



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA, BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**Evaluación del modo reproductivo en una población
segregante de un cruzamiento entre un genotipo sexual y
otro apomíctico de pasto llorón.**

TESINA PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIADO EN
CIENCIAS BIOLÓGICAS:

PRESENTADA POR:
Mateo Sansot Puleston
BAJO LA DIRECCIÓN DE:
Dr. Diego Carlos Zappacosta

Bahía Blanca, Noviembre 2023

Evaluación del modo reproductivo en una población segregante de un cruzamiento entre un genotipo sexual y otro apomíctico de pasto llorón.

TESINA PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIADO EN
CIENCIAS BIOLÓGICAS:

PRESENTADA POR:
Mateo Sansot Puleston
BAJO LA DIRECCIÓN DE:
Dr. Diego Carlos Zappacosta

Mateo Sansot Puleston

Sansot Puleston Mateo



Zappacosta Diego Carlos

AGRADECIMIENTOS

- A mi director, el Dr. Diego Carlos Zappacosta, por todo el compromiso, dedicación y ayuda durante la realización del trabajo.
- A mi profesora consejera Ana Julia Samantha Nebbia, por brindarme orientación y ayuda a lo largo de la carrera.
- Al CERZOS por permitirme usar las instalaciones y equipamiento.
- A mi familia, que ha estado siempre brindando apoyo, y me ha permitido estudiar.
- A mi pareja, por su dedicación incondicional.
- A mis compañeros y amigos, con quienes fue posible llevar a cabo la carrera.
- A Juan Pablo Selva y todo el grupo de Biotecnología Vegetal, por sus aportes que me permitieron llevar a cabo este trabajo.
- A todos los que de una forma u otra me hayan impulsado en esta etapa.

ÍNDICE

Agradecimientos.....	3
Resumen	5
Introducción	6
Reproducción sexual	6
Desarrollo del gametofito femenino	7
Apomixis.....	8
Herencia del carácter.....	9
Hipótesis	11
Objetivos	11
Materiales y métodos	12
Material vegetal	12
Observaciones citoembriológicas.....	13
Análisis de datos.....	16
Resultados y discusión.....	17
Preparación del material.....	17
Fenotipado por citoembriología.....	17
Proporción de plantas apomícticas-sexuales.....	19
Frecuencia de procesos apomícticos.....	20
Genotipado del modo reproductivo utilizando marcadores moleculares.....	21
Comparación del fenotipado obtenido por citoembriología con otros marcadores moleculares obtenidos por DArT-seq.....	22
Conclusión.....	24
Bibliografía.....	25

RESUMEN:

Eragrostis curvula (pasto llorón) es una gramínea originaria del sur de África, que actualmente se encuentra ampliamente distribuida y utilizada para forrajes debido a su gran rusticidad y adaptabilidad a suelos poco fértiles o erosionables en distintas partes del mundo. El pasto llorón posee una capacidad particular de reproducción, en la cual además de la reproducción sexual posee también otro modo de reproducción conocido como apomixis, más específicamente apomixis diplospórica. La apomixis está bajo control genético y puede ser explicada por la genética mendeliana, aunque también existe un componente epigenético. Basados en datos de segregación, los genes que controlan la apomixis parecen ser pocos en número, aunque como existe falta de recombinación en las regiones cromosómicas determinantes del carácter pueden estar involucrados numerosos genes que segregan en bloque. Recientemente se realizó un cruzamiento entre los genotipos tetraploides OTA-S (sexual) y Don Walter INTA (apomítico) para generar una población de mapeo y el modo reproductivo de la descendencia se realizó utilizando un marcador molecular 100% al carácter.

El objetivo de este trabajo fue evaluar citoembriológicamente la ocurrencia y frecuencia de procesos apomíticos y sexuales en individuos de una población segregante en modo reproductivo de pasto llorón, y comparar los resultados con el genotipado obtenido con el marcador molecular y establecer la frecuencia de procesos sexuales y apomíticos en cada uno de los individuos evaluados. Para esto, se colectaron y fijaron panojas en el momento de anthesis en 11 plantas provenientes del cruzamiento antes mencionado, se realizó el fenotipado por citoembriología utilizando un microscopio equipado con contraste de interferencia diferencial y se procedió a comparar los datos obtenidos por citoembriología con los obtenidos con el marcador molecular.

Para diferenciar procesos sexuales y apomíticos, se consideró la presencia de meiosis y la cantidad y posición de núcleos en el saco embrionario. El 55% de las plantas resultaron apomíticas y el 45% sexuales, esto sugiere una proporción cercana al 1:1, indicativo de un modelo de herencia de un único factor dominante. Se observó variabilidad en la frecuencia de procesos apomíticos entre plantas apomíticas (3 al 46%), además ninguna planta presentó un 100% de apomixis, indicando apomixis facultativa en todos los individuos. La comparación con los resultados de marcadores moleculares mostró una concordancia en todos los casos excepto uno, el cual será estudiado nuevamente. Comparando los resultados obtenidos con marcadores moleculares DArT-Seq ligados a la apomixis obtenidos del genotipado de la población de mapeo, se observó que algunas plantas apomíticas presentaban solo marcadores paternos (parental apomítico) y otras marcadores paternos y maternos (parental sexual) coincidiendo con bajos porcentajes de procesos apomíticos. Esto podría sugerir una posible poligenia en la expresión y regulación de la apomixis en *E. curvula*. Este estudio aporta valiosa información sobre la herencia de la apomixis en esta especie, destacando la complejidad genética de la misma. La combinación del fenotipado por citoembriología y marcador molecular mejora la fiabilidad de los resultados. Estos hallazgos sientan las bases para futuras investigaciones las cuales podrían tener implicaciones en la transferencia del carácter a cultivos de importancia agrícola.

INTRODUCCIÓN

Eragrostis curvula, conocida como “pasto llorón”, es una gramínea forrajera originaria del sur de África, que se caracteriza por su rusticidad, capacidad para prosperar en suelos pobres en fertilidad (Fig. 1) y su aptitud para consolidar suelos erosionables, incluso médanos (Covas, 1991).

Debido a los cambios climáticos globales, la zona de desertificación se está expandiendo lentamente, lo que hace urgente explotar el potencial no aprovechado de las especies de plantas adaptadas a zonas áridas (Brown y Wilby 2012). Por lo tanto, este género es muy adecuado para estudiar la adaptación a la sequía por su notable viabilidad en hábitats secos (Colom y Vazzana, 2001; Balsamo et al., 2006; Degu et al., 2008; Ginbot y Farrant, 2011; Buerdsell et al., 2022).



Figura 1: *Eragrostis curvula* creciendo sobre los médanos en Monte Hermoso.

Reproducción sexual

El pasto llorón es una especie perteneciente al grupo de las angiospermas, por lo tanto, posee alternancia de generaciones, esporofítica y gametofítica (Fig. 2). El esporofito se origina luego de la fecundación, a partir de un cigoto $2n$, el cual dará origen a la parte vegetativa de la planta (tallos, hojas y raíces) y a las flores en donde se encuentran los órganos sexuales (androceo y gineceo) (Goldberg et al., 1994). En estos órganos sexuales, se originan los gametofitos, femenino (saco embrionario) y masculino (granos de polen), en los cuales se formarán los gametos reducidos que participarán de la fecundación cerrando el ciclo (Yadegari y Drews, 2004; Fan et al., 2008).

