Tucker AE, Ackerman MS, Eads BD, Xu S, Lynch M (2013). Population-genomic insights into the evolutionary origin and fate of obligately asexual *Daphnia pulex*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110:15740-15745.
- Tucker MR, Okada T, Hu Y, Scholefield A, Taylor JM, Koltunow AM (2012). Somatic small RNA pathways promote the mitotic events of megagametogenesis during female reproductive development in *Arabidopsis*. *Development* 139:1399-1404.
- Tuteja N, Gill S, Khraiwesh B, Qudeimat E (2014). Abiotic stress-responsive small RNA-mediated plant improvement under a changing climate. In: *Climate Change and Plant Abiotic Stress Tolerance*, cap. 18.
- Udall J, Wendel JF (2006). Polyploidy and crop improvement. *Crop Science* 46:3-14.
- Umezawa T, Fujita M, Fujita Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2006). Engineering drought tolerance in plants: discovering and tailoring genes to unlock the future. *Current Opinion in Biotechnology* 17:113-122.
- van Baarlen P, van Dijk PJ, Hoekstra RF, de Jong JH (2000). Meiotic recombination in sexual diploid and apomictic triploid dandelions (*Taraxacum officinale* L.). *Genome* 43:827-835.
- van Kleunen M, Fischer M, Schmid B (2001). Effects of intraspecific competition on size variation and reproductive allocation in a clonal plant. *Oikos* 94:515-524.
- van Dijk PJ, Bakx-Schotman JMT (2004). Formation of unreduced megaspores (diplospory) in apomictic dandelions (*Taraxacum officinale*, s.l.) is controlled by a sex-specific dominant locus. *Genetics* 166:483-492.
- van Dijk P, de Jong H, Vijverberg K, Biere A (2009). An apomixis-gene's view on dandelions. En: Schon I, Martens K, van Dijk P (eds). *Lost Sex: The Evolutionary Biology of Parthenogenesis*. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pag. 475-493.
- van Dijk PJ, Tas ICQ, Falque M, Bakx-Schotman T (1999). Crosses between sexual and apomictic dandelions (*Taraxacum*). II. The breakdown of apomixis. *Heredity* 83:715-721.
- van Dijk PJ, Vijverberg K (2005) The significance of apomixis in the evolution of the angiosperms: a reappraisal. In: Bakker FT, Chatrou LW, Gravendeel B, Pelsers PB (eds) *Plant species-level systematics new perspectives on pattern and process*. A.R.G. Gantner Verlag, Ruggell, Liechtenstein, pag. 101-116.

- Vanyushin BF, Ashapkin VV (2011). DNA methylation in higher plants: past, present and future. *Biochimica et Biophysica Acta* 1809:360-368.
- Vaucheret H (2006). Post-transcriptional small RNA pathways in plants: mechanism and regulations. *Genes & Development* 20:759-771.
- Verhoeven KJF, Jansen JJ, Dijk PJV, Biere A (2010). Stress-induced DNA methylation changes and their heritability in asexual dandelions. *New Phytologist* 185:1108-1118.
- Viejo M, Rodríguez R, Valledor L, Pérez M, Cañal MJ, Hasbún R (2010). DNA methylation during sexual embryogenesis and implications on the induction of somatic embryogenesis in *Castanea sativa* Miller. *Sexual Plant Reproduction* 23: 315-323.
- Vielle-Calzada J, Crane C, Stelly D (1996a). Apomixis: The asexual revolution. *Science* 274:1322-23.
- Vielle-Calzada J, Nuccio M, Budiman M, Thomas T, Burson B, Hussey M, Wing R (1996b). Comparative gene expression in sexual and apomictic ovaries of *Pennisetum ciliare* (L.) Link. *Plant Molecular Biology* 32:1085-92.
- Vielle-Calzada J, Hernández-Lagana E, Rodríguez-Leal D, Rodríguez-Arévalo i, León-Martínez G, Abad-Vivero U, Demesa-Arévalo E, Armenta-Medina A, Alvarez-Mejia C (2012). Reproductive versatility and the epigenetic control of female gametogenesis. *Cold Spring Harb. Symposium in Quantitative Biology* 77:17-21.
- Vijverberg K, van der Hulst R, Lindhout P, van Dijk P (2004). A genetic linkage map of the diplosporous chromosomal region in *Taraxacum officinale* (common dandelion; Asteraceae). *Theoretical and Applied Genetics* 108:725-32.
- Vinocur B, Altman A (2005). Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Current Opinion in Biotechnology* 16:123-132.
- Voigt P (1971). Discovery of sexuality in *Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees. *Crop Science* 11:424-5.
- Voigt P, Bashaw E (1972). Apomixis and sexuality in *Eragrostis curvula*. *Crop Science*. 12:843-7.
- Voigt P, Bashaw E (1973). Facultative apomixis in *Eragrostis curvula*. *Agronomy Abstracts* 65:16.
- Voigt P, Bashaw E (1976). Facultative apomixis in *Eragrostis curvula*. *Crop Science* 16:803-5.

