



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR**

**TESIS DE DOCTORADO EN AGRONOMÍA**

*Identificación y caracterización de genes relacionados con  
los cambios de ploidía y la apomixis diplospórica en  
Eragrostis curvula*

*Lic. Juan Pablo Selva*

**BAHÍA BLANCA**

**ARGENTINA**

**2010**

## Prefacio

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Agronomía de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal, dependiente del Centro de Recursos Naturales Renovables de la Zona Semiárida (CERZOS-CONICET) y en el Laboratorio de Genética del Departamento de Agronomía de la Universidad Nacional del Sur, durante el período comprendido entre Septiembre de 2006 y Noviembre de 2009, bajo la dirección de la Dra. Viviana Echenique y de la Dra. Silvina Pessino.

**Juan Pablo Selva**

Licenciado en Ciencias Biológicas - UNS



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR  
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el 12/05/2010, mereciendo la calificación de 10.(.....diez.....)

## **Agradecimientos**

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) por haberme otorgado el sustento económico para realizar mis estudios de doctorado. Asimismo deseo agradecer a las autoridades del CERZOS y el Dpto. de Agronomía 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 y brindarme sus conocimientos y experiencia en mi formación como investigador, y sobre todo gracias por confiar en mí.

A mi co-directora, Silvina, por sus valiosas sugerencias y todos los conocimientos brindados. Quiero hacer extensivo el agradecimiento a todo el grupo de Zaballa, gracias por hacerme sentir como en casa y por su ayuda en el laboratorio.

A Germán Spangenberg, por haberme dado la posibilidad de trabajar en su instituto, gracias por haber sido tan atento, tanto en la relación laboral como en lo personal.

A Lucho, por todos los momentos compartidos en Australia. Gracias por tu amistad y por todo lo que me enseñaste a trabajar 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 Mauro, Diego y Pablo, por su amistad y la ayuda que me dieron durante la realización de este trabajo.

A mis padres, Ana y Daniel, 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 hermanas, Celina y Carla, por todo el amor que me brindan y por ser las maravillosas personas que son.

A Elsa y Juan, por todo su cariño y su apoyo siempre. Gracias por estar.

A Laura, 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 todos ustedes, sinceramente muchas gracias.

## Trabajos derivados de la presente tesis

### Publicaciones en revistas científicas

1. Mecchia MA, Ochogavía AC, **Selva JP**, Laspina N, Felitti S, Martelotto LG, Spangenberg G, Echenique VC & Pessino SC (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.
2. Cervigni GD, Paniego N, Díaz ML, **Selva JP**, Zappacosta D, Zanazzi D, Landerreche I, Felitti S, Pessino SC, Spangenberg G & Echenique VC (2008) **“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.
3. Cervigni GD, Paniego N, Pessino SC, **Selva JP**, Zappacosta DC, Spangenberg G & Echenique VC (2008) **“Gene expression in diplosporous and sexual *Eragrostis curvula* genotypes with differing ploidy levels”**. Plant Molecular Biology, 67: 11-23.
4. Echenique VC, Pessino SC, Díaz M, **Selva JP**, Luciani G, Zappacosta DC, Cervigni GD, Meier M, Garbus I, Cardone S, Miranda R & Spangenberg G (2008) **“Aportes de la biotecnología al mejoramiento del pasto llorón (*Eragrostis curvula*)”**. Revista Argentina de Producción Animal, 28:147-64.
5. Ochogavía AC, Cervigni GD, **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.

6. Selva JP, Pessino SC, Meier M & Echenique VC **“Identification of candidate genes related to polyploidy and/or apomixis in *Eragrostis curvula*”**. American Journal of Plant Sciences. Trabajo aceptado.

### **Publicaciones de divulgación**

1. Meier M, Zappacosta D, Selva JP, Cervigni GD & Echenique VC (2008) **“La apomixis, su estudio y posibles usos”**. AgroUNS, 9:10-13.

### **Presentaciones a Congresos**

#### **Internacionales**

1. Selva JP, Pessino SC & Echenique VC **“Differentially expressed transcripts related to apomixis and ploidy in the diplosporous grass *Eragrostis curvula*”**. 3º International Conference on Apomixis, 27 de Junio al 02 de Julio de 2007, Wernigerode, Alemania.
2. Cervigni GD, Paniego N, Pessino SC, Diaz ML, Selva JP, Zappacosta DC, Spangenberg G & Echenique VC. **“Gene expression study in diplosporous and sexual *Eragrostis curvula* genotypes with differing ploidy levels using ESTs and differential display”**. 5<sup>th</sup> International Symposium on the Molecular Breeding of Forage and Turf (MBFT2007), 1 al 6 de Julio de 2007, Sapporo, Japón.
3. Selva JP, Cervigni GD, Ochogavía AC, Zappacosta DC, Meier M, Pessino SC & Echenique VC **“Global analysis of the genome, transcriptome and epigenome in the diplosporous grass *Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees”**. XX<sup>th</sup> International Congress on Sexual Plant Reproduction, 4 al 8 de Agosto de 2008, Brasilia, Brasil.
4. Echenique VC, Díaz ML, Luciani G, Selva JP, Zappacosta DC, Cervigni GD, Meier M, Garbus I, Cardone S & Spangenberg G **“Biotechnological**

**and genomic tools for the improvement of weeping lovegrass (*Eragrostis curvula*)". XVII Plant and Animal Genome Conference, 10 al 14 de Enero de 2009, San Diego, California, US.**

### **Nacionales**

1. **Selva JP, Laspina N, Mecchia MA, Cervigni GD, Martelotto LG, Pessino SC & Echenique VC "Transcriptos diferencialmente expresados en plantas de *Eragrostis curvula* asociados a cambios en el nivel de ploidía". XXXV Congreso Argentino de Genética, 24 al 27 de Septiembre de 2006, San Luis, San Luis, Argentina.**

# Índice

PREFACIO .....	2
AGRADECIMIENTOS.....	3
TRABAJOS DERIVADOS DE LA PRESENTE TESIS .....	5
Publicaciones en revistas científicas .....	5
Publicaciones de divulgación.....	6
Presentaciones a Congresos .....	6
Internacionales.....	6
Nacionales .....	7
RESUMEN .....	11
ABSTRACT .....	15
INTRODUCCIÓN.....	18
Apomixis .....	19
Importancia de la Apomixis en la Agricultura.....	20
Distintos mecanismos de Apomixis.....	21
Genética de la apomixis .....	24
Apomixis y expresión de genes.....	28
Poliploidía .....	33
Poliploidía y su relación con la apomixis .....	37
El género <i>Eragrostis</i> .....	40
<i>Eragrostis curvula</i> (Pasto llorón, weeping lovegrass) .....	42
La apomixis en <i>Eragrostis</i> .....	43
Obtención de los materiales vegetales de <i>E. curvula</i> .....	46
Breve descripción de los materiales vegetales .....	47
HIPÓTESIS.....	50
OBJETIVOS.....	52
Objetivo general .....	53
Objetivos particulares .....	53
CAPÍTULO 1 - “CONSTRUCCIÓN Y SECUENCIACIÓN DE BIBLIOTECAS DE ADNC” .....	54
Introducción .....	55
Objetivos.....	56
Materiales y Métodos .....	57



Extracción del ARN total.....	57
Construcción de las bibliotecas de ADNc.....	57
Síntesis de la primera cadena de ADNc.....	58
Amplificación del ADNc por LD-PCR (long distance-PCR).....	59
Limpieza de los fragmentos.....	61
Extensión de los ADNcs con poli A.....	61
Fraccionamiento por tamaños de los ADNcs.....	62
Ligación de los fragmentos al vector.....	63
Transformación de las células competentes.....	63
Amplificación de las bibliotecas de ADNc.....	65
Titulación.....	65
Aislamiento del ADN.....	65
Determinación del tamaño de los insertos de la biblioteca.....	67
Secuenciación de ESTs.....	67
Procesamiento y análisis de las secuencias ESTs obtenidas.....	68
Desarrollo y detección de marcadores moleculares.....	70
<b>Resultados y Discusión.....</b>	<b>72</b>
Caracterización de las bibliotecas de ADNc.....	72
Análisis de las ESTs y generación de los unigenes.....	73
Anotación funcional de los unigenes de <i>E. curvula</i> .....	77
Desarrollo de microsatélites.....	80
Desarrollo de SNPs.....	82
<b>CAPÍTULO 2 - "ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE GENES UTILIZANDO LAS BIBLIOTECAS DE ADNc".....</b>	<b>83</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>84</b>
<b>Objetivo.....</b>	<b>84</b>
<b>Materiales y Métodos.....</b>	<b>85</b>
Material Vegetal.....	85
Construcción y secuenciación de las bibliotecas de ADNc.....	85
Análisis de ESTs.....	85
Sustracción de las ESTs de las bibliotecas.....	86
Validación de genes diferencialmente expresados.....	86
Mapeo in silico de los unigenes de las bibliotecas.....	88
<b>Resultados.....</b>	<b>88</b>
Comparación general entre bibliotecas.....	88
Identificación de genes relacionados con la expresión de la diplosporía.....	89

---

Identificación de genes expresados diferencialmente por nivel de ploidía .....	93
Validación de la expresión por PCR en tiempo real .....	99
Mapeo in silico de los genes diferencialmente expresados en el genoma de arroz .....	100
<b>Discusión .....</b>	<b>101</b>
<b>CAPÍTULO 3 - "ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE GENES UTILIZANDO LA TÉCNICA DE DISPLAY DIFERENCIAL" .....</b>	<b>105</b>
<b>Introducción .....</b>	<b>106</b>
<b>Objetivo.....</b>	<b>106</b>
<b>Materiales y Métodos .....</b>	<b>107</b>
Material Vegetal.....	107
Extracción de ARN.....	107
Ensayos de Display diferencial (DD).....	108
Análisis de agrupamiento y componentes principales .....	109
Recuperación de las bandas diferenciales.....	110
Análisis de las secuencias.....	111
Validación de la expresión diferencial de genes .....	111
Mapeo in silico .....	112
<b>Resultados.....</b>	<b>113</b>
Expresión de genes en inflorescencias inmaduras y hojas .....	113
Caracterización molecular de los transcritos aislados .....	117
Validación de la expresión por PCR en tiempo real .....	122
Mapeo in silico de los genes diferencialmente expresados en el genoma de maíz .....	123
Asignación genes de <i>E. curvula</i> a grupos funcionales de Arabidopsis (MAPMAN).....	134
<b>Discusión .....</b>	<b>135</b>
<b>CONSIDERACIONES FINALES .....</b>	<b>137</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>145</b>

## Resumen

*Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees, conocida vulgarmente como “*pasto llorón*”, es una gramínea forrajera, de origen sudafricano, extensamente cultivada en la zona semiárida templada de Argentina. Es una especie morfológicamente diversa y posee un amplio potencial genético para mejorar las características de resistencia a sequía, frío, productividad y palatabilidad. Desde el punto de vista citogenético se trata de un complejo polimórfico, ya que es un grupo poliploide donde la mayoría de sus miembros se reproducen en forma apomíctica. La apomixis es una forma de reproducción asexual (agámica) a través de semillas, que conduce a la generación de progenies genéticamente idénticas a la planta madre. Ha sido descrita en más de 400 especies de angiospermas. La apomixis gametofítica ocurre generalmente en grupos poliploides y se cree que ésta probablemente se originó a través de mutaciones en genes de la vía sexual.

En el Laboratorio de Biotecnología y Genética Vegetal (CERZOS-Departamento de Agronomía, UNS) se obtuvo, por cultivo *in vitro* de inflorescencias de un cultivar tetraploide de pasto llorón, *Tanganyika* (T), una planta diploide (UNST1122, D). Semillas de esta planta se trataron con colchicina y se obtuvieron dos plantas tetraploides (colchiploides) con un alto grado de sexualidad [UNST1131 (C) y UNST1112 (M)]. Esta serie de plantas permite estudiar tanto variaciones producidas por cambio de ploidía como por cambios en el modo reproductivo.

El objetivo planteado para esta tesis fue realizar un análisis global del transcriptoma derivado de ovarios diplospóricos y meióticos de esta serie isogénica de pasto llorón, y también del tejido de hoja, de manera de aislar los transcritos diferenciales por modo reproductivo y por cambios de ploidía, y así poder realizar asociaciones genéticas y funcionales sobre los factores

determinantes de la diplosporía en la especie, especialmente el factor ploidía. A fin de lograr este objetivo se realizó la construcción de bibliotecas de ADNc de la serie euploide isogénica (tres bibliotecas de inflorescencias inmaduras pertenecientes a los genotipos T, D y C, y una biblioteca de hoja del genotipo T), se secuenciaron ESTs de dichas bibliotecas y se hicieron análisis de las ESTs. Además se realizaron estudios de Display Diferencial (DD) de inflorescencias y hojas de la misma serie de plantas, y se secuenciaron y analizaron los transcritos diferenciales por ploidía y modo reproductivo para complementar el estudio de las bibliotecas. De la secuenciación de las bibliotecas se obtuvieron 12.295 ESTs de buena calidad. Luego del ensamblado y agrupamiento, se obtuvieron 8.884 unigenes, incluyendo 1.490 contiguos y 7.394 singletons. El algoritmo BLASTX fue utilizado para el análisis de homología de los unigenes de *E. curvula* contra la base de datos de SwissProt. Cuarenta y tres por ciento de los genes de *Eragrostis* encontraron homología con secuencias de trigo (391.939 genes anotados) y cebada (50.423 genes anotados), 49,25% con genes de avena (89.147 genes anotados) y 46,48% con genes de maíz (58.582 genes anotados). Además se detectaron 254 microsatélites (EST-SSRs) que facilitarán el mapeo utilizando poblaciones segregantes para el carácter apomixis u otros caracteres de calidad forrajera. En los ensayos de DD de inflorescencias inmaduras se generaron en total 4.242 transcritos y para los experimentos de hoja 7.622. Del total de transcritos, aproximadamente un 14% de inflorescencias y un 10% de hojas fueron diferenciales entre los distintos genotipos. Estos transcritos diferenciales integraron tres grupos: los diferenciales por modo reproductivo, los diferenciales por ploidía y un grupo particular, los inesperados, que estaban integrados por transcritos en los que el patrón de expresión era el mismo entre la planta apomíctica tetraploide y diploide sexual, pero distinto en la planta tetraploide sexual. Sesenta (60) bandas de inflorescencias y 42 de hoja fueron clonadas y secuenciadas con éxito. Este número representa un 10,83% y 5,68% del total de bandas diferenciales de inflorescencias y hojas, respectivamente. De los 60 transcritos secuenciados a partir de inflorescencias, 39 (65%) mostraron

homología significativa con genes de función conocida. De los 42 transcriptos secuenciados a partir de hojas, 14 (33,33%) mostraron homología con genes de función conocida.

Tanto en el análisis de las ESTs como en los DD se mostró que los patrones de expresión de las plantas tetraploides están muy relacionados, mientras que la expresión del genotipo diploide fue significativamente diferente, mostrando que el perfil de expresión, al menos para un gran número de genes, depende del nivel de ploidía. Este comportamiento en la expresión de genes se correlaciona muy bien con la estructura genética y epigenética de la serie en la prueba clásica y parcial de Mantel. Durante la conversión tetraploide-diploide se produce una proporción significativa de modificaciones genéticas y epigenéticas que revierten durante la conversión diploide-tetraploide, lo cual sugiere que algunos loci mantienen una secuencia particular y/o una cierta condición de metilación dependiente del nivel de ploidía. Estas variaciones genéticas y epigenéticas ocurren en un escenario particular de expresión que depende del nivel de ploidía.

Sin embargo, un grupo particular de genes mostraron un comportamiento curioso. Ellos se encontraron principalmente silenciados en los genotipos 2x sex. y 4x apo. Este grupo de genes se detectó tanto en los análisis de ESTs como en los realizados mediante la técnica de DD. Ya que las plantas 2x sex. y 4x apo. presentan diferente ploidía y modo reproductivo, el patrón de expresión de estos genes es intrigante. Estos genes candidatos fueron denominados de patrón inesperado o "inesperados". La mayoría de los genes de este grupo están sobreexpresados en la planta 4x sex, mientras que están reprimidos en los genotipos 4x apo. y 2x sex. Para explicar la existencia de este grupo de genes "inesperados" y la relación que podrían llegar a tener con la apomixis y la poliploidía, se plantea que para mantener la sexualidad a nivel tetraploide se requiere de la activación de un grupo de genes en la conversión 2x a 4x, y que esta activación estaría bloqueada (o silenciada) en el genotipo 4x apo, lo que

explicaría el grupo de genes silenciados que comparten este genotipo y el diploide sexual.

## Abstract

*Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees, commonly known as "weeping lovegrass" is a forage grass native from South Africa and widely cultivated in temperate semiarid regions of Argentina. It is a morphologically diverse species and has a large genetic potential for improving the characteristics of drought and cold resistance, productivity and palatability. Cytogenetically it constitutes a polymorphic complex, since it is a polyploid group where most members reproduce by apomixis. Apomixis is an asexual reproduction mode through seeds, which leads to the generation of progeny genetically identical to the maternal plant. Apomixis was described in over 400 species of angiosperms. Gametophytic apomixis generally occurs in polyploid groups and probably was originated through mutations of genes from the sexual pathway.

In the Laboratory of Plant Genetics and Biotechnology (CERZOS-Department of Agronomy, UNS), a diploid plant (UNST1122, D) was obtained by *in vitro* culture of inflorescences from plants of the tetraploid cultivar Tanganyika (T). Seeds of the diploid plant were treated with colchicine and DMSO and two plants were obtained, both tetraploids (colchipooids), with a high level of sexual reproduction [UNST1131 (C) and UNST1112 (M)]. This series of plants allowed the study of genetic and epigenetic variations caused by changes of ploidy and/or by changes in the reproductive mode.

The aim of this thesis was to conduct a comprehensive transcriptome analysis of meiotic diplosporous ovaries and leaf tissue of the isogenic series, and to isolate the transcripts that are differential by the reproductive mode and/or by ploidy in order to find out the genetic and functional associations on diplospory determinant factors in the species, especially ploidy. To achieve this goal the cDNA libraries of the isogenic euploid series were constructed (three of them from immature inflorescences belonging to the genotypes T, D and C, and one

library of leaves of genotype T), ESTs were sequenced and analysed. Studies of Differential Display (DD) of inflorescences and leaves of the same series of plants were also carried out and differential transcripts related to ploidy and the reproductive mode were sequenced and analyzed in order to complement the study of the libraries. A relatively high number of good quality ESTs (12,295) was obtained. After assembly and clustering, 8,884 unigenes were obtained, including 1,490 contigs and 7,394 singletons. Blastx was used for the analysis of homology of the *E. curvula* unigenes against SwissProt database. Forty-three percent of the *Eragrostis* genes found homology with sequences of wheat (391,939 annotated genes) and barley (50,423 annotated genes), 49.25% with oat genes (89,147 genes annotated) and 46.48% with Maize genes (58,582 annotated genes). In addition 254 microsatellites (EST-SSRs) were detected that will facilitate the mapping for apomixis or other traits like forage quality using segregating populations. In DD experiments 4,242 transcripts of immature inflorescences and 7,622 from leaf were generated. From these transcripts, approximately 14% from inflorescences and 10% from leaves were differentials between genotypes. These differential transcripts were divided into three groups: differential related to the reproductive mode, differential between ploidy levels and unexpected, a particular group which were composed of transcripts in which the expression pattern was similar in the tetraploid apomictic and in the diploid sex plant, but different in the sexual tetraploid plant. Sixty (60) bands from inflorescences and 42 from leaves were successfully cloned and sequenced. This number represents a 10.83% and 5.68% of the total differential bands from flowers and leaves, respectively. Thirty nine (39, 65%) out of 60 sequenced transcripts from inflorescences showed significant homology with genes of known function. Fourteen (14, 33.33%) out of 42 sequenced transcripts from leaves showed homology with genes of known function.



ESTs and DD analysis showed that the expression patterns of tetraploid plants are closely related, whereas the expression of the diploid genotype was significantly different, showing that the expression profile, at least for a large number of genes, depends on the ploidy level. This behavior in gene expression correlates well with the genetic and epigenetic structure of the series in classical and partial Mantel test. During the conversion tetraploid-diploid a significant proportion of genetic and epigenetic changes are produced that revert during the conversion diploid-tetraploid, suggesting that some loci have a particular sequence and / or a certain condition of methylation-dependent on the ploidy level. These genetic and epigenetic changes occur in a particular stage of expression that depends on the ploidy level.

However, a particular group of genes showed a curious behavior. They were mainly silenced in the 2x sex and 4x apo genotypes. This group of genes was detected in both ESTs and DD analysis. Since 2x sex and 4x apo plants have different ploidy level and different reproductive mode, the expression pattern of these genes is intriguing. These candidate genes were called "unexpected". Most genes in this group are overexpressed in the 4x sex plant, while being repressed in the 4x apo and 2x sex genotypes. To explain the existence of this group of "unexpected" genes and the relationship that might have with apomixis and polyploidy, we suggest that to maintain active the sexual reproduction at the tetraploid level the activation of a gene cluster is required, and that this activation would be blocked (or silenced) in the 4x apo genotype, explaining the silenced group of genes found in these genotype.

The candidate genes were *in silico* mapped onto the rice and maize chromosomes.

# **INTRODUCCIÓN**

## Apomixis

Una de las definiciones más claras de este término la formuló Gian A. Nogler quien en 1984 definió a 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.

La apomixis fue descrita por primera vez en 1841 en la planta australiana *Alchornea ilicifolia* por J. Smith. Cuando un ejemplar femenino de esta especie dioica fue llevado a los Kew Gardens de Londres desde Asia, la planta aislada floreció y produjo semillas en abundancia, poniendo al carácter en evidencia. Paradójicamente fue el monje naturalista Gregor Mendel quien, en el año 1869 y en forma involuntaria, realizó los primeros experimentos con plantas apomícticas al estudiar cruces entre especies del género *Hieracium* para intentar confirmar los resultados obtenidos con sus estudios sobre la herencia de arvejas de jardín, *Pisum sativum*. Mendel describió una situación curiosa: en sus experimentos obtenía progenies F<sub>1</sub> segregantes y numerosas F<sub>2</sub> no segregantes. El investigador atribuyó erróneamente la falta de segregación observada en estas poblaciones a una “frecuente autopolinización”. Ahora se sabe que muchas especies de este género son apomícticas (Asker y Jerling 1992).

Considerada a veces como una curiosidad botánica, la apomixis está lejos de serlo, ya que ha sido descrita en más de 400 especies de plantas que representan más de 40 familias tanto de Mono como Dicotiledóneas (Carman 1997). Este carácter está ausente en gimnospermas. La distribución de este modo de reproducción en las angiospermas no es homogénea, ya que el 75% de las especies confirmadas pertenecen tan solo a tres familias: Asteraceae,

Rosaceae y Poaceae, las cuales en su conjunto constituyen tan sólo el 10% de las plantas con flor. Algunos autores han postulado que este patrón de distribución puede reflejar la predisposición de cierto grupo de plantas a los cambios de desarrollo y genéticos que caracterizan a la apomixis. Otra característica que presenta este tipo de reproducción es que las especies apomícticas son invariablemente perennes y a veces poseen otros mecanismos de reproducción asexual, tales como estolones o rizomas (Bicknell y Koltunow 2004).

### **Importancia de la Apomixis en la Agricultura**

A pesar de su amplia distribución en las plantas con flor, la apomixis no está presente en muchas especies de interés agronómico, a excepción de varias gramíneas forrajeras, la mandioca, la manzana, los citrus, el mango y las fresas (Ortiz y Pessino 2002). Si el carácter pudiese ser transferido a especies de amplio cultivo como el maíz y el arroz, representaría una herramienta de enorme impacto en la producción de alimentos, ya que podría ser utilizado para la estabilización de genotipos superiores, la fijación de combinaciones híbridas y su multiplicación por semillas (Vielle-Calzada *et al.* 1996a). En teoría cualquier arreglo genético que lleve los factores determinantes de la apomixis podría ser mantenido y multiplicado como una réplica exacta por innumerables generaciones vía semillas. La perspectiva de clonar genotipos superiores híbridos podría representar una ayuda importante para los productores agropecuarios de los países en desarrollo, permitiéndoles sostener altos rendimientos año tras año usando parte de las semillas cosechadas sin pérdidas en la producción debidas a la segregación de caracteres y la depresión por endogamia. Entre otras ventajas, la expresión de la apomixis reduciría al mínimo el aislamiento físico requerido para preservar líneas genéticas homocigotas. Nuevos híbridos interespecíficos e intergenéricos podrían ser obtenidos y propagados fácilmente, permitiendo el desarrollo de genotipos mejor adaptados a los distintos ambientes. Asimismo podría facilitarse el uso de

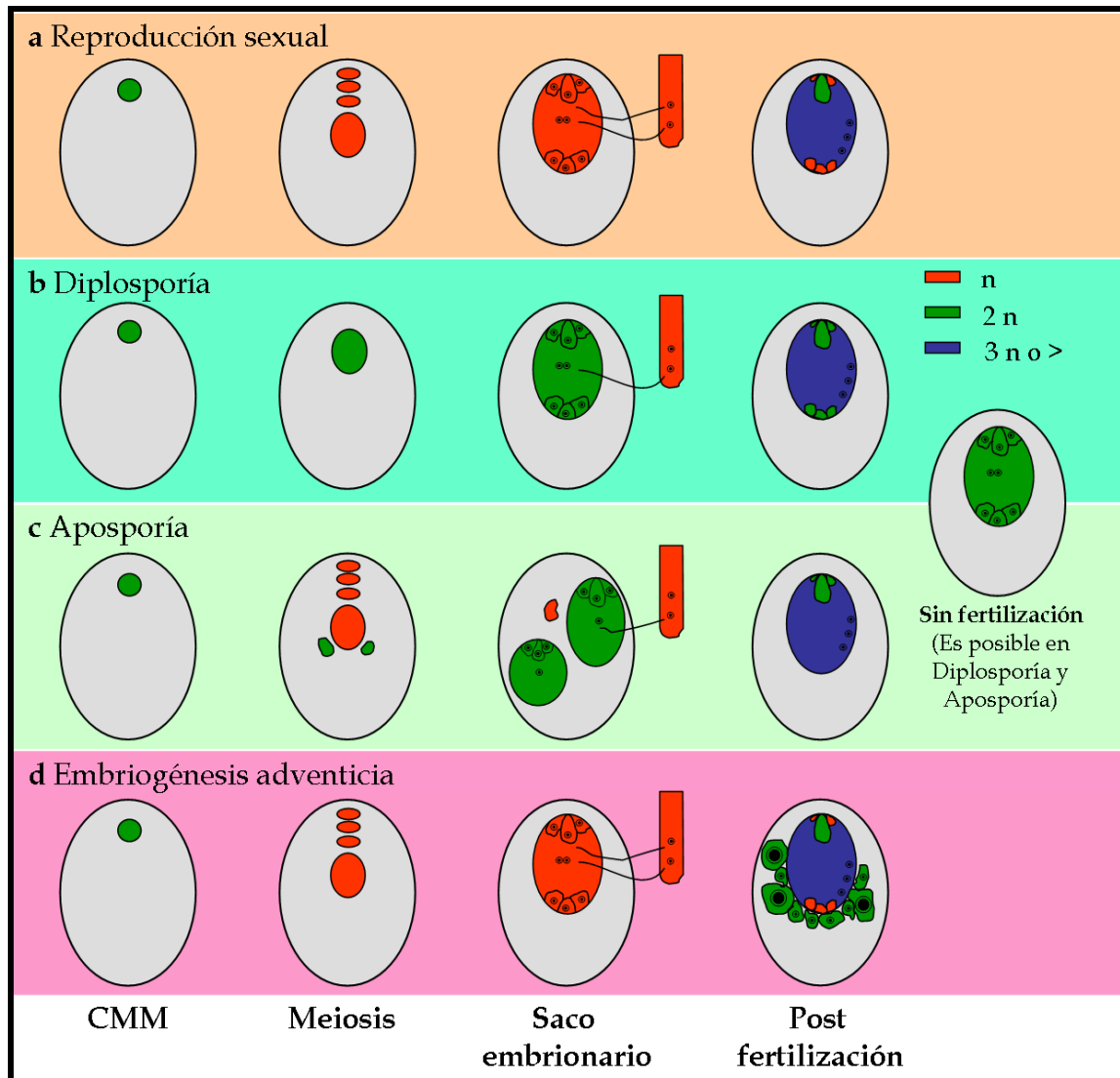
transformantes considerando que una planta transgénica apomíctica fijaría inmediatamente el nuevo carácter y se convertiría en un cultivar luego de su multiplicación (Vielle-Calzada *et al.* 1996a).

### **Distintos mecanismos de Apomixis**

Los procesos apomícticos eluden la ruta sexual evitando la reducción meiótica y la fecundación de la ovocélula. Debido a esto la ovocélula desarrolla un embrión que contiene exactamente el mismo genotipo de la planta que lo origina (Nogler 1984a). Estos mecanismos por los que se obtienen embriones asexuales pueden dividirse en tres: diplospóricos, apospóricos y embriónía adventicia (Fig. I.1). Los dos primeros se denominan conjuntamente apomixis gametofítica. Estos mecanismos apomícticos difieren en el tiempo en que se inician en el desarrollo del óvulo en relación a un proceso sexual típico. Tanto la diplosporía como la aposporía son procesos que se inician muy temprano en el desarrollo del óvulo, esto ocurre en el momento de la diferenciación de la célula madre de la megáspora (CMM) en el mecanismo diplospórico y luego de la diferenciación de dicha célula en la aposporía. Diplosporía y aposporía resultan en la formación de un saco embrionario 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, también denominada apomixis esporofítica, es iniciada tardíamente en el desarrollo del óvulo y usualmente ocurre en óvulos maduros. Los embriones somáticos se originan directamente a partir de células de la nucela o de los tegumentos del óvulo, sin que se forme un saco embrionario (Koltunow *et al.* 1995). Se desconocen los mecanismos moleculares y fisiológicos por los cuales se determina el destino de estas células para que se transformen en iniciales embrionarias (Koltunow 1993). Las células nucelares iniciales son similares a la ovocélula en cuanto al potencial de desarrollo pero no están contenidas en una estructura de megagametofito, sino que están adyacentes a un saco embrionario meiótico (de tipo sexual) y

rodeadas por otras células nucelares. Las células nucelares iniciales destinadas a formar embriones son morfológicamente distinguibles de las otras células nucelares por tener un núcleo grande y un citoplasma denso. Esta forma de apomixis es típica en los cítricos, los cuales representan un sistema modelo para estudiar el proceso (Koltunow 1993).

Aunque en la apomixis no se produce meiosis en la megáspora, si existe en la microspora, 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 aunque el embrión desarrolla sin fertilización, la formación del endosperma requiere en la mayoría de los casos de la unión de los núcleos polares del saco embrionario con uno de los núcleos espermáticos aportado por el grano de polen, proceso que se lo denomina pseudogamia (Koltunow 1993).



**Figura I.1:** Diferencias entre la reproducción sexual, diplospórica, apospórica y embriogénesis adventicia. Los óvalos en gris representan el tejido nucelar dentro del óvulo. a) En un proceso sexual típico una célula dentro de la nucela se convierte en la célula madre de la megáspora (CMM). Esta célula experimenta meiosis y cada una de las cuatro megásporas resultantes, tres de las cuales degeneran, reducen el número de cromosomas al estado haploide ( $n$ ). La megáspora funcional luego de tres mitosis forma el saco embrionario compuesto de siete células y ocho núcleos (la célula central es binucleada). La doble fertilización de la ovocélula y la célula central por dos células espermáticas dan como resultado la formación del cigoto  $2n$  y el endosperma  $3n$ . b) En diplosporía, hay una falla en la meiosis de la CMM y por mitosis forma un saco embrionario no reducido. c) En aposporía la meiosis de la CMM puede completarse y las iniciales de la aposporía (IA) se desarrollan de células somáticas nucelares que rodean a la CMM. d) En la embriogénesis adventicia los embriones se desarrollan a partir de células nucelares pero estas no forman un saco embrionario. Tanto en diplosporía como aposporía la formación del endosperma requiere de la fertilización de los núcleos polares (célula central) por un núcleo espermático aportado por el grano de polen (pseudogamia). En otros casos el endosperma puede desarrollarse "sin fertilización" de forma autónoma. (Adaptado de Ozias-Akins y van Dijk 2007).

## Genética de la apomixis

Los primeros estudios acerca de la apomixis indicaban que era un carácter heredable, pero no se conocían los genes o mecanismos involucrados (Gustafsson 1946). El hecho de que el carácter apomixis no está presente en muchas especies de interés agronómico, a excepción de varias gramíneas forrajeras (Bicknell y Koltunow 2004), ha llevado a que la mayoría de los estudios genéticos sobre el mismo deban ser realizados en especies silvestres altamente heterocigotas y poco caracterizadas genéticamente. Existen varios modelos que intentan explicar la herencia de la apomixis en diversas especies (Sherwood *et al.* 1994, Savidan 2000). En el caso particular de las gramíneas las hipótesis más aceptadas se basan en la existencia de uno o unos pocos genes ligados y co-adaptados de herencia simple (Savidan 2000). Una de las principales observaciones de los últimos años en los estudios de mapeo genético es que la región genómica vinculada a la formación de gametófitos no reducidos (apomeiosis) es normalmente pobre en recombinación (Bicknell y Koltunow 2004, Vijverberg *et al.* 2004). Se detectaron marcadores moleculares ligados a la apomixis en híbridos de maíz-*Tripsacum*, *Brachiaria*, *Pennisetum* y *P. notatum* (Ortiz y Pessino 2002, Martínez *et al.* 2003). En el caso de la aposporía, los marcadores identificados parecen encontrarse asociados definiendo una región genómica específica (ASGR, apospory-specific genomic region) que muestra una alta restricción a la recombinación y está asociada a un efecto pleiotrópico letal o ligada a un alelo con letalidad parcial que afecta a los gametos masculinos (Ozias Akins *et al.* 1998, Pupilli *et al.* 2001, Martínez *et al.* 2003). Esta región se ha identificado y caracterizado en especies como: *Pennisetum squamulatum* (Ozias-Akins *et al.* 1998, Goel *et al.* 2003, Akiyama *et al.* 2004), *Tripsacum dactyloides* (Grimanelli *et al.* 1998), *Paspalum simplex* (Pupilli *et al.* 2001, Pupilli *et al.* 2004) y *P. notatum* (Stein *et al.* 2007). En el caso especial de *P. notatum*, los estudios realizados hasta el presente indican que la aposporía está determinada por un locus simple dominante (apo-locus) con fuerte



distorsión de la segregación (Martínez *et al.* 2003, Stein *et al.* 2004, Stein *et al.* 2007). Se ha demostrado que la diplosporía se encuentra controlada por un locus simple en *Tripsacum* (Leblanc *et al.* 1995) y se han detectado marcadores ligados al mismo (Leblanc *et al.* 1995, Grimanelli *et al.* 1998). Estos mismos marcadores fueron mapeados en una población sexual diploide y se localizaron en un segmento que demostró colinearidad con un sector homeólogo del genoma de maíz correspondiente al cromosoma 6L (duplicado en los cromosoma 3L y 8L) (Grimanelli *et al.* 1998). En *Erigeron annuus* la diplosporía y la partenogénesis se encuentran controladas por genes independientes (Noyes y Rieseberg 2000). En *Taraxacum*, estudios recientes mostraron que varios elementos independientes (apomeiosis, partenogénesis y desarrollo autónomo del endosperma) controlan la diplosporía (Záveský *et al.* 2007). Dado que no existe una correspondencia entre los marcadores moleculares de RFLPs que han sido asociados a la aposporía y a la diplosporía (Leblanc *et al.* 1995, Pessino *et al.* 1997, Pupilli *et al.* 2001, Pupilli *et al.* 2004), los resultados hasta el momento parecen indicar que ambas formas de apomixis están gobernadas por genes diferentes (Grimanelli *et al.* 2001a).

Estudios citoembriológicos han revelado que la diplosporía está caracterizada por una alteración en el tiempo de desarrollo de la esporogénesis y del embrión (Grimanelli *et al.* 2003). Las plantas que exhiben este modo reproductivo muestran un fenotipo heterocrónico, resultado de una alteración temporal en la progresión del proceso sexual (Grimanelli *et al.* 2003).

Es interesante el caso de una raza pentaploide de *Paspalum minus* donde aparecen simultáneamente procesos apospóricos y diplospóricos en el mismo óvulo (Bonilla y Quarín 1997). Otro caso particular es el de la orquídea australiana *C. apostasioides*. En ella la célula madre de la megáspora central presenta apomixis diplospórica, mientras que en la nucela o el tegumento se forman embriones adicionales por apomixis esporofítica (Sorensen *et al.* 2009).

En *Paspalum* se observó que la proporción de segregación entre individuos apomícticos y sexuales era 1:2,8 (Martínez *et al.* 2001). Si se supone un gen mayor dominante para el carácter, la madre sexual se supone que debe ser de genotipo aaaa, mientras que el menor dosaje génico posible para un padre apomíctico debería tener el genotipo Aaaa. La segregación apomíctico/sexual esperada en la progenie sería 1:1 (50% apo - 50% sex). La proporción observada implica una distorsión en la relación de segregación, la que probablemente se encuentre asociada a un efecto pleiotrópico letal con penetrancia incompleta o a un factor letal parcial ligado que afecta a los gametos masculinos (Martínez *et al.* 2001). Estos estudios permitieron determinar que la aposporia se comporta como un carácter simple dominante y se transmite a la progenie de manera no-mendeliana. La distorsión en la segregación del carácter también se observó en la segregación de un grupo de marcadores moleculares vinculados a la aposporia (Martínez *et al.* 2003, Stein *et al.* 2004).

En relación a *Eragrostis*, al analizar las pruebas de progenie realizadas por Voigt *et al.* (Voigt y Bashaw 1972, Voigt y Burson 1992) y considerando apomícticas a todas las plantas que expresan este carácter, aunque sea en un bajo nivel, se observa que la proporción de progenie apomíctica vs sexual es de 96/56, lo que representa una proporción apomíctico/sexual de 1,7/1. Estos autores, clasifican a las plantas en sexuales, apomícticas e intermedias. Con esta clasificación formulan un modelo de un gen dominante regulando la expresión del carácter (proporción 1/1,4). Sin embargo, como se estableciera posteriormente (Savidan 2000), toda planta que tenga, aunque sea un solo saco apomíctico, debe ser considerada apomíctica. En función de estas consideraciones, el modelo que mejor explicara los resultados de Voigt *et al.* es el de dos genes independientes con efecto epistático (proporción 9/7 si es diploide y 2/1 para un tetraploide, como es el caso del pasto llorón) (Zappacosta 2009). Cabe recordar, como se mencionara previamente, que varios trabajos actuales señalan que la apomixis podría estar especificada por dos o más loci independientes.