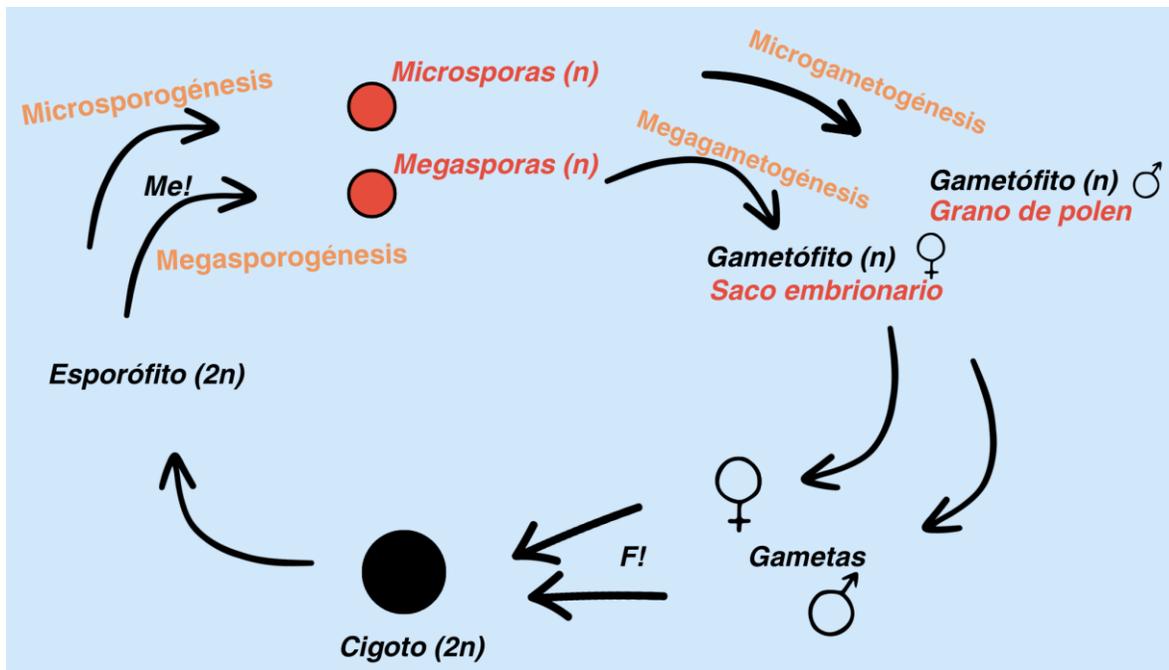


Figura 2: Esquema del ciclo de angiospermas. F!: fecundación, Me!: meiosis.

Desarrollo del gametofito femenino (megagametofito)

En pasto llorón, las flores se presentan en inflorescencias de tipo panoja, estas contienen espiguillas plurifloras con 3 a 10 flores cada una. Cada flor es hermafrodita, formada por un pistilo bicarpelar, tres estambres, dos lodículas, una pálea, una lemma y dos glumas. En el interior del ovario se encuentra el óvulo, recubierto por dos capas tegumentarias que convergen dejando una abertura, denominada micrópilo, que permite el ingreso del tubo polínico durante la fecundación. En el extremo opuesto del óvulo, se encuentra la chalaza. En el interior del óvulo se desarrolla una masa de tejido compacto (la nucela) en la que se diferenciará la célula madre de la megaspóra (CMM) (Bhojwani y Bhatnagar, 1983).

El desarrollo del saco embrionario (gametofito femenino), se lleva a cabo mediante los procesos de megasporogénesis y megagametogénesis (Fig. 3), mientras que en el grano de polen es resultado de la microsporogénesis y microgametogénesis. Una vez formados tanto el gametofito masculino como el femenino, ocurren los siguientes eventos: transporte del grano de polen al estigma (por polinización anemófila), germinación del grano formando el tubo polínico, que crece a lo largo del estilo hasta alcanzar el micrópilo, donde se liberan los núcleos espermáticos (n). Aquí se produce el proceso de doble fecundación: Un núcleo fecunda a la ovocélula (n) formando el cigoto (2n) y el otro, se fusiona a los núcleos polares (centrales) formando el endosperma (3n). Luego, a través de sucesivas mitosis, se forma una semilla madura con el embrión y el endosperma en su interior (Yadegari y Drews, 2004).

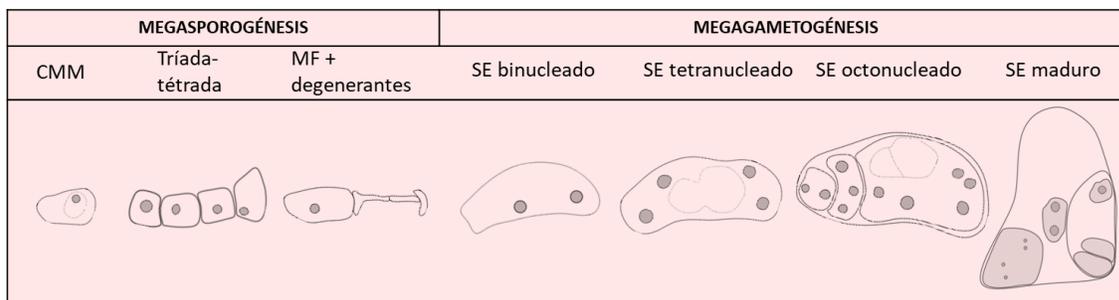


Figura 3: Megasporogénesis y Megagametogénesis del saco embrionario sexual de *Eragrostis curvula*. Los extremos micropilar y chalazal se encuentran en la parte derecha e izquierda, respectivamente, desde la célula madre de la megaspora (CMM) hasta el saco embrionario (SE). En el saco embrionario maduro octonucleado, la región chalazal y micropilar se reubican ambos hacia la parte inferior del saco debido al crecimiento y maduración, provocando la curvatura del saco y las estructuras que lo rodean. MF: megaspora funcional (Tomada de Bisp, 2022).

Apomixis

Eragrostis curvula posee, además del proceso de reproducción sexual, la capacidad de generar semillas en forma asexual mediante apomixis diplospórica. En este tipo de reproducción la CMM no sufre meiosis y la ovocélula no se fecunda, por lo tanto, los individuos generados a partir de estas semillas serán idénticas a la planta progenitora (clones) (Nogler, 1984). Éste carácter se encuentra en unas 400 especies de Angiospermas y parece haber surgido a partir de una desregulación del proceso sexual (Hojsgaard et al., 2014).

En la apomixis gametofítica, a diferencia de la reproducción sexual, el saco embrionario (SE) se forma en ausencia de meiosis (apomeiosis), y por lo tanto, los núcleos de dicho SE no están reducidos ($2n$). En el desarrollo del SE apomítico diplospórico de *E. curvula*, la CMM, no se divide meióticamente, pero sí crece en tamaño, denominándose este estadio como célula madre de la megaspóra elongada (CMME, Fig. 4). Ésta, luego sufre dos divisiones mitóticas que darán lugar a un SE tetranucleado, conformado por dos sinérgidas, un núcleo polar y la ovocélula (Fig. 4). La ovocélula ($2n$) no es fecundada y desarrolla espontáneamente un embrión por partenogénesis (Savidan, 2000). Este tipo particular de desarrollo fue descrito por Crane (2001) como apomixis tipo *Eragrostis*.

Un factor que se debe tener en cuenta en el proceso de apomixis es que ocurre sólo en el gametofito femenino, mientras que para la formación de los granos de polen se sigue la ruta de desarrollo sexual, con su correspondiente división meiótica, generando núcleos reducidos (n). Generalmente para la formación del endospermo de la semilla, se requiere de la unión del/los núcleos polares con un núcleo espermático del polen, mientras que el embrión, por otra parte, se desarrolla por partenogénesis sin fecundación. Este mecanismo es conocido como pseudogamia, y junto con la diplosporía son características que aparecen en *E. curvula* (Meier et al., 2011).

En general la apomixis es facultativa por lo cual coexiste con la sexualidad en el mismo individuo (e incluso en la misma espiguilla) y la predominancia de una u otra depende de la especie y el genotipo considerado (Conner y Ozias-Akins, 2017).

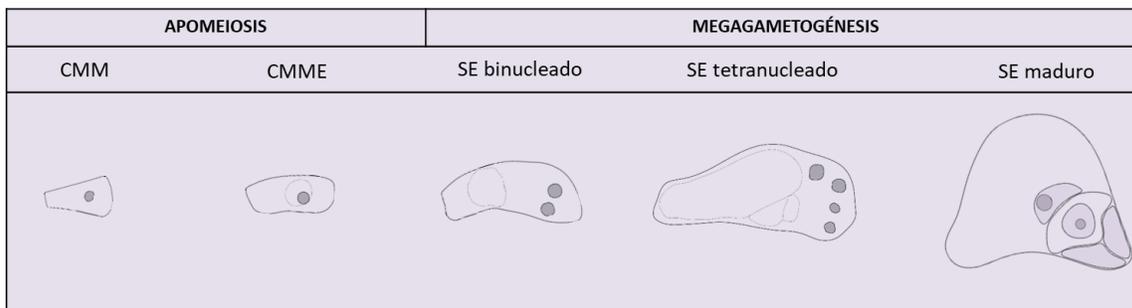


Figura 4: Apomeiosis y megagametogénesis en *E. curvula*. Los extremos micropilar y chalazal se encuentran en la parte derecha e izquierda, respectivamente, desde la célula madre de la megaspora (CMM) hasta el saco embrionario (SE). En el saco maduro, la región chalazal y micropilar se reubican ambos hacia la parte inferior del saco debido al crecimiento y maduración provocando la curvatura del saco y las estructuras que lo rodean. CMME: Célula madre de la megaspora elongada (Tomada de Bisp, 2022).

