



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTORADO EN BIOLOGÍA

LOCALIZACIÓN GENÓMICA DE REGIONES
ASOCIADAS A LA DIPLOSPORIA A TRAVÉS DE
MAPEO GENÉTICO DE ALTA DENSIDAD Y
DETERMINACIÓN DE LA HERENCIA DEL
CARÁCTER EN *ERAGROSTIS CURVULA*

MAURO SEBASTIÁN MEIER

BAHIA BLANCA

ARGENTINA

2019

Prefacio

Esta tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Biología, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal, dependiente del Centro de Recursos Naturales Renovables de la Zona Semiárida (CONICET) y en el Laboratorio de Genética del Departamento de Agronomía de la Universidad Nacional del Sur, durante el período comprendido entre marzo de 2007 y diciembre de 2018, bajo la dirección de la Dra. Viviana Echenique, Profesora Titular D.E. de las Cátedras de Genética General y Biotecnología Agrícola del Departamento de Agronomía de la Universidad Nacional del Sur.

Mauro Sebastián Meier

26 de Marzo de 2019

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

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

Agradecimientos

A mi directora de tesis, Viviana Echenique, por darme la gran oportunidad de trabajar en su grupo de trabajo, brindarme sus conocimientos en mi formación como investigador.

A Diego Zappacosta, por todos los conocimientos brindados, por su ayuda y trabajo en equipo.

A todo el equipo de trabajo (becarilos, técnicos e investigadores) del Laboratorio de Biotecnología y Genética Vegetal del CERZOS, por sus aportes y colaboración en este trabajo de equipo.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por haberme otorgado las Becas de Posgrado Tipo I (1° de abril de 2007- 31 de marzo de 2010) y Tipo II (1° de abril de 2010- 31 de agosto de 2011) para realizar mis estudios de doctorado.

A Luis Hernández e Ivone Lindström, por haberme dado la posibilidad de trabajar en su laboratorio, gracias por haber sido tan atentos.

A Juan Pablo Ortiz y Juliana Stein, por sus conocimientos brindados para la elaboración del mapa.

A mis padres, Marta y Oscar, 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 mi hermano Ariel, por todo el apoyo que me brinda siempre. Gracias por estar.

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

A Soledad, 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 mis hijo Mateo y Pia, por darme amor.

Mauro.

Indice

Prefacio	3
Agradecimientos	4
Indice	5
Resumen	8
Abstract	10
I-Introducción	11
I.1. Mapeo Genético.....	11
I.2- <i>Eragrostis curvula</i> (Pasto llorón).....	15
I.3- Apomixis en las Plantas.....	18
I.4- Control genético de la apomixis – Herencia.....	22
I.5- Apomixis en <i>E. curvula</i>	24
I.6- Importancia de la apomixis para la agricultura.....	27
I.7- Relevancia del tema.....	28
I.8- Trayectoria del grupo de trabajo en pasto llorón y apomixis.....	28
II- Hipótesis y Objetivos	30
II.1- Hipótesis.....	30
II.2- Objetivo General.....	30
II.3- Objetivos Específicos	30

III- Materiales y Métodos	31
III.1- Material vegetal.....	31
III.1.1- Genotipos.....	31
III.1.2- Cruzamientos realizados.....	31
III.1.3- Siembra de las semillas y establecimiento de las plantas F ₁	32
III.1.4- Estimación del tamaño del genoma de lo parentales y determinación del nivel de ploidía de las plantas obtenidas.....	34
III.2- Observaciones citoembriológicas.....	34
III.3- Extracción de ADN	36
III.4- Polimorfismos en el largo de los fragmentos de amplificación (AFLP).....	36
III.5- Microsatélites (EST-SSRs).....	37
III.6- Genotipado por Secuenciación (GBS).....	37
III.6.1- Extracción de ADN.....	37
III.6.2- Selección de individuos y diseño de muestras para GBS.....	38
III.6.3- Elección de la enzima de restricción.....	39
III.6.4- Construcción y secuenciado de las librerías de GBS.....	40
III.6.5- Filtrado de datos de las secuencias crudas.....	41
III.6.6- Análisis de la segregación de los marcadores SNP.....	42
III.7- Construcción de los mapas de ligamiento.....	42
III.8- Análisis de sintenia.....	43

IV- Resultados	44
IV.1- Cruzamientos realizados y semillas F1 obtenidas.....	44
IV.2 - Observaciones citoembriológicas	48
IV.3- Marcadores Moleculares.....	51
IV.3.1 - Marcadores AFLP.....	51
IV.3.2 - Marcadores EST-SSR.....	51
IV.3.3 - GBS y Marcadores SNP.....	52
IV.3.3.1- Elección de la enzima de corte.....	52
IV.3.3.2- Análisis de secuencias Illumina.....	55
IV.3.3.3- Filtrado de los SNPs.....	57
IV.4 – Mapa de ligamiento.....	58
IV.5 – Sintenia.....	78
IV.6-Tamaño del genoma.....	83
V- Discusión	84
VI – Conclusiones	90
VII – Bibliografía	92
VIII – Material Suplementario	114
IX - Publicaciones generadas durante el desarrollo de la tesis	129
X – Financiamiento	134

Resumen

Eragrostis curvula (Schrad.) Nees, pasto llorón, es una gramínea forrajera, de origen sudafricano, extensamente cultivada en la zona semiárida templada de Argentina. El pasto llorón es un complejo polimórfico donde la mayoría de sus miembros se reproducen por apomixis diplospórica, tipo de reproducción asexual a través de semillas, que conduce a la generación de progenies genéticamente idénticas a la planta madre. Los pasos de la apomixis implican evitar la meiosis para generar un saco embrionario no reducido (apomeiosis), desarrollo del embrión sin fecundación de la ovocélula (partenogénesis) y formación de endospermo viable de una manera dependiente o independiente de la fertilización de los núcleos polares.