- Voigt P, Burson B (1992). Apomixis in *Eragrostis*. Proceeding Apomixis Workshop, Atlanta, USA, USDA-ARS, ARS-104, 8-11.
- Voigt P, Rethman N, Poverene M (2004). Lovegrasses. In: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, Warm-Season (C4) Grasses, Agronomy Monograph Cap. 45, pag. 1027-1056.
- Vorster T, Liebenberg H (1977). Cytogenetic studies in the *Eragrostis curvula* complex. *Bothalia* 12:215-221.
- Vorster T, Liebenberg H (1984). Classification of embryo sacs in the *Eragrostis* complex. *Bothalia* 15:167-174.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van De Lee T, Hornes M, Zabeau M (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23:4407-4414.
- Wang WS, Pan YJ, Zhao XQ, Dwivedi D, Zhu LH, Ali J, Fu BY, Li ZK (2011). Drought-induced site-specific DNA methylation and its association with drought tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Experimental Botany* 62:1951-1960.
- Wang Y, Li L, Ye T, Lu Y, Chen X, Wu Y (2013). The inhibitory effect of ABA on floral transition is mediated by ABI5 in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* 64:675-684.
- Wessler S (1996). Plant retrotransposons: turned on by stress. *Current Biology* 6:959-961.
- Whitton J, Sears C, Baack E, Otto S (2008). The dynamic nature of apomixis in the Angiosperms. *International Journal of Plant Science*. 169:169-182.
- Williams J, Kubelik A, Livak K, Rafalski J, Tingey S (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18:6531-6535.
- Wilson JR, Ludlow MM, Fisher MJ, Schulze ED (1980). Adaptation to water stress of the leaf water relations of four tropical forage species. *Australian Journal of Plant Physiology* 7:207-220.
- Wuest SE, Schmid MW, Grossniklaus U (2013). Cell-specific expression profiling of rare cell types as exemplified by its impact on our understanding of female gametophyte development. *Current opinion in plant biology* 16:41-49.
- Xiong L, Wang RG, Mao G, Koczan JM (2006). Identification of drought tolerance determinants by genetic analysis of root response to drought stress and abscisic acid. *Plant Physiology* 142:1065-1074.

- Xiong L, Xu C, Maroof M, Zhang Q (1999). Patterns of cytosine methylation in an elite rice hybrid and its parental lines, detected by a methylation-sensitive amplification polymorphism technique. *Molecular and General Genetics* 261:439-46.
- Xu S, Innes DJ, Lynch M, Cristescu ME (2013). The role of hybridization in the origin and spread of asexuality in *Daphnia*. *Molecular Ecology*. 22:4549-4561.
- Yaish MW, Colasanti J, Rothstein SJ (2011). The role of epigenetic processes in controlling flowering time in plants exposed to stress. *Journal of Experimental Botany* 62:3727–3735.
- Yamada-Akiyama H, Akiyama Y, Ebina M, Xu Q, Tsuruta SI, Yazaki J, Kishimoto N, Kikuchi S, Takahara M, Takamizo T, Sugita S, Nakagawa H (2009). Analysis of expressed sequence tags in apomictic guineagrass *Panicum maximum*. *Journal of plant physiology* 166:750-761.
- Yokotani N, Ichikawa T, Kondou Y, Iwabuchi M, Matsui M, Hirochika H, Oda, K (2013). Role of the rice transcription factor JAmyb in abiotic stress response. *Journal of Plant Research* 126:131-139.
- Zappacosta D (2009). Contribución al conocimiento de la taxonomía y del modo reproductivo del pasto llorón, *Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees. Tesis de Doctorado en Agronomía, Universidad Nacional del Sur, Argentina.
- Zappacosta D, Meier M, Carrera A, Pacheco G, Cardone S, Selva JP, Echenique V (2011). Molecular markers to study the variability within the *Eragrostis curvula* complex. *Phyton* 80:211-220.
- Zappacosta D, Ochogavía A, Rodrigo JM, Romero J, Meier M, Polci P, Garbus I, Pessino S, Echenique V (2014). Increased apomixis expression concurrent with genetic and epigenetic variation in a newly synthesized *Eragrostis curvula* polyploid. *Scientific reports*, 4.
- Zeng YJ, Conner J, Ozias-Akins P (2011). Identification of ovule transcripts from the Apospory-Specific Genomic Region (ASGR)-carrier chromosome. *BMC Genomics* 12:206.
- Zhang L, Wang Y, Zhang X, Zhang M, Han D, Qiu C, Han Z (2012). Dynamics of phytohormone and DNA methylation patterns changes during dormancy induction in strawberry (*Fragaria 9 ananassa* Duch.). *Plant Cell Reports* 31:155-165.
- Zhang SQ, Outlaw WH (2001). Abscisic acid introduced into the transpiration stream accumulates in the guard cell apoplast and causes stomatal closure. *Plant, Cell & Environment* 24:1045-1054.

- Zhao X, Si Y, Hanson R, Crane C, Price H, Stelly D, Wendel J, Paterson A (1998). Dispersed repetitive DNA has spread to new genomes since polyploid formation in cotton. *Genome Research* 8:479-492.
- Zhu JK, Scumaker KS, Xiong L (2002). Cell signalling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell* 14:165-183.
- Zorzatto C, Chiari L, de Araujo Bitencourt G, do Valle CB, de Campos Leguizamon GO, Schuster I, Pagliarini MS (2010). Identification of a molecular marker linked to apomixis in *Brachiaria humidicola* (Poaceae). *Plant breeding* 129:734-736.