El fenotipado de la apomixis se puede hacer fundamentalmente de dos maneras, por observaciones citoembriológicas o utilizando marcadores moleculares ligados al carácter. En pasto llorón se probó también el test de progenie y la evaluación de la relación de ploidía embrión: endosperma en semillas por citometría de flujo (Meier et al., 2011). La última opción no es viable en pasto llorón porque las relaciones de ploidía embrión: endosperma son iguales en semillas provenientes de procesos apomícticos y sexuales. Con respecto al genotipado con marcadores moleculares, se han desarrollado marcadores a partir de estudios previos (Zappacosta et al., 2019) y de datos de secuenciación (José Carballo, com. pers), sin embargo dichos marcadores aún no han sido evaluados en plantas con fenotipo reproductivo incógnita.

Herencia del carácter

Si bien la apomixis en angiospermas es heredable y puede ser explicada por la genética mendeliana, la base genética es inesperadamente compleja y se ha encontrado un fuerte componente epigenético (Selva et al., 2017, 2020). Los primeros estudios sobre la herencia de la apomixis (Nogler, 1984) demostraron que la apomixis está bajo control genético, aunque, por supuesto, su expresividad puede verse afectada por modificadores de la expresión génica o condiciones ambientales (Savidan et al., 2001). El estudio de los factores genéticos involucrados en la apomixis se dificulta por la naturaleza poliploide de la mayoría de las especies apomícticas, la disponibilidad adecuada de plantas sexuales compatibles y las dificultades para clasificar la progenie, particularmente porque los componentes de la apomixis (apomeiosis, partenogénesis y pseudogamia) pueden segregarse en algunas

especies. Basados en datos de segregación, los genes que controlan la apomixis parecen ser pocos en número, aunque como existe falta de recombinación en las regiones cromosómicas determinantes del carácter pueden estar involucrados numerosos genes que segregan en bloque (Ozias-Akins y van Dijk, 2007).

Actualmente *E. curvula* se utiliza como modelo para el estudio de la apomixis ya que presenta genotipos con distinto modo reproductivo (apomícticos obligados, apomícticos facultativos y sexuales) y por su tipo particular de desarrollo de la semilla que posee la misma relación de ploidía embrión: endosperma en ambos procesos, sexual y apomíctico (Carballo et al., 2021). Recientemente se realizó un cruzamiento entre los genotipos tetraploides OTA-S (sexual) y Don Walter INTA (apomíctico) y se generó una población de mapeo (Zappacosta et al., 2019). Con dicha población se confirmó una herencia mendeliana simple del carácter con una proporción equivalente de individuos sexuales y apomícticos en la descendencia. Por medio de marcadores moleculares también se logró generar el primer mapa de ligamiento de la especie, identificar la región condicionante de la apomixis y marcadores 100% ligados al carácter. Para aumentar la resolución del mapa de ligamiento y confirmar la herencia del carácter se generó una nueva población de mapeo utilizando los mismos genotipos parentales.

Una evaluación fenotípica de los nuevos híbridos a través de análisis citoembriológicos permitirá comparar y corroborar los resultados de un fenotipado realizado previamente utilizando un marcador molecular experimental (Gallardo, 2023). Dichos conocimientos permitirían a futuro la manipulación del carácter para su introgresión en especies de producción agrícola de reproducción sexual, mediante la utilización de técnicas de ingeniería genética.

HIPÓTESIS:

Para realizar el trabajo se plantearon las siguientes hipótesis:

- El modo reproductivo segrega en forma mendeliana en pasto llorón, siendo igual la frecuencia de individuos sexuales y apomícticos en la progenie del cruzamiento entre OTA-S X Don Walter.
- El uso de un marcador molecular 100% ligado a la apomixis permite un genotipado confiable de la nueva población de mapeo.

OBJETIVO:

Como objetivo general, se planteó evaluar citoembriológicamente la ocurrencia y frecuencia de procesos apomícticos y sexuales en individuos de una población segregante en modo reproductivo de pasto llorón, y comparar los resultados con el fenotipado obtenido con un marcador molecular.

Los objetivos específicos son:

- Fenotipar por citoembriología los individuos del cruzamiento.
- Correlacionar los datos del fenotipado por citoembriología y con un marcador molecular.
- Evaluar la frecuencia de procesos apomícticos y sexuales en los individuos apomícticos producto de la cruce OTA-S X Don Walter.

MATERIALES Y MÉTODOS:

Material vegetal:

En el trabajo se utilizó material provisto por el grupo de Biotecnología Vegetal (CERZOS, CONICET-UNS, CCT Bahía Blanca), el cual corresponde a plantas adultas resultantes de un cruzamiento entre los genotipos tetraploides OTA-S (sexual) y Don Walter INTA (apomítico facultativo).

Las plantas utilizadas en esta tesis se encuentran en macetas de 3 L en el invernadero del CERZOS con riego periódico, fotoperiodo natural y a una temperatura de 25 +/- 5 °C. Para la inducción de la floración (vernalización), las plantas fueron retiradas del invernadero y llevadas a la intemperie durante unos 15 o 20 días en la estación invernal (Fig. 5).

Se utilizaron 11 individuos (que florecieron en el periodo 2022/2023) de la población de mapeo para la evaluación fenotípica por citoembriología, los cuales fueron identificados como 326, 332, 339, 340, 341, 350, 356, 359, 372, 377 y 458.



Figura 5: Población de trabajo, ejemplares OTA-S, ejemplares Don Walter y progenie entre estos.

Observaciones citoembriológicas:

Las panojas se colectaron en el momento de presentar los primeros signos de antesis en la parte superior de la panoja, donde es posible encontrar todo el rango de desarrollo del saco embrionario en la mayoría de las espiguillas, desde la célula arquesporrial hasta la posible fecundación (Meier et al., 2011). Las mismas se fijaron en Farmer (75% etanol absoluto, 25% ácido acético glacial) y luego de al menos 24 horas se transfirieron a etanol 70%.

Luego de la fijación, las espiguillas fueron diseccionadas bajo lupa Leica S8APO equipada con una cámara digital Leica MC120 HD, conservándose solo el pistilo acompañado de la antera de posición externa respecto al raquis. La conservación de esta antera permite que los pistilos, al momento de ser observados, se ubiquen naturalmente en posición sagital sobre el portaobjetos (Fig. 6), permitiendo así una correcta visualización del óvulo (Bisp, 2022).

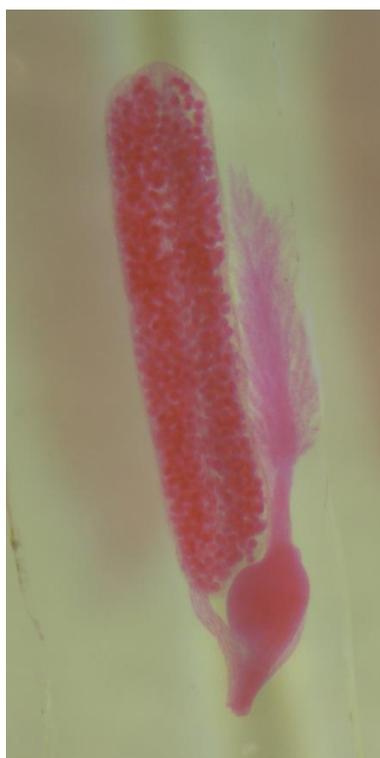


Figura 6: Pistilo posicionado de forma sagital unido a la antera de posición externa respecto al raquis.