Denominando los dos supuestos genes como D y P, las plantas apomíticas tendrían la constitución genética D---P---, asumiendo que son poliploides. Todas las demás combinaciones (D---pppp, ddddP--- y ddddpppp) serían sexuales. O sea que se necesitan las dos regiones dominantes, en al menos una dosis, para que las plantas expresen la apomixis. El producto del cruzamiento entre una madre sexual aaaabbbb y un padre apomítico DDddPPpp daría una progenie compuesta de la siguiente manera:

Gametas del padre apomítico:

♂	1/6 PP	4/6 Pp	1/6 pp
1/6 DD	1/36 DDPP (apo)	4/36 DDPp (apo)	1/36DDpp (sex)
4/6 Dd	4/36 DdPP (apo)	16/36 DdPp (apo)	4/36Ddpp (sex)
1/6 dd	1/36 ddPP (sex)	4/36 ddPp (sex)	1/36 ddpp (sex)

El parental femenino sólo daría gametas del tipo ddpp. Por lo tanto, el producto del cruzamiento sería:

1/36 DDddPPpp (apo)	4/36 DDddPppp (apo)	1/36 DDddpppp (sex)
4/36 DdddPPpp (apo)	16/36 DdddPppp (apo)	4/36 Ddddpppp (sex)
1/36 ddddPPpp (sex)	4/36 ddddPppp (sex)	1/36 ddddpppp (sex)

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

Estos resultados respaldarían la hipótesis de dos genes controlando la apomixis en pasto llorón. Sin embargo falta la evidencia experimental para confirmar el modelo propuesto. Actualmente en nuestro grupo de trabajo se están

realizando los cruzamientos para poder corroborar si esta hipótesis planteada es correcta.

### **Apomixis y expresión de genes**

Como se mencionara anteriormente, la existencia de una región de muy baja recombinación donde se encuentra el locus relacionado con la apomixis dificulta el clonado del/los disparadores de este carácter mediante estrategias de genética directa (clonado posicional basado en el mapa). En estas condiciones, los análisis del transcriptoma y las técnicas de genética reversa cobran particular relevancia y pueden constituir la forma más sencilla de identificar los genes que gobiernan este carácter. Además, el mapeo de las secuencias derivadas de los experimentos de expresión podría contribuir a la detección de los candidatos ubicados en el apo-locus, que intervendrían en la determinación genética de la apomixis.

Actualmente varios grupos de investigación se encuentran trabajando en la identificación de los genes involucrados en el control de este carácter. A partir de estos estudios de expresión diferencial se han aislado varios transcritos de ARNm asociados al carácter apomixis. Vielle-Calzada *et al.* (1996b) fueron los pioneros en realizar perfilados del transcriptoma en plantas apomícticas y sexuales. Informaron que un gen (*Pcs-2* se expresa sólo en ovarios sexuales mientras otros dos (*Pca-2* y *Pca-3*) lo hacen exclusivamente en ovarios apomícticos de buffelgrass (*Pennisetum ciliare*) conteniendo gametofitos femeninos celularizados. Estos transcritos no presentaron homologías con genes incluidos en las bases de datos. Chen *et al.* (1999) informaron la expresión de *asg1* (gen específico de la apomixis 1) en primordios florales de una accesión apomíctica de guineagrass (*Panicum maximum*) asociada temporalmente con la aparición de las células iniciales de la aposporía. La secuencia de *asg1* es similar a varios genes específicos de la semilla o el embrión de diferentes especies

vegetales, entre ellos *rd22* (un gen expresado en semillas e inducido por sequía en *A. thaliana*), *grp* (un gen que codifica una proteína rica en glicina de la pared celular de ovarios de *Phaseolus vulgaris*), *usp* (un gen que codifica a una proteína de semilla de *Vicia faba*) *plyg1* (un gen que codifica a un precursor de la cadena beta de poligalacturonasa de *Lycopersicum esculentum*) y *adr6p* (un gen regulado negativamente por auxina de *Glycine max*). La homología de secuencia con todos estos genes es altamente significativa por lo que los autores interpretaron que *asg1* podría cumplir una función nueva dentro del complejo de formación del embrión y la semilla, relacionada con la aparición de las iniciales de la aposporia. Por otro lado, Pessino *et al.* (2001) compararon la expresión de genes en flores de genotipos sexuales y apomícticos de *Paspalum notatum* e identificaron el gen *arp1*, que es homólogo a la kinesina *katD* de *A. thaliana*. *KatD* es una proteína motora del citoesqueleto que se expresa exclusivamente en tejido floral y cuya función no está aún definida. En otro trabajo, Rodrigues *et al.* (2003) identificaron 6 genes de expresión diferencial en ovarios de plantas apomícticas y sexuales de *Brachiaria brizantha*, los cuales poseen similitud con genes que codifican para la miosina, una exonucleasa de la superfamilia RecB, una quinasa MAP, una acuaporina, un factor translocador de proteínas y la proteína ribosomal 60S.

Más recientemente, una caracterización total del transcriptoma fue completado para la especie apospórica *Poa pratensis* (Albertini *et al.* 2004, 2005) .En este trabajo fueron aislados 55 genes de expresión diferencial a partir de flores de genotipos sexuales y apospóricos de *Poa pratensis*. Entre los genes aislados por Albertini *et al.* (2004, 2005) se encuentra la kinesina que ya había sido informada en *Paspalum* (Pessino *et al.* 2001) y otros genes relacionados con la recepción y transducción de señales hormonales y el control de la estructura del citoesqueleto. Asimismo, al menos dos de los genes aislados por Albertini *et al.* (2004) son idénticos a genes cuya expresión es afectada en inflorescencias por el

nivel de ploidía (Martelotto *et al.* 2005), y la mayoría de ellos coincide en funciones con los informados por Laspina *et al.* (2008) y Laspina (2009).

Laspina (2009) realizó un análisis de display diferencial en inflorescencias inmaduras de genotipos tetraploides sexuales y apomícticos apospóricos, seguido por validaciones por PCR en tiempo real. El análisis de alrededor de ~10000 transcritos resultó en la identificación de 65 genes únicos expresados diferencialmente en ambos tipos de plantas. Las secuencias identificadas fueron asignadas sistemáticamente a las diferentes rutas metabólicas y vías moleculares generales de *A. thaliana* utilizando el programa Mapman. Mientras varias de las secuencias diferencialmente expresadas parecieron corresponder a una cascada de transducción de señales de tipo ERK (Receptor Extracelular tipo Kinasa), otras resultaron asociadas con una variedad de procesos biológicos centrales de la célula, como el control del ciclo celular, el recambio de proteínas, la señalización intercelular, la actividad de transposones, la regulación transcripcional y la biosíntesis mediada por el retículo endoplásmico. Un análisis de mapeo *in silico* en el genoma de *Oryza sativa*, reveló que un grupo numeroso de genes silenciados en el genotipo apomíctico se localizaba en los extremos distales de ambos brazos del cromosoma 2 de esa especie. Un subgrupo particular de 5 de estos genes agrupaba en un área particular del cromosoma 2 de arroz que es sinténica con la región que gobierna la aposporia en *Paspalum notatum* y *Brachiaria brizantha*, según estudios previamente realizados por otros investigadores (Pessino *et al.* 1997, 1998, Pupilli *et al.* 2001, Martínez *et al.* 2003, Stein *et al.* 2004). Esta autora también realizó estudios de mapeo genético en *P. notatum* para 2 de los 5 genes mencionados, demostrándose que ambos estaban genéticamente ligados a la apomixis en la especie. Al menos seis (6) genes previamente asociados con la respuesta del transcriptoma a los cambios de ploidía fueron identificados entre aquellos expresados diferencialmente entre plantas apomícticas y sexuales de *P. notatum*.

También se caracterizó la expresión diferencial de genes en especies diplospóricas de *Boechera* (Brassicaceae) (*Boechera microphylla* y *B. lignifera* apomícticas, y *B. formosa*, sexual) (Dwivedi *et al.* 2008). En este trabajo, se detectaron 4500 genes diferencialmente expresados utilizando microarreglos. Entre los genes identificados se encuentran algunos relacionados con la organización de la estructura del genoma como genes del grupo polycomb (PcG) y factores de transcripción de tipo MADS box. Los autores postularon que los genes del grupo PcG, sobreexpresados en plantas apomícticas, podrían estar produciendo la alteración en la expresión de los genes de tipo MADS box, concluyendo en el desarrollo de apomixis (Dwivedi *et al.* 2008).

Otros estudios de mucha importancia para la elucidación de las bases moleculares de la apomixis informaron la caracterización de mutantes en las especies modelo, que sin ser apomícticas, presentaron fenotipos similares a algunas etapas particulares de su desarrollo. Entre ellas debemos citar: 1) las mutantes partenogénéticas *fie*, *fis*, *fis2*, *medea* y *medicis* de *Arabidopsis thaliana* (revisado en Guitton *et al.* 2004); 2) la mutante apomeiótica *dyad* de *Arabidopsis thaliana* (Ravi *et al.* 2008); 3) una mutante LRR de arroz que da origen a células análogas a las iniciales de aposporía (Bennet 2007) y 4) la mutante embriogénica somática *SERK* de zanahoria (Schmidt *et al.* 1997). Particularmente en el caso de la interesante mutante apomeiótica *dyad* de *A. thaliana*, se ha confirmado que la inactivación de un gen responsable de la cohesión de las cromátides hermanas y organización del centrómero durante la meiosis de células germinales (DYAD/SWITCH1) es capaz de generar el fenómeno de apomeiosis en dichas células, llevando luego de la fertilización por polen y a la producción de híbridos BIII (Ravi *et al.* 2008). La baja tasa de producción de sacos no reducidos y la ausencia de partenogénesis en esta mutante es un indicador más (entre muchos otros no comentados aquí) de que aunque la región genómica que controla el carácter es única, hay más de un gen o quizás una condición epigenética compleja involucradas en la regulación de la apomixis (Ravi *et al.*

2008). Prueba de este tipo de regulación epigenética es lo estudiado por Olmedo-Monfil *et al.* (2009), quienes descubrieron una proteína de interacción con micro ARNs (TELAMON) que controla la gametogénesis femenina restringiendo la diferenciación de las células precursoras de las gametas. La mutación en TELAMON da una diferenciación anormal de estas células precursoras de la gameta femenina, que les permite iniciar la gametogénesis originando un gametofito femenino, siendo este fenotipo una reminiscencia de la apomixis apospórica. Parece ser que TELAMON se expresa en las células somáticas acompañantes pero no en el linaje gamético. Dentro del óvulo, TELAMON interactúa preferencialmente con micro ARNs derivados de elementos repetitivos y su actividad es necesaria para un silenciamiento postranscripcional de los mismos dentro del gametofito femenino. Estos resultados indican que la regulación vía silenciamiento por pequeños ARNs es crucial para el destino celular dentro del óvulo de *Arabidopsis* y muestra la posibilidad de una regulación epigenética del control de la sexualidad y la apomixis en las angiospermas.

Otro trabajo que busca modificar los mecanismos involucrados en el proceso sexual con el fin de que a través de la manipulación de los mismo se pueda cambiar el modo reproductivo de sexualidad a apomixis es el realizado por Spillane *et al.* (2004). En *Arabidopsis thaliana* identificaron un gen (*Ods-1*) que controla la entrada en la segunda división meiotica. Se combinaron mutaciones de este gen con otras dos mutaciones, una elimina la recombinación y el apareamiento cromosómico (*Atspol 1-1*) y la otra modifica la segregación de las cromátidas (*Atrec8*). La combinación de la mutación en los genes *Atspol 1-1*, *Atrec8* y *ODS-1* permitió obtener una mutante denominada MiMe (del inglés mitosis instead of meiosis) en la cual la meiosis es completamente reemplazada por mitosis sin afectar los mecanismos siguientes del proceso sexual. En consecuencia, este genotipo produce gametos masculinos y femeninos diploides viables (d'Erfurth *et al.* 2009). Este trabajo es de gran interés ya que, como el



trabajo de Ravi *et al.* (2008), demuestra que se puede provocar la apomeiosis en plantas. A pesar de que para que un individuo se reproduzca por apomixis además de la apomeiosis debe haber partenogénesis y desarrollo del endosperma, estos trabajos son un paso muy importante para el entendimiento del proceso apomíctico.

## **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 el mejor instrumento conocido que resulta en la evolución de los genomas. Se estima que en 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 (Gaut y Doebley 1997, Blanc y Wolfe 2004b, Paterson *et al.* 2004, Yu *et al.* 2005, Cui *et al.* 2006), demostrando la frecuencia de la poliploidía a lo largo de la historia de las plantas. Esta ubicuidad de la poliploidía implica que ésta debe conferir ventajas selectivas sobre la diploidía, 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, la aparición de apomixis, 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, Leitch y Bennett 1997, Adams *et al.* 2003, Blanc y Wolfe 2004a, Adams y Wendel 2005, Comai 2005, Chen y Ni 2006, Udall y Wendel 2006).

Los nuevos poliploides pueden originarse por reproducción sexual, si están involucradas gametas  $2n$ , o mediante duplicación somática de cromosomas. Tradicionalmente se consideran dos formas de poliploidía: la *alopoliploidía* (alo = distinto) y la *autopoliploidia* (auto = propio). Estos términos describirían el grado

de homología entre los genomas duplicados que forman los poliploides. Los alopoliploides estarían formados por la reunión de al menos dos genomas divergentes en el mismo núcleo y serían originados a partir de hibridización entre especies distintas. Los autopoliploides, en cambio, tendrían complementos genómicos (casi) idénticos y típicamente se originarían a partir de hibridización intra-específica o auto-fertilización a partir de gametas  $2n$  o por duplicación somática de sus cromosomas. Los alo y autopoliploides han sido reconocidos habitualmente por el modo de apareamiento y herencia de sus cromosomas. Los alopoliploides se distinguirían por mostrar apareamiento bivalente y herencia disómica, mientras los autopoliploides exhibirían apareamiento multivalente y herencia polisómica (Stupar *et al.* 2007). Sin embargo esta clasificación en alopoliploides y autopoliploides es por demás simplista, ya que en la naturaleza existen numerosos casos intermedios donde algunos sectores del genoma divergen más que otros, y donde aparecen comportamientos mixtos entre herencia polisómica y disómica. A estos casos se los ha de llamar “alopoliploides segmentales”, “autoalopoliploides” y otras denominaciones, de acuerdo a cuál se cree que es el origen del poliploide (Ramsey y Schenke 2001).

Diversos estudios han demostrado que la poliploidización involucra un estrés o choque genómico que afecta la estructura del genoma a través de la ganancia y eliminación de secuencias (Osborn *et al.* 2003). Esto estaría relacionado a un fenómeno general de estabilización del nuevo poliploide. La evidencia general apunta a la presencia de una mezcla entre eventos genéticos y epigenéticos que incluirían el rearrreglo del genoma, la modulación de la actividad de retrotransposones y el silenciamiento de genes que se encontraría afectando al recién formado poliploide (Pessino y Martelotto 2006).

En alopoliploides resintetizados de especies de *Brassica* (Song *et al.* 1995) y trigo (Ozkan *et al.* 2001, Liu *et al.* 1998) se informó que ocurren cambios genéticos

grandes y rápidos luego de la poliploidización. Estos cambios estarían acompañados de reestructuraciones epigenéticas y de cambios en la expresión de genes. Se han detectado varios mecanismos involucrados en estos cambios rápidos, entre ellos la activación de transposones (Kashkush *et al.* 2003) y la recombinación homeóloga no recíproca (Gaeta *et al.* 2007). En general, los estudios realizados hasta el momento indican que la rápida delección de secuencias es la mayor causa de variación del genoma en aloploidoides sintéticos de trigo (Ozkan *et al.* 2002). La eliminación parecería ser no al azar y altamente reproducible y la dirección del cambio estaría determinada por la combinación de los anfiploides (Shaked *et al.* 2001).

En autoploidoides también se demostró la ocurrencia de cambios genómicos rápidos luego de la poliploidización. En un trabajo realizado en los materiales utilizados para esta tesis se informaron polimorfismos genéticos ante cambios de ploidía (Mecchia *et al.* 2007). Mas adelante se detallan estos materiales, pero en resumen se trata de una serie de plantas de *Eragrostis curvula* donde se alteró la ploidía, de tipo "4x-2x-4x", que consiste en un tetraploide natural (T), su derivado dihaploide (D) (obtenido por cultivo de tejidos), y dos tetraploides (C y M) obtenidos por tratamiento con colchicina a partir del dihaploide. Un 28% de los loci detectados demostraron polimorfismos durante los eventos de poliploidización. Curiosamente, la mayoría de los polimorfismos fueron del tipo "revertiente", donde un perfil específico de bandeo fue característico de un nivel de ploidía dado. La reversión representaría un proceso específico, ya que sorprendentemente la mayoría de las modificaciones totales (90,85%) fue completamente reproducible y reversible. Esto implicó que las formas alélicas del progenitor perdidas durante la dihaploidización fueron luego recuperadas al restaurar el nivel de ploidía original (Mecchia *et al.* 2007). Por otra parte, Martelotto *et al.* (2007), analizaron la respuesta del genoma a la poliploidización utilizando un sistema de *P. notatum*, formado por un genotipo diploide y su colchipoide (autotetraploide) derivado. Alrededor del 9,55% de las bandas

resultaron polimórficas entre los genotipos de *P. notatum*. La frecuencia de pérdida de marcadores para el genotipo tetraploide (1/0: 83,16%) fue significativamente más alta que la frecuencia de bandas ganadas por el mismo (0/1: 16,84%). La búsqueda de homologías en bases de datos indicó que las secuencias polimórficas involucrarían sectores no codificantes y varias veces repetidos en localización en el genoma de arroz (de 9 a 11 veces). Estas alteraciones genéticas serían inmediatamente seguidas por un re-arreglo parcial del transcriptoma. Además, los datos informados por Martelotto *et al.* (2007), sugieren que el incremento en el nivel de ploidía daría como resultado una alteración de las secuencias en regiones metiladas.

La frecuente pérdida de bandas observada durante la poliploidización, inicialmente sugiere que al menos un número consistente de modificaciones genéticas podrían involucrar eliminación de secuencias. Una explicación alternativa podría ser la inserción de novo de elementos repetitivos en tandem, que serían movilizados por un evento de “choque o estrés genómico”.

La duplicación de los genomas, tanto en alo como autoploidoides, afecta el número de copias de los genes (Wendel 2000). La cantidad de producto expresado es a menudo crítica para el correcto funcionamiento celular y, con todos los genes en mayor número de copias, se vería alterada de diversas maneras la compleja red regulatoria (Kellog 2003). Se ha demostrado que el cambio de ploidía podría afectar el silenciamiento de transgenes en *Arabidopsis* (Mittelsten-Scheid *et al.* 1996). Se han realizado varios estudios de la respuesta del transcriptoma a los cambios en el nivel de ploidía. Mediante análisis de expresión se han informado cambios epigenéticos y silenciamiento de genes en un alotetraploide de *Arabidopsis thaliana* (Comai *et al.* 2000, Lee y Chen 2001). También en trigo se analizaron los eventos que afectan la estructura de los genes y la expresión en los estadios tempranos de la aloploidía, donde pudo observarse una rápida pérdida de genes, tanto en híbridos intergenéricos de la

F<sub>1</sub> como luego de la duplicación de los cromosomas, silenciamiento de genes, asociado en parte con la metilación de citosinas, y activación transcripcional de retroelementos (Kashkush *et al.* 2002).

En *Paspalum notatum* se realizó un análisis completo del transcriptoma de la flor utilizando la técnica de display diferencial, donde se compararon citotipos diploides y sus derivados tetraploides (Martelotto *et al.* 2005). Luego de un análisis exhaustivo, se encontraron genes diferencialmente expresados relacionados con la modificación de la estructura del ADN/cromatina, la regulación de la transcripción, proteólisis, plegamiento de proteínas, metabolismo de lípidos y carbohidratos y transducción de señales.

Un estudio de los patrones de expresión en la especie *Solanum phureja*, utilizando una serie isogénica 1x - 2x - 4x, permitió determinar que alrededor de un 10 % de los genes evaluados (de un total de ~9000) mostraba alteraciones en su expresión luego del cambio de ploidía, concluyendo que los autoploiploides recién sintetizados de papa sufrirían mucho menos cambios en la expresión de genes que los aloploiploides, ya que poseen duplicados los alelos de una misma especie (Stupar *et al.* 2007). Sin embargo este 10 % es suficiente para explicar los cambios dramáticos en el fenotipo que se observan en algunas especies al autoploiploidizarlas (Quarin *et al.* 2001).

### **Poliploidía y su relación con la apomixis**

El hecho de que la apomixis gametofítica se exprese principalmente en individuos poliploides complica más la caracterización del control genético de este carácter. Es común que dentro de un mismo género (y a veces también dentro de una misma especie) se puedan encontrar individuos diploides que son sexuales, mientras que los poliploides tienden a reproducirse a través de apomixis gametofítica (Pessino *et al.* 1999). En general, las especies apomícticas

forman complejos agámicos o grupos en los cuales biotipos sexuales y apomícticos se encuentran a distintos niveles de ploidía. En la mayoría de los casos, los citotipos diploides son sexuales y los poliploides son apomícticos. Por esto, salvo raras excepciones, la apomixis gametofítica se encuentra siempre asociada a la poliploidía (Quarín 1992, Savidan 2000). Se considera que estos complejos agámicos son estructuras reproductivas complejas y evolucionadas donde la sexualidad permite la generación de nuevos genotipos y la apomixis la propagación clonal muy eficiente de las combinaciones genéticas superiores. Daurelio *et al.* (2004) presenta evidencias que sugieren que la diversidad generada a niveles de ploidía bajos puede ser impulsada hacia los niveles poliploides por eventos sucesivos de hibridaciones  $2n+n$ .

Los estudios pioneros de Nogler (1982) en *Ranunculus auricomus* demostraron que individuos diploides obtenidos por desarrollo partenogenético de ovocélulas reducidas de tetraploides apomícticos o por cultivo de anteras (dihaploides), eran capaces de reproducirse por apomixis. Resultados similares fueron obtenidos también en otras especies (Bicknell 1997, Kojima y Nagato 1997). Sin embargo, la presencia de apomixis gametofítica en diploides ha sido verificada en muy pocas especies en la naturaleza. Algunos ejemplos de apomixis gametofítica en estado diploide han sido reportados para algunas especies de los géneros *Paspalum* (Norrman *et al.* 1989), *Potentilla* (Asker y Jerling 1992), *Boechera* (Kantama *et al.* 2007) y *Brachiaria* (Naumova *et al.* 1999). En dichos trabajos se encontraron sacos apomeióticos, aunque no se habría recobrado ninguna semilla proveniente de apomixis en estos diploides (Naumova *et al.* 1999). Estudios realizados por Bicknell *et al.* (2000) en *Hieracium piloselloides* indicaron que la apomixis podía transmitirse tanto por gametas haploides como diploides, pero la existencia de una letalidad post-cigótica causaría la ausencia de apomixis a nivel diploide. Sin embargo, recientemente, Siena *et al.* (2008) realizaron un estudio en la especie *Paspalum rufum* y demostraron la existencia de sacos apospóricos funcionales en óvulos de esta

especie a nivel diploide. Estas observaciones estarían confirmando la existencia de potencial apomítico en el estado diploide, afirmando que el/los factor/es responsables de la aposporia estaría/n ocasionalmente expresándose a este nivel de ploidía. En el trabajo de Siena *et al.* (2008), de un total de 95 plantas de una F<sub>1</sub> generada a partir de autopolinización de un individuo diploide de *P.rufum* que poseía algunos sacos apospóricos, se obtuvieron 5 plantas con marcadores moleculares idénticos a los de la planta madre. Por otra parte, en cruzamientos con otros genotipos no se obtuvo ninguna progenie materna. Esto sugiere que el individuo de origen funcionaría generalmente de manera sexual cuando se encontrara disponible una fuente de polen diferente, pero admitiría una frecuencia promedio de agamosperma de aproximadamente un 7,3% en las autopolinizaciones.

Como se puede apreciar, aún no se han elucidado las bases genéticas de la relación entre la apomixis gametofítica y los niveles de ploidía, pero se han propuesto dos modelos posibles para tratar de explicarla. Uno de ellos es el modelo de la “*regulación por ploidía*” (Quarin *et al.* 2001), esta hipótesis postula que los alelos de algunos genes involucrados directa o indirectamente en la reproducción se expresan diferencialmente dependiendo del nivel de ploidía. Según esta hipótesis, aún cuando el alelo determinante de la apomixis (A) esté presente a nivel diploide, el mismo no puede expresarse en forma efectiva, ya que para ello se requiere de la existencia de un “entorno” poliploide. Nada parece indicar que el alelo A se requiera en más de una dosis, de hecho está repetidamente probado que el carácter apomixis es dominante y que plantas poliploides de constitución genética Aaaa son apomíticas. Lo que sucedería es que simplemente A no puede expresarse a niveles diploides porque: a) está bajo el control genético de un *locus* secundario B, el cual está regulado por ploidía; o b) está él mismo bajo el control de factores genéticos o epigenéticos regulados por ploidía. Este modelo se basa en los resultados experimentales obtenidos en *P. notatum* (Quarin y Bovo 1995, Quarin *et al.* 2001) y en *P. hexastachyum* (Quarin

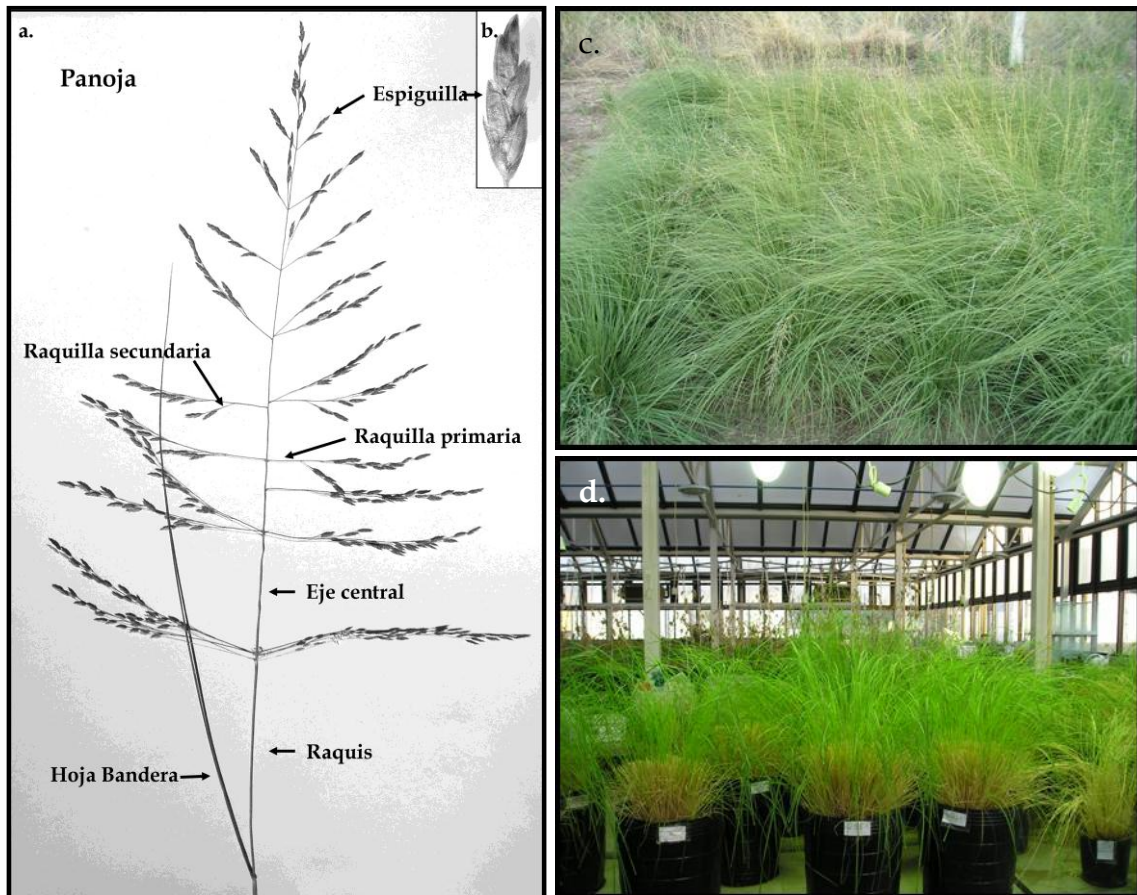
y Hanna 1980), donde se demostró que el/los alelos determinantes de la apomixis estaban presentes en las plantas sexuales a nivel diploide, sin embargo, la apomixis sólo se expresó en sus contrapartes autotetraploides obtenidas por duplicación con colchicina. Por otro lado, el modelo de la “*asincronía*” (Carman 1997) postula que la hibridación de dos ecotipos con conductas reproductivas divergentes generaría un aloploiploide con expresión asincrónica de los genes específicos de la meiosis y gametogénesis, que eventualmente conduciría a una expresión ectópica de la gametogénesis sin la participación de la meiosis. Sin embargo, Savidan (2000) critica las evidencias en las que Carman (1997) basó el modelo y sugiere que se deberían realizar nuevos experimentos para generar nuevos híbridos artificiales que expresen la apomixis y demostrar que el carácter sea heredable. Sin embargo, un trabajo realizado recientemente en la especie *Boechera holboellii* avala este modelo (Sharbel *et al.* 2009).

### **El género *Eragrostis***

El género *Eragrostis* es uno de los más grandes y difundidos de la familia Gramineae (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 característica del género es una panoja con numerosas espiguillas con lemas enteras y glabras (Fig. I.2). Todas las especies de *Eragrostis*, excepto *E. walteri* (Voigt *et al.* 2004), poseen anatomía tipo C<sub>4</sub> 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 de este género se encuentra en Sudáfrica. Las especies de mayor importancia económica son la especie objeto de esta tesis, *Eragrostis curvula*, y un cereal, *Eragrostis tef*, originario de Etiopía y destinado a la alimentación humana y del ganado a través de la producción de forraje. Otras



especies de este género se cultivan también como forrajeras o están en experimentación como tales, otras son malezas de relativa importancia en cultivos estivales, como *Eragrostis cilianensis*, la gramilla hedionda, de origen europeo y naturalizada en nuestro país. Asimismo son de importancia algunas especies que integran pastizales naturales, tales como *Eragrostis lugens* en la República Argentina, *Eragrostis superba* en Sudáfrica y algunas otras afines a *Eragrostis curvula*, que son de origen africano, como *Eragrostis chloromelas* y *Eragrostis lehmaniana*, especies que puede resultar difícil separar de *Eragrostis curvula* debido a la existencia de plantas con características intermedias.



**Figura 1.2:** a) Detalle de una panoja del género *Eragrostis*. b) Detalle de una espiguilla. c) Foto de un cultivar de *Eragrostis curvula* a campo. d) Foto de un cultivar de *Eragrostis curvula* en invernáculo.

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

La especie estudiada, *Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees (Fig. I.2), conocida vulgarmente como “*pasto llorón*” o *weeping lovegrass* (en inglés), es una especie forrajera que, pertenece a la familia Gramineae (Poaceae), subfamilia Chloridoideae (Watson y Dallwitz 1992). Esta gramínea de origen sudafricano, es extensamente cultivada en la zona semiárida templada de Argentina, cubriendo una superficie aproximada de 700.000 hectáreas (Fernández *et al.* 1991). Si bien el cultivo de esta especie se extiende desde Jujuy hasta Río Negro, el área de mayor concentración se encuentra abarcando casi la totalidad de la provincia de San Luís, el sur de la provincia de Córdoba, el este de la provincia de La Pampa y el oeste de la provincia de Buenos Aires. En la actualidad solo en la región pampeana abarca una superficie que alcanza las 500.000 has. La superficie potencial de expansión del cultivo en la región semiárida templada de la Argentina se estima en no menos de 5.000.000 has, en muchos casos en forma excluyente (Covas y Cairnie 1991).

*E. curvula* es una especie morfológicamente diversa (Poverene 1988) que ha sido dividida en tipos agronómicos (Leigh 1960) y que posee un amplio potencial genético para mejorar las características de resistencia a sequía, frío, productividad y palatabilidad (Voigt y Oaks 1985, Echenique 1987, Covas 1991). Desde el punto de vista citogenético se trata de un complejo polimórfico, ya que es un grupo poliploide (Streetman 1970, Jones *et al.* 1978) donde la mayoría de sus miembros se reproducen en forma apomíctica (Voigt 1971, Voigt y Bashaw 1972). El número básico de cromosomas de la especie es  $x=10$ , conteniendo 0,35 pg de ADN por genoma haploide (Bennett y Smith 1976). En principio fue considerada una especie con sistema de reproducción apomíctico obligado (Brown y Emery 1958, Leigh 1960), como se observa frecuentemente en gramíneas de clima templado (Streetman 1970), pero luego fueron descritas plantas sexuales (Voigt 1971, Voigt y Bashaw 1972) y apomícticas facultativas

(Voigt y Bashaw 1973, 1976, Brix 1974) lo que indica que el sistema reproductivo del pasto llorón presenta una complejidad superior a la comprobada inicialmente. Aparentemente la mayor parte de las líneas serían apomícticas facultativas con una muy baja frecuencia de reproducción sexual (Voigt y Burson 1983), sin embargo algunos estudios citológicos y de progenie afirman la presencia de plantas apomícticas obligadas. La variabilidad reproductiva de esta especie estaría bajo el control genético (Brix 1974).

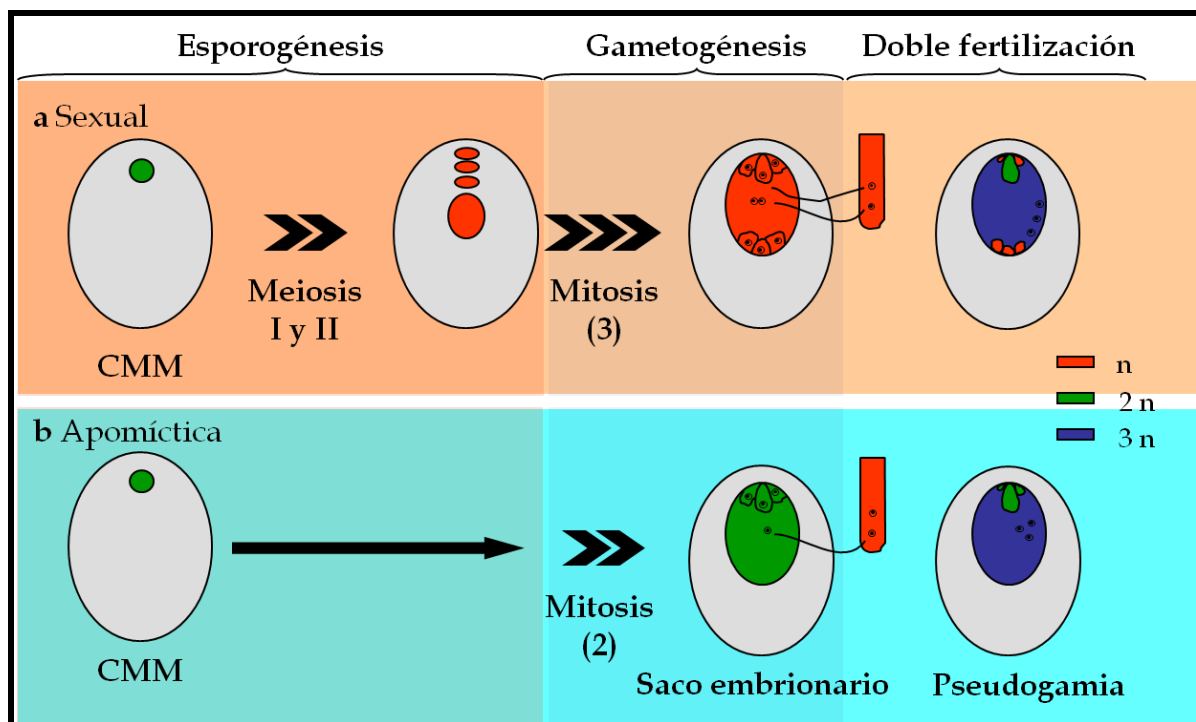
### **La apomixis en *Eragrostis***

Como se menciona anteriormente, los primeros estudios sobre el sistema reproductivo del pasto llorón lo describen como apomíctico obligado (Brown y Emery 1958, Leigh 1960). Streetman (1963) estudió detalladamente la reproducción de *E. curvula*, *E. chloromelas* y *E. lehmanniana*, concluyendo que el tipo de apomixis presente en estas especies es diplospórica, con sacos embrionarios de tipo *Antennaria* (embrionario no reducido y octanucleado). 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). El descubrimiento de apomixis facultativa en *E. curvula* (Voigt y Bashaw 1973, 1976, Brix 1974) demostró que el sistema reproductivo del pasto llorón es sumamente complejo. Voigt y Burson (1992) consideran que probablemente la mayor parte de las líneas son apomícticas facultativas, con una baja frecuencia de reproducción sexual. En un estudio citológico y de 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 apomíctico diplospórico presenta peculiaridades que lo hacen distinto a otros por lo que se considera como un modelo particular, tipo *Eragrostis* (Crane 2001), aunque previamente se lo había clasificado como de tipo *Antennaria* (Streetman 1963). En el proceso sexual (Fig. I.3a), la célula arquesporial se diferencia a partir de una célula hipodérmica de la nucela que se agranda poco a poco para dar paso a la primera división meiótica. Inmediatamente le sigue la segunda división meiótica, donde la célula calazal y la micropilar se dividen transversalmente dando una tétrada lineal, o bien, excepcionalmente, la célula micropilar se divide perpendicularmente formando una tétrada en T. Poco después de la formación de la tétrada las tres megásporas micropilares degeneran, quedando sólo la megáspora calazal, que dará origen al saco embrionario. El saco sexual finaliza su formación tras tres divisiones mitóticas dando una célula huevo, dos sinérgidas, dos núcleos polares y tres antípodas. Estas últimas pueden dividirse y formar un promedio de 15 células en el polo calazal. En el desarrollo del saco embrionario diplospórico la célula arquesporial también se diferencia a partir de una célula nucelar, que a diferencia del proceso sexual, no se divide meióticamente. Esta célula inmediatamente comienza a agrandarse, siendo la vacuola calazal la que más crece, volviéndose dominante y forzando al núcleo hacia el polo micropilar. El crecimiento de esta vacuola continua hasta que el tamaño del saco embrionario

es similar al saco embrionario sexual bi o tetranucleado. Luego, esta megáspora funcional elongada, tras dos divisiones mitóticas sucesivas, forma el saco embrionario tetranucleado, que se compone de una ovocélula, dos sinérgidas y un núcleo polar (Fig. I.3b). 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 aposporia como mecanismo reproductivo en pasto llorón (Streetman 1963, Voigt y Bashaw 1972). Poverene *et al.* (1987) hallaron plantas mellizas con cierta frecuencia en varios cultivares, lo cual es una posible evidencia de la existencia de embriones múltiples en esta especie.