Se utilizó la técnica de clarificación con salicilato de metilo siguiendo el protocolo descrito por Young et al. (1979) con pequeñas modificaciones. Se optó por la utilización de esta técnica ya que el tiempo que se necesita entre la colecta del material y la observación del mismo bajo microscopio es relativamente corto con respecto a las técnicas histológicas tradicionales de inclusión, corte con micrótopo y coloración.

Brevemente, los pistilos en etanol 70% se incubaron durante 60 minutos en agitación a temperatura ambiente en las siguientes soluciones: etanol 95%; etanol 95% con eosina 2%

(sólo 20 minutos), etanol 100% (más un enjuague con etanol 100%); etanol/salicilato de metilo 75%/25%; etanol/salicilato de metilo 50%/50%, etanol/salicilato de metilo 25%/75% y salicilato de metilo 100% (al menos 24 horas).

Los óvulos se observaron con un microscopio Leica DM2500 LED equipado con un sistema de contraste de interferencia diferencial (DIC) y una cámara digital (Leica MC170 HD). Esta técnica de microscopía óptica, produce imágenes de la muestra con apariencia tridimensional.

Al momento del montaje de los pistilos sobre el portaobjetos se utilizaron dos técnicas con el objetivo de lograr una buena posición de los pistilos y observación de los óvulos.

1. Técnica de la “canaleta” descrita por Bisp (2022), en donde se utiliza un portaobjetos con dos cubreobjetos, los cuales hacen de soporte para los pistilos. Los cubreobjetos se montan sobre el portaobjetos dejando un espacio a modo de “canaleta” que permite ubicar a los pistilos de forma correcta para su vista sagital, luego se coloca un tercer cubreobjetos tapando la “canaleta” para realizar las observaciones al microscopio (Fig. 7). La “canaleta” mantiene los pistilos en la posición correcta, es decir la posición donde es posible observar lateralmente los sacos embrionarios.

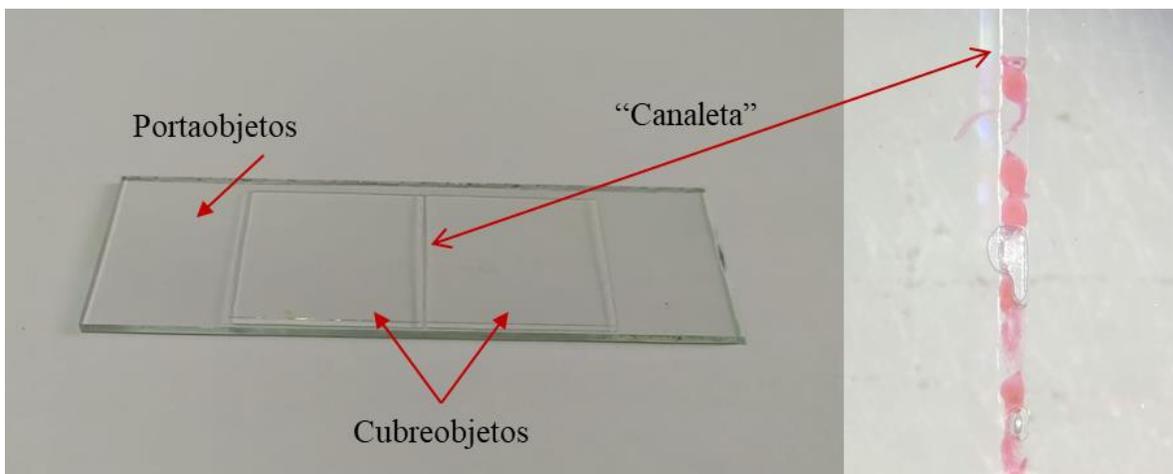


Figura 7: Metodología seguida para la observación de los pistilos bajo microscopio (combinación de portaobjetos y cubreobjetos). A la derecha se observa un detalle amplificado de la posición en que quedan los pistilos (Tomada de Bisp, 2022).

2. Uso de portaobjetos de superficie cóncava. Se utilizó un portaobjetos que posee en una de sus caras una concavidad, la cual se llena con salicilato de metilo 100% y luego se colocan los pistilos, posteriormente se coloca un cubreobjetos para realizar las observaciones al microscopio (Fig. 8). Aquí es importante que los pistilos permanezcan unidos a la antera para que naturalmente se posicionen de forma sagital.

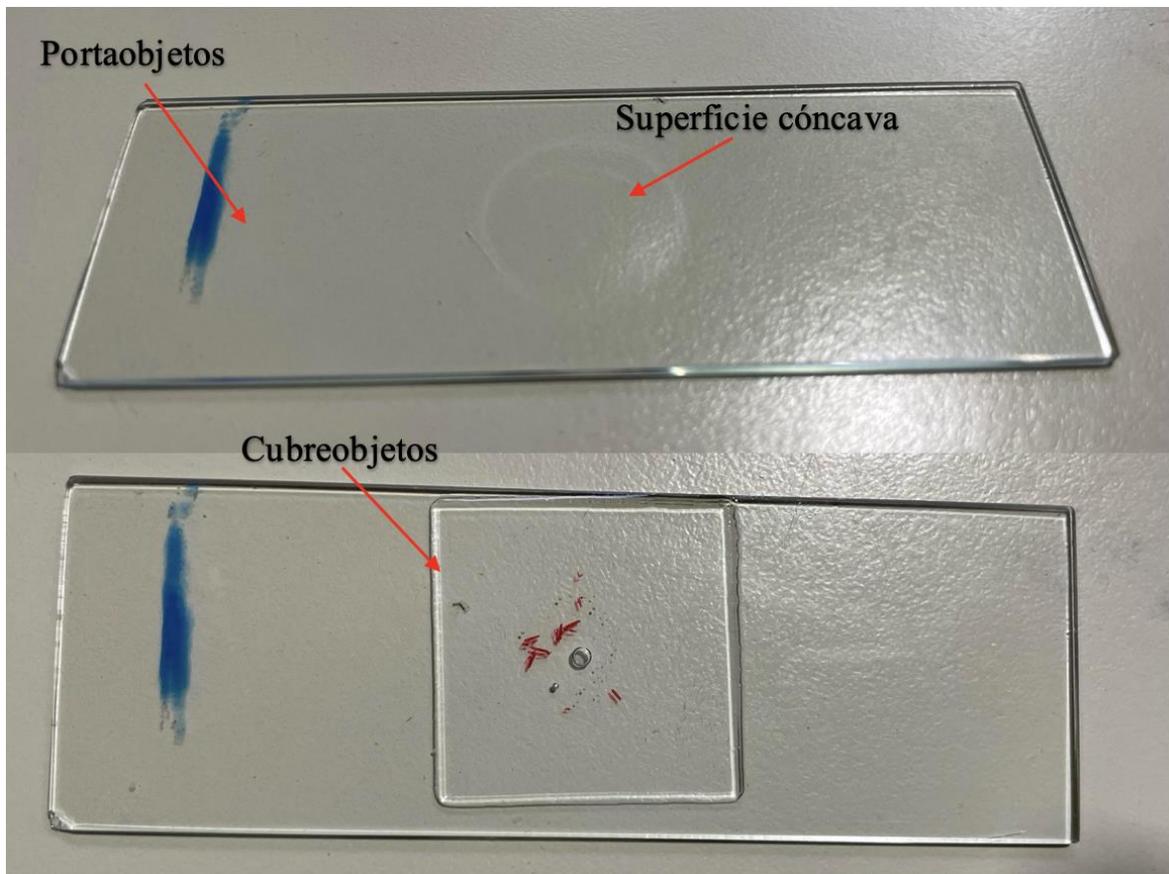


Figura 8: Metodología seguida para la observación de los pistilos utilizando portaobjetos con superficie cóncava.

Para cada una de las plantas evaluadas se observaron 30 pistilos. En cada una de las observaciones se determinó el estadio presente en cada óvulo, se identificó si presentaban un proceso sexual o apomíctico y se tomó un registro fotográfico. En total se observaron 331 pistilos y se tomaron 1160 fotos. Para la adquisición de imágenes en el microscopio se utilizó el software Leica LAS EZ.