**Figura I.3:** Diferencias entre la reproducción sexual (a) y la apomítica (b) en *Eragrostis curvula*. Los ovalos en gris representan el tejido nucelar dentro del óvulo. > indica la cantidad de divisiones.

### **Obtención de los materiales vegetales de *E. curvula***

El material vegetal utilizado para la realización de los estudios de expresión fue desarrollado por nuestro grupo de trabajo en el laboratorio de Biotecnología y Genética Vegetal (CERZOS- Departamento de Agronomía, Universidad Nacional del Sur). Una de las líneas de investigación que se desarrolla en este laboratorio es la aplicación de herramientas biotecnológicas para el mejoramiento del pasto llorón, *Eragrostis curvula*, con el objetivo de ampliar el área potencial de expansión del cultivo y aumentar su calidad nutricional y su palatabilidad. Como consecuencia de una evaluación de materiales obtenidos por cultivo *in vitro* a partir de inflorescencias inmaduras se identificó una planta proveniente del cultivar tetraploide apomíctico *Tanganyika*, que presentaba notables diferencias morfológicas con respecto a la planta donante de explanto (Fig. I.4). El análisis citológico de este individuo reveló que contaba con la mitad del número de cromosomas por célula ( $2n=2x=20$ ) que los miembros ordinarios del cultivar ( $2n=4x=40$ ), o sea que se trataba de un material dihaploide (denominado UNST1122) (Cardone *et al.* 2006). La inducción de la autopolinización de esta planta generó muy pocas semillas, pero se logró obtener una población  $R_1$  por polinización libre entre varias diploides réplicas (obtenidas por propagación vegetativa de UNST1122), que produjeron progenies  $R_2$ . Una serie de observaciones provenientes de varios niveles de evaluación de la progenie  $R_1$  de UNST1122 y de las  $R_2$  permitió afirmar la manifestación de un proceso de sexualidad y de posible autoincompatibilidad en dicha planta (Cardone *et al.* 2006). Este descubrimiento coincide con lo informado en trabajos anteriores que demuestran que los diploides que provienen de líneas poliploides apomícticas de una especie son sexuales (Quarín 1992).

Las semillas de una  $R_1$  de la planta diploide (UNST1122) fueron tratadas con colchicina (500mg/l) con la finalidad de restaurar el nivel inicial de ploidía

(tetraploide) (Fig. I.4). Se generaron de esta manera cuatro plantas de un total de 500 individuos que presentaban características morfológicas correspondientes a las tetraploides. El nivel de ploidía se estableció por citometría de flujo y se confirmó por recuentos cromosómicos en los ápices de raíz. Dos de éstas plantas (denominadas UNST1112 y UNST1131) se estudiaron por análisis de progenies para determinar el modo de reproducción, demostrándose que las mismas eran altamente sexuales (Cardone *et al.* 2006). Así como las líneas T (*Tanganyika*) y UNST1122 (diploide derivada de T) fueron analizadas morfológicamente observándose notables diferencias fenotípicas entre dichas plantas (Cardone *et al.* 2006), del mismo modo se analizaron las líneas UNST1112 y UNST1131, con respecto a T y UNST1122 (Mecchia *et al.* 2007).

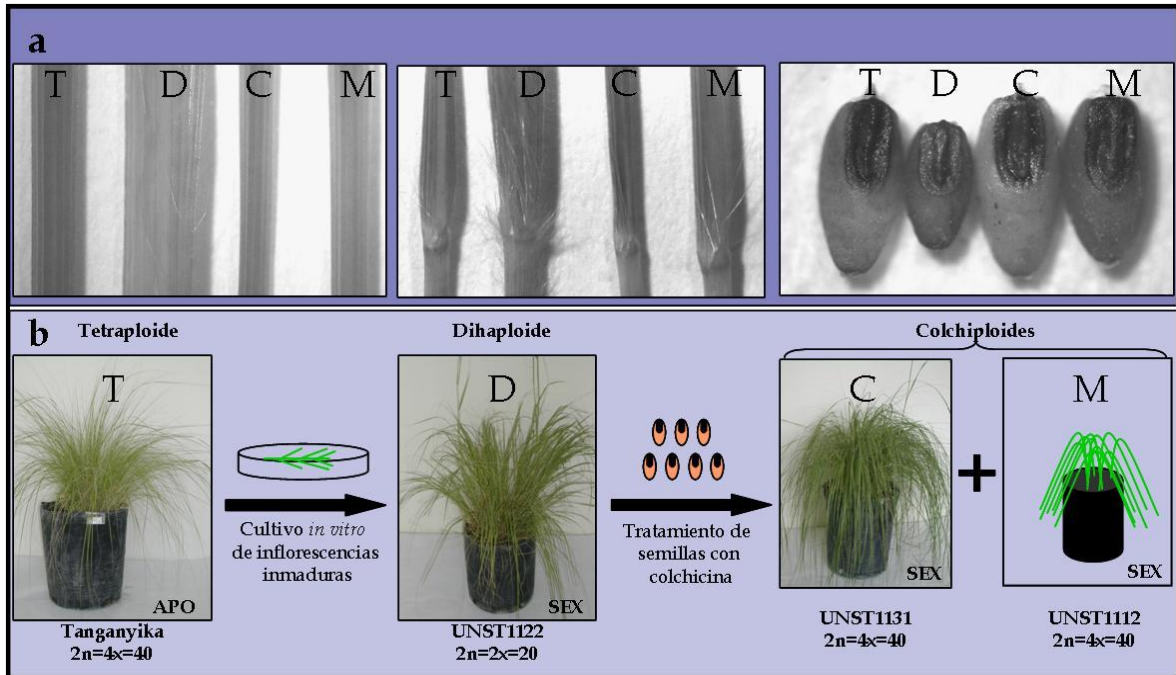
### **Breve descripción de los materiales vegetales**

El somaclón UNST1122 (inscrita en el INASE bajo el nombre de “*Victoria*”, y denominada “D” en esta tesis) se caracteriza por su gran vigor, con una peculiar pubescencia en las hojas que son, además, más anchas y con lígula más pequeña en comparación con el cultivar de origen, *Tanganyika* (denominado “T” en esta tesis) (Fig. I.4). También se caracteriza por un tamaño de semillas menor al de *Tanganyika*. El conteo de cromosomas de ápices de raíces de la regenerante primaria (R<sub>0</sub> UNST1122) permitió determinar que la misma posee un complemento de  $2n = 2x = 20$ , exactamente la mitad que el cv. *Tanganyika* ( $2n = 4x = 40$ ). La planta UNST1122 mostró una meiosis sin irregularidades, con apareamiento en bivalentes y producción de polen normal y viable en un 96,50%. Los conteos cromosómicos de 26 plantas de la progenie R<sub>1</sub> (obtenida por polinización libre) determinaron la presencia de plantas diploides (81%) y hexaploides (19%) (Cardone *et al.* 2006). La aparición de plantas hexaploides fue un indicio de variabilidad en la progenie R<sub>1</sub>. Los estudios citoembriológicos indicaron un desarrollo sexual del megagametófito. En coincidencia con esto,

los tests de progenie con datos morfológicos determinaron mayor variabilidad en la progenie R<sub>1</sub> respecto de la población proveniente de semilla apomíctica. Los resultados de los tests de progenie utilizando isoenzimas y marcadores de RAPDs indicaron también una progenie R<sub>1</sub> derivada de reproducción sexual detectando que el 87,7% de 28 plantas R<sub>1</sub> diferían del patrón materno.

En cuanto a las plantas colchiploides, utilizando citometría de flujo se seleccionaron 10 plantas entre las 72 rescatadas del tratamiento con colchicina que mostraron evidencias de haber duplicado su dotación cromosómica. Los conteos cromosómico comprobaron que sólo dos de esas plantas poseían el número cromosómico buscado,  $2n = 4x = 40$ , denominadas UNST1112 y UNST1131 (Fig. I.4). Las dos plantas tetraploides obtenidas responden al tipo agronómico "curvula" (llorón), con una morfología similar al cv. *Tanganyika*, con hojas angostas y glabras, y el mismo tamaño de semillas (Fig. I.4). El análisis del modo reproductivo de la planta UNST1131 (inscrita en el INASE bajo el nombre de "*Bahiense*", y denominada "C" en esta tesis) por test de progenies utilizando RAPDs en ensayos duplicados evidenció que se trata de un genotipo altamente sexual. Las progenies se obtuvieron por polinización libre. Se analizaron 7 plantas hijas presentando la totalidad de ellas un patrón de amplificación diferente al del genotipo materno, con desaparición de bandas y aparición de bandas nuevas. Los primeros 12 marcadores probados ya permitieron discriminar la totalidad de la progenie como provenientes de reproducción sexual. Cuando se realizó el mismo test sobre la otra planta tetraploide UNST1112 (denominada "M" en esta tesis) también se detectaron patrones diferentes al materno en la totalidad de las plantas analizadas (8), pero fue necesario utilizar 64 marcadores de RAPDs para discriminar claramente a la totalidad de la progenie (Cardone *et al.* 2006).





**Figura I.4:** a) Diferencias morfológicas (ancho de hoja, tamaño de lígula y tamaño de semilla) halladas entre *Tanganyika* (T), UNST1122 (D), UNST1131 (C) y UNST1122 (M). b) Esquema de la obtención de dichos materiales (modificado de Cardone *et al.* 2006 y Mecchia *et al.* 2007).

# **HIPÓTESIS**

La hipótesis que se plantea para esta tesis es que es posible identificar y clonar genes relacionados con la expresión de la diplosporía en *E. curvula* mediante un análisis del transcriptoma de una serie euploide de esta especie (igual transfondo genético, diferentes modos reproductivos y niveles de ploidía) empleando bibliotecas de ADNc y display diferencial (DD).

# **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Para demostrar esta hipótesis se propone realizar un análisis global del transcriptoma derivado de ovarios diplospóricos y meióticos de una línea isogénica de pasto llorón, de manera de aislar los transcritos diferenciales por modo reproductivo y por cambios de ploidía. Estos análisis permitirán realizar asociaciones genéticas y funcionales sobre el/los factores determinantes de la diplosporía en la especie, especialmente el factor ploidía.

### **Objetivos particulares**

A fin de lograr este objetivo general se proponen los siguientes objetivos particulares:

- Construcción de bibliotecas de ADNc
- Secuenciación de ESTs de las bibliotecas de ADNc
- Análisis de ESTs de las bibliotecas de ADNc
- Estudios de Display Diferencial (DD)
- Secuenciación y análisis de los transcritos diferenciales por ploidía y modo reproductivo obtenidos por DD

# **CAPÍTULO 1 - *“Construcción y secuenciación de bibliotecas de ADNc”***

## Introducción

Durante las últimas dos décadas, la secuenciación de bibliotecas de ADNc ha proporcionado un método simple y eficiente para la identificación de muchos genes de diferentes organismos (Adams *et al.* 1991). El análisis a gran escala de “etiquetas de secuencia expresadas” (ESTs, Expressed Sequence Tags) es ampliamente utilizada tanto para el estudio de expresión e identificación de genes candidatos para procesos biológicos (Hatey *et al.* 1998) como para el estudio de procesos evolutivos (Van der Hoevent *et al.* 2002). Las secuencias EST son generadas tomando clones al azar de una biblioteca de ADNc y realizando una sola reacción de secuenciación que abarca 300-500 pb del clon. Las diferencias en la expresión de genes pueden ser identificadas considerando el número de veces en que aparece representada una secuencia en particular. Sin embargo, las EST a menudo se generan a partir de bibliotecas de ADNc que han sido normalizadas para equalizar la abundancia de clones que corresponden a los diferentes transcritos. Las EST secuenciadas a partir de estas últimas pueden ser comparadas para identificar transcritos que se expresan en una biblioteca y están completamente ausentes en otra, pero si se pretende obtener datos cuantitativos exactos que describan abundancia relativa se debe recurrir indefectiblemente a bibliotecas de ADNc no normalizadas. La posibilidad de detectar diferencias en la expresión de genes a través de la comparación de la abundancia de secuencias en las bases de datos de EST se incrementa con el crecimiento de estas bases. La combinación de la información generada por las EST (nivel y localización espacio/ temporal de la expresión génica) y la de los proyectos de secuenciación de genomas (secuencias completas de los genes y sus promotores) permite realizar asociaciones de expresión y homología estructural que en muchos casos facilitan la inferencia de la posible función de los genes identificados. Por supuesto, esto constituye una instancia inicial en la identificación de la función de cada gen. Para determinar su actividad precisa deben hacerse estudios particulares dirigidos

en general a bloquear o aumentar su expresión por ingeniería genética y a modificar estructuralmente la molécula de manera de alterar la actividad de los diferentes dominios de la proteína que codifica (Pessino y Martelotto 2004).

Las ESTs son también una valiosa fuente de marcadores genéticos, como los microsatélites (SSRs, simple sequence repeats) (Lazo *et al.* 2004, Thiel *et al.* 2003, Eujayl *et al.* 2002, Gao *et al.* 2004) y los polimorfismos de nucleótido simple (SNPs, single nucleotide polymorphisms) (Garg *et al.* 1999, Yu *et al.* 2006). Estos marcadores son muy útiles para el mapeo genético, en los cuales los genes se pueden asociar con múltiples efectos pleiotrópicos (Ma *et al.* 2002, Rostoks *et al.* 2005, Xu *et al.* 2004, Ravel *et al.* 2005). Se ha demostrado que los microsatélites son uno de los sistemas de marcadores genéticos más útiles en biología. Se trata de secuencias de ADN que consisten en repeticiones en tandem de un serie de nucleótidos (de 1 a 6 pb), ampliamente distribuidas a lo largo de todo el genoma eucariota (Tóth *et al.* 2000), y que han sido hallados en todos los genomas procariotas y eucariotas estudiados hasta el momento (Katti *et al.* 2001). Los SSRs son altamente polimórficos debido a las mutaciones que afectan la cantidad de repeticiones en tándem. Esta hipervariabilidad entre organismos relacionados hace de los microsatélites un sistema de marcadores moleculares altamente informativo para un amplio espectro de aplicaciones, entre ellas el mapeo genético de alta densidad, la identificación de genotipos, el etiquetado molecular de genes, el análisis de diversidad genética, la exclusión de paternidad, la asignación de fenotipos y el mapeo de genes y selección asistida por marcadores (MAS, del inglés: marker-assisted selection) (Tautz 1989, Powell *et al.* 1996).

### **Objetivos**

El objetivo planteado en este capítulo fue la construcción de cuatro bibliotecas de ADNc a partir de las inflorescencias y hojas de la serie isogénica euploide



descrita previamente (4x apo (T) (hojas e inflorescencias), 2x sex (D) y 4x sex (C)) y la secuenciación de ESTs a partir de estas cuatro bibliotecas de *E. curvula*.

También se planteó como objetivo la anotación funcional de los genes de *E. curvula*, la obtención del índice génico para esta especie y el desarrollo de marcadores microsatélites y SNPs para la construcción de un mapa genético.

## **Materiales y Métodos**

### **Extracción del ARN total**

Las espiguillas y las hojas utilizadas para extracción de ARN se molieron con nitrógeno líquido y se utilizaron 30 mg de tejido para cada una de las extracciones. El ARN fue aislado utilizando el *SV Total RNA Isolation Kit* (Promega) de acuerdo a las instrucciones provistas en el manual del usuario.

### **Construcción de las bibliotecas de ADNc**

Se partió del ARN total proveniente de inflorescencias inmaduras de los siguientes genotipos: T (*E. curvula*, cv. *Tanganyika*, tetraploide apomíctico), D (*E. curvula*, diploide sexual obtenido por cultivo *in vitro* de inflorescencias inmaduras de T), C (*E. curvula*, autotetraploide apomíctico obtenido por tratamiento con colchicina de D). También se construyó una biblioteca a partir de ARN total aislado de hojas de T (*E. curvula*, cv. *Tanganyika*, tetraploide apomíctica) (Cardone *et al.* 2006). En la Tabla C1.1 se observa un detalle del material empleado para la construcción de las bibliotecas.

**Tabla C1.1:** Características de las bibliotecas de ADNc construídas.

<i>Denominación de la biblioteca</i>	<i>Tejido</i>	<i>Origen</i>	<i>Ploidía</i>	<i>Tipo de reproducción</i>
EC01	Inflorescencias inmaduras	UNST1122 (D)	dihaploide	sexual
EC02	Inflorescencias inmaduras	<i>Tanganyika</i> (T)	tetraploide	apomixis diplospórica
EC03	Hoja	<i>Tanganyika</i> (T)	tetraploide	apomixis diplospórica
EC04	Inflorescencias inmaduras	UNST1131 (C)	autotetraploide	sexual

### Síntesis de la primera cadena de ADNc

Para la reacción de síntesis de la primera hebra se utilizó el *SMART<sup>®</sup> PCR Synthesis Kit* (Clontech). Esta se llevó a cabo en un tubo de 0,5 ml conteniendo 1 µg de ARN total de cada genotipo. Este kit se basa en la síntesis de ADNc utilizando la transcriptasa reversa *Superscript II* de Clontech (200 unidades/reacción) que puede sintetizar ADNc de mayor tamaño que la correspondiente enzima de tipo silvestre (obtenida del virus de la leucemia murina de Molones, MMLV).

Este kit se usa para favorecer la obtención preferencial de los ADNcs completos mediante la utilización de un cebador oligo (dT) modificado (el 3' *SMART CDS Primer II A*) que se une a la secuencia del poli A para comenzar la síntesis de la primera cadena. Cuando la transcriptasa reversa alcanza el extremo 5' del ARNm, esta misma, debido a su actividad de transferasa terminal, agrega nucleótidos adicionales, principalmente dC, al extremo 3' de la hebra de ADNc.

El oligonucleótido *SMART CDS*, que contiene algunas bases G en su extremo 3' terminal se aparea con la región dC del ADNc creando un molde más largo. La transcriptasa reversa cambia entonces de molde y continúa replicando el

extremo del oligonucleótido. De esta manera el ADNc contiene el extremo 5' completo.

### Amplificación del ADNc por LD-PCR (long distance-PCR)

Dos  $\mu\text{l}$  de la reacción anterior fueron utilizados para la subsecuente reacción de PCR. El protocolo utilizado (Clontech, Palo Alto, CA) fue diseñado para lograr un balance entre mantener la representación génica y reducir la amplificación de productos inespecíficos, no deseados. Lo ideal para lograr este objetivo es realizar el menor número posible de ciclos de PCR. Se utilizó el *Advantage® 2 PCR Kit* (Clontech) que posee una mezcla de *Taq ADN polimerasa Titanium™* y otra polimerasa que permite corregir errores en la síntesis.

El cebador utilizado en la reacción también fue provisto por el kit (5' *PCR Primer II A*, 10  $\mu\text{M}$ ) que tiene la siguiente secuencia:

5'- AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT -3'

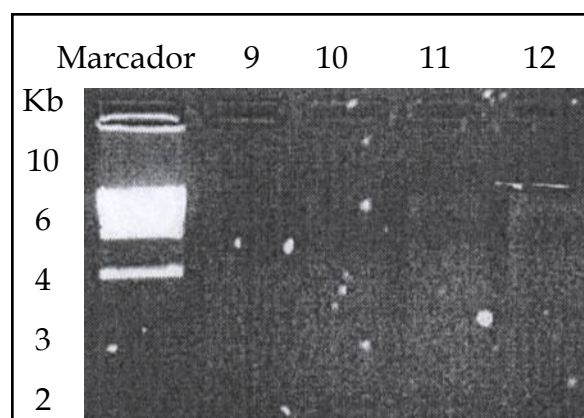
Para la PCR se utilizó el siguiente programa:

Temperatura	Tiempo	
95°C	1 minuto	
95°C	5 segundos	} X Ciclos
65°C	5 segundos	
68°C	6 minutos	
4°C	$\infty$ minutos	

La cantidad de ciclos se basó en el siguiente esquema:

ARN total ( $\mu\text{g}$ )	N° de ciclos de PCR
1 - 2	13 - 15
0,5 - 1	15 - 18
0,25 - 0,5	18 - 21
0,05 - 0,25	21 - 24

En función de la figura C1.1, donde se siembran 5  $\mu\text{l}$  de cada muestra de reacción, se elige el número de ciclos apropiados. Es necesario establecer un balance entre la cantidad de ADN requerido y evitar la redundancia de productos. Para ello se elige un número de ciclos que se encuentre entre los dos extremos. Para el caso de la figura C1.1, un número de 11 ciclos es suficiente. En nuestro caso particular, el número óptimo de ciclos utilizados fue de 15 para la biblioteca EC01, 15 para la EC02, 18 para la EC03 y 15 para la EC04.



**Figura C1.1:** Gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio utilizado para determinar el número de ciclos de amplificación del ADNc por PCR. Se parte de 1  $\mu\text{g}$  de ARN total para la síntesis de la primera hebra de ADNc. Luego se toman 2  $\mu\text{l}$  de ADNc de simple cadena para la síntesis de la segunda hebra por PCR, considerando distintos números de ciclos (9, 10, 11 y 12), finalmente se siembran 5  $\mu\text{l}$  del producto de amplificación.

## Limpieza de los fragmentos

La limpieza se realizó utilizando *Genclean Kit* (QBiogene), siguiendo las especificaciones del manual del usuario (<http://www.qbiogene.com>). Los cDNAs se colectaron en 20  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>. Esta limpieza tiene como fin purificar y desalar los fragmentos de ADNc, dejándolos listos para la reacción de agregado de extremos cohesivos para su unión al vector.

## Extensión de los ADNcs con poli A

Previo a la ligación en el *pGEM-T Easy vector* (Promega) (Fig. C1.2), cuyos extremos contienen dTs, y con el fin de asegurar una mayor eficiencia en la ligación, se adicionaron dAs a los extremos de los cDNAs. Para ello, en un volumen final de 30  $\mu$ l se mezclaron 18  $\mu$ l de los cDNAs purificados; 10  $\mu$ l del 10X *Dynazyme II buffer* (Finnzyme); 0,6  $\mu$ l de 10 mM dATP; 2,5  $\mu$ l *Dynazyme II DNA polymerase* (2U/ml) (Finnzyme) y 5,9  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>. Los tubos fueron incubados durante 30 minutos a 70 °C en el termociclador. Una vez finalizada la reacción se enfriaron en hielo y se adicionaron 70  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>.

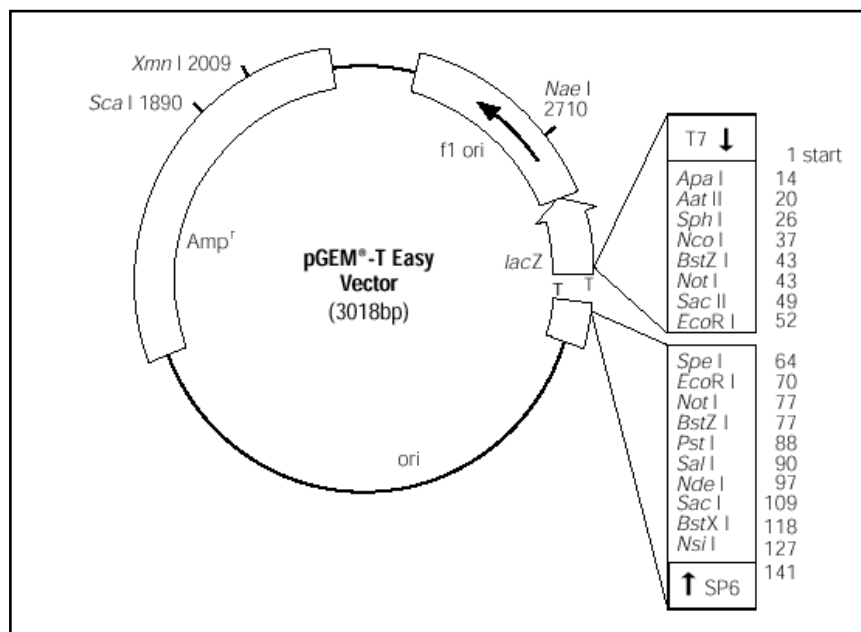
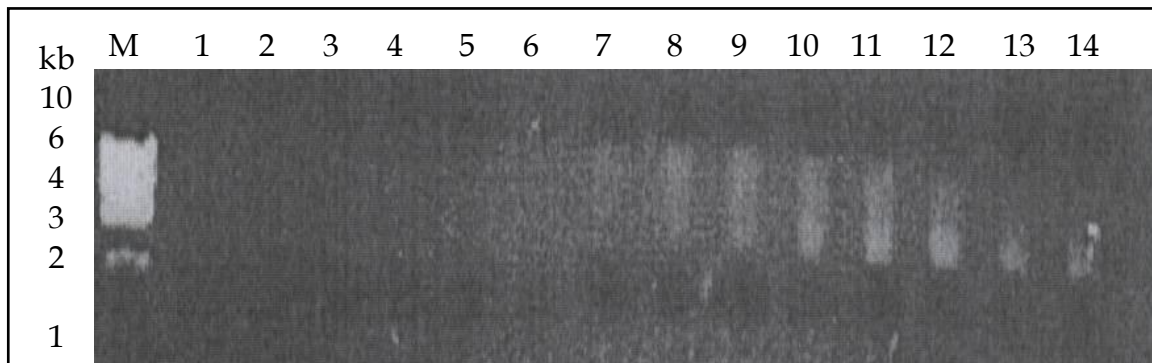


Figura C1.2: Mapa de restricción del vector *pGEM-T Easy* de Promega

### Fraccionamiento por tamaños de los ADNcs

A fin de eliminar fragmentos de bajo peso molecular y oligonucleótidos remanentes no deseables se procedió al fraccionamiento molecular. Para ello se utilizó una columna *Chroma Spin 1000 Column* (Clontech). Las fracciones apropiadas, es decir aquellas que contenían fragmentos de pesos moleculares elevados, se seleccionaron de acuerdo a la figura C1.3. Para ello las fracciones colectadas fueron sembradas en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Se tomaron tres fracciones, considerando una menos de la posición donde comienza a verse un chorreado en el gel. En el ejemplo de la figura C1.3, se toman las fracciones 6, 7 y 8.

En función de trabajar con baja redundancia y alta representatividad se eligieron para la biblioteca EC01 las fracciones 6, 7 y 8, para las bibliotecas EC02 y EC03 las fracciones 7, 8 y 9, y para la biblioteca EC04 las fracciones 5, 6 y 7. Estas fracciones fueron combinadas y limpiadas utilizando una columna Bio 101 donde el ADNc se eluyó con 10  $\mu$ l de agua filtrada con filtros milli-Q.



**Figura C1.3:** Fraccionamiento por tamaño del ADNc. Se siembran 5  $\mu$ l de cada fracción en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. En este caso se consideran las fracciones 6, 7 y 8 porque contienen los fragmentos de ADN de mayor tamaño.

### **Ligación de los fragmentos al vector**

Se utilizó el protocolo de ligado rápido para el cual se tomaron 1µl de vector pGEM-T Easy (50 ng), 3µl del ADNc obtenido en el paso anterior y 3 unidades/µl de T4 ADN ligasa, en un volumen total de reacción de 10 µl en el buffer específico para la enzima T4. La reacción de ligado tuvo lugar durante 1 hora a 24°C.

### **Transformación de las células competentes**

Se utilizó la cepa de *E. coli* XL10-Gold® Ultracompetent, de Stratagene, derivada de la cepa de alta eficiencia XL2-Blue MRF'.

La capacidad que poseen estas células de aceptar insertos más largos permite obtener bibliotecas donde se encuentra mejor representada la población de ADNc. Contiene además el gen *lac192Δ15* sobre el episoma F', que permite la selección de los plásmidos recombinantes en base a la coloración blanco/azul de las colonias, conocida como  $\alpha$ -complementación. Para poder seleccionar por este método se utilizan vectores que contienen las secuencias regulatorias y la secuencia codificante para los primeros 146 aminoácidos del gen de la  $\beta$ -galactosidasa (*lacZ*) de *E. coli*. En esta secuencia codificante se ubica el sitio de clonado múltiple (polylinker), que no interrumpe el marco de lectura. Estos vectores se usan en células huéspedes (Lac+), que codifican para la porción carboxiterminal de la  $\beta$ -galactosidasa. Los fragmentos proteicos son inactivos, sólo cuando se asocian forman la proteína activa. Las colonias bacterianas portadoras del vector no recombinante en presencia del sustrato cromogénico para la  $\beta$ -galactosidasa (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactosido ó X-gal) son de color azul. La inserción de un fragmento de ADN en el sitio de clonado múltiple resulta en la síntesis de un fragmento amino terminal que no es capaz de complementarse. Por lo tanto, aquellas bacterias que tengan un fragmento insertado en el sitio de clonado múltiple darán colonias blancas en presencia del sustrato (X-gal).

Las células ultracompetentes, almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ , se descongelaron sumergidas en hielo y se mezclaron agitando suavemente. De esta suspensión de bacterias se tomaron  $100\ \mu\text{l}$  que se colocaron en un tubo Falcon preenfriado de  $15\ \text{ml}$ . Por cada  $100\ \mu\text{l}$  de suspensión de bacterias se agregaron  $0,04$  volúmenes ( $4\ \mu\text{l}/100\ \mu\text{l}$ ) de  $\beta$ -mercaptoetanol. El mercaptoetanol tiene la capacidad de hacer la superficie celular más porosa, la cual incrementa la eficiencia de transformación. El contenido del tubo se mezcló por agitación suave y las células se incubaron en hielo por  $10$  minutos, agitando el tubo cada  $2$  minutos. Concluido este período se agregaron  $2\ \mu\text{l}$  de la mezcla de ligación y se agitó suavemente, incubando luego en hielo durante  $30$  minutos. En ese momento se agregaron los suplementos ( $12,5\ \text{ml/l}$  de  $\text{MgCl}_2\ 1\text{M}$ ,  $12,5\ \text{ml/l}$  de  $\text{MgSO}_4\ 1\text{M}$  y  $10\ \text{ml}$  de glucosa  $2\text{M}$ ) al medio NZY<sup>+</sup> ( $5\ \text{g/l}$  de  $\text{NaCl}$ ,  $5\ \text{g/l}$  de extracto de levadura,  $10\ \text{g/l}$  de hidrolizado de caseína) y el mismo se colocó a  $42^{\circ}\text{C}$  para ser utilizado más adelante. El pulso de calor se realizó colocando el tubo con las células y plásmidos en un baño de agua a  $42^{\circ}\text{C}$  durante  $30$  segundos, luego de lo cual se sumergió inmediatamente en hielo, donde se lo mantuvo por  $2$  minutos. Transcurrido ese tiempo se agregaron  $0,9\ \text{ml}$  del medio NZY<sup>+</sup> precalentado a  $42^{\circ}\ \text{C}$  y se incubó por  $1$  hora a  $37^{\circ}\text{C}$ , agitando a  $250\ \text{rpm}$ . Alícuotas de  $25$ - $50\ \mu\text{l}$  de la mezcla de transformación se plaquearon sobre el medio LB agar suplementado con ampicilina ( $100\ \mu\text{g/ml}$ ), IPTG (isopropil tio- $\beta$ -galactósido) (se disuelven  $250\ \mu\text{l}$  en  $50\ \text{ml}$  de agua ( $100\ \text{mM}$ )), de allí se toman  $0,5\ \text{ml}$  para tener una concentración final de  $0,5\ \text{mM}$ ) y X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil  $\beta$ -D-galactósido) (se disuelve el polvo en dimetil formamida al  $100\%$  a fin de tener una concentración final de  $50\ \text{mg/l}$ ). Se agregan directamente al medio de cultivo junto con el antibiótico. Las placas se incubaron durante toda la noche a  $37^{\circ}\text{C}$ . El remanente de la biblioteca se almacenó a  $4^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de realizar la amplificación.



### **Amplificación de las bibliotecas de ADNc**

A la biblioteca nativa, que se encontraba almacenada a 4°C, se le agregaron 4 ml de NZY<sup>+</sup> y se incubó por 3 horas a 37°C, agitando a 250 rpm. Transcurrido ese lapso se agregaron 5 ml de glicerol estéril al 50%, se mezcló suavemente y se alicuotó de a 200 µl en microtubos de 1,5 ml, los cuales se almacenaron a - 80°C.

### **Titulación**

Se tomó un tubo de cada biblioteca amplificada y se descongeló sumergido en hielo. Una vez descongelado se tomaron alícuotas de 50, 75 y 100 µl que plaquearon en medio LB que contenía ampicilina (100 µg/ml), IPTG y X-gal. Las placas se incubaron durante toda la noche a 37°C y al día siguiente se examinaron las placas, contando el número de colonias blancas sobre el total de colonias obtenidas. El título se calculó como el porcentaje de colonias con insertos (blancas) sobre el total de colonias.

### **Aislamiento del ADN**

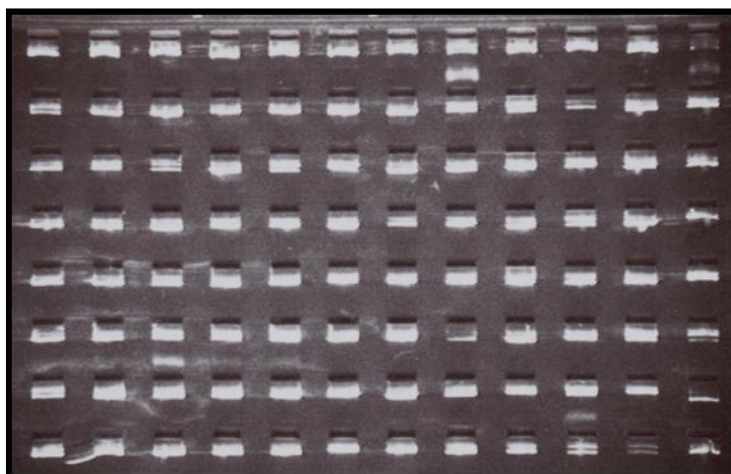
El día previo al aislamiento de ADN plasmídico se realizó un procedimiento similar al mencionado en el punto anterior a fin de colectar las colonias blancas para hacerlas crecer en medio LB con ampicilina. Cada colonia, picada con un palillo de madera (escarbadientes), fue colocada en una de las 96 celdas que componen uno de los 4 bloques que se colocaron en el robot para el aislamiento del ADN. Por ello, a fin de minimizar el riesgo de sobrecrecimiento de las bacterias y formación de colonias satélites, las placas se retiraron de la estufa temprano en la mañana. Una vez crecidas las colonias, las placas se mantuvieron en heladera por hasta 3 días. Una vez picadas completamente, las placas se eliminaron.

El picado de las colonias y la siembra en los bloques se llevó a cabo en el gabinete de flujo laminar. A cada celda del bloque (previamente colocado bajo luz ultravioleta por 10 minutos) se le agregaron 1,3 ml de medio LB conteniendo 5 mg/ml de ampicilina (10 mg/ml). Las colonias blancas se picaron una a una y cada escarbadietes fue colocado en una celda del bloque de cultivo. Luego de unos minutos los palillos fueron retirados y el bloque cubierto con la tapa se incubo por aproximadamente 26 horas a 37°C, con agitación a 300 rpm.

Las bacterias se colectaron por centrifugación del bloque a 1750xg durante 20 minutos a fin de obtener el pellet de bacterias en el fondo de cada celda. El líquido remanente se eliminó invirtiendo el bloque luego de la centrifugación. Si no se lo utilizaba inmediatamente para aislar el ADN, el mismo era conservado a -20 °C hasta el momento de introducirlo en el Biorobot 9600 (Qiagen) para aislar el ADN plasmídico utilizando un *QIAprep 96 Turbo Miniprep Kit*.

El método de aislamiento consiste en una miniprep donde el producto de cada bloque es recogido en una placa de 96 celdas donde la posición de cada celda es designada por una letra y un número, a fin de poder identificar fehacientemente la posición de cada clon secuenciado. Los plásmidos se recogen en agua MilliQ.

A fin de constatar la presencia de los plásmidos en las placas se realizó una electroforesis en un gel teñido con bromuro de etidio con la forma de las mismas de manera de correr 96 ADNs al mismo tiempo (Fig. C1.4).



**Figura C1.4:** Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio con los 96 ADNs a secuenciar.

### **Determinación del tamaño de los insertos de la biblioteca**

Se tomaron muestras de 12 plásmidos al azar de cada biblioteca a fin de estimar el tamaño promedio de los insertos. Para separar el ADN plasmídico del ADNc se realizó una digestión con la enzima EcoRI, para lo cual se incubaron 2 $\mu$ l ADN del vector (250 ng/ $\mu$ l) con 2 $\mu$ l de buffer de la enzima 10X, 0,5  $\mu$ l de la enzima Eco RI (10 U/ $\mu$ l) y 15,5  $\mu$ l de agua deionizada estéril durante de 30 min. a 37°C, luego los fragmentos se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio.

### **Secuenciación de ESTs**

Los insertos de ADNc de las bibliotecas de *E. curvula* fueron secuenciados utilizando el primer de secuenciación SMART (5'-TAACAACGCAGAGTACGCGG-3') con un secuenciador Megabace 4000 usando el kit *BigDye Terminator* (Applied Biosystems) con ADN polimerasa *Ampli-Taq FS* (PE Applied Biosystems). Se secuenciaron ESTs (Expressed

Sequence Tags) que consisten en secuencias parciales de los ADNc y no el clon completo.

### **Procesamiento y análisis de las secuencias ESTs obtenidas**

Las secuencias obtenidas a partir de las bibliotecas de ADNc de inflorescencias y hojas fueron procesadas en primera instancia por el servicio de secuenciación del Plant Biotechnology Centre, La Trobe University, Victoria, Australia, que generó archivos de secuencias con formato FASTA utilizando el programa Phred (Ewing y Green 1998; [www.phrap.org](http://www.phrap.org)) considerando los parámetros de base del mismo. Para liberar a las secuencias de la contaminación, por regiones flanqueantes del vector, se utilizó el programa Crossmatch.

Las secuencias se encuentran depositadas en la base de datos del Parkville Bioinformatics Consortium (PBC) que es un consorcio constituido por el Ludwig Institute for Cancer Research, Melbourne Branco Walter y Eliza Hall Institute for Medical Research CSIRO Division of Molecular Science, Parkville Laboratory.

Posteriormente, las secuencias fueron reprocesadas a través de la plataforma automatizada de procesos XGI (Nacional Center Genome Research, [www.ncgr.org](http://www.ncgr.org)), montada en un servidor IBM serie x 225 (INTA01, Instituto de Biotecnología, CICVyA, INTA Castelar). Los pasos de edición y anotación de las secuencias consistieron en la producción de archivos de secuencia en formato FASTA asociados a archivos de calidad de trazas del electroferograma original, usando los parámetros de base del programa Phred (Ewing y Green 1998; [www.phrap.org](http://www.phrap.org)); la eliminación de secuencias con un largo menor a 100 pb; la eliminación de regiones de baja calidad; y el ensamblado de secuencias relacionadas de cada biblioteca mediante el armado de “contigs” y “singletons” utilizando el programa CAP3 (Huang y Madan 1999), con una rigurosidad alta

(identidad de secuencia  $P = 90$ ) y superposición de la longitud de secuencias ( $O = 40$ ). Se calculó el número real de unigenes y el nivel de redundancia tanto para cada biblioteca de manera independiente, como teniendo en cuenta la combinación de las cuatro. Este proceso se llevó a cabo de la siguiente manera: 1) el perfil de agrupamiento de genes para cada biblioteca por separado y las cuatro combinadas se obtuvo utilizando el programa ESTstat (Wang *et al.* 2004) ajustada para bibliotecas de ADNc parciales 5' y error de corrección Tipo III por agrupamientos y 2) se estimó el número real de unigenes y el nivel de redundancia con el programa ESTstatCF (Wang *et al.* 2005). También se calculó el número de genes nuevos a ser encontrados y el nivel de redundancia simulando la adición de una muestra proporcional de ESTs ( $S: 0,5, 1,0, 1,5$  y  $2,0$ -referidos al número inicial de ESTs) para cada biblioteca y para las cuatro combinadas.

Las secuencias editadas se compararon utilizando BLASTX, *Basic Local Alignment and Search Tool* (Altschul *et al.* 1994), que compara una secuencia de nucleótidos traducida en todos sus marcos de lectura con una base de datos de secuencias de proteínas. En este caso se consideraron aquellas depositadas en la base de datos SwissProt, base de datos distribuida por European Molecular Biology Laboratory (EMBL), ([www.expasy.ch/sprot](http://www.expasy.ch/sprot)).

La caracterización funcional de las bibliotecas se basó en la nomenclatura y el esquema de clasificación de Gene Ontology ([www.geneontology.org](http://www.geneontology.org)) utilizando el programa Blast2GO (Conesa *et al.* 2005).

Las secuencias editadas también se compararon contra los índices de genes (GI) de trigo (*Triticum aestivum*-TaGI), maíz (*Zea mays*-ZmGI), Avena (*Avena sativa*-OGI), cebada (*Hordem vulgare*-HvGI) y Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*-AtGI) de TIGR (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/tgipage.html>) utilizando el algoritmo BLASTN (Altschul *et al.* 1994).

Las secuencias fueron depositadas en el GeneBank (con la nomenclatura: EH183417 a EH195711).

## **Desarrollo y detección de marcadores moleculares**

### **Microsatélites derivados de las ESTs (EST-SSRs)**

Para el desarrollo de los marcadores EST-SSR se utilizaron las 12.295 secuencias consenso de alta calidad producto de la secuenciación de las cuatro bibliotecas. Se utilizó el programa SSR Discovery (Robinson *et al.* 2004) para identificar los microsatélites dentro de las ESTs y el diseño de primers. Para la selección de los EST-SSRs se tuvieron en cuenta los siguientes criterios: mínimo de seis repeticiones para dinucleótidos, de cinco repeticiones para trinucleótidos, de cuatro repeticiones para tetra y pentanucleótidos, productos de amplificación de 200 a 500 pb, temperatura de annealing entre 56 y 62 °C, contenido de CG entre 40 y 60% y *primers* entre 18 y 25 pb. Se sintetizaron 60 *primers* de los seleccionados (AlphaDNA, Canadá) para determinar la eficiencia de amplificación y el patrón de amplificación utilizándose ADN del cv. *Tanganyika*. Para la amplificación se utilizó el siguiente protocolo: *buffer* 1X, 2,5 mM Cl<sub>2</sub>Mg, 0,125 mM (c/u) dNTPs, 10 mM primer, 1,6 U Taq polimerasa Invitrogen, 50 ng ADN. El programa de amplificación fue tipo touchdown (la temperatura baja de a 1°C en los primeros ciclos de amplificación): 94°C 4', 18 ciclos de 94°C 30'', 68°C 30'' (-1°C/ciclo), 72°C 1', 30 ciclos de 94°C 30'', 50°C 30'', 72°C 1', 72°C 10', en ciclador MJ Research 100. Los productos de amplificación se separaron en geles de acrilamida al 6% y se tiñeron con plata.

Se extrajo ADN genómico de 9 cultivares de *E. curvula* (DW: *Don Walter*, DJ: *Don Juan*, DP: *Don Pablo*, DE: *Don Eduardo*, K: *Kromdraai*, DA: *Don Arturo*, M: *Morpa*, E: *Ermelo*, T: *Tanganyika*) y de los materiales UNST1122 (D: *Victoria*), UNST1131 (C: *Bahiense*) y UNST1112 (M). Se utilizó un protocolo de extracción rápida a partir de material fresco. El ADN genómico se extrajo utilizando el

siguiente *buffer* o solución reguladora: 50 mM Tris-HCl 1M pH 8, 10 mM EDTA 0,5 M pH 8, 100 mM ClNa 5 M, 10% SDS y 10 mM  $\beta$ -mercaptoetanol. Para la extracción se partió de material fresco (aprox. 50  $\mu$ g) de plantas de aproximadamente tres meses de edad. Se cortaron hojas en pequeñas porciones y se colocaron en un mortero tubular de vidrio esmerilado y se homogeneizaron con el *buffer*. El producto obtenido se transfirió a un tubo Eppendorf de 1,5 ml y se incubó durante 20 min. a 65 °C con agitación lenta (estufa con agitador vertical). Posteriormente se agregaron 200  $\mu$ l de acetato de potasio 5 M (pH 4,8) y se incubó en hielo durante 20 min. Pasado ese tiempo se centrifugaron los tubos en una centrífuga Eppendorf (20 min. a 13.000 rpm) para eliminar restos de tejido. El paso anterior se repitió para lograr un sobrenadante más limpio. El mismo se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf de 1,5 ml y se agregaron 700  $\mu$ l 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  $\mu$ l de alcohol 70% y se centrifugó durante 4 min. a 13.000 rpm. Este lavado se repitió una segunda vez. Luego el pellet se secó a estufa a 37°C o en flujo laminar durante aproximadamente 30 min. Y se resuspendió en 50  $\mu$ l de *buffer* TE 1X. La concentración de ADN se determinó en un fluorímetro BioRad, utilizando como estándar ADN de timo de ternera en varias concentraciones para establecer una curva de calibrado. Se utilizó como colorante fluorescente Hoechst 33258 (BioRad).

Trece de los *primers* que dieron mejores patrones de amplificación fueron utilizados para evaluar los polimorfismos existentes entre distintos cultivares de pasto llorón. Para ello se utilizó ADN de los cultivares mencionados previamente, un programa de amplificación tipo touchdown y geles de acrilamida al 6% con tinción de plata.

### Polimorfismos de nucleótido simple derivados de las EST (EST-SNPs)

Los SNPs se identificaron en las ESTs utilizando el programa SNP Discovery (Barker *et al.* 2003). Para cada SNP candidato se calcularon dos mediciones de confianza, la redundancia de los polimorfismos en el locus y la co-segregación del SNP candidato con los otros SNPs en el alineamiento. Las ESTs de las cuatro bibliotecas fueron alineadas y solo se consideraron los SNPs con una redundancia mínima de 10 y una segregación de 5.

## Resultados y Discusión

### Caracterización de las bibliotecas de ADNc

La Tabla C1.2 describe las principales características de cada biblioteca, incluyendo el origen del ARN, el título, el tamaño promedio de los insertos, y el largo promedio de lectura para las ESTs. El tamaño de inserto obtenido en las cuatro bibliotecas fue similar y se encontró en un rango de 500 a 3500 pb. La longitud de lectura promedio por biblioteca cayó en un rango de 354 y 544 pb. Aunque la tecnología SMART utilizada para la creación de las bibliotecas permite la generación de insertos de gran tamaño, la lectura parcial lograda permite realizar un muestreo rápido y exhaustivo de los transcritos presentes en las distintas bibliotecas a un costo razonable.

**Tabla C1.2:** Título, tamaño de inserto y largo promedio de las ESTs de las bibliotecas de ADNc de *E. curvula*.

<i>Biblioteca</i>	<i>Tejido</i>	<i>Título (colonias con inserto/ml)</i>	<i>Tamaño de inserto promedio (pb)</i>	<i>Largo promedio de las ESTs (pb)</i>
EC01	Inflorescencias inmaduras	7.635	1.568	480
EC02	Inflorescencias inmaduras	8.720	1.922	544
EC03	Hoja	13.680	1.562	456
EC04	Inflorescencias inmaduras	7.152	1.427	354



Una estrategia similar de construcción y análisis de ESTs ha sido usada por otros autores como Sawbridge *et al.* (2003a y b) y Ji *et al.* (2006) La accesibilidad a grandes colecciones de insertos de ADNc permite la caracterización de aquellos transcritos diferencialmente expresados en relación al nivel de ploidía y modo reproductivo de esta especie. A fin de evaluar esta expresión diferencial entre estos estadios de desarrollo y garantizar la representatividad de los transcritos en las diferentes bibliotecas de ADNc estas fueron construidas, como se mencionara anteriormente, evitando cualquier paso de normalización y/o enriquecimiento.

### **Análisis de las ESTs y generación de los unigenes**

Luego de la limpieza para eliminar las secuencias de baja calidad y la secuencia del vector de clonación, 12.295 ESTs fueron obtenidas de las 12.425 originales generadas a partir de las cuatro bibliotecas de ADNc. Estas secuencias incluyen 3.650 de la biblioteca EC01; 3.644 de la EC02; 1609 de la EC03 y 3392 de la EC04. Luego del ensamblado y agrupamiento, se obtuvieron 8.884 unigenes, incluyendo 1.490 contiguos y 7.394 singletons (Tabla C1.3). La proporción de singletons, calculada en relación al número total de ESTs en cada biblioteca, fue similar para cada una de las cuatro bibliotecas: 66,04% para la EC01 (2427 ESTs), 74,09% para la EC02 (2700 ESTs), 65,69% para la EC03 (1057 ESTs), 63,92% para la EC04 (2157 ESTs) y 60,01% (7394 ESTs) combinando las cuatro bibliotecas. Para cada biblioteca se generó un perfil de agrupamiento individual y otro grupal tomando en cuenta todas las secuencias de *Eragrostis curvula*, utilizando el programa ESTstat (Wang *et al.* 2004). El número de ESTs por contig varió de 2 a 19 para la biblioteca EC01, de 2 a 17 para EC02 y EC04, y de 2 a 43 para la EC03. En la Tabla C1.3 se pueden observar las principales características de cada biblioteca, tales como número de ESTs, unigenes, singletons, contigs, ESTs por contig y nivel de redundancia.

**Tabla C1.3:** Características de las bibliotecas de ADNc de *E. curvula*: número de ESTs, singletons, contigs, unigenes and nivel de redundancia.

	<i>Bibliotecas de ADNc</i>				
	<i>EC01</i>	<i>EC02</i>	<i>EC03</i>	<i>EC04</i>	<i>Bibliotecas combinadas</i>
<i>ESTs</i>	3.650	3.644	1.609	3.392	12.295
<i>Unigenes</i>	2.924	3.053	1.188	2.590	8.884
<i>Singletons</i>	2.427	2.700	1.057	2.157	7.394
<i>Contigs</i>	527	353	131	433	1.490
<i>ESTs en contigs</i>	1.248	944	552	1.235	4.926
<i>Redundancia*</i>	1,25	1,19	1,34	1,34	1,38

\*Nivel de redundancia: estimado según Wang *et al.* (2005)

Los ocho unigenes con más prevalencia estuvieron representados por 14 - 46 ESTs. Entre ellos, el gen de la enzima RuBisCO (46 ESTs y 1.678 pb), involucrada en la fijación de CO<sub>2</sub>; enzimas del metabolismo energético: gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa citosólica (23 ESTs y 1.238 pb),  $\beta$ -galactosidasa (15 ESTs y 564 pb), ATP sintasa (14 ESTs y 1.417 pb); genes asociados a la síntesis de proteínas: factor de elongación 1-alfa (18 ESTs y 1.582 pb) y proteína ribosomal 60s (22 ESTs y 1.353 pb) y dos genes involucrados en la división celular como la cadena  $\beta$ -2 de tubulina (25 ESTs y 1.354 pb) y la proteína checkpoint 1 (CHK1) (30 ESTs y 1,066 pb). Varios de los genes antes mencionados son típicamente expresados en tejidos y órganos en activa división y crecimiento, tales como hojas jóvenes e inflorescencias.

Para evitar realizar secuenciaciones extra, es importante estimar el número de nuevos genes que pueden descubrirse considerando el nivel de redundancia que se alcanzaría luego de agregar un nuevo set de ESTs. Esta es una consideración importante para guiar la selección del número de clones a ser incluidos en el muestreo de diversas bibliotecas de cDNA, maximizando la tasa de descubrimiento de genes. El nivel de redundancia, calculado de acuerdo a Wang *et al.* (2005), fue bajo para cada biblioteca, lo que indica que con una nueva ronda de secuenciación se podrían hallar nuevos genes (Tabla C1. 3).

Como puede deducirse en función del número de singletons, el valor más bajo de redundancia se obtuvo para la biblioteca EC02. Si un genoma típico de plantas contiene entre 30 y 40.000 genes (Bennetzen *et al.* 2004), cada biblioteca por separado y la combinación de los 8.884 unigenes, representarían del 5 al 10 y el 22% del genoma de *E. curvula*, respectivamente. Por ello consideramos que se debería realizar una nueva ronda de secuenciación sobre las mismas o utilizar nuevas tecnologías que permitan obtener un mayor número de transcritos.

La Tabla C1.4 muestra el número de supuestos nuevos genes que podrían ser descubiertos teniendo en cuenta la adición de un grupo proporcional de ESTs. Duplicando el número de EST (2S) se lograría la identificación de 3.699 nuevos genes de la biblioteca EC01, 4.519 de la biblioteca EC02, 1.752 de la biblioteca EC03 y 3.607 de la biblioteca EC04. En todos estos casos el nivel de redundancia sería similar al actual. Esto significa que, independientemente de la situación actual de cada biblioteca, será posible identificar hasta 12.243 nuevos genes del número total de ESTs, alcanzando un total de 21.127 genes y una cobertura de, aproximadamente, el 53% del genoma de *E. curvula*, manteniendo aún un bajo nivel de redundancia.

**Tabla C1.4:** Número posible de genes de *E. curvula* que podrían ser descubiertos secuenciando nuevas ESTs.

S	<i>Bibliotecas de ADNc</i>									
	<i>EC01 (3,675)<sup>a</sup></i>		<i>EC02 (3,644)<sup>a</sup></i>		<i>EC03 (1,609)<sup>a</sup></i>		<i>EC04 (3,392)<sup>a</sup></i>		<i>Bibliot. combinadas (12,320)<sup>a</sup></i>	
	<i>NGS</i>	<i>NR.</i>	<i>NGS</i>	<i>NR</i>	<i>NGS</i>	<i>NR</i>	<i>NGS</i>	<i>NR</i>	<i>NGS</i>	<i>NR</i>
<b>0.5</b>	1.124 <sup>b</sup> (1.086-1.156)	1,36 <sup>c</sup> (1,35-1,37)	1.258 (1.251-1.341)	1,26 (1,25-1,27)	497 (495-516)	1,41 (1,40-1,43)	1.016 (977-1.048)	1,41 (1,39-1,42)	3.475 (3.390-3.524)	1,49 (1,49-1,51)
<b>1.0</b>	2.099 (2.016-2.169)	1.46 (1,44-1,49)	2.452 (2.381-2.525)	1,32 (1,31-1,34)	953 (901-993)	1,48 (1,46-1,52)	1.944 (1.860-2.013)	1,49 (1,47-1,52)	6.628 (6.421-6.728)	1,59 (1,58-1,61)
<b>1.5</b>	2.951 (2.817-3.079)	1,56 (1,53-1,60)	3.527 (3.400-3.648)	1,38 (1,36-1,41)	1.370 (1.287-1.436)	1,55 (1,51-1,60)	2.804 (2.656-2.910)	1,57 (1,54-1,61)	9.536 (9.205-9.693)	1,67 (1,66-1,70)
<b>2.0</b>	3.699 (3.510-3.895)	1,66 (1,62-1,71)	4.519 (4.315-4.700)	1,44 (1,41-1,48)	1.752 (1.638-1.851)	1,62 (1,57-1,69)	3.607 (3.381-3.751)	1,64 (1,60-1,70)	12.243 (11.771-12.446)	1,75 (1,73-1,79)

<sup>a</sup> Número total de ESTs

<sup>b, c</sup> Intervalo de confianza del 95%.

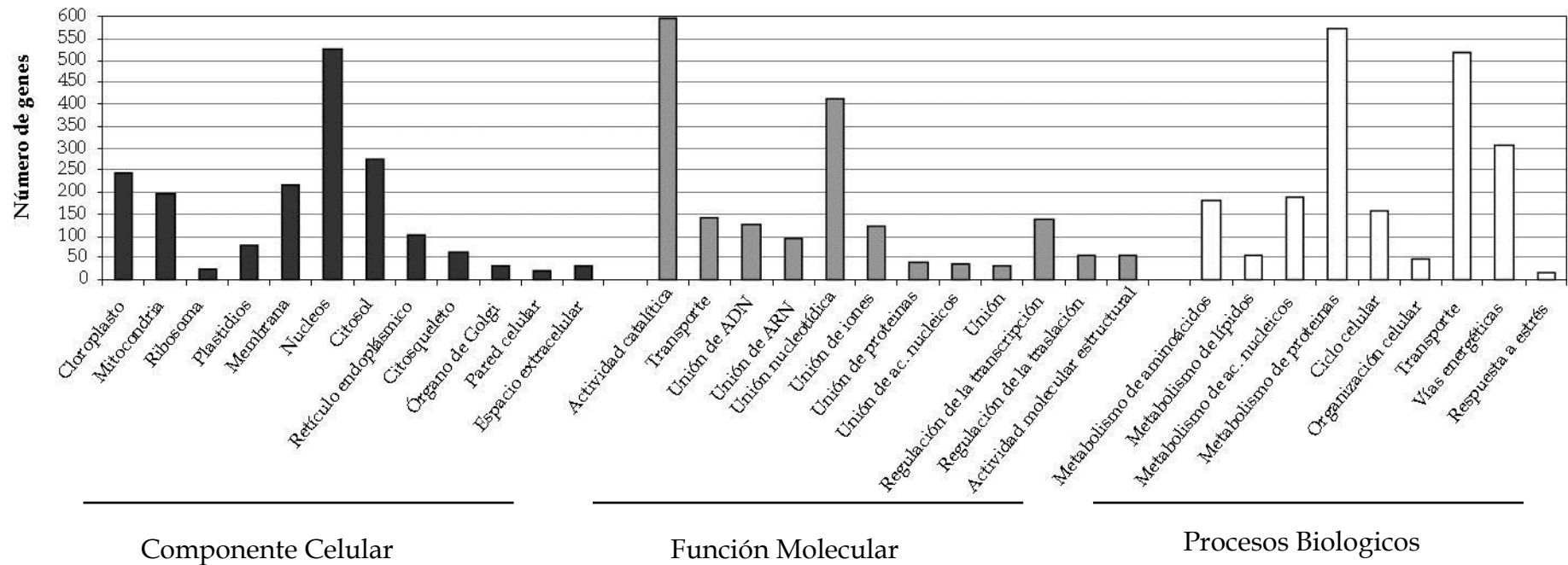
**S:** Proporción de ESTs agregadas en relación al total de ESTs por biblioteca. **NGS:** Nuevos genes secuenciados (genes a ser descubiertos).

**NR:** Nivel de redundancia.

### **Anotación funcional de los unigenes de *E. curvula***

El algoritmo BLASTX fue utilizado para el análisis de homología de los unigenes de *E. curvula* contra de las secuencias de proteínas depositadas en las bases de datos públicas SW/Treml. La caracterización funcional de los unigenes se basó en la nomenclatura y el esquema de clasificación de Gene Ontology ([www.geneontology.org](http://www.geneontology.org)).

En el proceso de anotación, cuando se registraban múltiples “hits”, se seleccionaba el de menor e-value. De los 8.884 unigenes cuyos productos mostraron homología (e-value  $\leq 1 \times 10^{-5}$ ) con secuencias presentes en las bases de datos públicas mencionadas, 3.358 (37,80%) mostraron homología significativa con proteínas y se le asignaron posibles funciones (Fig. C1.5). El 22% de los genes categorizados fueron clasificados en relación a funciones moleculares, el 23% a procesos biológicos y el 21% a componentes celulares. La mayor proporción de los unigenes caracterizados funcionalmente se agrupó en seis categorías: actividad catalítica, unión de nucleótidos, metabolismo de proteínas, unión, transporte y vías energéticas, con una alta actividad nuclear, típica de los tejidos jóvenes (Fig. C1.5). La función biológica de otros 3671 (41,32%) unigenes fue asignada teniendo en cuenta la bases de datos SW/Treml, pero no fue posible clasificarla a través de la anotación GO (Tabla C1.5). La combinación de ambas anotaciones resultó en un total de 7029 (79,11%) unigenes funcionalmente clasificados. Sin embargo, 1855 (20,88%) unigenes no mostraron homología significativa con las bases de datos anteriormente mencionadas.



**Figura C1.5:** Grupos funcionales en los que fueron clasificados los unigenes de pasto lloron de acuerdo a la anotación Gene Ontology (e-value  $\leq 1 \times 10^{-5}$ ).

**Tabla C1.5:** Unigenes de *E. curvula* que mostraron identidad en la base de datos TIGR de trigo, avena, maíz, cebada y arabidopsis.

<i>Índice génico (GI)</i>	<i>Tamaño del GI</i>	<i>Genes anotados de E. curvula</i>
<i>Trigo</i>	391.939	3.823 (43,03%)
<i>Avena</i>	89.147	4.508 (49,25%)
<i>Maíz</i>	58.582	4.130 (53,52%)
<i>Cebada</i>	50.453	3.846 (43,21%)
<i>Arabidopsis</i>	81.826	1.983 (22,32%)

Con el fin de buscar genes conservados dentro de los unigenes de *Eragrostis* en relación con otras especies de plantas se compararon estos con los índices de genes disponibles (GI) de maíz (*Zea mays*), trigo (*Triticum aestivum*), avena (*Avena sativa*), cebada (*Hordeum vulgare*) y *Arabidopsis thaliana* utilizando el algoritmo BLASTN (Tabla C1.6). Cuarenta y tres por ciento de los genes de *Eragrostis* encontraron homología con secuencias de trigo (391.939 genes anotados) y cebada (50.423 genes anotados), 49,25% con genes de avena (89.147 genes anotados) y 46,48% con genes de maíz (58.582 genes anotados). A pesar de que el número de genes disponible de estas gramíneas es muy diferente entre ellas, el porcentaje de unigenes de *E. curvula* representado en estas especies es muy cercano al 50%, alcanzando el valor más elevado cuando la búsqueda de homología se realizó contra el GI de maíz, lo cual es lógico ya que es la especie taxonómicamente más relacionada con *Eragrostis* (Yeoh y Watson 1986). Sin embargo, sólo el 22,32% de los genes de *E. curvula* puso de manifiesto cierto grado de similitud de secuencia con los genes de *Arabidopsis*. Así como aproximadamente el 50% de los genes de *E. curvula* están representados en el índice de genes (GI) de cereales, otro 28% representan genes únicos de *E. curvula* o especies estrechamente relacionadas, lo que los hace genes candidatos para caracteres que no están presentes en las especies mencionadas, como aquellos condicionantes de la apomixis. Es interesante observar que la representación de genes es independiente del tamaño del GI de cereales utilizado. La falta de correlación entre el número de genes en el GI y las homologías con las secuencias de *Eragrostis* podría deberse a diferentes factores,

tales como: 1) el número de genes en la GI puede estar sobreestimado. De acuerdo a Bennetzen *et al.* (2004), el número total de genes en genomas de monocotiledóneas podría estar sobreestimada debido a la presencia de retrotransposones, 2) la función desconocida de genes de *Eragrostis* 3) que algunas secuencias podrían corresponder a transcritos no funcionales.

**Tabla C1.6:** “Singletons” y “contigs” con “hits” positivos en SW o Trembl que no se incluyeron en la clasificación “GO”

<i>Unigenes</i>	<i>Base de datos</i>		<i>Total<sup>2</sup></i>
	<i>SW</i>	<i>Trembl</i>	
<i>Singletons</i>	171	2.504	2.675
<i>Contigs</i>	643	353	996
<i>Total<sup>1</sup></i>	814	2.837	3.671

<sup>1</sup> Número total de unigenes.

<sup>2</sup> Singletons y contigs con identidad en SW/Trembl.

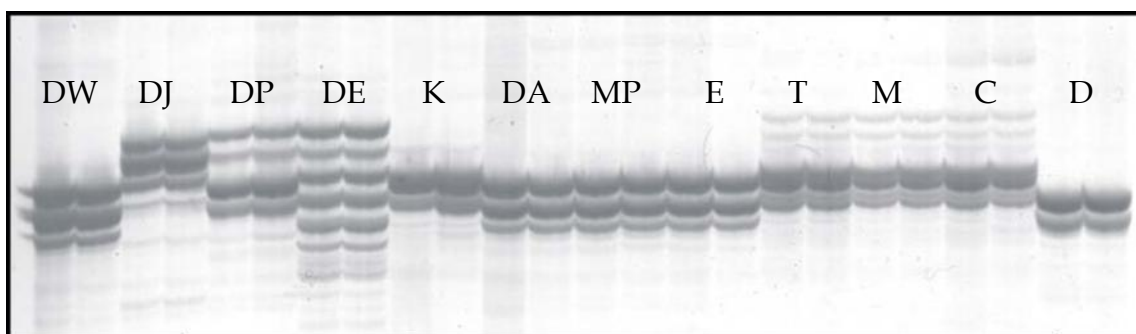
### Desarrollo de microsatélites

Se detectaron 254 microsatélites en las bibliotecas de unigenes de pasto llorón, de esos 219 se hallaron sobre secuencias únicas (singletons) y 35 sobre secuencias agrupadas en contiguos (contigs). A diferencia de lo que se ha encontrado en otras gramíneas, incluso en *Eragrostis tef* (Yu *et al.* 2006), en pasto llorón los microsatélites con repeticiones de dos y tres nucleótidos están igualmente representados en las 254 EST-SSRs, con porcentajes del 38,95 y 40,16% respectivamente. Los tetra y penta-nucleótidos muestran valores significativamente menores (12,04 y 8,33%, respectivamente). No obstante, las proporciones de EST que contienen SSRs, como así también la frecuencia de la detección *in silico* de SSRs, incluso para la misma especie es muy variable en la literatura (Peng y Lapitan 2005). Al igual que en otras especies (Nicot *et al.* 2004), los motivos di-nucleótidos más abundantes fueron (GA)<sub>n</sub> y (AC)<sub>n</sub>, representado un 63,37 y un 27,72% del total, respectivamente. Como en el caso del trigo (Nicot *et al.* 2004), los motivos GC están pobremente representados (1,98%). Aunque se cree que los microsatélites (AT)<sub>n</sub> son muy abundantes en el



genoma de las plantas (Lagercrantz *et al.* 1993, Morgante y Olivieri 1993), en *E. curvula* sólo representaron un 4,95%. Resultados similares fueron hallados por Nicot *et al.* (2004) en trigo. Estos autores sugieren que la autocomplementación existente en los microsatélites (AT)<sub>n</sub> dificulta su detección. Los motivos dinucleótidos pueden representar múltiples codones dependiendo del marco de lectura y traducirse en diferentes aminoácidos. Por ejemplo, los motivos (GA)<sub>n</sub> o (CT)<sub>n</sub>, según que hebra del ADN sea codificante, pueden traducirse en los aminoácidos Arg, Glu, Ala y Leu. Ala y Leu, estando presentes en las proteínas con frecuencias del 8 y 10%, respectivamente (Lewin 1994). Kantety *et al.* (2002) sugieren que esta podría ser una de las razones de la alta frecuencia de los motivos (GA)<sub>n</sub> en las bibliotecas de ESTs. Entre las combinaciones de trinucleótidos, los tipos predominantes fueron (CCG)<sub>n</sub> y (CCT)<sub>n</sub>, representado el 25,71 y 23,81% del total de microsatélites, respectivamente. En trigo y arroz estos motivos representan el 83 y 79% del total (Kantety *et al.* 2002). La Rota *et al.* (2005), informan que en trigo, cebada y arroz la relación entre los di-, tri-, tetra- y penta-nucleótidos varía en relación a la longitud de las repeticiones. En este estudio, sólo en arroz la relación entre los di- y tri-nucleótidos fue similar, pero sólo en aquellos casos donde la longitud de las secuencias fue mayor a 30 pb. Esta diferencia con nuestros resultados puede depender del número de unigenes detectados en ambos casos, 8.884 en *E. curvula*, contra la secuenciación completa del genoma de arroz. Como se mencionara en Materiales y Métodos, se diseñaron *primers* para 60 de los 254 EST-SSRs encontrados (AlphaDNA, Canadá) que fueron amplificados para su validación utilizando ADN del cv. *Tanganyika* (Zappacosta 2009). De ellos, 35 (58%) fueron efectivamente amplificados en las condiciones experimentales mencionadas previamente (ver Materiales y Métodos) (Fig. C1.6). Como se menciona en el trabajo de Nicot *et al.* (2004), la falta de amplificación puede deberse a varias razones: 1) uno de los *primers* diseñados a partir de las ESTs puede quedar entre dos exones, 2) el amplicon puede contener un intron demasiado largo dando un producto de PCR que no puede ser visualizado en el perfil electroforético, 3) error en la

secuenciación o problemas durante la síntesis de los *primers* y 4) como se usaron secuencias consenso obtenidas de la compilación de varias ESTs, algunas de ellas pueden resultar de la adición de diferentes copias del mismo gen (homeólogos o parálogos). Con algunos de los *primers* se obtuvieron patrones de amplificación con múltiples bandas, similares a los obtenidos al utilizar marcadores RAPDs (Zappacosta 2009). Con SSRs se espera un menor número de bandas amplificadas y los resultados obtenidos pueden deberse al tipo de programa utilizado en la amplificación (touchdown), que puede generar bandas inespecíficas (debido a las bajas temperaturas que permiten la unión de *primers* a regiones inespecíficas) o a la presencia de varios sitios de unión de los *primers*, ya que para el desarrollo de los mismos sólo se contó con la secuenciación de una pequeña porción del genoma del pasto llorón.



**Figura C1.6:** Patrones de amplificación obtenidos con SSRs en diferentes materiales de pasto llorón. Las letras corresponden a los siguientes genotipos: DW: *Don Walter*, DJ: *Don Juan*, DP: *Don Pablo*, DE: *Don Eduardo*, K: *Kromdraai*, DA: *Don Arturo*, MP: *Morpa*, E: *Ermelo*, T: *Tanganyika*, M: colchíploide UNST1112, C: colchíploide UNST1131 (*Bahiense*) y D: dihaploide UNST1122 (*Victoria*). Modificada de Zappacosta 2009.

### Desarrollo de SNPs

La identificación de los SNPs se realizó utilizando las secuencias de las cuatro bibliotecas. Se detectaron un total de 190 SNP en 18 contigs.

**CAPÍTULO 2** - *“Análisis de expresión de genes  
utilizando las bibliotecas de ADNc”*

## **Introducción**

Siempre se ha asociado la expresión de la apomixis gametofítica con la poliploidía. La fuerte correlación de la apomixis con la poliploidía es interesante y puede sugerir la existencia de mecanismos mediante los cuales los procesos sexuales están desregulados consecuencia de un aumento en el número de complemento genómico (Spillane *et al.* 2004). En *Paspalum spp.*, la autoploidización de diploides sexuales pueden generar linajes tetraploides apospóricos (Quarin *et al.* 2001). El aumento de la ploidía puede desencadenar tanto alteraciones genéticas como epigenéticas que conducen a una remodelación estable de la expresión de genes que pueden contribuir a la aparición de la apomixis (Spillane *et al.* 2004).

En este capítulo se presenta un análisis de expresión de genes con las ESTs generadas a partir de las bibliotecas de ADNc ya descritas (ver Cap 1.), tendiente a elucidar las relaciones de expresión entre genotipos muy relacionados genéticamente pero con diferente nivel de ploidía y modo reproductivo.

## **Objetivo**

El objetivo planteado en este capítulo fue averiguar las bases moleculares de la apomixis diplospórica y su relación con los cambios de ploidía en *E. curvula* utilizando las bibliotecas de la serie euploide generada por nuestro grupo de trabajo y descritas en el capítulo anterior.

## **Materiales y Métodos**

### **Material Vegetal**

Las plantas de la serie euploide se obtuvieron como se describió anteriormente en la introducción de esta tesis.

### **Construcción y secuenciación de las bibliotecas de ADNc**

Se construyeron cuatro bibliotecas de ADNc de *E. curvula*, tres de ellas a partir de inflorescencias inmaduras: una del individuo dihaploide (D,  $2n = 2x = 20$ , sexual, EC01) una del cv *Tanganyika* (T,  $2n = 4x = 40$ , apomítico, EC02), y una del individuo colchipoide (C,  $2n = 4x = 40$ , sexual, EC04), en un estadio de desarrollo premeiótico. La cuarta biblioteca se construyó a partir de hojas plantas de 12 días del cv. *Tanganyika* (T,  $2n = 4x = 40$ , apomítico, EC03). La toma de muestras fue estandarizada cuidadosamente, teniendo en cuenta el tamaño y aspecto exomorfológico de las espiguillas y también por observación al microscopio de ovarios y anteras. Se tomaron todas las precauciones posibles para minimizar el riesgo de detección de falsos positivos, para ello todas las plantas se colocaron en un mismo sector, en las mismas condiciones de invernáculo y se colectaron las muestras a la misma hora del día para todos los individuos (4 pm, época de floración, año 2003). El procedimiento realizado para la construcción y secuenciación de las cuatro bibliotecas se detalla en el Capítulo 1.

### **Análisis de ESTs**

Como se describe en el Capítulo 1, las ESTs se limpiaron de secuencias de vector y de colas poly A utilizando el programa Seqclean (TIGR, the Institute for Genomic Research, Rockville, MD, USA), las secuencias con más de 100 pb y una calidad Phred mayor a 20 (Ewing *et al.* 1998) se almacenaron en formato FASTA y estas secuencias se ensamblaron utilizando el programa CAP3

(Huang and Madan 1999) con una alta rigurosidad (identidad de secuencia  $P = 90$ ) y superposición de la longitud de secuencias ( $O = 40$ ). Las secuencias editadas se compararon utilizando BLASTX, *Basic Local Alignment and Search Tool* (Altschul *et al.* 1994), contra la base de datos SwissProt/Trembl ([www.expasy.ch/sprot](http://www.expasy.ch/sprot)) con un e-value  $\leq 1 \times 10^{-5}$ .

### **Sustracción de las ESTs de las bibliotecas**

Se realizó un estudio de hibridación electrónico utilizando BLASTN para sustraer las bibliotecas de a pares. Se llevó a cabo una selección, avalada estadísticamente, de los genes diferencialmente expresados siguiendo la metodología propuesta por Audic y Claverie (1997) con un intervalo de confianza de 0.95 o 0.9.

### **Validación de genes diferencialmente expresados**

Se eligieron al azar 10 genes expresados diferencialmente entre las bibliotecas de las plantas diplospóricas y sexuales de *E. curvula* para su validación por PCR en tiempo real a partir de las muestras de ADNc. Para ello el ARN total de las muestras de las plantas de la serie euploide se extrajo en el mismo estadio utilizado para la construcción de las bibliotecas.

Las reacciones de PCR en tiempo real se prepararon en un volumen final de 25  $\mu$ l conteniendo 500 nM del par de primers específicos, 1X SYBR Green Master Mix (PE Biosystems) y 12 ng de ADNc (el ADNc se obtuvo por retrotranscripción del ARNm utilizando la enzima Superscript II, Invitrogen en conjunto con cebador poli T). Los primers específicos para la validación de los genes diferencialmente expresados y para el control interno (gen con igual expresión en las distintas bibliotecas, Contig 1075 RuBisCO unidad mayor) se diseñaron utilizando el programa Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/primer3code.html>). Los mismos fueron

diseñados para amplificar fragmentos de entre 90 a 150 pb de longitud. Las secuencias de los primers utilizados se muestran en la Tabla C2.1.

**Tabla C2.1:** Secuencias de los primers utilizados para la validación por PCR en tiempo real.

<i>Contig</i>	<i>Forward<sup>a</sup></i>	<i>Reverse<sup>b</sup></i>
<i>Contig 1389</i>	CTCGCACATTGCTGTCAAGT	CGCTCTTGATGACTCCAACA
<i>Contig 1171</i>	TAATCGCTGGTTTTCTGCT	GCTTCATCAAGGGATTGGAA
<i>Contig 1219</i>	TACCGCATCATGGATACGAA	GCAGCTGTTCCAGCTCTACC
<i>Contig 1362</i>	GACCCTGCGAACAAGGTGT	CCCATTGGAAACATCCAAC
<i>Contig 455</i>	CACGCCGACAAGATCAAGGA	AACAGGCTGAATCCCATGTC
<i>Contig 1217</i>	AGGCCTAAGGGAATGAGGAA	CAGACTCACCTCAAGCACCA
<i>Contig 1438</i>	GTCCAATCCTCGGTTTCAGA	CACCACAGTCGTTGCTGAGT
<i>Contig 1468</i>	ACCGTCGTTTGTCCAAAAG	GTCGCACTCCACGGTAAAAT
<i>Contig 857</i>	GCTTGAGAACACGGAGAAGG	CATAAACAGCGGCAGAGTCA
<i>Contig282</i>	CTGGCGTAATAGCGAAGAGG	AGGGAAGAAAGCGAAAGGAG
<i>Contig1075<sup>c</sup></i>	CTTGAATGCGACTGCAGGTA	GAAGAAGTAGGCCGTTGTTCG

<sup>a, b</sup> La secuencia de los primers se indican en dirección 5´a 3´ de izquierda a derecha.

<sup>c</sup> Contig usado como control interno en la validación por PCR en tiempo real.

Se controló que la eficiencia de amplificación sea equivalente para todas las muestras y para el control interno. También se incluyó en la preparación de las reacciones de PCR un control negativo de la RT y un control donde no se incluyó el ADN molde. Todas las reacciones se realizaron por triplicado. Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador Eppendorf Mastercycler Realplex<sup>2</sup>, con el siguiente programa: 3 min a 95°C, 45 ciclos de 15 s a 95°C, 30 s a 57°C y 20 s a 72°C; seguido de 5 min a 72°C. Al final se realizó una curva de disociación para verificar los productos de amplificación (86 ciclos de 10s desde 65 a 90°C, incrementando 0.3°C por ciclo a partir del ciclo 2).