Para diferenciar entre procesos sexuales y apomícticos se tuvo en cuenta la presencia o ausencia de meiosis o degenerantes y la cantidad y posición de los núcleos en el saco embrionario (Meier et al., 2011). Básicamente, en un proceso sexual, en el interior de la nucela se diferencia la CMM ($2n$), que luego de sufrir una división meiótica genera cuatro células megasporas reducidas (n), que generalmente adoptan una disposición lineal (tétrada). Posteriormente, las tres células que se encuentran cercanas al micrópilo sufren muerte celular y degeneran, quedando así una megaspora funcional (MF) (n) en el extremo chalazal. La MF comienza a sufrir divisiones mitóticas, formando un saco inmaduro binucleado, luego tetranucleado y por último octonucleado, inicialmente sin citocinesis, y luego, generando un saco maduro con células diferenciadas: tres antípodas en el extremo chalazal, una célula central binucleada (con dos núcleos llamados núcleos polares), dos sinérgidas y una ovocélula en el extremo micropilar (Fig 3). Este patrón de desarrollo es descrito como tipo-Polygonum. Particularmente en *Eragrostis* las antípodas continúan

dividiéndose por lo que podemos observar gran cantidad de antípodas en el polo chalazal (Vorster et al., 1984).

En un proceso apomítico tipo *Eragrostis*, la CMM no sufre meiosis y comienza a aumentar de tamaño, formándose lo que denominamos célula madre de las megasporas elongada (CMME). La CMME comienza a sufrir divisiones mitóticas, formando un saco inmaduro binucleado y luego tetranucleado con todos los núcleos en el extremo micropilar. Luego ocurre la citocinesis quedando un saco embrionario maduro conformado por dos sinérgidas, un núcleo polar y la ovocélula (Fig. 4).

Para caracterizar una planta como sexual o apomítica, se siguieron los criterios propuestos por Savidan (2000) donde las plantas se consideran sexuales cuando solo presentan procesos sexuales en los pistilos observados y apomíticos cuando se observa al menos un proceso apomítico.

La Tabla 1 resume las principales diferencias que se pueden hallar entre los procesos apomítico y sexual en pistilos de *E. curvula*.

Tabla 1. Características de la megasporogénesis y megagametogénesis propias de los procesos sexuales y apomíticos utilizadas para el fenotipado (de acuerdo a Meier et al., 2011).

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

Análisis de datos

Para la recolección de los datos, su selección y su posterior análisis, así como también la realización de tablas y figuras con gráficos comparativos, se utilizó el programa Microsoft Office Excel (versión 2019).

RESULTADOS y DISCUSIÓN:

Preparación del material

Se recolectó y fijo material suficiente de cada ejemplar y el proceso de disección/clarificación fue adecuado ya que permitió una buena observación de los óvulos. En la observación, la técnica en la que se utiliza el portaobjetos cóncavo resulto ser más eficiente (considerando que se realizó una buena extracción de pistilos junto con la antera correspondiente) ya que ésta nos permite trabajar con mayor cantidad de material en el mismo portaobjetos acortando los tiempos de observación.

Fenotipado por citoembriología

En el presente trabajo, las principales diferencias que se observaron se encontraban en estadios iniciales/intermedios del proceso reproductivo, siendo para el caso de reproducción sexual la presencia de una MF con las células degenerantes (Fig. 9 A) como así también SE binucleados o tetranucleados con sus núcleos polarizados (Fig. 9 C y E), es decir, uno o dos núcleos en el extremo micropilar y uno o dos núcleos en el extremo chalazal y, para el caso de apomixis, la CMME (Fig. 9 B) como así también SE binucleados o tetranucleados con todos los núcleos en el extremo micropilar (Fig. 9 D y F).

También se encontraron, en menor frecuencia, estadios avanzados, siendo para el caso de reproducción sexual la presencia de un SE octonucleado, mientras que, para el caso de reproducción apomíctica, se observó la presencia de un SE maduro tetranucleado.

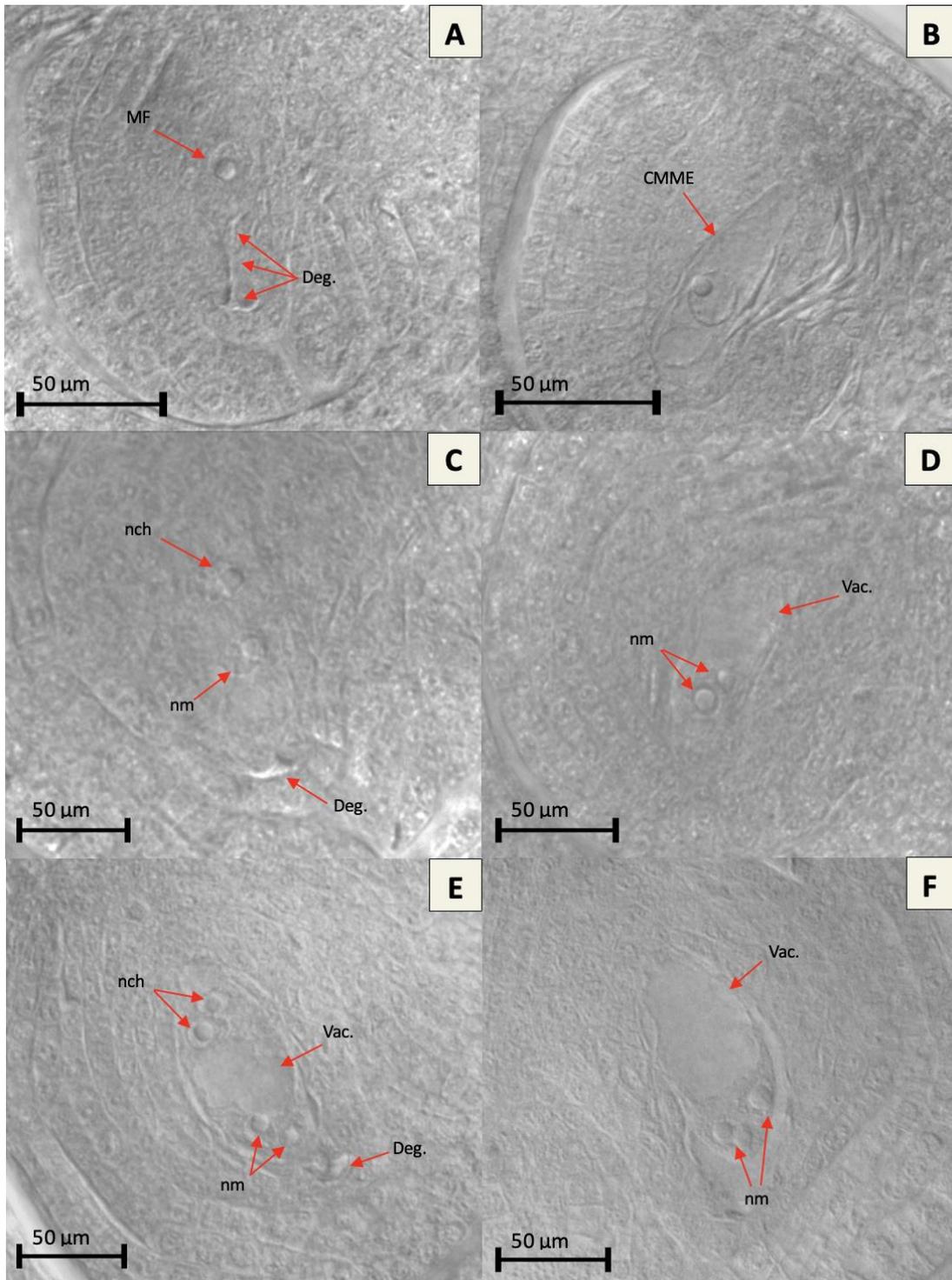


Figura 9: Desarrollo del saco embrionario sexual (A, C y E) y apomítico (B, D y F) de *E. curvula*, observado bajo microscopio de interferencia diferencial. A. Megaspore funcional más células degenerantes. B. Célula madre de las megasporas elongada. C. Saco sexual binucleado con restos de células degenerantes. D. Saco apomítico binucleado con vacuola en crecimiento. E. Saco sexual tetranucleado con restos de células degenerantes. F. Saco apomítico binucleado avanzado con una gran vacuola. Referencias: MF: Megaspore funcional, Deg: Células degenerantes, CMME: Célula madre de las megasporas elongada, nch: Núcleos chalazales, nm: Núcleos micropilares, Vac: Vacuola.