El ciclo de corte o Ct se calculó utilizando el programa Eppendorf Mastercycler Realplex<sup>2</sup>. La expresión relativa entre las bibliotecas se analizó mediante el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak and Schmittgen 2001). Las diferencias de medias se compararon mediante la prueba t de student para muestras apareadas. Se consideró como significativo un valor  $P \leq 0,05$ . Se calculó el valor  $\Delta Ct$  para cada muestra mediante la sustracción del Ct de cada gen diferencialmente expresado con el Ct del control interno. El  $\Delta\Delta Ct$  se calculó mediante la sustracción del  $\Delta Ct$  de cada muestra con el  $\Delta Ct$  del genotipo T (*Tanganyika*, 4x, apomítico).

### **Mapeo in silico de los unigenes de las bibliotecas**

La posición de los unigenes sobre el genoma de arroz se determinó con el algoritmo BLASTN mediante el uso de la herramienta BlastView de página web de Gramene (<http://gramene.org/>). Se tomaron en cuenta los unigenes que presentaban homología de alineamiento con un e-value  $\leq$  a 0.001, utilizando la opción “exact matches”. La bondad del ajuste de los unigenes en el genoma de arroz se probó con la prueba  $\chi^2$  con un valor de significancia del 5%.

## **Resultados**

### **Comparación general entre bibliotecas**

Las secuencias correspondientes a las bibliotecas EC02 (4x apo), EC04 (4x sex) y EC01 (2x sex) fueron sustraídas de a pares *in silico* para identificar genes diferencialmente expresados entre ellas (EC01 vs. EC02, EC01 vs. EC04 y EC02 vs. EC04) siguiendo la metodología descrita por Audic y Claverie (1997). Como se mencionara en el capítulo 1, se obtuvo un total de 8.884 unigenes entre las tres bibliotecas. En la Tabla C2.2 se observa el número de ESTs analizadas y los genes diferencialmente expresados en cada comparación. Varios de los genes en la lista que muestran un intervalo de confianza del 90% muestran homología con secuencias asociadas a cambios de ploidía en *Paspalum notatum* (Martelotto



*et al.* 2005) y también con secuencias asociadas a la reproducción apospórica en la misma especie (Laspina *et al.* 2008). Es por esto que se decidió incluir no solo las secuencias que presentaban un intervalo de confianza del 95%, sino también las que presentaron un intervalo de confianza del 90% para este análisis.

**Tabla C2.2:** Comparación de los niveles de expresión de genes entre las bibliotecas.

<i>Bibliotecas comparadas</i>	<i>Nº de ESTs comparadas</i>	<i>Transcriptos diferenciales*</i>
EC01 vs. EC02	3.650 vs. 3.644	40
EC01 vs. EC04	3.650 vs. 3.392	88
EC02 vs. EC04	3.644 vs. 3.392	79

EC01: 2x sexual; EC02 4x apomítico; EC04: 4x sexual. \* Unigenes expresados diferencialmente entre las bibliotecas, seleccionados siguiendo el método de Audic y Claverie (1997) con un intervalo de confianza de 0.95 y 0.90.

### **Identificación de genes relacionados con la expresión de la diplosporía**

Un grupo de genes que mostró un patrón de expresión diferencial entre las bibliotecas EC01 (2x sex) vs. EC02 (4x apo) y EC04 (4x sex) vs. EC02 (4x apo) (Grupo 1) se lo consideró como potencialmente asociado a la apomixis en esta especie. Los genes de este grupo se encuentran reprimidos o sobre-expresados en apo. vs. sex., más allá del nivel de ploidía de la planta sexual. Estos genes, expresados diferencialmente con niveles significativos se detallan en la Tabla C2.3. De los 11 genes diferencialmente expresados, nueve se encuentran reprimidos y dos sobre-expresados en las líneas sexuales.

Un grupo adicional de genes (Grupo 2) se detectó como diferencialmente expresados entre las bibliotecas EC02 (4x apo) y EC04 (4x sex), pero no diferencialmente expresados entre las bibliotecas EC02 (4x apo) y EC01 (2x sex). Los genes dentro de este grupo también son genes diferencialmente expresados entre el genotipo diplospórico y el sexual, pero con el mismo nivel de ploidía

(tetraploide). En la planta diploide sexual, estos transcritos presentan un nivel de expresión intermedio, por lo que no son detectados como diferencialmente expresados cuando se los compara con una herramienta estadística. Este grupo particular de genes se lista en la Tabla C2.4. De un total de 15 genes, seis están sobre-expresados y nueve reprimidos o silenciados en el genotipo sexual.

**Tabla C2.3:** Genes diferencialmente expresados en líneas sexuales y diplospóricas independientemente del nivel de ploidía (Grupo 1).

Nº del Contig <sup>a</sup>	EC02 <sup>b</sup> 4x apo	EC04 <sup>b</sup> 4x sex	EC01 <sup>b</sup> 2x sex	EC03 <sup>b</sup> Hoja	ID	Descripción	Cr. de arroz <sup>c</sup>	Score	Valor E
45**	14	0	6	0	P62614	AMP synthase beta chain	8	70	6,7e <sup>-47</sup>
290	0	5	4	0	Q42699	methyltransferase (methionine synthase)	12	109	9,8e <sup>-144</sup>
391	5	12	15	14	N/A	N/A	1*	380	0,0
524	4	0	0	0	O35964	SH3-containing GRB2-like Proteína 1	-	-	-
615**	5	0	0	1	P93276	Posible proteína mitocondrial	1*	590	0,0
657**	5	0	0	0	Q94DD0	Posible hidrolasa	12	61	1,9e <sup>-24</sup>
690**	5	0	0	0	O22424	Proteína Ribosomal 40 S	2	137	1,5e <sup>-158</sup>
760**	9	2	0	1	P17784	Fructosa-bifosfato aldolasa	12	60	3,3e <sup>-49</sup>
922	6	1	1	0	Q2QLX5	Cisteína sintasa	4	631	0,0
977	4	0	0	1	Q0ZIX7	Proteína Ribosomal L2	4	712	2,5e <sup>-77</sup>
1000**	15	1	6	32	P19163	RuBisCO-Subunidad grande	10	300	0,0

<sup>a</sup> Contigs diferenciales con un intervalo de confianza de 0.95 se marcan con doble asterisco (\*\*). El resto de los genes fueron diferenciales usando un intervalo de confianza de 0.90.

<sup>b</sup> Se indica el número de veces que se encontró el transcripto en cada biblioteca.

<sup>c</sup> La ubicación en el mapa de arroz se averiguó utilizando el algoritmo BLASTN del sitio web Gramene (con un valor  $E \leq 0.001$ ). Unigenes que mapean en el cromosoma 1 y/o 5 se marcan con un asterisco (\*).

**Tabla C2.4:** Genes diferencialmente expresados en las líneas sexual y diplospórica con el mismo nivel de ploidía (tetraploide), que presentan expresión intermedia en la línea diploide sexual (Grupo 2).

Nº del Contiga <sup>a</sup>	EC02 <sup>b</sup> 4x apo	EC04 <sup>b</sup> 4x sex	EC01 <sup>b</sup> 2x sex	EC03 <sup>b</sup> hoja	ID	Descripción	Cr. de arroz <sup>c</sup>	Score	Valor E
1106	4	0	1	2	N/A	N/A	4	1067	0,0
1164**	0	5	1	0	Q10QZ6	Elongation factor 1-alpha	3	436	0,0
1330**	0	5	1	0	Q28EK6	CHK1 checkpoint homolog	9	564	0,0
1389**	0	4	2	1	Q10QZ4	Elongation factor 1-alpha	3	371	2,4e-210
1458	0	4	1	0	Q10A30	Fructose-bisphosphate aldolase	5*	267	3,5e-148
1465	0	4	1	0	Q9AXB2	Disease resistance protein-like	1*	168	9,1e-15
195	4	0	1	0	Q3BCU2	Zinc finger protein	2	114	9,4e-109
216**	5	0	2	0	Q2VC18	Ribosomal protein S14	2	89	6,8e-42
294**	5	0	1	7	Q5M9Z9	Hypothetical protein	3	1016	0,0
439	0	4	1	0	Q91XL3	UDP-glucuronic acid decarboxylase 1	3	50	1,3e-18
44	4	0	3	0	Q9M583	Hypersensitive-induced response protein	9	104	1,3e-111
444	10	1	4	0	P00827	ATP synthase beta chain	1*	174	1,7e-92
570	6	0	3	0	Q2HTU3	Ubiquitin	6	707	0,0
598	8	0	3	1	Q10A26	Enolase	10	58	8,8e-69
944	4	0	1	0	Q10P65	Proline-rich protein	3	65	2,1e-27

<sup>a</sup> Contigs diferenciales con un intervalo de confianza de 0.95 se marcan con doble asterisco (\*\*). El resto de los genes fueron diferenciales usando un intervalo de confianza de 0.90.

<sup>b</sup> Se indica el número de veces que se encontró el transcripto en cada biblioteca.

<sup>c</sup> La ubicación en el mapa de arroz se averiguó utilizando el algoritmo BLASTN del sitio web Gramene (con un valor  $E \leq 0.001$ ). Unigenes que mapean en el cromosoma 1 y/o 5 se marcan con un asterisco (\*).

Curiosamente, un conjunto grande de 50 genes (Grupo 3) presentó una expresión diferencial tanto en las comparaciones EC02 (4x apo) vs. EC04 (4x sex) como en EC01 (2x sex) vs. EC04 (4x sex) (Tabla C2.5). Es decir, para estos 50 genes, la expresión en el genotipo diploide sexual se correlacionó completamente con la expresión en el genotipo tetraploide apomíctico. Del total de 50 genes en común, 44 se hallaban silenciados y seis sobre-expresados en el diploide sexual y el tetraploide apomíctico.

### **Identificación de genes expresados diferencialmente por nivel de ploidía**

Aquellos genes que mostraron una expresión diferencial en las comparaciones EC01 (2x sex) vs. EC04 (4x sex) y EC01 (2x sex) vs. EC02 (4x apo) (Grupo 4, Tabla C2.6), se consideraron potencialmente modulados por el nivel de ploidía en esta especie, ya que mostraban una diferencia de expresión entre el nivel diploide y el tetraploide, más allá del modo reproductivo de los genotipos tetraploides. Se detectaron 20 genes diferencialmente expresados entre las líneas tetraploides y el diploide. Estos genes se hallaban silenciados en los tetraploides.

Un conjunto adicional de genes (Grupo 5) mostró diferencias de expresión entre las bibliotecas EC01 (2x sex) y EC04 (4x sex), pero no se los detectó como diferenciales entre EC01 (2x sex) y EC02 (4x apo) (Tabla C2.7). Estos genes están expresados diferencialmente entre la planta diploide y tetraploide, con el mismo modo de reproducción (sexual). En la biblioteca tetraploide apomíctica, estos transcritos revelaron un nivel de expresión intermedio, por lo que no son detectados como diferencialmente expresados cuando se los compara con una herramienta estadística. De un total de 16 genes, cinco estaban sobre-expresados y once silenciados en el genotipo tetraploide.

Por último, un grupo sustancial de genes, expresados diferencialmente, detectados al comparar las bibliotecas EC01 (2x sex) vs. EC04 (4x sex), también fueron detectados como diferenciales en la comparación EC02 (4x apo) vs. EC04 (4x sex). Estos genes integran el Grupo 3, y ya habían sido detectados también en la búsqueda de genes relacionados con la reproducción diplospórica y detallados previamente en la Tabla C2.5.

**Tabla C2.5:** Genes diferencialmente expresados en las líneas sexual y diplospórica con el mismo nivel de ploidía (tetraploide), que también presentan expresión diferencial entre las líneas tetraploide y diploide sexual (Grupo 3).

Nº del Contiga <sup>a</sup>	EC02 <sup>b</sup> 4x apo	EC04 <sup>b</sup> 4x sex	EC01 <sup>b</sup> 2x sex	EC03 <sup>b</sup> hoja	ID	Descripción	Cr. de arroz <sup>c</sup>	Score	Valor E
1002	0	4	0	1	P34893	10 kDa chaperonin (Protein CPN10)	7	105	4,5e-99
1064	0	4	0	2	N/A	N/A	4	442	5,4e-25
1156	0	4	0	0	N/A	N/A	-	-	-
1157	0	4	0	0	Q10DEC1	Myb-like DNA-binding domain containing protein	-	-	-
1171**	0	6	0	0	Q9C802	Hypothetical protein	-	-	-
1178	0	4	0	0	N/A	N/A	12	41	3,9e-13
1181**	0	5	0	0	Q16AX5	Glutamyl-tRNA synthetase	-	-	-
1185	0	4	0	0	N/A	N/A	-	-	-
1215	0	4	0	0	N/A	N/A	1*	40	7,7e-13
1217**	0	5	0	0	Q5NBS32	COP9 signalosome complex subunit	1*	57	8,5e-23
1219**	0	5	0	0	Q7XEV8	Serine/threonine-protein kinase NAK	3	154	7,9e-82
1224	0	4	0	0	N/A	N/A	-	-	-
1233	0	4	0	0	N/A	N/A	-	-	-
1234	0	4	0	0	Q10EF8	HEAT repeat family protein	3	78	7,9e-56
1235	0	4	0	0	N/A	N/A	-	-	-
1251	0	4	0	0	Q10H67	Alpha-1,4-glucan-protein synthase	3	194	3,7e-11
1255	0	4	0	0	Q8LC75	Nuclear transport factor 2, putative	-	-	-
1258**	0	6	0	0	Q9SKB9	Acetolactate synthase	-	-	-
1322	0	4	0	0	Q9FHY9	GTPase activ prot of Rab-like small GTPases	9	330	9,5e-18
1326	0	4	0	0	Q2F962	Cytochrome c biogenesis Fn	11	60	1,1e-24
1335	0	4	0	0	Q1SIB0	Ribosomal protein L1	8	163	6,3e-16
1362**	0	5	0	0	Q9LI34	Putative importin-alpha re-exporter	-	-	-
1393**	0	5	0	0	N/A	N/A	9	42	1,5e-13
1404**	0	5	0	0	Q93WA3	Putative serine/threonine-specific kinase	1*	63	4,4e-42
1409	0	4	0	0	N/A	N/A	-	-	-

1420	0	4	0	0	N/A	N/A	-	-	-
1425	0	4	0	0	N/A	N/A	3	67	3,6e-55
1430	0	4	0	0	Q75GC3	RNA pol II accessory factor	-	-	-
1435	0	4	0	0	N/A	N/A	12	108	2,1e-53
1437	0	4	0	0	Q10KC0	Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase	7	178	9,4e-22
1438**	0	5	0	0	Q4324	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	-	-	-
1442	0	4	0	0	Q9ZRQ1	2-oxoglutarate dehydrogenase E2 subunit	4	73	3,8e-32
1450	0	4	0	0	Q5N749	Putative microtubule bundling polypept. TMBP200	1*	76	5,5e-44
1466	0	4	0	0	Q8LMT3	Putative retroelement	-	-	-
1467	0	4	0	1	Q9SV36	Kinesin-like protein	4	52	9,3e-20
1468**	0	5	0	0	Q7F8U2	Put. phosphatidylinos-phosphatidylchol transfer prot	-	-	-
1488	0	4	0	0	O49600	Importin alpha-like protein	1*	29	4,0e-06
1495	0	4	0	0	Q1RY71	Transcription elongation factor S-II	-	-	-
1500	0	4	0	0	Q10LV9	Eukaryotic translation initiation factor 2 beta subunit	3	98	2,5e-58
1508	0	4	0	0	Q5N8C9	P protein-like	1*	74	3,4e-88
1512	0	4	0	0	Q10Q06	Digalactosyldiacylglycerol synthase 2	3	157	1,7e-82
257**	8	4	9	0	Q6ENV3	Photosystem I assembly protein ycf4	3	243	5,3e-26
282**	7	0	8	0	Q84NX8	Putative ribosomal protein L19	-	-	-
338**	0	10	2	2	Q6R9A5	Hypothetical protein	12	594	0,0
345**	5	0	4	1	O64937	Elongation factor 1-alpha	3	355	0,0
45**	14	0	6	0	Q7VG78	GMP synthase	8	125	2,9e-63
455**	9	2	10	1	P35135	Ubiquitin-conjugating enzyme E2	8	253	1,4e-24
461	4	0	4	0	Q0ZA68	Peroxidase	1*	111	1,7e-21
60**	8	2	15	0	Q2TFP1	Tubulin B4	1*	366	0,0
857**	2	7	0	0	Q2HUA7	Longin-like	3	38	1,9e-11

<sup>a</sup> Contigs diferenciales con un intervalo de confianza de 0.95 se marcan con doble asterisco (\*\*). El resto de los genes fueron diferenciales usando un intervalo de confianza de 0.90.

<sup>b</sup> Se indica el número de veces que se encontró el transcrito en cada biblioteca.

<sup>c</sup> La ubicación en el mapa de arroz se averiguó utilizando el algoritmo BLASTN del sitio web Gramene (con un valor  $E \leq 0.001$ ). Unigenes que mapean en el cromosoma 1 y/o 5 se marcan con un asterisco (\*).



**Tabla C2.6:** Genes diferencialmente expresados entre líneas diploide y tetraploides, independientemente del modo reproductivo (Grupo 4).

Nº del Contig <sup>a</sup>	EC02 <sup>b</sup> 4x apo	EC04 <sup>b</sup> 4x sex	EC01 <sup>b</sup> 2x sex	EC03 <sup>b</sup> hoja	ID	Descripción	Cr. de arroz <sup>c</sup>	Score	Valor E
111	0	0	5	0	P46690	Gibberellin-regulated protein 4 precursor	6	121	4,9e-61
200	0	4	0	0	Q307Z3	Fructokinase-like	8	146	5,2e-76
251**	0	0	7	0	Q10LR6	60S ribosomal protein L19-1	3	216	1,3e-194
256	0	0	4	0	Q9JKB8	Pre-mRNA-splicing factor 18	7	236	3,7e-146
26**	0	0	6	0	Q10F32	Ribosome inactivating protein	-	-	-
281	0	0	4	0	Q8W0S9	Putative beta-1,3-glucanase	-	-	-
295	0	0	4	0	P11884	Aldehyde dehydrogenase	6	74	1,0e-44
30	0	0	4	0	Q10NX7	Beta-galactosidase	3	173	1,8e-70
336	0	0	4	0	Q710Q4	Putative microtubule-associated protein	7	55	9,9e-45
370	0	0	5	0	Q6R9A5	Hypothetical protein	1*	224	5,7e-211
395**	0	0	6	0	Q948T6	Lactoylglutathione lyase	3	171	1,8e-150
456	0	0	4	0	Q2IB43	Cellulose synthase 1	1*	194	2,9e-228
468	0	0	5	2	Q33C08	Ribosomal protein S12	4	493	0,0
475	0	0	4	0	P08965	Meiosis protein mei2	2	45	1,0e-15
49**	0	0	7	0	Q1RY26	Type III polyketide synthase	10	122	5,0e-70
54	0	0	4	0	Q10FR4	Cytochrome P450 family protein	4	65	1,3e-27
66	0	0	4	0	N/A	N/A	3	41	2,3e-13
74	0	0	4	2	Q9FMK4	Topoisomerase-like protein	8	171	1,0e-179
9	0	0	4	0	Q5NKI1	MYB18 protein	5*	220	5,2e-120
993	0	0	4	1	Q1SIB0	Ribosomal protein L1	8	163	2,9e-149

<sup>a</sup> Contigs diferenciales con un intervalo de confianza de 0.95 se marcan con doble asterisco (\*\*). El resto de los genes fueron diferenciales usando un intervalo de confianza de 0.90.

<sup>b</sup> Se indica el número de veces que se encontró el transcripto en cada biblioteca.

<sup>c</sup> La ubicación en el mapa de arroz se averiguó utilizando el algoritmo BLASTN del sitio web Gramene (con un valor  $E \leq 0.001$ ). Unigenes que mapean en el cromosoma 1 y/o 5 se marcan con un asterisco (\*).

**Tabla C2.7:** Genes diferencialmente expresados en las líneas diploide y tetraploide con el mismo modo reproductivo (sexual), pero que presentan expresión intermedia en la línea tetraploide apomíctica (Grupo 5).

Nº del Contig <sup>a</sup>	EC02 <sup>b</sup> 4x apo	EC04 <sup>b</sup> 4x sex	EC01 <sup>b</sup> 2x sex	EC03 <sup>b</sup> hoja	ID	Descripción	Cr de arroz <sup>c</sup>	Score	Valor E
1090	21	24	14	8	N/A	Expressed protein	1*	1103	0,0
1114**	4	8	2	1	Q28EK6	Tubulin alpha-3 chain	11	441	0,0
1228**	2	5	0	0	Q0Z9W3	N/A	5*	35	1,8e-10
1239	1	4	0	0	N/A	Expressed protein	11	39	4,1e-12
1349**	2	5	0	0	O22347	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydr.	8	75	2,9e-57
141	1	0	4	0	P23686	S-adenosylmethionine synthetase 1	1*	456	2,2e-26
241**	1	0	5	5	N/A	N/A	1	312	0,0
346**	1	0	5	0	P00722	Lactoylglutathione lyase	8	65	2,0e-27
398**	3	1	8	2	Q8S1X8	ATP synthase beta Chain	3	1089	0,0
403	2	0	4	0	Q2TFP1	Tubulin B-1	1*	456	6,3e-26
426**	1	0	5	1	Q6H8J2	Ubiquitin-conjugating enzyme E2-17 kDa	1*	61	8,3e-42
639**	5	2	11	0	Q6ENQ9	Elongation factor 1-alpha	3	613	0,0
666**	2	0	6	0	Q9ZPN9	Chloroplast 30S ribosomal protein S3	5*	472	0,0
7	1	0	4	0	Q2QQX0	Protein kinase	4	108	7,7e-53
828	10	4	14	2	Q28EK6	Expressed protein	9	859	0,0
897	2	0	4	0	Q1SL98	Ribosomal protein L10E	5*	286	1,1e-16

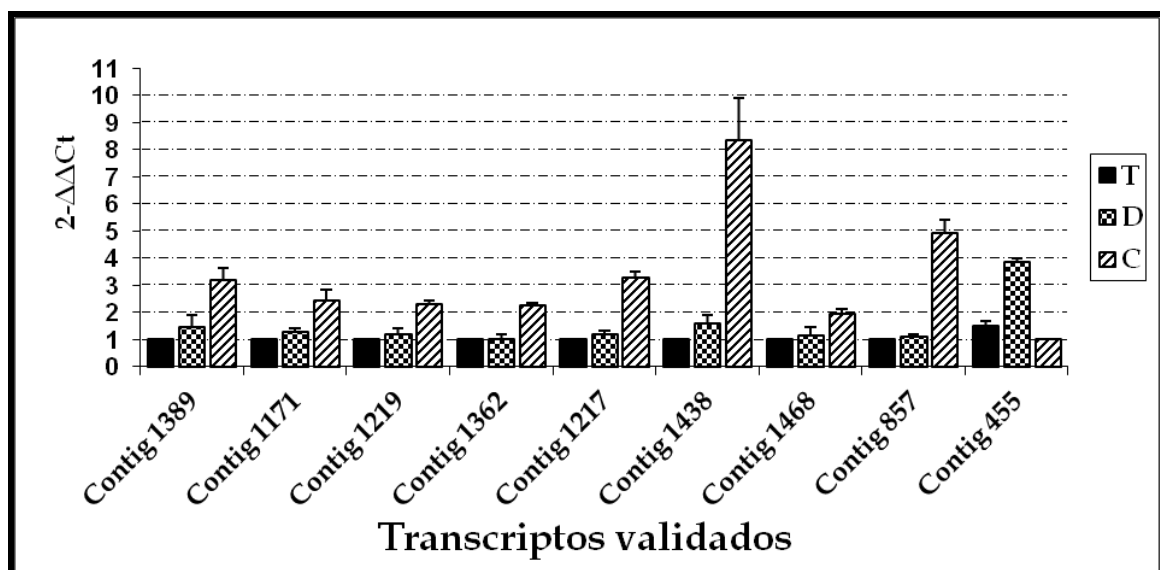
<sup>a</sup> Contigs diferenciales con un intervalo de confianza de 0.95 se marcan con doble asterisco (\*\*). El resto de los genes fueron diferenciales usando un intervalo de confianza de 0.90.

<sup>b</sup> Se indica el número de veces que se encontró el transcripto en cada biblioteca.

<sup>c</sup> La ubicación en el mapa de arroz se averiguó utilizando el algoritmo BLASTN del sitio web Gramene (con un valor  $E \leq 0.001$ ). Unigenes que mapean en el cromosoma 1 y/o 5 se marcan con un asterisco (\*).

### Validación de la expresión por PCR en tiempo real

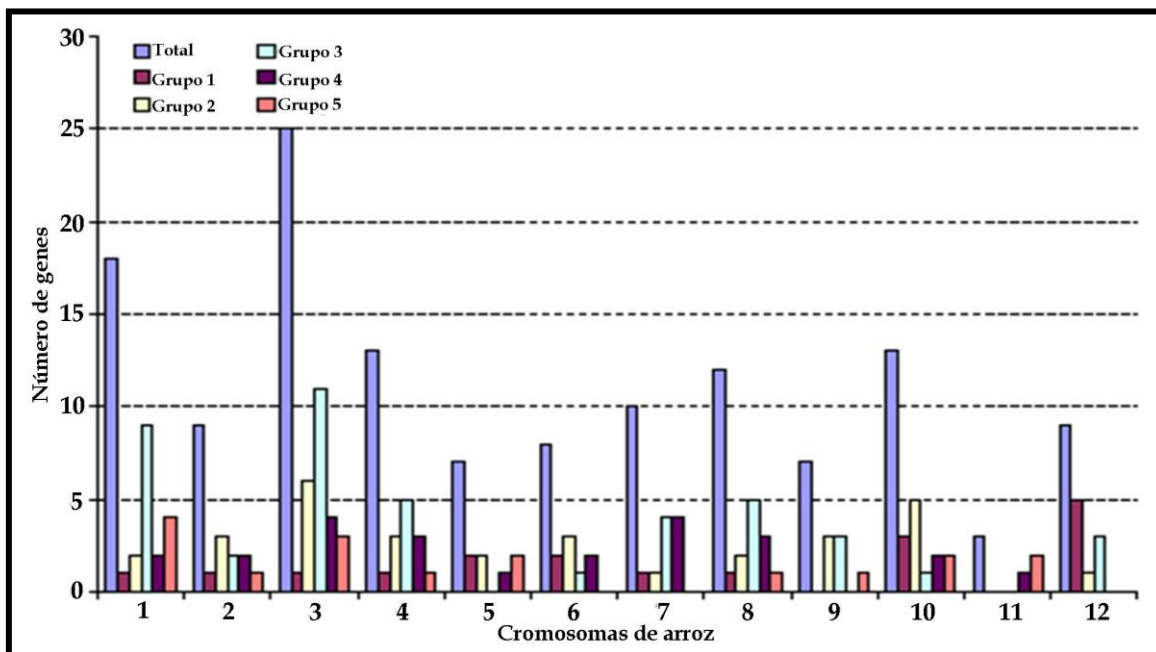
Las reacciones de PCR en tiempo real se llevaron a cabo para aquellos genes, elegidos al azar, que presentaban una diferencia de expresión significativa en los ensayos de sustracción de las diferentes bibliotecas (EC01, D; EC02, T; y EC04, C). Se amplificaron en total 10 genes de expresión diferencial y un gen de control interno (rubisco). Uno de los primers diseñados para esta validación (contig 282) falló en la amplificación para los tres genotipos. Los otros nueve pares de primers amplificaron correctamente todas las muestras, pudiéndose validar ocho genes (Figura C2.2), confirmando los resultados mostrados en las Tablas C2.4 y C2.5 (Contigs 1389, 1171, 1219, 1362, 1217, 1438, 1468 y 857). El contig 455 (Tabla C2.5) tuvo una confirmación parcial, validando la diferencia de expresión entre 4x apo vs. 4x sex. Las diferencias entre 4x apo vs. 2x sex no fueron estadísticamente significativas.



**Figura C2.1:** Validación por PCR en tiempo real de los genes diferencialmente expresados en las líneas isogénicas de *E. curvula*. El eje Y representa cuantas veces un gen es expresado con respecto al genotipo T (4x apo).

### **Mapeo in silico de los genes diferencialmente expresados en el genoma de arroz**

A fin de identificar posibles secuencias candidatas en la iniciación de la diplosporía los genes que mostraron una expresión diferencial entre las bibliotecas fueron asignados *in silico* a secuencias del genoma de arroz. La única información disponible de la posible localización de la región sinténica con el locus de la diplosporía en arroz fue informada en el estudio realizado por Leblanc *et al.* (1995). Estos investigadores mostraron que la diplosporía en *Tripsacum dactyloides* co-segrega fuertemente con sondas que mapean en los cromosomas 6L y 8L de maíz. Un análisis comparativo utilizando el sitio web Gramene (<http://www.gramene.org/>) dio como resultado que los cromosomas 1 y 5 de arroz presentan una sintenia conservada con las regiones del cromosoma 6L y 8L de maíz. Se determinó cuál, de cada una de las secuencias diferencialmente expresadas, mapeaba en la región asociada a la diplosporía (supeditada al grado de conservación entre las especies). El número de homologías con un e-value  $\leq$  a 0.001 y la distribución en los cromosomas de cada uno de los transcritos se muestran en las Tablas C2.5 a C2.7. Con asterisco se encuentran marcados los clones que mapean en la región cromosómica de arroz sinténica al locus de la diplosporía (Tablas C2.5 a C2.7). La distribución general sobre los cromosomas de los transcritos que tienen homología significativa con secuencias de arroz se muestran en la Figura C2.2. Un total de 92 contigs fueron mapeados sobre los doce cromosomas de arroz, mostrando que los genes diferencialmente expresados se distribuyen a lo largo de todo el genoma de esta gramínea. Sin embargo, la prueba de  $\chi^2$  mostró una elevada concentración de genes sobre los cromosomas 1 y 3, 17 ( $P = 0.0028$ ) y 20 ( $P = 0.0455$ ) genes respectivamente, mientras que el valor esperado era de 7,66. Los cromosomas 7, 9 y 11 mostraron el menor número de transcritos con homología: 4 ( $P = 0.0497$ ), 2 ( $P = 0.0130$ ) y 2 ( $P = 0.0130$ ), respectivamente.



**Figura C2.2:** Número de genes diferencialmente expresados según el modo reproductivo y/o cambio del nivel de ploidía, agrupados en los cromosomas de arroz de acuerdo a la homología con secuencias del genoma de esta gramínea. Los cromosomas 1 y 3 contienen el grupo más grande de genes activados/silenciados según sus diferencias por nivel de ploidía y/o modo reproductivo. (Estadísticamente validado con la prueba de  $\chi^2$ ).

## Discusión

El trabajo presentado en este capítulo de tesis permitió, mediante la técnica de secuenciación de ESTs, realizar una caracterización general de los perfiles de expresión de genes que se encuentran controlados tanto por cambios en el nivel de ploidía como por el modo reproductivo en inflorescencias inmaduras de *E. curvula*. El análisis de ESTs es una de las dos técnicas utilizadas en esta tesis para la identificación y caracterización de genes. La secuenciación de las bibliotecas construidas no ha sido concluida aún, ya que existe la posibilidad de continuar con esta tarea. Los genes identificados hasta el momento serían aquellos que presentan elevada expresión. Por ello se eligió además otra técnica que, en contraste, es efectiva en la detección tanto de transcritos con elevada expresión como aquellos con baja expresión. Se trata del display diferencial (ver

Capítulo 3). Por otro lado, el análisis de ESTs detecta diferencias cuantitativas en expresión, mientras que la técnica de display diferencial revela principalmente las diferencias cualitativas, es decir, las del tipo presencia - ausencia.

Mediante este análisis se logró identificar un grupo de genes que estaban expresados de forma diferencial entre los individuos 2x sex y 4x sex, que también estaban expresados diferencialmente entre las plantas 4x apo y 4x sex. Curiosamente, este grupo particular de genes muestra una expresión muy similar entre el genotipo 2x sexual y el genotipo 4x apo. Estos resultados pudieron ser confirmados y validados por PCR en tiempo real.

Dos hipótesis son posibles para explicar la presencia de este grupo de genes: 1) que un incremento en el nivel de ploidía requiera la activación o silenciamiento de un particular grupo de genes, pero que por alguna razón esa activación / silenciamiento falla en la planta apomíctica diplospórica 2) que el tratamiento con colchicina utilizado para generar la línea colchoploide C (4x sex) haya provocado alteraciones genéticas o epigenéticas del genoma que dan como resultado los patrones de expresión en esta línea en particular. Cada hipótesis, o una combinación de ambas pueden explicar los resultados obtenidos.

Es sabido que la poliploidización plantea un desafío para la continuidad tanto de una meiosis estable como para la homeostasis del sistema de regulación de genes. La redundancia en el genoma que involucra la poliploidización contribuye directamente a la pérdida del balance en la expresión génica. Un mecanismo conocido generalmente como “diploidización genética” da lugar a nuevos patrones estables de actividad genética durante la poliploidización, para lograr mantener la homeostasis (Wendel 2000, Ma and Gustafson 2005). Es tentador hipotetizar que el reordenamiento o remodelamiento de la expresión de algunos genes durante el proceso de diploidización genética no se logra en la

planta apomíctica diplospórica (grupo de genes que también mantienen el mismo nivel de expresión en la planta diploide), y que la diplosporía podría ser la causa de esa falla.

Sin embargo, cualquier especulación posible requeriría una evaluación cuidadosa del efecto de la colchicina sobre la expresión del genotipo colchiploide (C, 4x sex), a través del desarrollo y procesamiento de los correspondientes controles (es decir, plantas sometidas a un mismo tratamiento con colchicina pero que no hayan duplicado su dotación cromosómica). Estudios actuales (Martelotto *et al.* 2005; Osborn *et al.* 2003; Ozkan *et al.* 2001; Liu *et al.* 2001) postulan que la técnica de cultivo de tejidos y tratamientos con colchicina usados en generación de poliploides no producen alteraciones en la constitución genética de los genotipos, sin embargo modificaciones epigenéticas y variaciones fenotípicas pueden ser detectadas (Hao *et al.* 2004, Peredo *et al.* 2006). El análisis de la variación de las secuencias de ADN en plantas generadas de callos embriogénicos de pomelo, almacenadas *in vitro* por el método de crecimiento lento, no detectó la presencia de polimorfismos en marcadores RAPDs con 102 primers utilizados (siempre que el nivel de ploidía se mantenía constante) (Hao *et al.* 2004). Sin embargo, con análisis de polimorfismos sensibles a metilación (MSAP, methylation sensitive amplification polymorphism) (Xiong *et al.* 1999) se informaron cambios en la metilación del ADN entre las muestras almacenadas comparadas con los controles (Hao *et al.* 2004). Un análisis de las variaciones genéticas y epigenéticas en plantas de lúpulo regeneradas de subcultivos sucesivos de callos organogénicos no mostraron bandas polimórficas en los estudios de AFLPs de dichas plantas (Peredo *et al.* 2006), sin embargo, cambios epigenéticos si fueron detectados con estudios de MSAP (Peredo *et al.* 2006). La caracterización genética de la misma serie euploide de *E. curvula* usada en esta tesis mostró que el cultivo de tejidos seguido por tratamiento con colchicina no genera polimorfismos genéticos entre los genotipos, ya que los dos colchiploides obtenidos por duplicaciones

individuales (UNST1131, denominado C y UNST1112, denominado M) mostraron casi la misma estructura genética (Mecchia *et al.* 2007). Sin embargo, en concordancia con los resultados obtenidos en lúpulo y citrus, los análisis de MSAP mostraron que los genotipos presentan diferencias en los patrones generales de metilación (Ochogavia *et al.* 2009). Por lo que variaciones en los patrones de metilación inducidos por colchicina pueden eventualmente modificar la expresión génica.

El análisis y asignación *in silico* de los genes sobre las regiones cromosómicas del genoma de arroz mostraron que, aunque las secuencias expresadas diferencialmente en relación al modo reproductivo o nivel de ploidía se distribuían a lo largo de todos los cromosomas, un grupo significativo lo hacía sobre los cromosomas 1 y 3. Como se menciona anteriormente, el cromosoma 1 de arroz contiene regiones sinténicas con el locus de la diplosporía en *Tripsacum*. Los genes identificados en este trabajo y asignados a dicha región cromosómica serán investigados funcionalmente en un futuro como posibles candidatos para la reproducción diplospórica.

Hay estudios que proponen que la diplosporía implica una falla heterocrónica en el desarrollo de las vías sexuales, sin que haya una interrupción de las vías en si mismas (Grimanelli *et al.* 2003). En este trabajo se demuestra que la falla heterocrónica esta eventualmente asociada a una falla parcial en el modelado de la expresión de genes durante la poliploidización en la planta diplospórica. Consideramos que es necesario realizar más estudios para determinar si es esa la razón por la que la apomixis necesita de la poliploidización para su expresión. La identificación de varios genes candidatos que se están expresando durante el desarrollo diplospórico (algunos de ellos en regiones sinténicas con el locus de la diplosporía en otras especies) contribuirá a la dilucidación de este fenómeno y, en un futuro, posibilitará la manipulación del carácter para el beneficio de la agricultura.



**CAPÍTULO 3** - *“Análisis de expresión de genes  
utilizando la técnica de display diferencial”*

## **Introducción**

En el capítulo anterior se realizó un análisis comparativo de la expresión de genes basado en ESTs de la serie euploide descrita anteriormente, en el cual se encontraron 112 genes que podrían estar asociados a una regulación por ploidía o modo reproductivo. Sin embargo, no fue posible realizar una cobertura completa del transcriptoma ya que solo se obtuvieron 12.000 secuencias. Los 112 candidatos obtenidos por el análisis de las ESTs reflejan solo aquellos genes que se están expresando a niveles elevados en los tejidos analizados. En este capítulo se muestra un análisis complementario del transcriptoma de hoja e inflorescencias inmaduras mediante la técnica de display diferencial (DD). Con esta técnica la obtención de un cierto producto de amplificación depende de la combinación de primers al azar utilizados, por lo que incluso los transcriptos que están en menor proporción pueden ser amplificados si la secuencia de estos tiene homología con el primer utilizado (Matz and Lukyanov 1998). Es por ello que con este análisis se espera complementar el análisis de ESTs realizado previamente, detectando los transcriptos que escaparon al primer análisis.

## **Objetivo**

El objetivo planteado en este capítulo fue investigar las bases moleculares de la apomixis diplospórica y su relación con los cambios de ploidía en *E. curvula* mediante un análisis completo del transcriptoma. Para ello se utilizó la técnica de display diferencial en hojas e inflorescencias inmaduras de la serie euploide generada por nuestro grupo de trabajo y descritas en el Capítulo 1.

## **Materiales y Métodos**

### **Material Vegetal**

Las plantas de la serie euploide se obtuvieron como se describió anteriormente en la introducción de esta tesis.

Para la realización de los experimentos de DD las muestras de inflorescencias se tomaron en Diciembre de 2006. Todas las muestras fueron tomadas a la misma hora del día (4 pm) de plantas que se encontraban en invernáculo creciendo bajo las mismas condiciones. Las muestras de inflorescencias se tomaron cuando estas se encontraban emergiendo de la hoja bandera. Como se describió anteriormente, el desarrollo de la espiguilla es asincrónico (ver Cap. 2). El estadio en el que se encontraba la espiguilla se controló bajo el microscopio. De esta forma se garantizó que en las muestras para extracción de ARN solo se hallaran estadios de célula arqueosporial o anteriores. Los estadios de desarrollo del saco embrionario dentro de la espiguilla se evaluaron de la siguiente manera: las espiguillas fueron inmediatamente fijadas en FAA (10% formol, 5% ácido acético, 50% alcohol y 35% agua destilada) donde se conservaron hasta el momento de su utilización. Luego se procedió a la inclusión de las espiguillas, por separado, en parafina (Paraplast), montado y corte en micrótopo en secciones de 10  $\mu\text{m}$  de espesor y se siguió la tinción típica con safranina-fast green. Todo el proceso se realizó de acuerdo a la técnica de Johansen (1940).

Para los experimentos de DD de hoja se colectaron hojas jóvenes, de 10cm de longitud, a partir de plantas totalmente desarrolladas. Cada muestra consistió de cinco hojas tomadas de diferentes macollos.

### **Extracción de ARN**

Las extracciones de ARN total para los experimentos de DD se realizaron como fuera descripto previamente (ver Cap. 1).

## Ensayos de Display diferencial (DD)

Los experimentos de DD se realizaron utilizando el protocolo general informado por Liang & Pardee (1992) con algunas modificaciones menores (Pessino *et al.* 2001). Se utilizaron cuatro oligonucleótidos anclados llamados DDT1, DDT2, DDT3 y DDT4, que corresponden a las secuencia 5'T(12)(ACg)X3', donde X representa A, C, G o T, respectivamente. Se usaron 116 decámeros arbitrarios provenientes del Proyecto de Síntesis de Cebadores para RAPD de la *British Columbia University* (serie 3 y 4) en combinación con los oligonucleótidos ancla para crear pares de cebadores. La transcripción reversa se realizó usando la enzima *Superscript II* (Invitrogen Life Technologies) siguiendo el protocolo indicado por los fabricantes. Las reacciones de PCR fueron realizadas por duplicado en un volumen final de 25 µl conteniendo 1X *Taq activity buffer* (Promega); 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 50 µM dNTPs; 0,70 µM cebador arbitrario; 2,5 µM cebador ancla; 2 U de *GoTaq DNA polimerase* (Promega) y 2,5 µl de la reacción de transcripción reversa (previamente diluida 1/20). Los controles negativos se realizaron utilizando ARN total no sometido a transcripción reversa con el fin de verificar la ausencia de ADN genómico contaminante en las preparaciones de ARN total. Para las amplificaciones se utilizó el termociclador *MyCycler* (Bio-rad). El programa consistió en un paso inicial de 3 minutos a 94°C, seguido de 40 ciclos de 20 segundos a 94°C, 20 segundos a 42°C y 30 segundos 72°C, con una etapa de elongación de 5 minutos a 72°C. Las muestras fueron mezcladas con buffer de siembra STR 3X (10 mM NaOH; 95% v/v formamida; 0,05% p/v azul de bromofenol y 0,05% p/v de xylene-cyanol) en una proporción 3:1, desnaturalizadas durante 5 minutos a 95°C y separadas en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 5% p/v (acrilamida:bis-acrilamida (19:1); 0,5X TBE; 7,5 M urea). Para la electroforesis se utilizó un equipo de secuenciación modelo *SequiGene sequencing cell* (Bio-Rad), la corrida se realizó a 60 W por 2½ horas (1 hora sin las muestras y 1½ horas con las muestras) usando los buffers 0,5X y 1X TBE pH 8,0 en los reservorios superior e inferior, respectivamente. Los productos de amplificación

fueron teñidos con nitrato de plata siguiendo el procedimiento del *DNA Silver Staining System* (Promega). Brevemente, el gel se incubó durante 20 minutos en solución fijadora (ácido acético glacial 10% v/v), seguido de 3 lavados en H<sub>2</sub>O destilada (H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>) de 3 minutos cada uno e incubación en solución de tinción (1 g/l AgNO<sub>3</sub>; 0,1% v/v formaldehído) por 30 minutos. Luego se lavó por 10 segundos en H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> pre-enfriada y se reveló con solución desarrolladora (30 g/l carbonato de sodio; 0,1% v/v formaldehído; 2 mg/l tiosulfato de sodio) pre-enfriada, deteniéndose la reacción con agregado de solución fijadora. Los geles se lavaron exhaustivamente con agua y se tomaron los datos directamente sobre el vidrio luego del secado en estufa a 37°C por al menos 2 horas. La documentación se hizo mediante digitalización directa usando el escáner Astra 3400 (UMAX).

### **Análisis de agrupamiento y componentes principales**

Los datos de los experimentos de DD fueron agrupados y convertidos en una matriz binaria en la cual "1" indica la presencia de banda, "0" su ausencia y "5" un dato perdido debido a una falla en la reacción de amplificación o a la carencia de definición de una determinada banda. Las matrices se analizaron y se determinó el coeficiente de similitud entre individuos (coeficiente de Jaccard), según la siguiente fórmula:

$$J = a/(a+b+c)$$

donde "a" es el número de bandas comunes a ambos individuos, "b" el número de bandas presentes en uno de los individuos analizados y ausente en el otro y "c" es el número de bandas presentes en éste último que se encuentran ausentes en el primero (Jaccard 1908). El análisis de agrupamiento se realizó por el método UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) usando el paquete computacional Infostat (<http://www.infostat.com.ar>, FCA-

UNC, Argentina). Las relaciones entre individuos en base a las matrices se analizaron mediante el análisis de componentes principales (ACP). Se elaboraron tres matrices, una con los datos de inflorescencias inmaduras, la segunda con datos de hojas y una tercera matriz combinando los datos de ambos tejidos. Sólo para la construcción de la tercera matriz se tomó el mismo número de transcritos para ambos tejidos. Se tomó como dato el número de marcadores amplificados de panoja (4.242) y se le asignaron a hoja números relativos basados en los porcentajes obtenidos en las diferentes categorías de polimorfismos mostrados en la Tabla C3.2. Esto se realizó con el fin de hacer compatible los datos para la generación de la tercera matriz.

### **Recuperación de las bandas diferenciales**

Los fragmentos de gel conteniendo las bandas diferenciales fueron cortados cuidadosamente en secciones pequeñas y el ADN fue eluído en 50 µl de un buffer conteniendo acetato de amonio 0,5 M y EDTA 1 mM pH 8, incubado a 37° C durante toda la noche. La precipitación se realizó durante 30 min a -80 °C agregando 0,05 volúmenes de ClNa 5M y 2,5 volúmenes de etanol absoluto. Posteriormente se centrifugó a 13.000 rpm por 10 minutos y se lavó cuidadosamente el pellet dos veces con etanol 70% v/v. Luego de centrifugar nuevamente a 13.000 rpm, el pellet se secó en estufa a 37°C hasta que no se observaron vestigios de alcohol y se resuspendió en 15 µl de agua bidestilada estéril. Los fragmentos fueron re-amplificados bajo las mismas condiciones de PCR descritas anteriormente para DD, empleando los cebadores correspondientes. La presencia de la banda amplificada se observó en un gel de agarosa al 1,5% en TAE 1X. La existencia de bandas contaminantes se controló en un segundo gel de poliacrilamida. Los fragmentos obtenidos fueron entonces clonados en el vector *pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector System* (Promega), siguiendo las especificaciones del fabricante.

### **Análisis de las secuencias**

La secuenciación de los clones de ADNc fue realizada por Ibiotec (INTA Castelar, Argentina). Los análisis de homología de secuencia fueron hechos usando los algoritmos BLASTN y BLASTX 2.2.20 (Altschul *et al.* 1997, Zhang *et al.* 2000) que se encuentran disponibles en el la página web del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Se utilizó también el programa tBLASTX del Arabidopsis Information Resource, TAIR, (<http://www.arabidopsis.org/>) con el fin de obtener las anotaciones funcionales de las secuencias diferenciales de *E. curvula* en las bases de secuencia de *Arabidopsis thaliana* y el programa MapMan (<http://gabi.rzpd.de/projects/mapman>) para ubicar las secuencias en las vías metabólicas (Thimm *et al.* 2004; Usadel *et al.* 2005).

### **Validación de la expresión diferencial de genes**

La técnica de PCR en tiempo real fue utilizada para validar la expresión diferencial de doce genes candidato elegidos al azar (seis candidatos de hoja y seis de inflorescencias inmaduras). Las reacciones se prepararon como se describe en el capítulo anterior. En esta oportunidad los primers utilizados se diseñaron usando el programa Primerquest, de la página web de IDT Scitools (<http://www.idtdna.com/Scitools/Applications/Primerquest/>), y sintetizados también por IDT (<http://www.idtdna.com/Home/Home.aspx>). La secuencia de los primers utilizados se muestra en la Tabla C3.1. En esta oportunidad el gen de igual expresión entre los distintos genotipos que se utilizó como control interno fue el gen de actina.

**Tabla C3.1:** Secuencias de los primers usados para la validación por PCR en tiempo real.

<i>Secuencia</i>	<i>Forward<sup>a</sup></i>	<i>Reverse<sup>b</sup></i>
33.P.2.264.DC	TATGGACCCGAACCTGGGTGATT	TAGCTCTGGGTTCGAGTGGCATT
12.P.2.218.DC	AAGCTIGCCTCAGCTGTCTACCT	CAGCAAATGCCCAGTTCGCATACA
20.P.2.222.D	ACGCCCCGAGGAAAGATCATTAGCA	TGCTCGGATTGTATGAGGACAGCA
42.P.2.269.TC	ACAAGACAGCCAAGGAGTGAAGGA	ACCAGTTCAGTTTACCACCACCGA
52.P.2.275.TC	TCGATTAGCGAAGGACAAGGTGGA	TGGCAAGACCATCACTTTGGAGGT
82.P.3.248.TC	GAATTACAAGCAAGCCCGCAAGGT	GCAATAGCATTTGCCGGCTGAGAA
71.H.2.251.D	TGGTGCTGCAAAGGAACTAGAGAG	TGCCTTTCGCCCACTAAACTTCT
23.H.2.237.T	TTGTCAATTGGCAGACGGTACGGA	TAAGTGCACGGCCAACTTCTCCA
27.H.2.270.TC	AACCTCGAGACGCTGTCCGTTTA	AGATGTAGGTGAGGTTGGAGCAGT
43.H.2.275.TC	AAAGAGTCCACCTGACCTTGTT	ACCTCCAAAGTGATGGTCTTGCCA
49.H.2.287.D	TTCCTCAGCTCTCCCAACTGTGT	AATCGTGTGATGCGGTCATCAGT
97.H.2.304.D	GCCCATGCATTGTTGGTGACCTT	ACAAGCACCTTCTGGTCTCAACGA
<i>Actina<sup>c</sup></i>	AAGATCAAGGTGGTTGCTCCTCCA	ATCTGCTGGAATGTGCTGAGGGAT

<sup>a, b</sup> La secuencia de los primers se indica en dirección 5'-3' (de izquierda a derecha)

<sup>c</sup> Gen usado como control interno en la validación por PCR en tiempo real.

La metodología fue la misma que la utilizada para las validaciones de la ESTs (Ver Cap. 2), salvo que en esta oportunidad las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un *iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System* (BioRad) y el programa utilizado para calcular el valor de Ct fue el *iQ5 Real Time Detection System* (BioRad).

### Mapeo in silico

Las secuencias expresadas diferencialmente obtenidas por DD y aquellas obtenidas por secuenciación de ESTs fueron mapeadas *in silico* en el genoma de maíz. Este análisis se realizó con la herramienta provista por la página web “Maizesequence” (<http://maizesequence.org/>). La posición de las secuencias sobre los cromosomas de maíz se determinó mediante el análisis de BLASTN con la herramienta BLAST provista por la página web “Maizesequence”



(<http://maizesequence.org/>). Sólo las secuencias con un valor  $E \leq 0.001$  fueron mapeadas. Para ello se utilizó la opción “exact matches”. La secuencia del marcador RFLP *csu68* (GeneBank gi: 409635), asociada con el locus de la diplosporía en *Trypsacum* (Leblanc *et al.* 1995, Savidan *et al.* 2008), se utilizó como sonda para calcular la distancia física entre la región asociada a la diplosporía y las secuencias con expresión diferencial obtenidas por análisis de ESTs y DD.

## Resultados

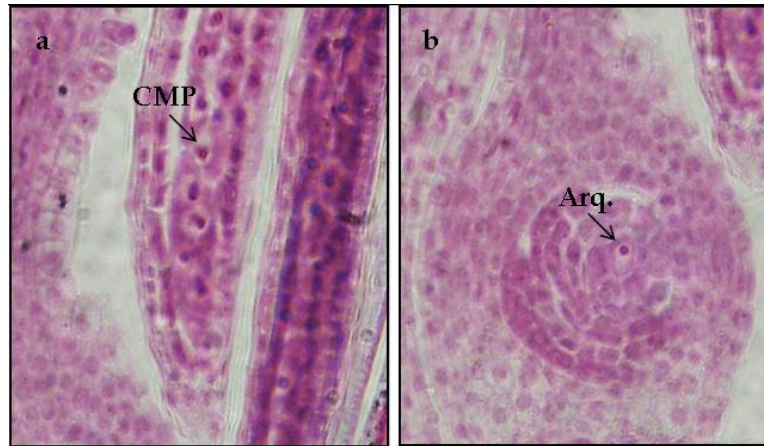
### Expresión de genes en inflorescencias inmaduras y hojas

En la figura C3.1 se indican los estadios de desarrollo del gametofito masculino y femenino en los que se tomaron las muestras para los ensayos de DD. Como se comentara anteriormente, 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.

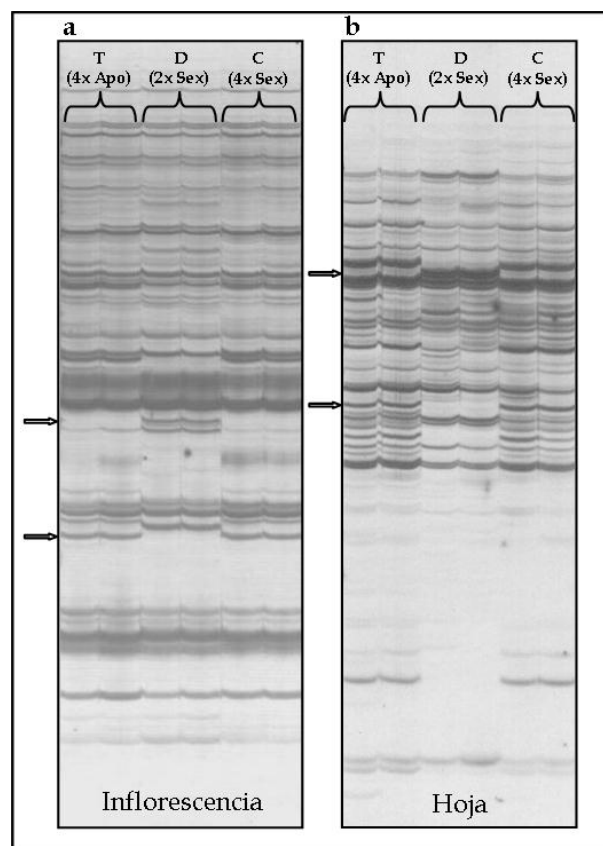
Las muestras de ARN fueron tomadas de espiguillas en el estadio de arquéspora. Este estadio de desarrollo coincide con la presencia de células madres del polen dentro de las anteras (Fig. C3.1)

En los ensayos de Display Diferencial de inflorescencias inmaduras se realizó un total de 116 combinaciones de primers que dieron buena amplificación y generaron 4.242 bandas. Para los experimentos realizados con ADNc de hoja, se hicieron 111 combinaciones que generaron 7.622 bandas. En la figura C3.2 se muestran porciones típicas de geles de display diferencial de inflorescencias y de hojas. Para el conteo de bandas solo se utilizó la región central del gel, donde

la resolución del mismo y los perfilados de bandas eran óptimos y totalmente reproducibles.



**Figura C3.1:** Corte de espiguilla teñido con safranina fast-geen. a) antera. b) óvulo. CMP: célula madre del polen. Arq.: Arquespora.



**Figura C3.2:** Porción típica de los geles de DD en el que se representa una porción del transcriptoma de *E. curvula*. a) Inflorescencia. b) Hoja. Las flechas indican algunos de los polimorfismos encontrados.

Aquellos transcritos que mostraron una clara diferencia de señal entre las líneas 2x y 4x fueron aquellos regulados por ploidía, mientras que los regulados por modo reproductivo mostraron una clara diferencia entre las líneas sexuales y la diplospórica. Las bandas que mostraron un patrón presencia-ausencia fueron cortadas y eluidas del gel, y luego reamplificadas con el mismo programa de PCR utilizando la misma combinación de primers. La Tabla C3.2 resume el número de alteraciones encontradas en los geles de poliacrilamida. Las bandas obtenidas del gel se encontraban en un rango de 200 a 800 pb. De las 4.242 bandas totales obtenidas de inflorescencias, se identificaron 554 bandas diferenciales (14,05%), mientras que de las 7.622 bandas de hoja, 739 (9,70%) bandas mostraron expresión diferencial.

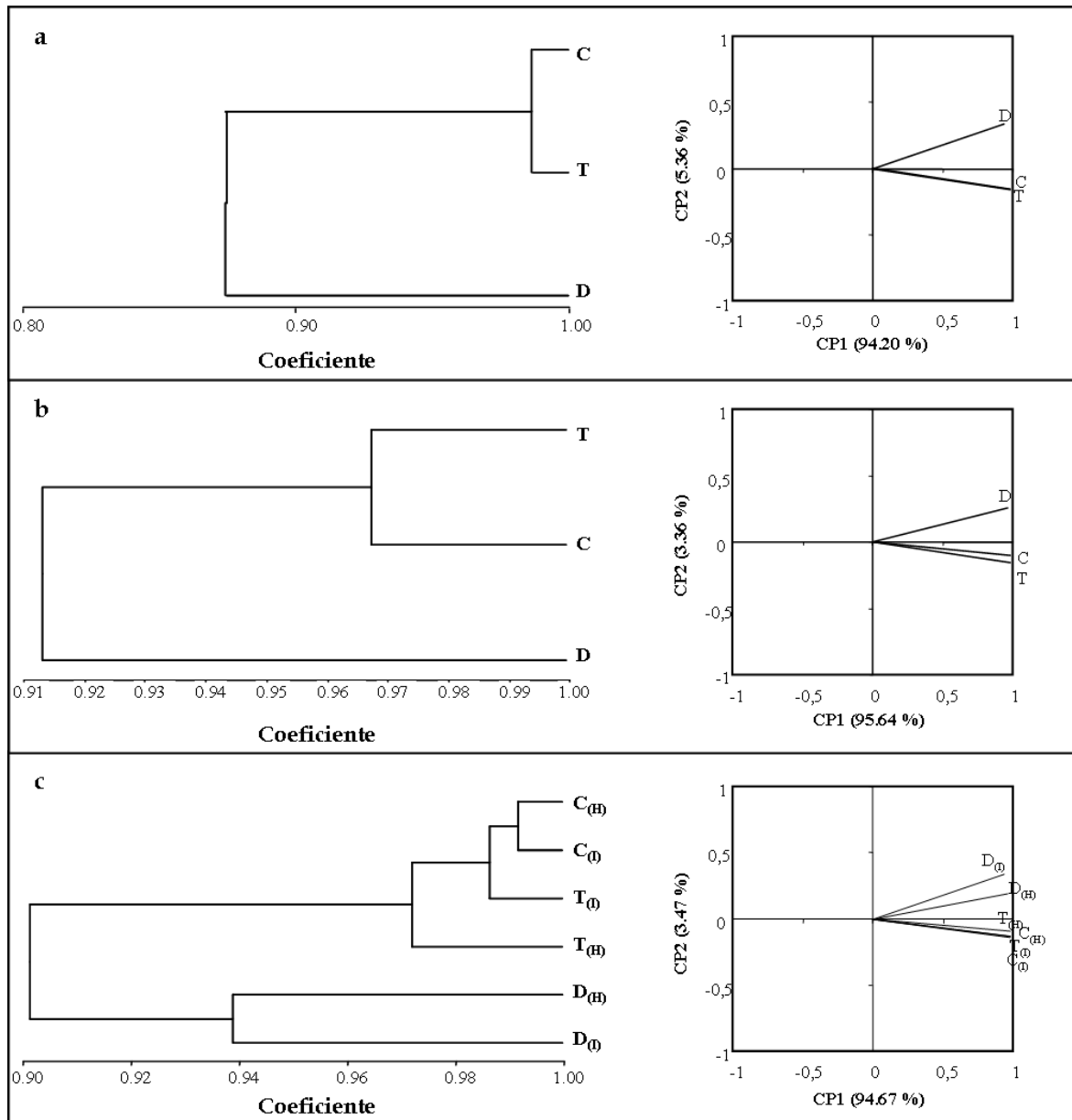
**Tabla C3.2:** Tipo y porcentaje de bandas detectadas en los geles de DD de inflorescencias y hojas.

Tipo <sup>a</sup>	Genotipo			Descripción	Inflorescencias		Hojas	
	T 4xApo	D 2xSex	C 4xSex		Nº de bandas	P (%)	Nº de bandas	P (%)
1/1/1	1	1	1	Monomórficas	3688	86,95	6883	90,31
1/0/1	1	0	1	Polimórficas por ploidía	284	11,84	277	6,74
0/1/0	0	1	0		218		235	
1/0/0	1	0	0	Polimórficas por modo reproductivo	11	0,71	125	2,17
0/1/1	0	1	1		19		43	
0/0/1	0	0	1	Polimórficas inesperadas	6	0,5	23	0,78
1/1/0	1	1	0		16		36	

<sup>a</sup> 1 indica presencia y 0 indica ausencia de banda, en los correspondientes genotipos (T, D, C)

Del total de las bandas diferenciales, el 11,84% de inflorescencias y el 6,74% de hojas fueron diferenciales en relación al nivel de ploidía, y el 0,71% y 2,17% lo fueron en relación al modo reproductivo en inflorescencia y hoja, respectivamente. Un pequeño porcentaje de bandas (0,5 y 0,78%) mostraron un patrón al que se denominó “patrón inesperado”, ya que mostró similitud entre el genotipo tetraploide apomítico y el diploide sexual. Este patrón particular de expresión estuvo presente tanto en inflorescencias como en hojas, y también fue detectado anteriormente en el análisis de ESTs.

La figura C3.3 muestra los dendrogramas del análisis de similitud y los gráficos del análisis de componentes principales correspondientes a los datos de expresión de inflorescencias, hojas y la combinación de ambos tejidos. Los genotipos T y C agruparon juntos a una distancia de 0,013 y 0,031 en inflorescencias y hojas, respectivamente, mientras que el genotipo D quedó excluido del agrupamiento, a una distancia de 0,125 y 0,083 con respecto a los tetraploides (Fig. C3.3a y b). El tercer gráfico muestra claramente las diferencias entre los patrones de expresión del diploide y los tetraploides y sugiere que la ploidía es incluso más importante que el tipo de tejido para definir la estructura del transcriptoma (Fig. C3.3c). Estos resultados coinciden con los obtenidos a partir de los análisis de ESTs. Por otra parte, en el trabajo de Mecchia *et al.* (2007), también se observó utilizando marcadores moleculares (RAPDs y AFLPs) que, a nivel del genoma también existe una mayor similitud entre los tetraploides, que difieren del diploide, con la presencia de bandas que revierten luego de un cambio en el nivel de ploidía desde 2x a 4x, restaurando la estructura presente en el tetraploide original. Esto sugiere que la estructura genética de las plantas tetraploides es similar y difiere de la de la planta sexual diploide. Esta reversión también fue observada en los patrones de metilación de citocinas en esta misma serie euploide (Ochogavía *et al.* 2009). Es decir que a nivel epigenético las plantas tetraploides también son más semejantes entre si.



**Figura C3.3:** Dendrogramas y análisis de componentes principales (ACP). Los gráficos corresponden a los datos de expresión de inflorescencias y hojas de la serie euploide de *E. curvula* (T (4x Apo), D (2x Sex) and C (4x Sex). a) Datos inflorescencia. b) Datos de hoja. c) Combinación de los datos de ambos tejidos.

### Caracterización molecular de los transcritos aislados

Las bandas polimórficas del gel que presentaban buena definición fueron cortadas, eluidas y re-amplificadas. Sesenta (60) bandas de inflorescencias y 42 de hoja fueron clonadas y secuenciadas con éxito. Este número representa un

10,83% y 5,68% del total de bandas diferenciales de inflorescencias y hojas, respectivamente.

De los 60 transcriptos secuenciados, 39 (65%) mostraron homología significativa con genes de función conocida (Tabla C3.3). Los 21 clones restantes (35%) representaron secuencias nuevas. Los análisis de secuencias se llevaron a cabo mediante comparación contra la base de datos del GeneBank usando el algoritmo BLASTX. De los 42 transcriptos secuenciados a partir de hojas, 14 (33,33%) mostraron homología con genes de función conocida y 28 (66,66%) representaron nuevas secuencias (Tabla C3.4). Se encontró un transcripto en común de función desconocida, expresado tanto en hojas como inflorescencias del genotipo diploide (125.P.3.225.D de inflorescencias y 31.H.2.295.D de hojas). Se halló otro transcripto, expresado en ambos tejidos (52.P2.275.TC de inflorescencias y 43.H.2.275.TC de hojas) de los genotipos tetraploides, que presentó homología con la proteína ubiquitina. El resto de los transcriptos analizados presentaron expresión específica para cada tejido. Sin embargo, es importante considerar que solo se secuenció un número limitado de bandas, por lo que una cantidad mayor de secuencias podría revelar más genes en común expresados en ambos tejidos.

**Tabla C3.3:** Genes diferencialmente expresados en inflorescencias de la serie euploide de *E. curvula* con distinto nivel de ploidía y modo reproductivo.

Nombre de la secuencia	T 4x Apo	D 2x Sex	C 4x Sex	Nº de accesión	Descripción	Score	Valor E
<b>Relacionados a diplosporía</b>							
33.P.2.264.DC	0	1	1	ABR26094.1	Retrotransposon protein	122	9e-27
12.P.2.218.DC	0	1	1	BAA06629.1	Plasma membrane H <sup>+</sup> ATPase	126	5e-28
129.P.3.245.DC	0	1	1	BAC79202.1	Putative phospholipase D beta 1	179	6e-45
127.P.3.240.T	1	0	0	BAD67774.1	Phosphogluconate dehydrogenase	331	1e-89
<b>Inesperados</b>							
126.P.3.228.C	0	0	1	YP_514664.1	Ribosomal protein L2	223	5e-57
4.P.1.A3.C	0	0	1	ABA96267.1	Expressed protein	144	2e-33
20.P.1.289.C	0	0	1	YP_001518614.1	Serine/threonine protein kinase	67.8	3e-10
142.P.3.240.C	0	0	1	EAZ04360.1	Hypothetical protein	59.3	2e-7
3.P.1.A3.C	0	0	1	EAZ29130.1	Hypothetical protein	174	2e-42
5.P.1.A4.C	0	0	1	EAZ39836.1	Hypothetical protein	84.3	3e-15
16.P.1.289.C	0	0	1	BAB92466.1	Hypothetical protein	175	1e-42
1.P.A1.C	0	0	1	N/A	N/A	N/A	N/A
8.P.B5.C	0	0	1	N/A	N/A	N/A	N/A
<b>Relacionados a ploidía</b>							
7.P.1.B4.D	0	1	0	AAL76001.1	Putative gag-pol polyprotein	94.7	2e-23
9.P.1.B5.D	0	1	0	ABG68041.1	Protein kinase	89.4	8.0e-17
12.P.1.268.D	0	1	0	AAP46197.1	Putative gag-pol polyprotein	57.2	0.001
13.P.1.268.D	0	1	0	YP_819362.1	Transcriptional regulator	135	1e-30
17.P.1.278.D	0	1	0	BAD27978.1	Put. calcium-transporting ATPase	262	6e-69
18.P.1.295.D	0	1	0	AF466646_9	Putative gag-pol polyprotein	184	2e-45
21.P.1.289.D	0	1	0	EAZ44595.1	Hypothetical protein	137	4e-31
20.P.2.222.D	0	1	0	BAD19264.1	Putative leucine aminopeptidase	277	2e-73
39.P.2.266.D	0	1	0	ABA99626.1	Protein kinase	232	6e-60
43.P.2.269.D	0	1	0	ABR25744.1	60S ribosomal protein I12	79.3	3e-13
19.P.3.249.D	0	1	0	EAY84737.1	Hypothetical prot.	152	2e-35

41.P.3.302.D	0	1	0	BAD45137.1	Putative prot kinase ADK1	48.9	1e-4
50.P.3.304.D	0	1	0	EAZ29192.1	Hypothetical protein	111	2e-23
49.P.3.304.D	0	1	0	EAY93458.1	Hypothetical prot.	69.7	7e-11
94.P.3.262.D	0	1	0	ABR26094.1	Retrotransposon protein	79.7	7e-14
2.P.A1.D	0	1	0	N/A	N/A	N/A	N/A
10.P.C1.D	0	1	0	N/A	N/A	N/A	N/A
19.P.300.D	0	1	0	N/A	N/A	N/A	N/A
16.P.2.219.D	0	1	0	N/A	N/A	N/A	N/A
23.P.2.222.D	0	1	0	N/A	N/A	N/A	N/A
67.P.2.290.D	0	1	0	N/A	N/A	N/A	N/A
35'.P.3.300.D	0	1	0	N/A	N/A	N/A	N/A
125.P.3.225.D	0	1	0	N/A	N/A	N/A	N/A
138.P.3.202.D	0	1	0	N/A	N/A	N/A	N/A
139.P.3.240.D	0	1	0	N/A	N/A	N/A	N/A
18.P.1.230.TC	1	0	1	AAV43957.1	Putative serine carboxypeptidase II	76.3	8e-13
17.P.2.220.TC	1	0	1	BAC57277.1	Ribosomal protein S15a	154	2e-36
21.P.2.222.TC	1	0	1	BAC83627.1	Put. hydroxyproline-rich glycoprot	81.3	2e-14
41.P.2.269.TC	1	0	1	BAD45438.1	Zinc finger POZ domain	182	2e-44
42.P.2.269.TC	1	0	1	AAF07182.1	Histone H2A protein	76.6	2e-12
52.P.2.275.TC	1	0	1	AAX40652.1	Polyubiquitin	201	7e-50
16'.P.3.239.TC	1	0	1	BAC20898.1	Put. transcription repressor HOTR	132	2e-29
59.P.3.234.TC	1	0	1	EAY93458.1	Hypothetical protein	118	2e-25
82.P.3.248.TC	1	0	1	ABA95621.2	MATE efflux family protein	230	2e-59
98.P.3.264.TC	1	0	1	AAQ56285.1	Putative gag-pol protein	106	7e-22
110.P.3.269.TC	1	0	1	AAO20067.1	Put. cleavage and polyadenylat prot	126	6e-28
131.P.3.245.TC	1	0	1	ABA95797.1	Retrotransposon protein	163	5e-39
136.P.3.202.TC	1	0	1	AAC72195.1	Pyruvate dehydrogen. E1 alpha sub.	165	1e-39
4.P.2.202.TC	1	0	1	N/A	N/A	N/A	N/A
25.P.2.251.TC	1	0	1	N/A	N/A	N/A	N/A
29.P.2.261.TC	1	0	1	N/A	N/A	N/A	N/A
35.P.2.264.TC	1	0	1	N/A	N/A	N/A	N/A
45.P.2.269.TC	1	0	1	N/A	N/A	N/A	N/A
51.P.2.275.TC	1	0	1	N/A	N/A	N/A	N/A
15.P.3.239.TC	1	0	1	N/A	N/A	N/A	N/A
111.P.3.269.TC	1	0	1	N/A	N/A	N/A	N/A
133.P.3.248.TC	1	0	1	N/A	N/A	N/A	N/A



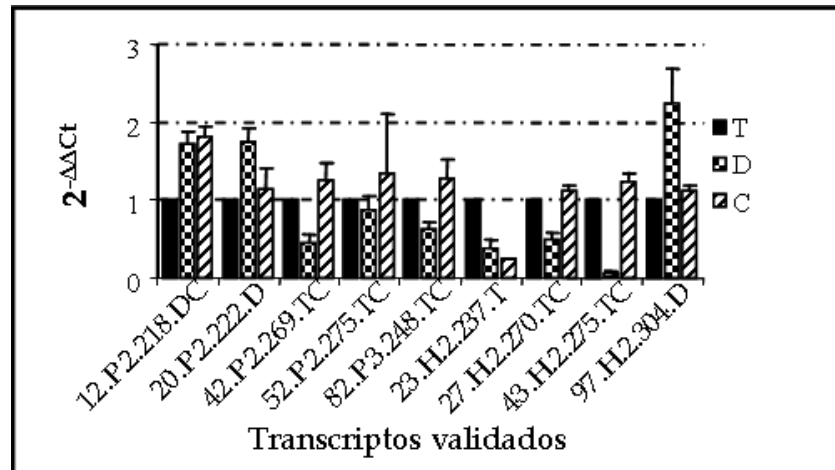
**Tabla C3.4** Genes diferencialmente expresados en hojas de la serie euploide de *E. curvula* con distinto nivel de ploidía y modo reproductivo.

Nombre de la secuencia	T 4x Apo	D 2x Sex	C 4x Sex	Nº de accesión	Descripción	Score	Valor E
<b>Relacionados a diplosporia</b>							
23.H.2.237.T	1	0	0	ABF97406.1	Retrotransposon protein	103	3,0e-21
88.H.2.300.T	1	0	0	AAX94970.1	Put. retrotransposon protein	139	6,0e-32
95.H.2.303.T	1	0	0	ABA97267.1	Put. retrotransposon protein	115	2,0e-24
2.H.2.219.T	1	0	0	N/A	N/A	N/A	N/A
3.H.2.219.T	1	0	0	N/A	N/A	N/A	N/A
14.H.2.230.T	1	0	0	N/A	N/A	N/A	N/A
19.H.2.230.T	1	0	0	N/A	N/A	N/A	N/A
38.H.2.266.T	1	0	0	N/A	N/A	N/A	N/A
42.H.2.275.T	1	0	0	N/A	N/A	N/A	N/A
55.H.2.300'.T	1	0	0	N/A	N/A	N/A	N/A
56.H.2.300'.T	1	0	0	N/A	N/A	N/A	N/A
66.H.2.248.T	1	0	0	N/A	N/A	N/A	N/A
<b>Inesperados</b>							
63.H.2.245.C	0	0	1	BAD05450.1	Clathrin-coat assembly protein-like	164	1,0e-39
86.H.2.350.C	0	0	1	BAD44833.1	Put. protein kinase	98.2	2,0e-19
98.H.2.304.C	0	0	1	BAB89591.1	Lustrin A-like	380	2,0e-104
52.H.2.287.C	0	0	1	N/A	N/A		
<b>Relacionados a ploidía</b>							
97.H.2.304.D	0	1	0	ABA98712.1	NB-ARC domain containing protein	388	1,0e-106
13.H.2.230.D	0	1	0	ABA97273.2	Protein kinase domain containing	62.4	1,0e-8
49.H.2.287.D	0	1	0	AAV43957.1	Put. serine carboxypeptidase II	269	4,0e-71
51.H.2.287.D	0	1	0	T02955	Put. cytochrome P450 monooxygenase	148	4,0e-37
71.H.2.251.D	0	1	0	AAP53939.1	Put. retrotransp. prot.	82.4	9,0e-15
87.H.2.350.D	0	1	0	ABF95633.1	Aspartyl protease family protein	67.8	2,0e-10
15.H.2.230.D	0	1	0	N/A	N/A		
16.H.2.230.D	0	1	0	N/A	N/A		
28.H.2.270.D	0	1	0	N/A	N/A		
41.H.2.275.D	0	1	0	N/A	N/A		
68.H.2.248.D	0	1	0	N/A	N/A		
83.H.2.341.D	0	1	0	N/A	N/A		
27.H.2.270.TC	1	0	1	NP_189066.1	Put. protein kinase	115	1,0e-24
43.H.2.275.TC	1	0	1	ABR25718.1	Polyubiquitin	202	6,0e-51
8.H.2.225.TC	1	0	1	N/A	N/A		
22.H.2.237.TC	1	0	1	N/A	N/A		
26.H.2.270.TC	1	0	1	N/A	N/A		
33.H.2.295.TC	1	0	1	N/A	N/A		
54.H.2.296.TC	1	0	1	N/A	N/A		

78.H.2.319.TC	1	0	1	N/A	N/A
79.H.2.319.TC	1	0	1	N/A	N/A
82.H.2.337.TC	1	0	1	N/A	N/A
84.H.2.341.TC	1	0	1	N/A	N/A
85.H.2.350.TC	1	0	1	N/A	N/A
90.H.2.302TC	1	0	1	N/A	N/A
99.H.2.304.TC	1	0	1	N/A	N/A

### Validación de la expresión por PCR en tiempo real

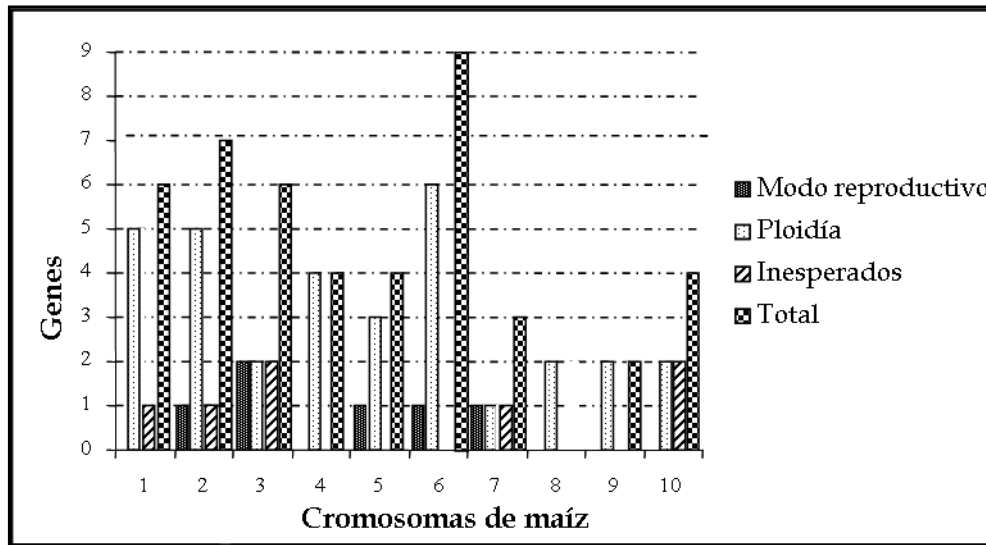
Las reacciones de PCR en tiempo real se llevaron a cabo para genes elegidos al azar que presentaban una diferencia de expresión significativa en los ensayos de DD en ambos tejidos. Se amplificaron 12 genes de expresión diferencial (6 de inflorescencias y 6 de hojas) y un gen constitutivo como control interno (actina). Nueve genes fueron validados exitosamente (Fig. C3.4), confirmando los resultados mostrados en la Tabla C3.2. Tres genes no pudieron validarse. Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de una expresión diferencial debida a diferentes alelos que no se haya podido detectar con los primers diseñados para PCR en tiempo real. La técnica de PCR en tiempo real usada no garantiza que realmente se puedan distinguir distintos alelos o incluso distintos genes dentro de una familia génica. El hecho de que con esta técnica se amplifiquen necesariamente fragmentos pequeños de ADNc (entre 90 y 150pb) incrementa la posibilidad de obtener la misma curva de disociación para todos los amplicones originados por diferentes alelos o genes relacionados.