Proporción de plantas apomícticas-sexuales

Como se muestra en la Tabla 2, de las once plantas estudiadas provenientes del cruzamiento entre OTA-S x Don Walter, seis presentaron procesos apomícticos (individuos 356, 340, 358, 326, 339 y 332) y cinco únicamente procesos sexuales (individuos 377, 350, 359, 372 y 341), lo que resulta en un 55% de plantas apomícticas y un 45% de plantas sexuales (Fig. 10).

Tabla 2: Modo reproductivo presente en cada planta evaluada.

Planta	377	356	350	359	372	340	458	326	339	341	332
Reproducción	Sexual	Apomixis	Sexual	Sexual	Sexual	Apomixis	Apomixis	Apomixis	Apomixis	Sexual	Apomixis

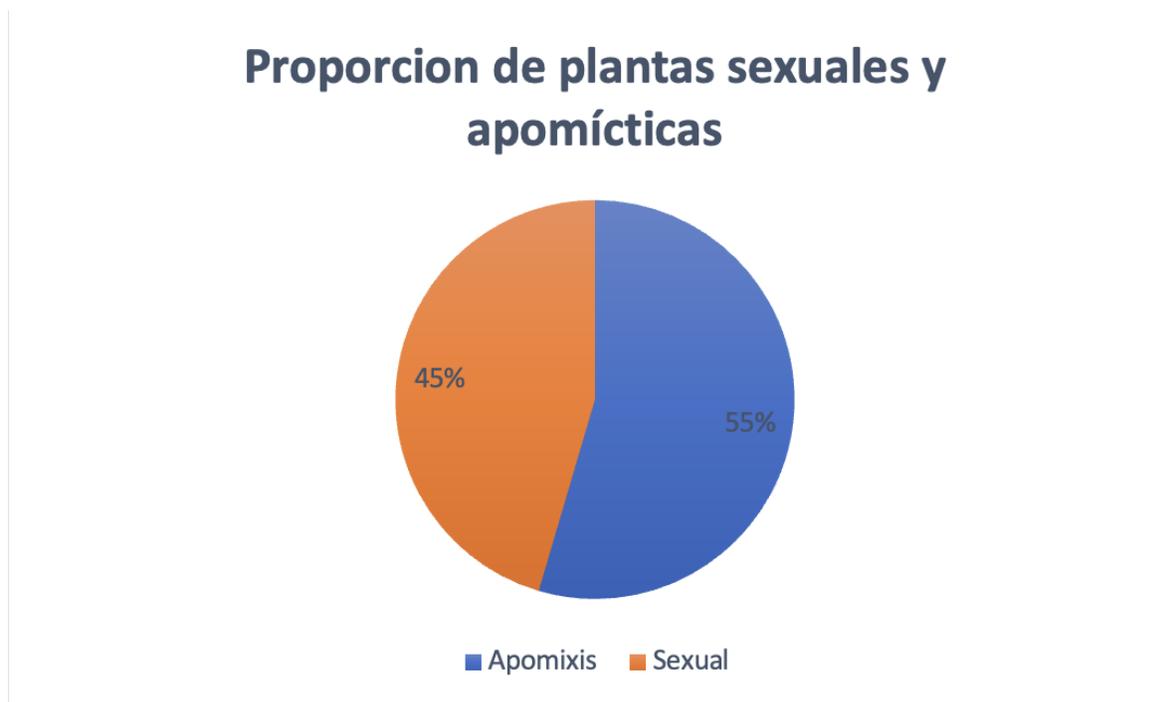


Figura 10: Proporción de individuos sexuales y apomícticos entre las plantas evaluadas.

Es importante aclarar que, para considerar que una planta presenta apomixis, hace falta una sola observación de un proceso apomíctico, mientras que, para considerar que una planta presenta reproducción sexual hace falta observar la totalidad de los procesos de tipo sexual. De las 11 plantas evaluadas, en seis se observó la presencia de procesos apomícticos, es decir que poseen la región determinante de la apomixis. Las restantes cinco plantas, al poseer únicamente procesos sexuales, se espera que no contengan la región determinante de la apomixis.

De acuerdo con el análisis fenotípico, 6 individuos apomícticos y 5 sexuales, representan una proporción cercana al 1:1 que concuerda con un modelo de herencia de un único factor dominante, como se observó previamente en la pasto llorón (Zappacosta et al., 2019) y también recientemente con la nueva población de mapeo (Gallardo, 2023). Lo mismo

también se describe para otras especies apomícticas diplospóricas, como *Taraxacum officinale* (Vijverberg et al., 2004) y *Tripsacum dactyloides* (Grimanelli et al., 1998).

En este trabajo se evaluaron 11 plantas de toda la progenie, debido a que fueron las plantas que florecieron en el período 2022/2023 cuando se tomaron las muestras, por lo tanto, sería de utilidad evaluar el resto de los individuos para así confirmar este tipo de herencia mendeliana. Para ello, se comenzó con la colecta de panojas en la floración 2023/2024.

Frecuencia de procesos apomícticos

Como se observa en la Figura 11, cinco plantas (377; 350; 359; 372; 341) tuvieron únicamente procesos sexuales, mientras que las seis restantes (356; 340; 458; 326; 339; 332) presentaron, en diferente frecuencia, procesos sexuales y apomícticos. La frecuencia de procesos apomícticos varía para cada una de las plantas consideradas apomícticas, alcanzando valores muy bajos (3,3%) para algunos casos y relativamente altos (46,6%) para otros. En ninguna de las plantas analizadas se encontró un 100% de apomixis, es decir que poseen procesos sexuales en diferentes frecuencias, por lo que serían facultativas. Esta sexualidad residual se considera clave para generar un pequeño grado de variabilidad genética para afrontar posibles nuevos escenarios ambientales. Hay que tener en cuenta que solo se está evaluando la apomeiosis, por lo que el verdadero porcentaje de apomixis o sexualidad debería evaluarse en los individuos de la progenie.

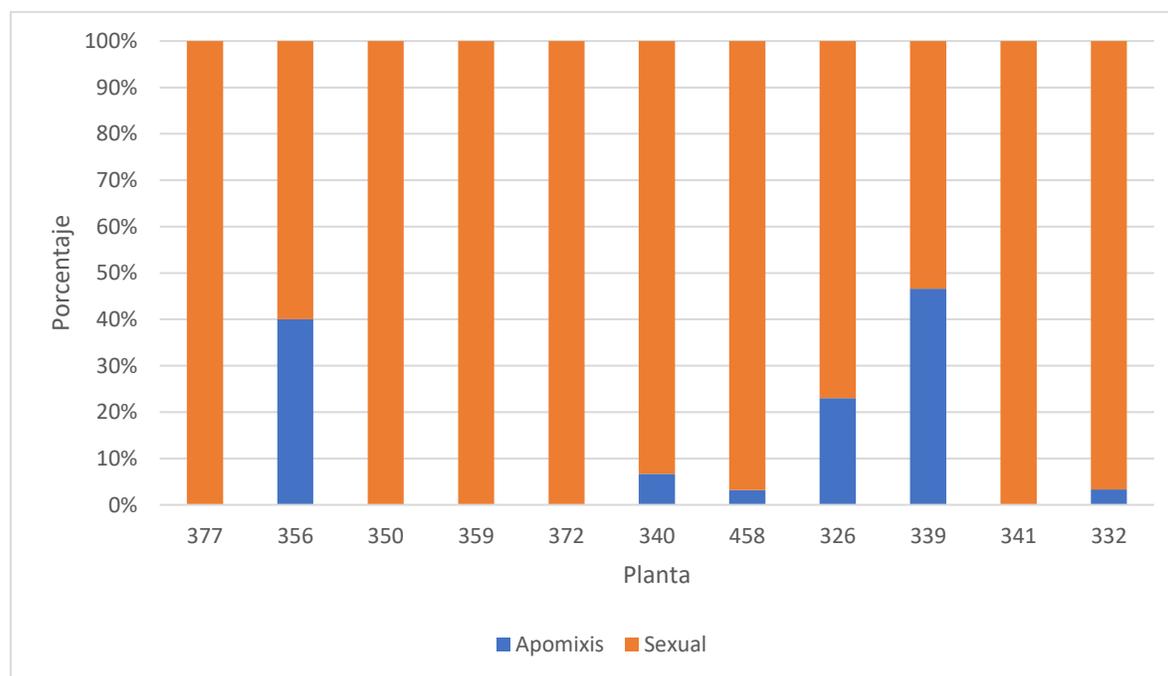


Figura 11: Porcentaje de pistilos con procesos sexuales y apomícticos presentes en cada una de las plantas evaluadas.