**Figura C3.4:** Validación por PCR en tiempo real de los genes diferencialmente expresados en las líneas isogénicas de *E. curvula*. El eje Y representa cuantas veces un gen es expresado con respecto al genotipo T (4x apo). Las diferencias entre valores medios para pares de muestras se analizaron con la prueba *t* de Student ( $P < 0.05$ ).

### Mapeo *in silico* de los genes diferencialmente expresados en el genoma de maíz

Los genes que mostraron una expresión diferencial en los ensayos de DD fueron asignados *in silico* a secuencias ortólogas del genoma de maíz a fin de identificar posibles transcriptos candidatos para la iniciación de la diplosporía. Un total de 48 transcriptos (36 de inflorescencias y 12 de hojas) fueron exitosamente mapeados *in silico* sobre el genoma de maíz. Los transcriptos mapeados se distribuyeron sobre todo el genoma, lo que indica que los genes que codifican los transcriptos expresados diferencialmente se distribuyen uniformemente en todo el genoma de maíz. La figura C3.5 muestra la distribución de los transcriptos mapeados sobre el genoma de maíz. Los mismos se agruparon en transcriptos regulados por los cambios de ploidía, por el modo reproductivo y como transcriptos inesperados. Como se mencionara anteriormente, el grupo de transcriptos inesperados fueron aquellos que mostraron igual expresión en los genotipos 2x sexual y 4x apomictico, y una expresión contraria en el genotipo 4x sexual.



**Figura C3.5:** Número de genes diferencialmente expresados en la serie euploide de *E. curvula* mapeados *in silico* sobre el genoma de maíz.

Al conocerse que la región asociada a la diplosporía en *Tripsacum* (región “DIP”) es sinténica con un fragmento distal del brazo largo del cromosoma 6 de maíz (Leblanc *et al.* 1995), y está duplicada en los cromosomas 8L y 3L (Savidan *et al.* 2008), la posibilidad de identificar genes expresados diferencialmente en esa región genómica es de especial interés, dado que permitiría la detección de posibles candidatos que estén relacionados con la iniciación de la diplosporía.

Los marcadores RFLP *Csu68* y *mc28* (informados como ligados a la diplosporía en *Tripsacum*) están localizados en la región distal del cromosoma 6 (cerca del telómero) a 0 cM uno del otro, y presentan una fracción de recombinación de 0,18 con la región DIP (Leblanc *et al.* 1995).

La Tabla C3.5 muestra la localización exacta de los transcritos diferenciales sobre el cromosoma 6 de maíz. Las secuencias usadas para el mapeo *in silico* sobre el cromosoma 6 fueron las originadas por el análisis de display diferencial y las obtenidas por el análisis de ESTs descritas en el capítulo anterior. Diecinueve (19) transcritos originados por DD y 10 ESTs pudieron ser mapeados exitosamente en base a la homología con secuencias de maíz. Para el

diseño de la tabla se utilizó el marcador *csu68* indicando la región DIP y se colocaron todas las secuencias de expresión diferencial en relación a su distancia al mismo. Todas las secuencias, excepto el contig 44 (proteína de respuesta inducida hipersensible, grupo inesperado), se posicionaron entre el marcador *csu68* y el centrómero.

Es interesante notar que de los 29 transcriptos que mapearon sobre el cromosoma 6, solo 3 se encontraron diferencialmente expresados en relación al modo reproductivo, 16 pertenecen al grupo modulado por ploidía y 10 al grupo de los inesperados.

La figura C3.6a muestra la región de 50,1 Mpb que incluye a la sonda *csu68*. Podría decirse que la región está predominantemente modulada por ploidía, en donde algunos transcriptos fallan en la respuesta a los cambios de ploidía en el genotipo diplospórico. Un pequeño grupo particular de genes ubicados en dicha región se encuentran específicamente silenciados o activados durante el desarrollo diplospórico. De los 17 genes mapeados en esa región, solo uno está asociado con el modo reproductivo (silenciado en el genotipo apomítico), ocho están asociados a la regulación por el nivel de ploidía y ocho pertenecen al grupo de expresión inesperada. Los genes que pertenecen al grupo inesperado dentro de esa región están principalmente silenciados en los genotipos tetraploide apomítico y diploide sexual (seis de ocho). De los ocho genes asociados con el nivel de ploidía, cinco se encuentran silenciados en los genotipos tetraploides y tres activados en los mismos.

Un análisis similar de mapeo *in silico* se realizó sobre el cromosoma 8 de maíz (Tabla C3.6), el cual fue informado como sinténico para la región DIP por Savidan *et al.* (2008). La Tabla C3.6 muestra la localización cromosómica exacta de los transcriptos diferenciales mapeados sobre el cromosoma 8. Como se hizo para el cromosoma 6, las secuencias usadas para el mapeo *in silico* fueron las

originadas por el análisis de display diferencial y las ESTs descritas en el capítulo anterior. Cinco (5) transcritos obtenidos por DD y 14 ESTs fueron mapeados exitosamente en base a la homología con secuencias de maíz. La sonda *csu68* se localizó en el cromosoma 8L en una posición cercana al centrómero.

De los 19 genes diferenciales localizados sobre el cromosoma 8, tres están regulados por el modo reproductivo, nueve por el nivel de ploidía y 7 pertenecen al grupo inesperado. La figura C3.6b muestra la región de 59.6 Mpb que rodea al marcador *csu68*. De igual manera que en el cromosoma 6, la región se percibe como controlada por ploidía. De los 8 genes mapeados en esa región, tres están asociados con el modo reproductivo (2 silenciados y uno activado en el genotipo apomíctico), tres se encontraron asociados al cambio de ploidía (dos activados y uno silenciado en el genotipo diploide) y dos pertenecen al grupo de los inesperados (ambos silenciados en los genotipos apomíctico y diplo sexual).

El mapeo *in silico* sobre el cromosoma 3 (Tabla C3.7), que también fue informado como sinténico para la región DIP por Savidan *et al.* (2008), se realizó de la misma manera. La Tabla C3.7 muestra la localización cromosómica exacta de los transcritos diferenciales mapeados sobre el cromosoma 3. Siete (7) transcritos de los análisis de DD y 19 ESTs pudieron ser mapeados exitosamente en base a la homología con secuencias de maíz.

**Tabla C3.5:** Genes de *E. curvula* mapeados *in silico* sobre el cromosoma 6 de maíz.

Transcriptos (DD y ESTs)				Genotipos <sup>a</sup>			Distancia
Nombre de la secuencia	Descripción	ID	T (4x)	D (2x)	C (4x)	(Mpb)	
Contig74	Topoisomerase-like protein	Q9FMK4	0	1	0	206,5	
133.P.3.248.TC	N/A	N/A	1	0	1	182,8	
82.P.3.248.TC	MATE efflux family protein	ABA95621.2	1	0	1	182,8	
127.P.3.240.T	Phosphogluconate dehydrogenase	BAD67774.1	1	0	0	171,5	
97.H.2.304.D	NB-ARC protein	ABA98712.1	0	1	0	126,4	
16.P.1.289.C	Hypothetical protein	BAB92466.1	0	0	1	121,8	
41.P.2.269.TC	Zinc finger POZ domain	BAD45438.1	1	0	1	105,6	
41.H.2.275.D	N/A	N/A	0	1	0	99,5	
52.P.2.275.TC	Polyubiquitin	AAX40652.1	1	0	1	57,7	
43.H.2.275.TC	Polyubiquitin	ABR25718.1	1	0	1	57,7	
Contig1488	Importin alpha-like protein	O49600	0	0	1	54,4	
66.H.2.248.T	N/A	N/A	1	0	0	50,9	
Contig1437	Glycerald.-3-phosph. dehyd.	Q4324	0	0	1	48,7	
18.P.1.230.TC	Serine carboxypeptidase II	AAV43957.1	1	0	1	46,2	
49.H.2.287.D	Serine carboxypeptidase II	AAV43957.1	0	1	0	46,2	
Contig345	Elongation factor 1-alpha	O64937	1	1	0	41,6	
98.H.2.304.C	Lustrin A-like	BAB89591.1	0	0	1	34,8	
94.P.3.262.D	Retrotransposon protein	ABR26094.1	0	1	0	33,8	
33.P.2.264.DC	Retrotransposon protein	ABR26094.1	0	1	1	33,8	
Contig111	Gibberellin-regulated prot. 4	P46690	0	1	0	25,6	
Contig439	UDP-gluc. ac. decarboxyl 1	Q91XL3	0	0	1	24,7	
Contig1002	10 kDa chaperonin	P34893	0	0	1	20,7	
142.P.3.240.C	Hypothetical protein	EAZ04360.1	0	0	1	19,5	
Contig1335	Ribosomal protein L1	Q1SIB0	0	0	1	16,6	
136.P.3.202.TC	Pyruvate dehydrogen.	AAC72195.1	1	0	1	10,3	

Contig241	photosyst I assemb prot Ycf4	AAS46129.1	0	1	0	6,3
51.H.2.287.D	Cytoch P450 monooxygenase	T02955	0	1	0	3,5
42.P.2.269.TC	Histone H2A protein	AAF07182.1	1	0	1	0,6
<b>Marcador <i>csu68</i><sup>b</sup></b>						<b>0</b>
Contig44	Hypersens.-induc. resp. prot.	AAF68390.1	1	1	0	-0,4

<sup>a</sup> 1 indica que el gen está expresado, 0 indica que el gen está silenciado. Los patrones 1/0/1 y 0/1/0 corresponden a genes controlados por ploidía; 0/1/1 y 1/0/0 a genes controlados por modo reproductivo y 0/0/1 y 1/1/0 corresponden a genes con patrón "inesperado".

<sup>b</sup> La sonda *csu68* está localizada en la región subtelomérica del cromosoma 6 de maíz.



**Tabla C3.6:** Genes de *E. curvula* mapeados *in silico* sobre el cromosoma 8 de maíz.

Transcriptos (DD y ESTs)				Genotipos <sup>a</sup>			Distancia
Nombre de la secuencia	Descripción	ID	T (4x)	D (2x)	C (4x)	(Mpb)	
27.H.2.270.TC	Putative protein kinase	NP_189066.1	1	0	1	30,9	
12.P.2.218.DC	Plasma membrane H <sup>+</sup> ATPase	BAA06629.1	0	1	1	0,008	
<b>Marcador <i>csu68</i><sup>b</sup></b>						<b>0</b>	
Contig570	Ubiquitin	AAX40652.1	1	0	0	-3,6	
20.P.2.222.D	Putative leucine aminopeptidase	BAD19264.1	0	1	0	-13,5	
Contig290	Methyl transferase	ABG22093.1	0	1	1	-18,3	
Contig639	Elongation factor 1-alpha	AAC15413.1	0	1	0	-28,7	
Contig1389	Elongation factor 1-alpha	ACR38047.1	0	0	1	-28,7	
Contig1164	Elongation factor 1-alpha	AAC15413.1	0	0	1	-28,7	
Contig1495	BAH domain containing protein	ACG43491.1	0	0	1	-50,9	
Contig1467	Kinesin-like proteína	CAB41097.2	0	0	1	-71,7	
Contig857	Longin-like	ABD28727.1	0	0	1	-81,1	
Contig426	Ubiquitin-conjugating enzyme	AAB88617.1	0	1	0	-84,4	
9.P.1.B5.D	Protein kinasa	ABG68041.1	0	1	0	-87,4	
7.P.1.B4.D	Putative gag-pol polyprotein	AAL76001.1	0	1	0	-104,4	
Contig993	Ribosomal protein L1	ACG48489.1	0	1	0	-118,7	
Contig1228	putative histone deacetylase HD2	AAU10714.1	0	0	1	-142,9	
Contig1458	Fructose 1,6-bisphosphate aldolase	AAS05825.1	0	0	1	-143,2	
Contig760	Fructose-bisphosphate aldolase	ACG37623.1	1	0	1	-143,3	
Contig256	Prp18 domain containing protein	ACG31451.1	0	1	0	-151,4	

<sup>a</sup> 1 indica que el gen está expresado, 0 indica que el gen está silenciado. Los patrones 1/0/1 y 0/1/0 corresponden a genes controlados por ploidía; 0/1/1 y 1/0/0 a genes controlados por modo reproductivo y 0/0/1 y 1/1/0 corresponden a genes con patrón "inesperado".

<sup>b</sup> La sonda *csu68* está localizada en la región subcentromérica del cromosoma 8 de maíz.

**Tabla C3.7:** Genes de *E. curvula* mapeados *in silico* sobre el cromosoma 3 de maíz.

Transcriptos (DD y ESTs)				Genotipos <sup>a</sup>			Distancia
Nombre de la secuencia	Descripción	ID	T (4x)	D (2x)	C (4x)	(Mpb)	
86.H.2.350.C	Putative protein kinase	BAD44833.1	0	0	1	155,1	
Contig1349	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydr.	ACG36109.1	0	0	1	131,2	
Contig141	S-adenosylmethionine synthetase 1	AAC05590.1	0	1	0	121,9	
3.P.1.A3.C	Hypothetical protein	EAZ29130.1	0	0	1	88,3	
39.P.2.266.D	Protein kinasa	ABA99626.1	0	1	0	86,4	
Contig1106	Hypothetical proteína	AAR91063.1	1	0	0	68,7	
Contig977	Ribosomal protein L2	CAA37241.1	1	0	0	68,7	
Contig398	ATP synthase CF1 beta subunit	NP_043032.1	0	1	0	47,9	
Contig395	40S ribosomal protein S9	ACG32995.1	0	1	0	41,9	
Contig897	Ribosomal protein L10E	ACG32302.1	0	1	0	38,2	
Contig9	MYB18 protein	AAU10775.1	0	1	0	37,9	
Contig1090	Expressed proteína	ACN36160.1	1	0	1	32,7	
Contig1114	Tubulin alpha-3 chain	ACG26907.1	0	0	1	16,3	
Contig666	Ribosomal protein S3	NP_043062.1	0	1	0	15,3	
Contig1330	Unknown [Zea mays]	ACN37093.1	0	0	1	13,5	
Contig370	Second. cell wall-related glycosyltransf	ACG31432.1	0	1	0	6,8	
<b>Marcador <i>csu68</i><sup>b</sup></b>						<b>0</b>	
Contig468	Ribosomal protein S7	NP_043077.1	0	1	0	-4,4	
Contig60	Tubulin B4	AAD20179.1	1	1	0	-34,6	
8.H.2.225.TC	N/A	N/A	1	0	1	-34,6	
43.P.2.269.D	60S ribosomal protein l12	ABR25744.1	0	1	0	-39,1	
Contig456	Cellulose synthase 1	AAR23311.1	0	1	0	-49,1	
Contig1465	Unknown [Zea mays]	ACN31952.1	0	0	1	-74,3	
15.P.3.239.TC	N/A	N/A	1	0	1	-75,4	
Contig251	60S ribosomal protein L19-1	ACG32985.1	0	1	0	-77,9	

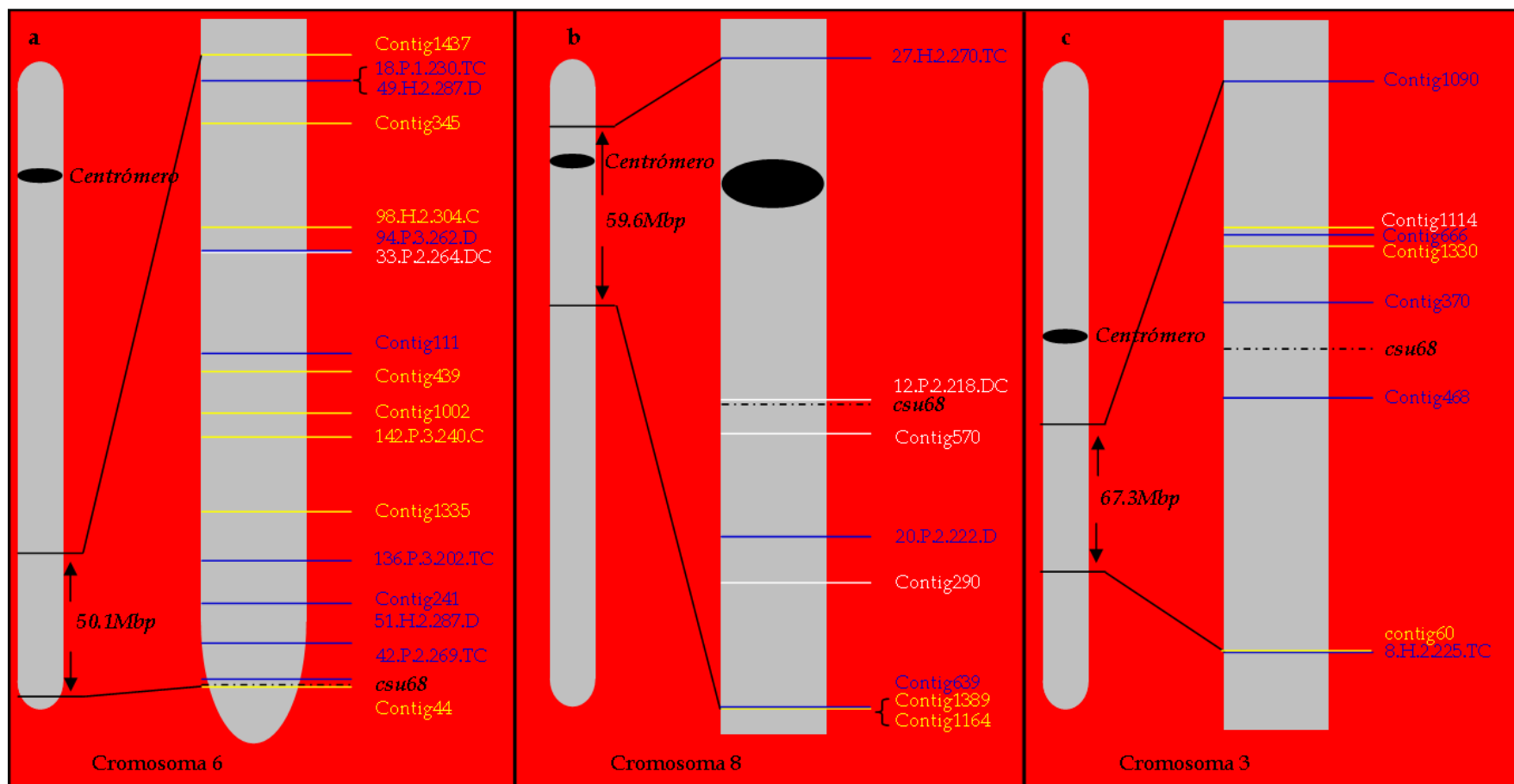
Contig657	Putative hydrolase	ABA95828.1	1	0	0	-91,7
4.P.1.A3.C	Expressed protein	ABA96267.1	0	0	1	-92,6

<sup>a</sup> 1 indica que el gen está expresado, 0 indica que el gen está silenciado. Los patrones 1/0/1 y 0/1/0 corresponden a genes controlados por ploidía; 0/1/1 y 1/0/0 a genes controlados por modo reproductivo y 0/0/1 y 1/1/0 corresponden a genes con patrón "inesperado".

<sup>b</sup> La sonda *csu68* está localizada en la región central del cromosoma 3 de maíz.

De los 26 genes diferenciales localizados en el cromosoma 3, tres están regulados por modo reproductivo, 15 regulados por el nivel de ploidía y ocho pertenecen al grupo de los inesperados. La Figura C3.6c muestra la región de 67,3 Mpb que rodea al marcador *csu68*. Este marcador se encuentra localizado en la región central del cromosoma 3L. Como en el cromosoma 6L y 8L, la región se percibe como controlada por el nivel de ploidia. De los ocho genes mapeados en esta región ninguno se encontró asociado al modo reproductivo, cinco están regulados por el nivel de ploidia (tres activos en el genotipo diploide) y tres pertenecen al grupo inesperado. Dos de éstos genes inesperados están silenciados en los genotipos apomíctico y diploide sexual.

Si se considera el estado de expresión de los genes mapeados *in silico* sobre los cromosomas 6, 8 y 3 de los 74 genes mapeados (29, 19 y 26, respectivamente), 52, 41 y 36 se encuentran silenciados en los genotipos tetra apo, diplo sex y tetra sex, respectivamente. Estos números dan una relación genes silenciados/genes totales de 0,7, 0,55 y 0,49 respectivamente, indicando que el genotipo con el mayor número de genes silenciados en los cromosomas mapeados es el genotipo apomíctico.

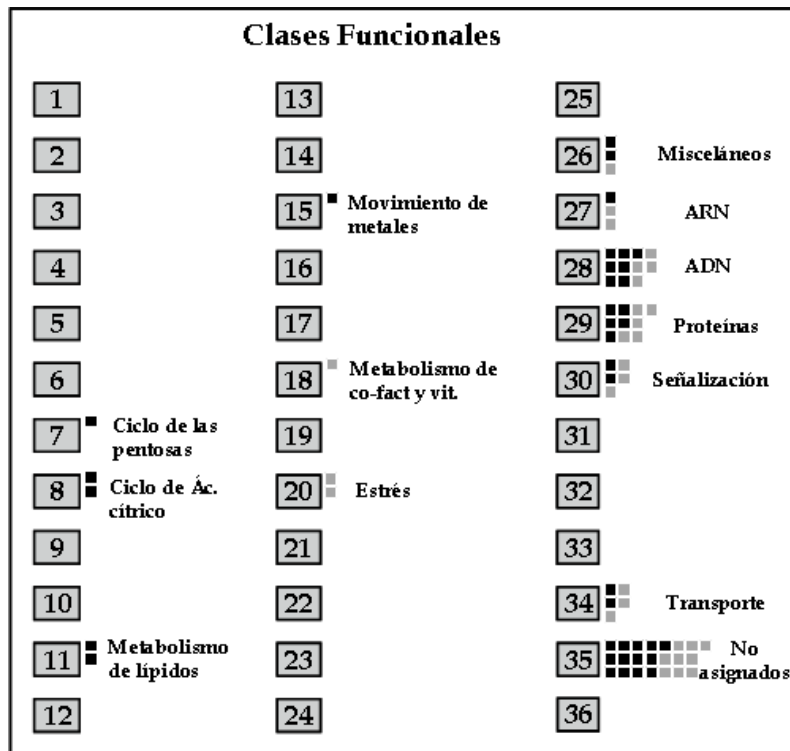


**Figura C3.6:** Cromosomas 6, 8 y 3 de maíz mostrando la región que rodea al marcador *csu68*, el cual está ligado al locus DIP en *Tripsacum* (Leblanc *et al.* 1995). La distancia de las secuencias mapeadas *in silico* están representadas en escala. Las secuencias pertenecientes al grupo inesperado se presentan en amarillo, las pertenecientes al grupo regulado por ploidía en azul y las asociadas al modo reproductivo en blanco.

### **Asignación genes de *E. curvula* a grupos funcionales de Arabidopsis (MAPMAN)**

Una búsqueda de homología mediante BLAST en el sitio web TAIR permitió detectar secuencias en el genoma de *Arabidopsis thaliana* que tienen homología con los genes diferencialmente expresados de *E. curvula*. El agrupamiento de secuencias en clases funcionalmente relacionadas se logró cargando las mismas en el programa MAPMAN (<http://gabi.rzpd.de/projects/mapman>). Se usó este procedimiento para predecir las clases funcionales y las vías moleculares afectadas durante los cambios de ploidía y modo reproductivo. La figura C3.7 muestra las secuencias obtenidas a partir de inflorescencias y hojas asignadas a las clases funcionales de *A. thaliana*.

Cincuenta y una (51) y 36 secuencias diferencialmente expresadas (DD) de inflorescencias y hojas, respectivamente, fueron anotadas exitosamente por homología con secuencias de Arabidopsis. De tales secuencias, 18 y 20, respectivamente, fueron asignadas a diferentes vías metabólicas con una clara preferencia por ciertos grupos. Las vías más representadas fueron: ADN, ARN, Proteína y Señalización celular (Fig. C3.7). Un grupo de 19 secuencias de inflorescencias y 9 de hojas no pudieron ser asignadas a ninguna vía conocida de Arabidopsis.



**Figura C3.7:** Vista general de la distribución, de los genes de *E. curvula* expresados diferencialmente, en las distintas clases funcionales de *Arabidopsis thaliana* según el programa MapMan.

## Discusión

En este capítulo se informa la identificación de varios genes que están controlados por ploidia y/o el modo reproductivo en *E. curvula*. La serie euploide de plantas usada representa un excelente material para detectar transcritos específicos relacionados con los caracteres antes mencionados. El número de bandas polimórficas asociadas con el modo reproductivo en inflorescencias fue relativamente bajo (0,71 %) (Ver Tabla C3. 2). Estos resultados concuerdan con informes previos en la especie apospórica *Paspalum notatum* (Laspina et al. 2008), donde un porcentaje similar (1,2 %) de genes se encontraron expresados diferencialmente en relación al modo reproductivo (aposporía) en inflorescencias premeióticas usando la técnica de DD. Así, el número de genes que presenta una expresión alterada en flores durante el

desarrollo apomítico muestran un orden de magnitud similar tanto en aposporía como en diplosporía. No sucede lo mismo en relación a ploidía. Mientras que en este estudio se detectó un 11,84 % de bandas polimórficas por ploidía, Martelotto et al. (2005) observa solo 1,35 % de bandas polimórficas en un sistema análogo de *P. notatum*. Esto sugiere que la respuesta del transcriptoma a la autoploidización es específica de cada especie, siendo considerablemente mayor en *E. curvula* que en *P. notatum*. Sería interesante, como continuación de este trabajo, utilizar una técnica cuantitativa y más resolutive que permita la detección de un mayor porcentaje de genes diferencialmente expresados, candidatos a controlar estos caracteres en plantas.

Cuando se consideró la diferencia en expresión entre hojas e inflorescencias, fue posible observar la presencia de un 6,74 % de polimorfismos relacionados con el nivel de ploidía en hojas y un 11,84% en inflorescencias, indicando que la respuesta del transcriptoma a los cambios de ploidia es más marcada en inflorescencias. Sorprendentemente, un 2,17% de bandas polimórficas relacionadas al modo reproductivo se detectaron en hojas y sólo 0,71% en inflorescencias. Ese resultado no esperado indica que las diferencias en la expresión de genes entre las plantas sexuales y apomíticas no solo ocurren en el tejido reproductivo. En *P. notatum*, la expresión de genes asociados a la aposporía se ha detectado en anteras y para algunos genes particulares esa expresión fue incluso más marcada que en el óvulo (Laspina *et al.* 2008). Estas observaciones confirman que las plantas apomíticas presentan patrones nuevos de expresión en otros tejidos diferentes del óvulo, pero dicha expresión aparentemente no se refleja en la morfología de ambas plantas.



# **CONSIDERACIONES FINALES**

Se puede destacar que se logró la construcción de cuatro bibliotecas de ADNc que contienen transcriptos completos, es decir, del largo total de los ARNm, y se pudo realizar la secuenciación y análisis de 12.295 ESTs de alta calidad. Estas ESTs, luego de su análisis, dieron como resultado 8.884 unigenes (1.490 contigs y 7.394 singletons). Del total de los unigenes, 7.029 (79,11%) fueron categorizados y depositados en las bases de datos públicas, de las cuales el 37,80% fueron clasificadas de acuerdo a Gene Ontology (anotación GO). El 22% de los genes anotados están relacionados con funciones moleculares, el 23% con procesos biológicos y el 21% con componentes celulares. La mayor proporción de los unigenes funcionalmente categorizados cayeron en seis categorías: actividad catalítica, unión nucleotídica, metabolismo de proteínas, unión, transporte y vías energéticas, con una alta actividad nuclear. El 43% de los unigenes de *Eragrostis* se corresponden con secuencias de trigo y cebada, el 49,25% con avena y el 46,48% con maíz.

El desarrollo de los 254 microsatélites y los 190 SNPs derivados de las ESTs facilitarán el mapeo utilizando poblaciones segregantes para el carácter apomixis u otros caracteres de calidad forrajera. Los marcadores que cosegrogen con los caracteres antes mencionados pueden ser utilizados como sondas para el clonado posicional de genes y para identificar regiones genómicas. La comparación entre los resultados de mapeo y los estudios de expresión permitirán la identificación de genes candidatos. Alternativamente, las secuencias identificadas pueden ser utilizadas para incrementar la calidad forrajera. En este sentido, uno de los parámetros más importantes a ser considerados es el contenido de lignina, que influye fuertemente en la digestibilidad de la materia seca (Spangenberg *et al.* 1998). La disponibilidad de las secuencias involucradas en estas vías van a permitir el mejoramiento molecular regulando negativamente las enzimas clave de las mismas por supresión en sentido y antisentido (Díaz *et al.* 2010).

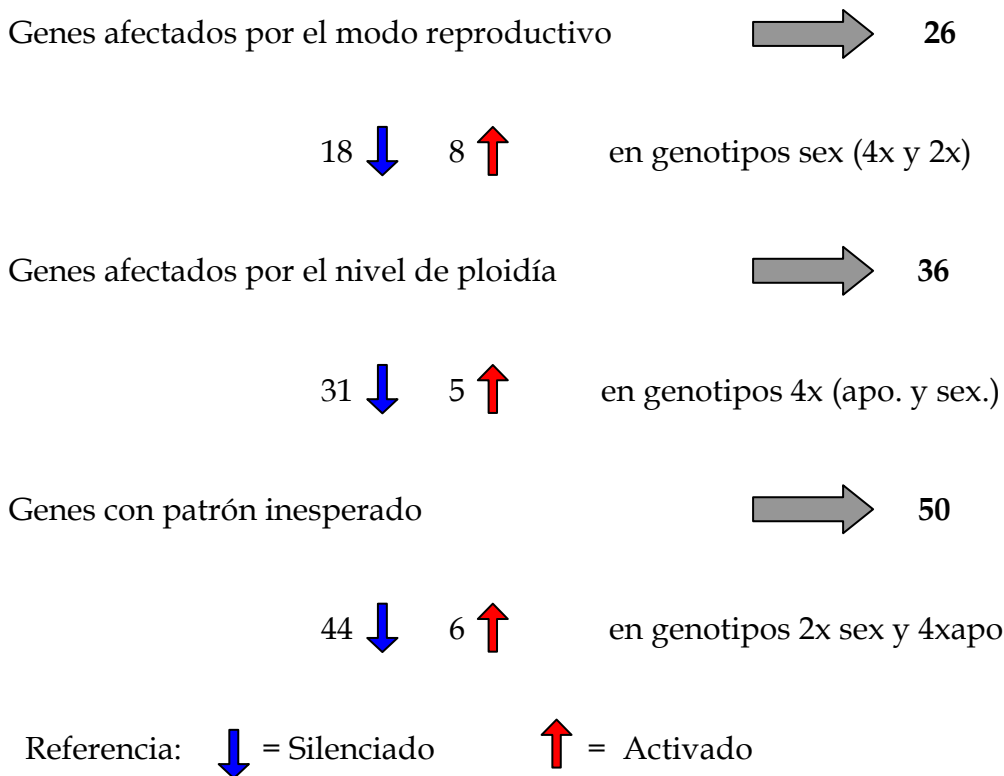
Por lo expuesto, estas bibliotecas constituyen una herramienta importante para la identificación de genes y el mejoramiento molecular de *E. curvula*. La caracterización de las ESTs y la comparación de los diferentes genotipos de *Eragrostis* con distintos niveles de ploidía y modo reproductivo permitieron la identificación de genes relacionados con la apomixis diplospórica y la expresión de genes regulados por ploidía.

En el análisis de las ESTs y DD se mostró que los patrones de expresión de las plantas tetraploides están muy relacionados, mientras que la expresión del genotipo diploide fue significativamente diferente, mostrando que el perfil de expresión, al menos para un gran número de genes, depende del nivel de ploidía. Este comportamiento en la expresión de genes se correlaciona muy bien con la estructura genética y epigenética de la serie en la prueba clásica y parcial de Mantel (Mecchia *et al.* 2007, Ochogavia *et al.* 2009). Durante la conversión tetraploide-diploide se produce una proporción significativa de modificaciones genéticas y epigenéticas que revierten durante la conversión diploide-tetraploide, lo cual sugiere que algunos loci mantienen una secuencia particular y/o una cierta condición de metilación dependiente del nivel de ploidía. Estas variaciones genéticas y epigenéticas ocurren en un escenario particular de expresión que depende del nivel de ploidía.

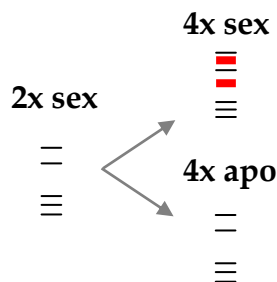
Sin embargo, un grupo particular de genes mostraron un comportamiento curioso. Ellos se encontraron principalmente silenciados en los genotipos 2x sex. y 4x apo. Este grupo de genes se detectó tanto en los análisis de ESTs como en los realizados mediante la técnica de DD. Ya que las plantas 2x sex. y 4x apo. presentan diferente ploidía y modo reproductivo, el patrón de expresión de estos genes es intrigante. Estos genes candidatos fueron denominados de patrón inesperado o "inesperados". La mayoría de los genes de este grupo están sobreexpresados en la planta 4x sex, mientras que están reprimidos en los genotipos 4x apo. y 2x sex. Como se menciona en la discusión del capítulo 2,

para explicar la existencia de este grupo de genes “inesperados” y la relación que podrían llegar a tener con la apomixis y la poliploidía, se plantea que para mantener la sexualidad a nivel tetraploide se requiere de la activación de un grupo de genes en la conversión 2x a 4x, y que esta activación estaría bloqueada (o silenciada) en el genotipo 4x apo, lo que explicaría el grupo de genes silenciados que comparten este genotipo y el diploide sexual.

En resumen, lo que se ve en los resultados obtenidos es lo siguiente:



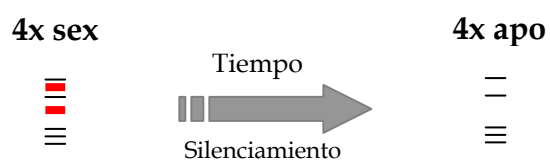
Podría graficarse la expresión de este grupo de genes de la siguiente manera:



Lo que se observa es que luego de la duplicación un grupo de genes tiene expresión aumentada en el genotipo 4x sex. Estos genes no son activos (o están silenciados) en plantas 2x sex. y 4x apo. La hipótesis planteada que explicaría este comportamiento del grupo de genes con patrón inesperado es que “se requiere de un proceso de reestructuración del transcriptoma para mantener la sexualidad en los genotipos poliploides”. De este planteo se deduce que tal vez la apomixis sea el resultado de una falla en este proceso de activación de genes.

Zappacosta (2009), realizó nuevos análisis genómicos y pruebas de progenie a distintos genotipos de *E. curvula* e incluyó la serie euploide utilizada en esta tesis. Este autor observó que las plantas diploides de *E. curvula* siempre se reproducen de forma sexual, pero que en las plantas poliploides (entre ellas el genotipo C, 4x sex, estudiado en esta tesis) el grado de sexualidad disminuye con el tiempo, aumentando el número de sacos diplospóricos. Como conclusión este autor plantea que en *Eragrostis* las plantas “tienden” a la apomixis.

Los resultados obtenidos por Zappacosta parecen indicar que la sexualidad se silencia con el tiempo en *Eragrostis*.



Los resultados de los estudios de mapeo *in silico* indican que el mayor grupo de transcriptos detectados con DD y ESTs (29) mapean sobre el cromosoma 6 de maíz. Diecisiete (17) de ellos se encuentran dentro de la región de 50,1 Mpb que fue previamente asociada por sintenia con la disploporía por Leblanc *et.al.* (1995). La mayoría de los transcriptos que mapearon sobre esta región particular están relacionados al nivel de plodía (8) o pertenecen al grupo inesperado (8). Dentro de este grupo la mayoría de ellos (6 de 8) están

silenciados en el genotipo 2x sex, fallando en su activación en el tetraploide apomictico, pero se encuentran activos en el tetra sex. Seis (6) de estos 8 genes del grupo “inesperado” se encuentran en una subregión de 25,1 Mpb dentro de la región donde se encuentra la sonda de referencia *csu68*. Lo anterior nos indica que el 75 % de los genes del grupo inesperado que mapean en el cromosoma 6 están concentrados en el 50 % del área total. Solo un gen que mapea en esta región (a 33,8 Mpb de *csu68*) está expresado diferencialmente por modo reproductivo. Éstas observaciones indicarían que la expresión de los genes localizados en la región DIP estaría fuertemente influenciada por los cambios de ploidía, incluso podría pensarse que en una subregión particular el genotipo diplospórico estaría fallando en la respuesta al cambio de ploidía. Los re-arreglos locales del genoma de *E. curvula* respecto del genoma de maíz podrían estar obstaculizando la detección del escenario real de expresión en ese área genómica. Si se considera también los genes localizados sobre los cromosomas 3 y 8 se puede asumir que la ploidía está fuertemente afectando esa región genómica y que también los genes están en su mayoría silenciados en el genotipo apomíctico.