Genotipado del modo reproductivo utilizando marcadores moleculares

Los individuos evaluados en el presente trabajo fueron fenotipados por modo reproductivo utilizando un marcador molecular 100 % asociado al carácter (Gallardo, 2023). En la Figura 12 se muestra un gel de agarosa representativo del fenotipado realizado con el marcador molecular donde se puede observar la amplificación del fragmento de 450 pb presente solo en los genotipos apomícticos (Don Walter e híbridos apomícticos) y ausente en los genotipos sexuales (OTA-S e híbridos sexuales).

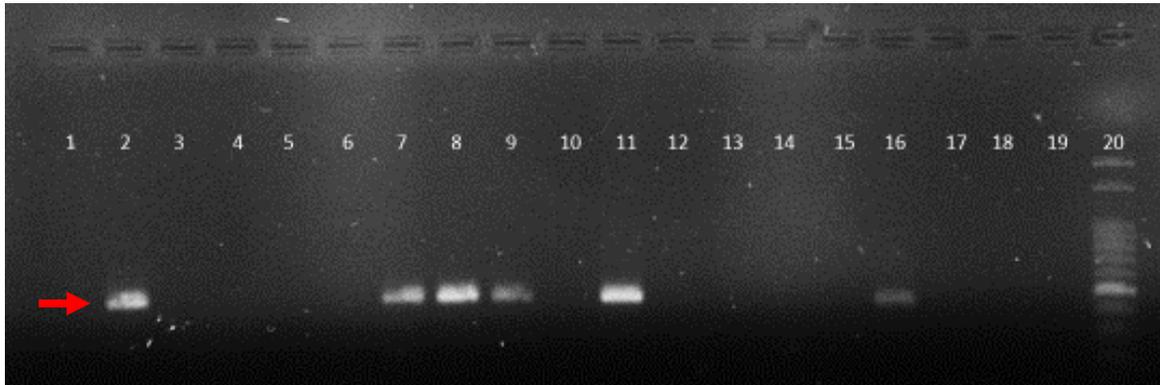


Figura 12: Gel de agarosa al 1% donde se muestra la amplificación del marcador molecular 100% ligado a la apomixis. Con una flecha roja se indica el fragmento que solo amplifica en plantas apomícticas. Calle 1: OTA-S, calle 2: Don Walter, calles 3-19: individuos segregantes de la población de mapeo, calle 20: marcador de peso molecular (Tomado de Gallardo 2023).

En la Tabla 3 se comparan los resultados del fenotipado hallados con el marcador molecular y por citoembriología de las plantas evaluadas en el presente trabajo.

Tabla 3: Fenotipado por modo reproductivo utilizando un marcador molecular 100% ligado a la apomixis y por citoembriología de individuos de la población de mapeo originada del cruzamiento entre OTA-S x Don Walter.

Individuo	Marcador molecular	Citoembriología
326	Apomíctico	Apomíctico
335	Apomíctico	Apomíctico
339	Apomíctico	Apomíctico
340	Apomíctico	Apomíctico
341	Sexual	Sexual
350	Sexual	Sexual
356	Apomíctico	Apomíctico
359	Sexual	Sexual
372	Sexual	Sexual
377	Sexual	Sexual
458	Sexual	Apomíctico

Como se observa en la Tabla 3 hubo coincidencia en los resultados obtenidos por el marcador molecular y por citoembriología, excepto en el individuo 458 donde la ausencia de amplificación del marcador molecular indica que es sexual y por citoembriología se

observó un saco embrionario típico de procesos apomícticos y el resto de los 30 pistilos observados presento procesos sexuales. Para confirmar el dato citoembriológico, se volvió a evaluar la foto correspondiente y se confirmó que corresponde a un saco apomíctico. Como esta inconsistencia se debe a solo una observación hay probabilidades de que se trate de un error humano, por ejemplo contaminación, por lo tanto se colectaran nuevas muestras de la planta 458 en la nueva floración y se hará un nuevo análisis.

Comparación del fenotipado obtenido por citoembriología con otros marcadores moleculares obtenidos por DArT-seq

En el trabajo realizado por Gallardo (2023) el total de los individuos híbridos del cruzamiento entre OTA-S y Don Walter y que forman la población de mapeo, fueron genotipados por marcadores DArT-seq (Diversity Array Technology), estos marcadores son de tipo SNPs e InDels y pueden proporcionar un análisis profundo de la diversidad genética, un perfil del genoma completo y un mapeo de alta densidad de características complejas, contribuyendo significativamente a la mejora de varias especies de cultivos.

A partir de los datos de genotipado se lograron identificar numerosos marcadores SNPs e InDels total o parcialmente asociados al modo reproductivo. En la Tabla 4 se observan 13 de estos marcadores y si presentan el alelo presente en OTA-S (sex) o el de Don Walter (APO) en las 11 plantas evaluadas en este trabajo.

Tabla 4: Marcadores moleculares obtenidos en geotipado por DArT-seq de los individuos evaluados en este trabajo. APO: presencia del alelo de Don Walter, SEX: presencia del alelo de OTA-S.

Marcador\Planta	326	332	339	340	341	350	356	359	372	377	458
100272833_INDEL	APO	APO	APO	SEX	SEX	SEX	APO	SEX	SEX	SEX	SEX
100477277 F 0-6:C>T-6:C>T	APO	APO	APO	APO	SEX	SEX	APO	SEX	SEX	SEX	SEX
100502388 F 0-17:A>T-17:A>T	APO	APO	APO	APO	SEX	SEX	APO	SEX	SEX	SEX	SEX
100503486 F 0-27:T>A-27:T>A	APO	APO	APO	APO	SEX	SEX	APO	SEX	SEX	SEX	SEX
100507778 F 0-28:T>C-28:T>C	APO	APO	APO	SEX	SEX	SEX	APO	SEX	SEX	SEX	SEX
100503486 F 0-31:G>A-31:G>A	APO	APO	APO	APO	SEX	SEX	APO	SEX	SEX	SEX	SEX
100510472	APO	APO	APO	APO	SEX	SEX	APO	SEX	SEX	SEX	SEX
100009298	APO	APO	APO	APO	SEX	SEX	APO	SEX	SEX	SEX	SEX
100423212	APO	APO	APO	APO	SEX	SEX	APO	SEX	SEX	SEX	SEX
100139482	APO	SEX	APO	APO	SEX	SEX	APO	SEX	SEX	SEX	SEX
100459025	APO	APO	APO	APO	SEX	SEX	APO	SEX	SEX	SEX	SEX
100194581	APO	APO	APO	APO	SEX	SEX	APO	SEX	SEX	SEX	SEX
INDEL PEGA SOBRE HP 100129656	APO	APO	APO	APO	SEX	SEX	APO	SEX	SEX	SEX	SEX

Del total de once plantas, seis resultaron sexuales para todos los marcadores (individuos 341, 350, 359, 372, 377 y 458), tres resultaron apomícticas para todos los marcadores (individuos 326, 339 y 356) y dos resultaron apomícticas para algunos marcadores y sexuales para otros (individuos 332 y 340). La planta 332 resulto apomíctica para todos los marcadores menos para el marcador 100139482 en donde resulto sexual y, la planta 340, resulto apomíctica para todos los marcadores menos los marcadores 100272833 y 100507778 en donde resulto sexual.

Ambas plantas 332 y 340 que resultaron apomícticas para algunos marcadores y sexuales para otros, fenotípicamente, presentaron valores bajos de frecuencia de procesos apomícticos, 3,3% y 6,6% respectivamente. Mientras que las plantas que resultaron

apomícticas para todos los marcadores presentaron, fenotípicamente, valores más altos de frecuencia de procesos apomícticos.