El hallazgo de una planta (OTA-S) proveniente de Estados Unidos (USDA) tetraploide y, hasta donde hemos realizado el análisis (un año) de sacos embrionarios (211), es completamente sexual, nos permitiría inferir que, si existe la región condicionante de la apomixis, las plantas, aunque en principio se comporten como altamente sexuales, con el tiempo, tienden a silenciar la sexualidad y aumentar la expresión de la apomixis. La planta proveniente de USDA carecería de dicha región. No sucede lo mismo con aquellas obtenidas por nuestro grupo de trabajo. Esto permitiría inferir que también el genotipo diploide la posee pero no la puede expresar.

Tomando en cuenta los resultados previos obtenidos por el grupo de trabajo (Mecchia *et al.* 2007, Ochogavia *et al.* 2009) y los informados en esta tesis y

comparados con los obtenidos en otras especies, pueden detectarse muchos aspectos en común. A pesar de las variaciones en los patrones de desarrollo en las diferentes especies, la apomixis parece mostrar características conservadas al nivel molecular. Los genes diferenciales informados por Albertini *et al.* (2004) en *Poa pratensis* y por Laspina *et al.* (2008) en *P. notatum* revelan varias características en común y vías relacionadas. Además, publicaciones acerca de genes expresados diferencialmente durante la autoploidización en *P. notatum* (Martelotto *et al.* 2007) y *S. phureja* (Stupar *et al.* 2007) muestran un grupo de secuencias comunes.

También se encontró que la mayoría de la secuencias encontradas en las distintas especies coincide, se trata de elementos repetitivos, proteína kinasas, proteínas ribosomales, factores de transcripción, factores de elongación, proteínas ricas en prolina, proteínas de respuesta a estrés, proteínas del ciclo celular, proteínas con dominios de unión al DNA, ubiquitina, citocromo P450, kinesina, celulosa sintetasa, enolasa.

Restaría a continuación realizar un estudio comparativo detallado a fin de evaluar la conservación del control de los cambios genéticos relacionados con la ploidía y/o con la apomixis en diferentes especies. En un futuro cercano se comenzara un estudio comparativo entre las especies *P. notatum*, *E. curvula* y *T. dactyloides*.

En esta tesis se presenta una lista de genes candidatos que pueden estar actuando como disparadores y/o participantes de la respuesta a la poliploidización y la ocurrencia del desarrollo diplospórico en *E. curvula*. La representación diferencial del transcriptoma es una evidencia inicial de la asociación entre un grupo de genes y un rasgo particular. Sin embargo es necesaria una mayor evidencia experimental para confirmar que los candidatos identificados están participando en el desarrollo reproductivo y/o están

regulados por los cambios de ploidía. En un futuro cercano los fragmentos génicos identificados serán utilizados para realizar transformación genética en *E. curvula* usando la tecnología sentido-antisentido para investigar el rol funcional de los mismos en el desarrollo reproductivo.



# **BIBLIOGRAFÍA**

- 
- Adams KL & Wendel JF (2005) Novel patterns of gene expression in polyploid plants. *Trends Genet.* 21:539-43
- Adams KL, Cronn R, Percifield R & Wendel JF (2003) Genes duplicated by polyploidy show unequal contributions to the transcriptome and organ-specific reciprocal silencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:4649-54
- Adams MD, Kelley JM, Gocayne JD, Dubnick M, Polymeropoulos MH, Xiao H, Merril CR, Wu A, Olde B, Moreno RF, Kerlavage AR, McCombie WR & Venter JC (1991) Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. *Science* 252:1651-56
- Akiyama Y, Conner J, Goel S, Morishige D, Mullet J, Hanna W & Ozias-Akins P (2004) High resolution physical mapping in *Pennisetum squamulatum* reveals extensive chromosomal heteromorphism of genomic region associated with apomixis. *Plant Physiol.* 134:1733-41
- Albertini E, Marconi G, Barcaccia G, Raggi L & Falcinelli M. (2004) Isolation of candidate genes for apomixis in *Poa pratensis*. *Plant Mol. Biol.* 56:879-94
- Albertini E, Marconi G, Reale L, Barcaccia G, Porceddu A, Ferranti F & Falcinelli M (2005) SERK and APOSTART. Candidate genes for apomixis in *Poa pratensis*. *Plant Physiol.* 138: 2185-99
- Albertini E, Porceddu A, Ferranti F, Reale L, Barcaccia G, Romano B & Falcinelli M (2001) Apospory and parthenogenesis may be uncoupled in *Poa pratensis*: a cytological investigation. *Sex Plant Reprod.* 14:213-17
- 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 Res.* 25:3389-402.

- 
- Altschul SF, Boguski MS, Gish W & Wootton JC (1994) Issues in searching molecular sequence databases. *Nat. Genet.* 6:119–29
- Asker S & Jerling L (1992) Apomixis in plants. CRC Press, Boca Raton, USA.
- Audic S & Claverie JM (1997) The significance of digital gene expression profiles. *Genome Res.* 7:986–95
- Barker G, Batley J, O’Sullivan H, Edwards KJ & Edwards D (2003) Redundancy based detection of sequence polymorphisms in expressed sequence tag data using autoSNP. *Bioinformatics* 19:421–22
- Bennett J (2007) Ligand–LRR receptor kinase interaction is required to control the number of megaspore mother cells in the rice ovules. Proceedings of the IX Gatersleben Research Conference, 3rd International Apomixis Conference. Wernigerode , Germany, pp. 107.
- Bennett M & Smith J (1976) Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Phil. Trans. Royal Soc. London, Series B* 274:227–74.
- Bennetzen JL, Coleman C, Liu R, Ma J, Ramakrishna W (2004) Consistent over-estimation of gene number in complex plant genomes. *Curr Opin Plant Biol* 7:732–736
- Bicknell R & Koltunow A (2004) Understanding apomixis: recent advances and remaining conundrums. *Plant Cell* 16:S228–45
- Bicknell R (1997) Isolation of a diploid, apomictic plant of *Hieracium aurantiacum*. *Sex Plant Reprod.* 10:168–72
- Bicknell R, Borst N & Koltunow A (2000) Monogenic inheritance of apomixis in two *Hieracium* species with distinct developmental mechanisms. *Heredity* 84:228–37

- Blanc G & Wolfe KH. (2004a) Functional divergence of duplicated genes formed by polyploidy during Arabidopsis evolution. *Plant Cell* 16: 1679-91
- Blanc G & Wolfe KH. (2004b) Widespread paleopolyploidy in model plant species inferred from age distributions of duplicate genes. *Plant Cell* 16: 1667-78
- Bonilla J & Quarín C (1997) Disporous and aposporous apomixis in a pentaploid race of *Paspalum minus*. *Plant Sci.* 127:97-104
- Brix K (1974) Sexual reproduction in *Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees. *Z. Pflanzenzuchtg* 71:25-32
- Brown W & Emery W (1958) Apomixis in the Gramineae: Panicoideae. *Am. J. Bot.* 45:253-63
- 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 microcolinearity with rice. *Theor. Appl. Genet.* 112:1179-91
- Cardone S (2006) Caracterización de nuevo germoplasma de pasto llorón obtenido por métodos biotecnológicos y su utilización para el estudio de la apomixis. Tesis Doctoral, Universidad Nacional del Sur.
- Cardone S, 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* for the study of apomixis (diplospory). *Euphytica* 151:263-72

- 
- Carman J (1997) Asynchronous expresión of duplicate genes in angiosperms may cause apomixis, bispory, tetraspory, and polyembryony. *Biol. J. Linn. Soc.* 61:51–94
- Catanach A, Erasmuson S, Podivinsky E, Jordan B & Bicknell R (2006) Deletion mapping of genetic regions associated with apomixis in *Hieracium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103(49):18650–55
- Chen L, Miyazaki C, Kojima A, Saito A & Adachi T (1999) Isolation and characterization of a gene expressed during early embryo sac development in apomictic Guinea grass (*Panicum maximum*). *Journal Plant Physiol.* 154:55–62
- Chen ZJ & Ni ZF (2006) Mechanisms of genomic rearrangements and gene expression changes in plant polyploids. *Bio-Essays* 28:240–52
- Comai L (2005). The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nat. Rev. Genet.* 6: 836–46
- Comai L, Tyagi AP, Winter K, Holmes-Davis R, Reynolds SH, Stevens Y & Byers B (2000) Phenotypic instability and rapid gene silencing in newly formed Arabidopsis allotetraploids. *Plant cell* 12:1551–67
- Conesa A, Gotz S, Garcia-Gomez JM, Perol J, Talon M & Robles M (2005) Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* 2:3674–76
- 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 Pág
- 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, Pág. 7-17
- Crane C (2001) Classification of apomictic mechanisms. En: The flowering apomixis: from mechanisms to genetic engineering. Eds. Y Savidan, J Carman & T Dresselhaus, Mexico D.F., European Commission DG VI (FAIR), Cap. 3, pág. 24-43
- Cui LY, Wall PK, Leebens-Mack JH, Lindsay BG & Soltis DE (2006) Widespread genome duplications throughout the history of flowering plants. *Genome Res.* 16:738-49
- d'Erfurth I, Jolivet S, Froger N, Catrice O, Novatchkova M, Mercier R (2009) Turning Meiosis into Mitosis. *PLoS Biol.* 7(6): e1000124
- Daurelio LD, Espinoza F, Quarín CL & Pessino SC (2004) Genetic diversity in sexual diploids and apomictic tetraploid populations of *Paspalum notatum* situated in sympatry or allopatry. *Plant Syst. Evol.* 244:189-99
- Diaz ML, Garbus I & Echenique V (2010) Allele specific expression of a weeping lovegrass gene from the lignin biosynthetic pathway, caffeoyl-coenzyme A 3-O-methyltransferase. *Molecular Breeding* (en prensa)
- Dwivedi K, Jamison M, Kowallis B, Heywood K, Cope K, Pattanayak J, Roche D & Carman J (2008) Differential Gene Expression in Ovules of Apomictic and Sexual *Boechera* (Brassicaceae). Western Section Annual Winter Meeting, February 22 and 23
- Ebina M, Nakagawa H, Yamamoto T, Araya H, Tsuruta S, Takahara M & Nakajima K (2005) Co-segregation of AFLP and RAPD markers to apospory in guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.). *Grassland Sci.* 51:71-8

- Echenique V (1987) Algunas claves bioquímicas, físicas y anatómicas para el estudio de la resistencia a la sequía en pasto llorón, *Eragrostis curvula* (Schrad) Nees. Tesis Doctoral, Universidad Nacional del Sur.
- Eujayl I, Sorrells ME, Baum M, Wolters P & Powell W (2002) Isolation of EST-derived microsatellite markers for genotyping the A and B genomes of wheat. *Theor. Appl. Genet.* 104:399-407
- Ewing B, Hillier LD, Wendl MC & Green P (1998) Base-calling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy Assessment. *Genome Res.* 8:175-85
- Fernández O, Brevedan R y Gargano A (1991) El pasto llorón, su biología y su manejo. CERZOS y Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina, 393 Pág.
- Gaeta RT, Pires JC, Iniguez-Luy F, Leon E & Osborn TC (2007) Genomic changes in resynthesized *Brassica napus* and their effect on gene expression and phenotype. *Plant Cell* 19(11):3403-17
- Gao LF, Jing RL, Huo NX, Li Y, Li XP, Zhou RH, Chang XP, Tang JF, Ma ZY & Jia UZ (2004) One hundred and one new microsatellite loci derived from ESTs (EST-SSRs) in bread wheat. *Theor. Appl. Genet.* 108:1392-1400
- Garg K, Green P & Nickerson DA (1999) Identification of candidate coding region single nucleotide polymorphisms in 165 human genes using assembled expressed sequence tags. *Genome Res.* 9:1087-92
- Gaut BS & Doebley JF (1997) DNA sequence evidence for the segmental allotetraploid origin of maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:6809-14
- Goel S, Chen Z, Conner J, Akiyama Y, Hanna W & Ozias-Akins P (2003) Delineation by fluorescence in situ hybridization of a single hemizygous

- chromosomal region associated with aposporous embryo sac formation in *Pennisetum squamulatum* and *Cenchrus ciliaris*. *Genetics* 163:1069–82
- Grimanelli D, Garcia M, Kaszas E, Perotti E & Leblanc O (2003) Heterochronic expression of sexual reproductive programs during apomictic development in *Tripsacum*. *Genetics* 165:1521–31
- 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 (2001) Developmental genetics of gametophytic apomixis. *Trends in Genetics* 17:597–604
- Guitton AE, Page DR, Chambrier P, Lionnet C, Faure JE, Grossniklaus U & Berger F. (2004). Identification of new members of Fertilisation Independent Seed Polycomb Group pathway involved in the control of seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 131, 2971-2981.
- Gustafsson A (1946) Apomixis in higher plants. Part I. The mechanisms of apomixis. Lunds Univ. årsskr. N. F. Avd. 2, 42:1-66
- Hao YJ, Wen XP & Deng XX (2004) Genetic and epigenetic evaluations of citrus calluses recovered from slow-growth culture. *J. Plant Physiol.* 161:479–84
- Hatey F, Tosser-Klopp G, Clouscard-Martinato C, Mulsant P & Gasser F (1998) Expressed sequence tags for genes: a review. *Genet. Sel. Evol.* 30:521–41
- Huang X & Madan A (1999) CAP3: a DNA sequence assembly program. *Genome Res.* 9:868–77
- Jaccard P (1908) Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat.* 44:223-70



- 
- Jessup R, Burson B, Burow G, Wang Y, Chang C, Li Z, Paterson A & Hussey M (2002) Disomic inheritance, suppressed recombination, and allelic interactions govern apospory in buffelgrass as revealed by genome mapping. *Crop Sci.* 42:1688-94.
- Ji W, Li Y, Li J, Dai C-h, Wang X, Bai X, Cai H, Liang Yang L & ZhuY-m (2006) Generation and analysis of expressed sequence tags from NaCl-treated Glycine soja. *BMC Plant Biol.* 6:4
- Johansen DA (1940) Plant microtechnique. McGrawHill Book Co., New York.
- Jones B, Ponti J, Tavassoli A & Dixon P (1978) Relationships of the Ethiopian cereal Tef (*Eragrostis tef*): evidence from morphology and chromosome number. *Ann. Bot.* 42:1369-73
- Kantama L, Sharbel TF, Schranz ME, Mitchell-Olds T, de Vries S & de Jong H (2007) Diploid apomicts of the *Boechera holboellii* complex display large-scale chromosome substitutions and aberrant chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104:14026-31
- Kantety RV, La Rota M, Matthews DE & Sorrells ME (2002) Data mining for simple sequence repeats in expressed sequence tags from barley, maize, rice, sorghum and wheat. *Plant. Mol. Biol.* 48:501-10
- Kashkush K, Feldman M & Levy AA (2002) Gene loss, silencing and activation in a newly synthesized wheat allotetraploid. *Genetics* 160:1651-59
- Kashkush KH, HFeldman MH & HLevy AA (2003) Transcriptional activation of retrotransposons alters the expression of adjacent genes in wheat. *Nat Genet.* 33(1):102-6

- 
- Katti MV, Ranjekar PK & Gupta VS (2001) Differential distribution of simple sequence repeats in eukaryotic genome sequences. *Mol. Biol. Evol.* 18:1161-67
- Kellog EA (2003) What happens to genes in duplicated genomes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 100:4369-71
- Kojima A & Nagato Y (1997) Discovery of highly apomictic and highly amphimictic dihaploids in *Allium Tuberosum*. *Sex Plant Reprod.* 10:8-12
- Koltunow A (1993) Apomixis: embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. *Plant Cell* 5:1425-37
- Koltunow A, Bicknell R & Chaudhury M (1995) Apomixis: Molecular strategies for the generation of genetically identical seeds without fertilization. *Plant Physiol.* 108:1345-52
- La Rota M, Kantety RV, Yu JK & Sorrells ME (2005) Nonrandom distribution and frequencies of genomic and EST-derived microsatellite markers in rice, wheat, and barley. *BMC Genomics* 6:23
- Lagercrantz U, Ellegren & Anderson L (1993) The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. *Nucleic Acids Res.* 21:1111-15
- Laspina NV (2009) Identificación de genes asociados con la expresión de la apomixis en *Paspalum notatum*. Tesis Doctoral, Universidad Nacional de Rosario.
- Laspina NV, Vega T, Seijo JG, Gonzalez AM, Martelotto LG, Stein J, Podio M, Ortiz JPA, Echenique VC, Quarín CL & Pessino SC (2008) Gene expression analysis at the onset of aposporous apomixes in *Paspalum notatum*. *Plant. Mol. Biol.* 67:615-28

- 
- Lazo GR, Chao S, Hummel DD, Edwards H, Crossman CC, Lui N, Matthews DE, Carollo VL, Hane DL, You FM, Butler GE, Miller RE, *et al.* (2004) Development of an Expressed Sequence Tag (EST) Resource for Wheat (*Triticum aestivum* L.): EST generation, unigene analysis, probe selection and bioinformatics for a 16,000-Locus Bin-Delineated Map. *Genetics* 168:585-93
- Leblanc O, Grimanelli D, González de León D & Savidan Y (1995) Detection of the apomictic mode of reproduction in maize-*Tripsacum* hybrids using maize RFLP markers. *TAG* 90:1198-203
- Lee HS & Chen ZJ (2001) Protein-coding genes are epigenetically regulated in *Arabidopsis* polyploids. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 98:6753-58
- Leigh J (1960) Some aspects of anatomy, ecology and physiology of *Eragrostis*. Tesis Ph. D., Universidad de Witwatersrand, Johannesburg, Sudáfrica.
- Leitch IJ & Bennett MD (1997) Polyploidy in angiosperms. *Trends Plant Sci.* 2:470-76
- Lewin B (1994) *Genes V*. Oxford University Press, New York
- Liang P & Pardee AB (1992) Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257:967-71
- Liu B, Vega JM & Feldman M (1998) Rapid genome changes in newly synthesized Amphiploids of *Triticum* and *Aegilops*. II. Changes in low copy coding DNA sequences. *Genome* 41:535-42
- Livak KJ & Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. *Methods* 25:402-08

- 
- Ma C-X, Casella G & Wu R (2002) Functional mapping of quantitative trait loci underlying the character process: a theoretical framework. *Genetics* 16:1751-62
- Ma X-F & Gustafson JP (2005) Genome evolution of allopolyploids: a process of cytological and genetic diploidization. *Cytogenetic Genome Res.* 109:236-249
- Martelotto LG, Ortiz JPA, Espinoza F, Quarín CL & Pessino SC (2005) A comprehensive analysis of gene expression alterations in a newly synthesized *Paspalum notatum* autotetraploid. *Plant Sci.* 169:211-20
- Martelotto LG, Ortiz JPA, Stein J, Espinoza F, Quarín CL & Pessino SC (2007) Genome rearrangements derived from autopolyploidization in *Paspalum sp.* *Plant Sci.* 172:970-77
- Martínez E, Hopp E, Stein J, Ortiz J & Quarín C (2003) Genetic characterization of apospory in tetraploid *Paspalum notatum* based on the identification of linked molecular markers. *Mol. Breed.* 12:319-27
- Martínez E, Urbani M, Quarín C, & Ortiz JP (2001) Inheritance of apospory in bahiagrass, *Paspalum notatum*. *Hereditas* 135:19-25
- Masterson J (1994) Stomatal size in fossil plants: evidence of poliploidy in majority of angiosperms. *Science* 264:421-23
- Matz MV & Lukyanov SA (1998) Different strategies of differential display: areas of application. *Nucleic Acids Research* 26(24):5537-43
- Mecchia MA, Ochogavía A, Selva JP, Laspina N, Felitti S, Martelotto LG, Spangenberg G, Echenique V & Pessino SC (2007) Genome polymorphisms and gene differential expression in a 'back and forth'

- ploidy-altered series of weeping lovegrass (*Eragrostis curvula*), *J. Plant Phys.* 164(8):1051–61
- Mittelsten-Scheid O, Jakovleva L, Apsar K, Maluszynska J, Paszkowsky J. (1996). A change of ploidy can modify epigenetic silencing. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 93: 7114–7119
- Murashige T & Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15:473–97
- Naumova TN, Hayward M & Wagenvoort M (1999) Apomixis and sexuality in diploid and tetraploid accessions of *Brachiaria decumbens*. *Sex Plant Reprod.* 12:43–52
- Nicot N, Chiquet V, Gandon B, Amilhat L, Legeai F, Leroy P, Bernard M & Sourdille P (2004) Study of simple sequence repeat (SSR) markers from wheat expressed sequence tags (ESTs). *Theor. Appl. Genet.* 109(4):800–05
- Nogler G (1984a) Gametophytic apomixis. En: Embryology of Angiosperms, Ed. B Johri, Springer Verlag, Berlin, pág. 475–518
- Nogler G (1984b) Genetics of apospory in apomictic *Ranunculus auricomus*. V. Conclusion. *Bot. Helv.* 92:411–23
- Nogler GA (1982) How to obtain diploid apomictic *Ranunculus auricomus* plants not found in the wild state. *Bot. Helv.* 92:13–22
- Norrmann GA, Quarin CL & Burson BL (1989) Cytogenetics and reproductive behavior of different chromosome races in six *Paspalum* species. *Jour. Hered.* 80:24–28
- Noyes R, Baker R & Mai B (2007) Mendelian segregation for two-factor apomixis in *Erigeron annuus* (Asteraceae). *Heredity* 98:92–8

- 
- Ochogavía AC, Cervigni G, Selva JP, Echenique VC, Pessino SC (2009) Variation in cytosine methylation patterns during ploidy level conversions in *Eragrostis curvula*. *Plant Mol. Biol.* 70:17-29
- Olmedo-Monfil V, Durán-Vicente N, Arteaga-Vázquez M, Demesa-Arevalo E, Autran D, Grimanelli D & Vielle-Calzada J (2009) Control of aposporous gamete formation by a non-cell autonomous small RNA pathway in arabidopsis. 9th International Plant Molecular Biology (IPMB) St. Louis, Missouri.USA
- Ortiz J & S. Pessino. (2002) Apomixis and its potential role in agriculture. *AgBiotechNet* 4:1-4
- 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 genet.* 19:141-47
- Ozias-Akins P & van Dijk P (2007) Mendelian genetics of apomixis in plants. *Annu. Rev. Genet.* 41:509-37
- Ozias-Akins P, Lubbers E, Hanna W & McNay J (1993) Transmission of the apomictic mode of reproduction in *Pennisetum*: co-inheritance of the trait and molecular markers. *Theor. Appl. Genet.* 85:632-8
- Ozias-Akins P, Roche D & Hanna W (1998) Tight clustering and hemizyosity of apomixis-linked molecular markers in *Pennisetum squamulatum* implies genetic control of apospory by divergent locus that may have no allelic form in sexual genotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:5127-32
- Ozkan H, Levy AA & Feldman M (2001) Allopolyploidy-induced rapid genome evolution in the wheat (*Aegilops-Triticum*) group. *Plant Cell* 13:1735-47

- 
- Ozkan H, Levy AA & Feldman M (2002) Rapid differentiation of homoeologous chromosomes in newly-formed allopolyploid wheat, *Isr. J. Plant Sci.* 50:S65–S76
- Paterson AH, Bowers JE & Chapman BA (2004) Ancient polyploidization predating divergence of the cereals, and its consequences for comparative genomics. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 101:9903–08
- Peng JH & Lapitan NLV (2005) Characterization of EST-derived microsatellites in the wheat genome and development of eSSR markers. *Funct. Integr. Genomics* 5:80–96
- Peredo EL, Revilla MA & Arroyo-Garcia R (2006) Assessment of genetic and epigenetic variation in hop plants regenerated from sequential sub-cultures of organogenic calli. *J. Plant Physiol.* 163:1071–79
- Pessino S & Martelotto L (2004) Métodos para el estudio de la expresión de genes. En: *Biología y Mejoramiento Vegetal*. Eds. V Echenique, C Rubinstein y L Mroginski. Editorial de INTA. Parte VII Capítulo 2. Pág. 229–238
- Pessino S & Martelotto L (2006) Genome structure and gene expression in polyploid plants. En: *Floriculture, Ornamentals and Plant Biotechnology: Advances and Topical Issues (1<sup>st</sup> Edition)*, Teixeira da Silva, Global Science Books, London, UK.
- Pessino S, Espinoza F, Martínez EJ, Ortiz JP, Valle E & Quarin CL (2001) Isolation of cDNA clones differentially expressed in flowers of apomictic and sexual *Paspalum notatum*. *Hereditas* 134:35–42

- 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 & Quarín C (1999) The molecular genetics of gametophytic apomixis. *Hereditas* 130:1-11
- Pessino S, Ortiz J, Leblanc O, do Valle C & Hayward M (1997) Identification of a maize linkage group related to apomixis in *Brachiaria*. *Theor. Appl. Genet.* 94:439-44
- Porceddu A, Albertini E, Barcaccia G, Falistocco E & Falcinelli M (2002) Linkage mapping in apomictic and sexual Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.) genotypes using a two way pseudotestcross strategy based on AFLP and SAMPL markers. *Theor. Appl. Genet.* 104:273-80
- Poverene M & 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, pág. 19-38
- Poverene M (1988) Contribución citogenética y quimiosistemática a la taxonomía del pasto llorón, *Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees. Tesis Doctoral, Universidad Nacional del Sur.
- Poverene M, Di Renzo M, & Tiranti I (1987) Poliembrionía en pasto llorón, *Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees. Actas XXI Jornadas Argentinas de Botánica, pág. 71
- Powell W, Machray GC & Provan J (1996) Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends Plant Sci.* 1:215-22
- Pupilli F, Lobombarda P, Caceres M, Quarín C & Arcioni S (2001) The chromosome segment related to apomixis in *Paspalum simplex* is



- homologous to the telomeric region of the long arm of rice chromosome 12. *Mol. Breed.* 8:53–61
- Pupilli F, Martínez E, Busti A, Calderini O, Quarín C & Arcioni S (2004) Comparative mapping reveals partial conservation of synteny at the apomixis locus in *Paspalum* spp. *Mol. Gen. Genomics* 270:539–48
- Quarín C & Bovo OA (1995) Apomictic colchicine-induced tetraploid *Paspalum notatum*, Abstracts of International Conference on Harnessing Apomixis, College Station, Texas, pág. 71
- Quarín C & Hanna WW (1980) Effect of three ploidy levels on meiosis and mode of reproduction in *Paspalum hexastachyum*. *Crop Sci.* 20:69–75
- Quarín C (1992) The nature of apomixis and its origin in Panicoid grasses. *Apomixis Newsletter.* 5:8–15
- Quarín C, Espinoza F, Martinez EJ, Pessino SC & Bovo OA (2001) A rise of ploidy level induces the expression of apomixis in *Paspalum notatum*. *Sex Plant Reprod.* 13:243–49
- Rabeau T, Longly B & Louant B (1986) Unreduced-embryo sac ontogenesis in *Eragrostis curvula*. *Can. J. Bot.* 64:1778–85
- Ramsey J & Schemske DW (2002) Neopolyploidy in flowering plants. *Annu. Rev. Ecol. System.* 33:589–639
- Ravel C, Praud S, Linossier AML, Balfourier MDF, Brunel PDD & Charmet G (2005) Identification of Glu-B1-1 as a candidate gene for the quantity of high-molecular-weight glutenin in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) by means of an association study. *Theor Appl Genet* 112:738–43

- 
- Ravi M, Marimuthu MPA & Siddiqi I (2008) Gamete formation without meiosis in *Arabidopsis*. *Nature* 451:1121–24
- Robinson AJ, Christopher G, Love CG, Batley J, Barker G & Edwards D (2004) Simple sequence repeat marker loci discovery using SSR primer. *Bioinformatics* 20:1475–76
- 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*). *Sex. Plant Reprod.* 13:217–23
- Roche D, Cong P, Chen Z, Hanna W, Gustine D, Sherwood R & Ozias-Akins P (1999) An apospory-specific genomic region is conserved between buffelgrass (*Cenchrus ciliaris* L.) and *Pennisetum squamulatum* Fresen. *Plant J.* 19:203–8
- Rodrigues JCM, Cabral GB, Dusi DMA, Mello LV, Rigden D & Carneiro VTC (2003) Identification of differentially expressed cDNA sequences in ovaries of sexual and apomictic plants of *Brachiaria brizantha*. *Plant Mol. Biol.* 53:745–57
- Rostoks N, Mudie S, Cardle L, Russell J, Ramsay L, Svensson ABJT, Wanamaker AI, Walia H, Hedley EM, Liu H, Close JM, Marshall DF & Waugh R (2005) Genome-wide SNPdiscovery and linkage analysis in barley based on genes responsive to abiotic stress. *Mol. Gen. Genomics* 274:515–27
- Savidan Y (1980) Chromosomal and embryological analyses in sexual X apomictic hybrids of *Panicum maximum* Jacq. *Theor. Appl. Genet.* 57:153–6
- Savidan Y (2000) Apomixis: genetics and breeding. *Plant Breed. Rev.* 18:13–86

- Savidan Y, Grimanelli D, Perotti E & Leblanc O (2008) Means for identifying nucleotide sequences involved in apomixes. Patente N°: 20080155712.
- Sawbridge T, Ong E-K, Binnion C, Emmerling M, McInnes R, Meath K, Nguyen N, Nunan K, O'Neill M, O'Toole F, Rhodes C, Simmonds J, Tian P, Wearne K, Webster T, Winkwort A & Spangenberg G (2003b) Generation and analysis of expressed sequence tags in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) *Plant Sci.* 165:1089–1100
- Sawbridge T, Ong E-K, Binnion C, Emmerling M, Meath K, Nunan K, O'Neill M, O'Toole F, Simmonds J, Wearne K, Winkworth A & Spangenberg G (2003a) Generation and analysis of expressed sequence tags in white clover (*Trifolium repens* L.) *Plant Sci.* 165:1077–1087
- Schmidt ED, Guzzo F, Toonen MA & de Vries SC (1997) A leucin-rich repeat containing receptorlike kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. *Development* 124: 2049–62
- Selva JP (2005) Evaluación de nuevos materiales de *Eragrostis curvula* obtenidos por métodos biotecnológicos con fines de mejoramiento y para estudios básicos. Tesis Doctoral, Universidad Nacional del Sur.
- Shaked H, Kashkush K, Ozcan H, Feldman M & Levy AA (2001) Sequence elimination and cytosine methylation are rapid and reproducible responses of the genome to wide hybridization and allopolyploidy in wheat. *Plant Cell* 13:1749–59
- Sharbel TF, Voigt ML, Corral JM, Thiel T, Varshney A, Kumlehn J, Vogel J & Rotte B (2009) Molecular signatures of apomictic and sexual ovules in the *Boechera holboellii* complex. *The Plant Journal* 58:870–82

- 
- Sherwood RT, Berg CC & Young BA (1994) Inheritance of apospory in buffelgrass. *Crop Science*, 34: 1490-94
- Siena LA, Sartor ME, Espinoza F, Quarín CL & Ortiz JPA (2008) Genetic and embryological evidences of apomixis at the diploid level of *Paspalum rufum* support recurrent auto-polyploidization in the species. *Sex. Plant Reprod.* 21:205-15
- Song K, Lu P, Tang K & Osborn TC (1995) Rapid genome change in synthetic polyploids of *Brassica* and its implications for polyploid evolution. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 92:7719-23
- Sorensen AM, Rouse DT, Clements MA, John P & Perotti E (2009) Description of a fertilization-independent obligate apomictic species: *Corunastylis apostasioides* Fitzg. *Sex Plant Rep.* 22:153-65
- Spangenberg G, Wang Y & Potrykus I (1998) Biotechnology in forage and turf grass improvement. Springer-Verlag, Berlin, Germany
- Spillane C, Curtis MD & Grossniklaus U (2004) Apomixis technology development-virgin births in farmers' fields. *Nat. Biotechnol.* 22(6):687-91
- Stalker H & Wright N (1975) Reproduction of *Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees. *J. Ariz. Acad. Sci.* 10:106-10
- Stein J, Pessino S, Martínez E, Rodríguez M, Siena L, Quarín C & Ortiz J. (2007) A genetic map of tetraploid *Paspalum notatum* Flüggé (bahiagrass) based on single-dose molecular markers. *Mol. Breed.* 20:153-66
- Stein J, Quarín C, Martínez E, Pessino S & Ortiz J (2004) Tetraploid races of *Paspalum notatum* show polysomic inheritance and preferential chromosome pairing around the apospory-controlling locus. *Theor. Appl. Genet.* 109:186-91

- Streetman L (1963) Reproduction of the lovegrass, the genus *Eragrostis*-I. *E. chloromelas* Steud., *E. curvula* (Schrad.) Nees, *E. lehmanniana* Nees and *E. superba* Peyr. *Wrightia* 3:41–51
- Streetman L (1970) Cytogenetics of *Eragrostis*. Proceedings of the First Weeping Lovegrass Symposium, The Samuel Roberts Noble Foundation, Oklahoma, USA, 28 y 29 de Abril.
- Stupar RM, Bhaskar OB, Yandell BS, Rensink WA, Hart AL, Ouyang S, Veilleux RE, Busse JS, Erhardt RJ, Buell CR & Jiang J. (2007) Phenotypic and transcriptomic changes associated with potato autopolyploidization. *Genetics* 176: 2055–67
- Tautz D (1989) Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucl. Acids Res.* 17:6463–71
- Thiel T, Michalek W, Varshney RK & Graner A (2003) Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor. Appl. Genet.* 106:411–22
- Thimm O, Blasing O, Gibon Y, Ángel A, Meyer S, Krüger P, Selbig J, Müller L, Rhee S & Stitt M (2004) MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *The Plant Journal* 37:914–39
- Tóth G, Gaspari Z & Jurka J (2000) Microastellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Res.* 10:967–81
- Udall J & Wendel JF (2006) Polyploidy and crop improvement. *Crop Sci.* 46:S3–S14
- Usadel B, Ángel A, Thimm O, Redestig H, Blaesing O, Palacios-Rojas N, Selbig J, Hannemann J, Piques MC, Steinhauser D, Scheible WR, Gibon Y,

- Morcuende R, Weicht D, Meyer S & Stitt M (2005) Extension of the visualization tool MapMan to allow statistical analysis of arrays, display of corresponding genes and comparison with known responses. *Plant Physiology* 138:1195–1204
- Van der Hoevent R, Ronning C, Giovannoni J, Martin G & Tanksley S (2002) Deductions about the number, organization, and evolution of genes in the tomato genome based on analysis of a large expressed sequence tag collection and selective genomic sequencing. *Plant Cell* 14:1441–56
- van Dijk P (2003) Ecological and evolutionary opportunities of apomixis: insights from *Taraxacum* and *Chondrilla*. *Phil. Trans. Royal Soc. London* 358:1113–21
- 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 Mol. Biol.* 32:1085–92
- 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). *Theor. Appl. Genet.* 108:725–32
- Voigt P & Bashaw E (1972) Apomixis and sexuality in *Eragrostis curvula*. *Crop Sci.* 12:843–7
- Voigt P & Bashaw E (1973) Facultative apomixis in *Eragrostis curvula*. *Agron. Abs.* 65:16
- Voigt P & Bashaw E (1976) Facultative apomixis in *Eragrostis curvula*. *Crop Sci.* 16:803–5

- 
- Voigt P & Burson B (1983) Breeding of apomictic *Eragrostis curvula*. Proceedings of the XIV International Grassland Congress, Lexington, Kentucky, June 15-24, 1981
- Voigt P & Burson B (1992) Apomixis in *Eragrostis*. Proceeding Apomixis Workshop, Atlanta, USA, USDA-ARS, ARS-104, pág. 8-11
- Voigt P (1971) Discovery of sexuality in *Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees. *Crop Sci.* 11:424-5
- Voigt P, & Oaks W (1985) Lovegrasses, dropseeds, and other desert and subtropical grasses. *In: Range plant improvement in western North America: Proceedings of a symposium at the annual meeting of the Society for Range Management, February 14, 1985, Salt Lake City, Utah. Society for Range Management, Denver, Colorado. p. 70-79.*
- Voigt P, Burson B & Sherman R (1992) Mode of reproduction in cytotypes of lehmann lovegrass. *Crop Sci.* 32:118-21
- Voigt P, Rethman N & Poverene M (2004) Lovegrasses. *En: Warm-Season (C4) Grasses, Agronomy Monograph no. 45, American Society of Agronomy, USA.*
- Vorster T & Liebenberg H (1984) Classification of embryo sacs in the *Eragrostis* complex. *Bothalia* 15:167-74
- Wang JP, Lindsay BG, Cui L, Wall PK, Marion J, Zhang J & de Pamphilis CW (2005) Gene capture prediction and overlap estimation in EST sequencing from one or multiple libraries. *BMC Bioinformatics* 6:300
- Wang JP, Lindsay BG, Leebens-Mack J, Cui L, Wall K, Miller WC & de Pamphilis CW (2004) EST clustering error evaluation and correction. *Bioinformatics* 20:2973-84

- 
- Watson L & Dallwitz MJ (1992) The Grass Genera of the World. CAB International 1038pp.
- Wendel JF (2000) Genome evolution in poliploids. *Plant Mol. Biol.* 42:225-49
- Xiong LZ, Xu CG, Shagai Maroof MA & Zhang Q (1999) Patterns of cytosine methylation in an elite rice hybrid and its parental genotypes, detected by a methylation-sensitive amplification polymorphism technique. *Mol Gen Genet* 261:439-46
- Xu SS, Khan K, Klindworth DL, Faris JD & Nygar G (2004) Chromosomal location of genes for novel glutenin subunits and gliadins in wild emmer wheat (*Triticum turgidum* L. var. *dicoccoides*). *Theor. Appl. Genet.* 108:1221-28
- Yeho H-H & Watson L (1986) Taxonomic patterns in protein aminoacid profiles of grass leaves and caryopses. En: Grass system and evolution. Eds. TR Soderstrom, KW Hilu, CS Campbell, ME Barkworth. Smithsonian Institution Press, Washington, DC, pp 88-96
- Yu J, Sun Q, La Rota M, Edwards H, Tefera H & Sorrells M (2006) Expressed sequence tag analysis in *tef* [*Eragrostis tef* (Zucc.) Trotter]. *Genome* 49:365-72
- Yu J, Wang J, Lin W, Li SG & Li H (2005) The genomes of *Oryza sativa*: a history of duplications. *PLoS Biol.* 3:e38
- Zappacosta D (2009) Contribución al conocimiento de la taxonomía y del modo reproductivo del pasto llorón *Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees. Tesis Doctoral, Universidad Nacional del Sur.



Záveský L, Jarolímová V & Stěpánek J (2007) Apomixis in *Taraxacum paludosum* (section *Palustria*, Asteraceae): Recombinations of apomixis elements in intersectional crosses. *Pl. Syst. Evol.* 265:147-63

Zhang Z, Schwartz S, Wagner L & Miller W (2000) A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J. Comput. Biol.* 7: 203-14