Esto podría dar indicios de que la apomixis se trata de un caso de poligenia, en donde varios genes interactúan para influir en la intensidad o la expresión del carácter.

El caso de la planta 458 resulto ser sexual para todos los marcadores utilizados, aunque, en el análisis fenotípico resulto presentar, en muy baja frecuencia (3,2%), procesos apomícticos. Esto en parte refuerza la idea de que la apomixis se trate de un caso de poligenia, como así también, la posibilidad de que aun queden por utilizarse otros marcadores moleculares.

CONCLUSIÓN

Este trabajo aporta información valiosa sobre la herencia de la apomixis en *Eragrostis curvula* confirmando la herencia mendeliana planteada y destaca la complejidad de los mecanismos genéticos y epigenéticos involucrados en la regulación de la reproducción apomíctica en esta especie.

La utilización de marcadores únicamente no nos permite conocer los porcentajes de apomixis, por lo tanto, el fenotipado por citoembriología es fundamental para encontrar plantas con altos y bajos porcentajes de apomixis y sexualidad para estudios futuros sobre la regulación del carácter.

El análisis fenotípico por citoembriología complementó el análisis por marcadores moleculares, corroborando su funcionamiento y mejorando la fiabilidad de los mismos.

Estos hallazgos sientan las bases para futuras investigaciones las cuales podrían tener implicaciones en la ingeniería genética de plantas de importancia agrícola.

Nuestra hipótesis es que la sexualidad es el modo básico de reproducción y que la apomixis es derivada y puede suprimir, pero no eliminar la sexualidad. También existirían otros genes que controlan el nivel de expresión de la apomixis en plantas que contienen la región determinante del carácter, ya que el porcentaje de procesos sexuales y apomícticos en una misma planta puede cambiar en distintas floraciones y ante situaciones de estrés, dando la posibilidad a una regulación externa (por fuera de la región APO) o por mecanismos epigenéticos.

BIBLIOGRAFÍA

Balsamo R.A., Willigen C.V., Bauer A.M. y Farrant J. (2006). Drought tolerance of selected *Eragrostis* species correlates with leaf tensile properties. *Annals of Botany*, 97, 985-991.

Bhojwani S.S. y Bhatnagar S.P. (1983). The embryology of angiosperms. *Vikas Publishing House Pvt. Ltd.*, New Delhi, India.

Bisp P. A. (2022) *Creación de un calendario reproductivo floral para estudios de expresión de genes en pasto llorón (Eragrostis curvula)*. Tesis de grado Licenciatura en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Del Sur.

Brown C. y Wilby R.L. (2012). An alternate approach to assessing climate risks. *Eos, Transactions American Geophysical Union*, 93, 401-402.

Buerdsell S.L., Milligan B.G. y Lehnhoff E.A. (2022). Extreme drought induces rapid declines in co-occurring native *Bouteloua eriopoda* and invasive *Eragrostis lehmanniana*. *Ecosphere*, 13, e4048.

Carballo J., Zappacosta D., Marconi G., Gallardo J., Marsico M., Gallo C.A., Caccamo M., Albertini E. y Echenique V. (2021). Differential methylation patterns in apomictic vs. sexual genotypes of the diplosporous grass *Eragrostis curvula*. *Plants* 10, 946

Colom M.R. y Vazzana C. (2001). Drought stress effects on three cultivars of *Eragrostis curvula*: photosynthesis and water relations. *Plant growth regulation*, 34, 195-202.

Conner J.A. y Ozias-Akins P. (2017) Apomixis: engineering the ability to harness hybrid vigor in crop plants. *Plant Germline Development*. Humana Press, New York, pag. 17-34.

Covas, G. (1991). Taxonomía y morfología del pasto llorón, *Eragrostis curvula* (Schrad. Nees) con referencia sobre otras especies cultivadas de *Eragrostis*. En: Fernández O.A., Brededan R.E. y Gargano A. (eds): *El pasto llorón. Su biología y manejo*. CERZOS, Bahía Blanca. pag. 7-17.

Crane C.F. (2001). Classification of apomictic mechanisms. En: Savidan Y., Carman J.G. y Dresselhaus T. (eds): *The Flowering of Apomixis: From Mechanisms to Genetic Engineering*. CIMMYT, IRD, European Commission OC VI (FAIR): México, México, pag. 24-43.

Degu H.D., Ohta M. y Fujimura T. (2008). Tolerancia a la sequía de *Eragrostis tef* y desarrollo de raíces. *Revista Internacional de Ciencias Vegetales* 169, 768-775.

Fan Y.F., L. Jiang H.Q. Gong y Liu C.M. (2008). Sexual reproduction in higher plants I: Fertilization and the initiation of zygotic program. *Journal of Integrative Plant Biology* 50: 860-867.

Gallardo J. (2023) *Evidencias genéticas y epigenéticas del control de la apomixis en Eragrostis curvula*. Tesis doctoral, Universidad Nacional Del Sur.

- Ginbot Z.G. y Farrant J.M. (2011). Physiological response of selected *Eragrostis* species to water-deficit stress. *African Journal of Biotechnology*, 10, 10405-10417.
- Grimanelli, D., Leblanc, O., Espinosa, E., Perotti, E., González De León, D., y Savidan, Y. (1998). Mapping diplosporous apomixis in tetraploid *Tripsacum*: one gene or several genes?. *Heredity*, 80 (1), 33-39.
- Goldberg R.B., De Paiva G. y Yadegari R. (1994). Plant embryogenesis: zygote to seed. *Science* 266, 605-614.
- Hojsgaard D., Klatt S., Baier R., Carman J.G. y Hörandl E. (2014). Taxonomy and biogeography of apomixis in angiosperms and associated biodiversity characteristics. *Critical Reviews in Plant Sciences* 33, 414-427.
- Meier M., Zappacosta D., Selva J.P., Pessino S. y 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.
- Nogler G. (1984). Gametophytic apomixis. En: *Embryology of angiosperms*, BM Johri (ed.), pag. 475-518.
- Ozias-Akins P. y van Dijk P.J. (2007). Mendelian genetics of apomixis in plants. *Annual Review of Genetics* 41, 509-537
- Savidan Y., Carman J.G. y Dresselhaus T. (eds) (2001) The flowering of apomixis: from mechanisms to genetic engineering. CIMMYT, IRD, European Commission DG VI (FAIR), Mexico, D.F.
- Savidan, Y. (2000). Apomixis: genetics and breeding. *Plant breeding reviews* 18, 13-86.
- Selva J.P., Siena L., Rodrigo J.M., Garbus I., Zappacosta D., Romero J.R., Ortiz J.P.A., Pessino S., Leblanc O. y Echenique V. (2017). Temporal and spatial expression of genes involved in DNA methylation during reproductive development of sexual and apomictic *Eragrostis curvula*. *Scientific Reports* 7, 15092.
- Selva J.P., Zappacosta D., Carballo J., Rodrigo J.M., Bellido A., Gallo C.A., Gallardo J. y Echenique V. (2020). Genes modulating the increase in sexuality in the facultative diplosporous grass *Eragrostis curvula* under water stress conditions. *Genes* 11, 969.
- Vijverberg, K., Van der Hulst, RGM, Lindhout, P. y Van Dijk, PJ (2004). A genetic linkage map of the diplosporous chromosomal region in *Taraxacum officinale* (common dandelion; Asteraceae). *Theoretical and Applied Genetics*, 108, 725-732.
- Vorster T.B. y Liebenberg H. (1984) Classification of embryo sacs in the *Eragrostis curvula* complex. *Bothalia* 15:167-174.
- Yadegari R. y Drews G. N. (2004). Female gametophyte development. *Plant Cell* 16, S133-S141.

Young B.A., Sherwood R.T. y Bashaw E.C. (1979). Cleared-pistil and thick-sectioning techniques for detecting aposporous apomixis in grasses. *Canadian Journal of Botany*, 57, 1668-1672.

Zappacosta D., Gallardo J., Carballo J., Meier M., Rodrigo J.M., Gallo C.A., Selva J.P., Stein J., Ortiz J.P., Albertini E. y Echenique V. (2019). A high-density linkage map of the forage grass *Eragrostis curvula* and localization of the diplospory locus. *Frontiers in Plant Science* 10, 918.