El objetivo general de esta tesis es estudiar la herencia de la diplosporía en *Eragrostis curvula* y localizar la/s región/es condicionantes de la misma a través de la obtención de una población de mapeo a nivel tetraploide, segregante para el modo reproductivo, y de la construcción de un mapa genético de alta densidad, basado en marcadores moleculares.

El primer paso de trabajo de esta tesis fue obtener una población de mapeo tetraploide proveniente del cruzamiento entre un genotipo sexual (OTA-S, accesión PI574506 del USDA) con un genotipo apomíctico facultativo (cv. Don Walter-INTA). La caracterización fenotípica de los híbridos F₁, realizada mediante análisis citoembrológicos, dio como resultado una proporción 1:1 de plantas apomícticas vs. sexuales (34:27, Chi² = 0,37), lo que concuerda con un modelo de herencia genética de un solo factor dominante.

La población segregante para este carácter permitió construir el primer mapa de ligamiento saturado de *E. curvula* a nivel tetraploide utilizando marcadores moleculares tradicionales (AFLP y SSR) y derivados de secuenciación (GBS-SNP) en el cual se identificó el locus que controla la diplosporía. Se construyeron mapas de ligamiento para cada uno de los parentales por separado con 1.114 marcadores para OTA-S y 2.019 para Don Walter, construyendo en ambos 40 grupos de ligamiento, lo que concuerda con el número de

cromosomas al nivel tetraploide. El largo total del mapa de OTA-S fue de 1.335 cM, con una densidad promedio de marcadores 1,22 cM/marcador. La longitud del mapa de Don Walter fue de 1.976,2 cM, con una densidad de promedio de marcadores de 0,98 cM/marcador. El locus responsable de la diplosporía fue mapeado en el grupo de ligamiento 3 de Don Walter.

Mediante análisis de sintenia, comparando las secuencias de los marcadores GBS-SNP con genomas completos de especies relacionadas (*Oropetium thomaeum*, *Cenchrus americanus*, *Setaria italica*, *Zea mays*, *Panicum hallii* y *Oryza sativa*) se logró establecer cuáles de los grupos de ligamiento de cada parental corresponderían a los grupos de homólogos / homeólogos.

El mapa de ligamiento genético que se logró alcanzar en esta tesis es el primer mapa de este tipo para *E. curvula*, es el mapa más saturado para el género *Eragrostis* y uno de los mapas más saturados para entre las gramíneas poliploides forrajeras.

Abstract

Eragrostis curvula (Schrad.) Nees (weeping lovegrass) is an apomictic species native to Southern Africa that is used as forage grass in semiarid regions of Argentina. Apomixis is a mechanism for clonal propagation through seeds that involves the avoidance of meiosis to generate an unreduced embryo sac (apomeiosis), parthenogenesis, and viable endosperm formation by in a fertilization-dependent or -independent manner. In this thesis, the first saturated linkage map of tetraploid *E. curvula* is informed, using both traditional (AFLP and SSR) and high-throughput molecular markers (GBS-SNP), and the locus controlling diplospory is identified. Also syntenic relationships with genomes of other grass species are established to identify homologs/homeologs groups. A tetraploid mapping population was obtained from the cross between a sexual genotype (OTA-S) with a facultative apomictic individual of cv. Don Walter. Phenotypic characterization of F₁ hybrids by cytoembryological analysis yielded a 1:1 ratio of apomictic vs. sexual plants (34:27, $\chi^2 = 0.37$), which agrees with the model of inheritance of a single dominant genetic factor. The final number of markers was 1,114 for OTA-S and 2,019 for Don Walter. These markers were distributed into 40 linkage groups per parental genotype, which is consistent with the number of *E. curvula* chromosomes (containing 2 to 123 markers per linkage group). The total length of the OTA-S map was 1,335 cM, with an average marker density of 1.22 cM per marker. The Don Walter map was 1,976.2 cM, with an average marker density of 0.98 cM/marker. The locus responsible for diplospory was mapped on Don Walter linkage group 3. Syntenic analysis, comparing GBS-SNP markers sequences with complete genomes of related species (*Oropetium thomaeum*, *Cenchrus americanus*, *Setaria italica*, *Zea mays*, *Panicum hallii* y *Oryza sativa*) allowed to establish the homologs/homeologs groups for each linkage map and the relationships between both linkage maps. The genetic linkage maps reported in this study, the first such map for *E. curvula*, is the most saturated map for the genus *Eragrostis* and one of the most saturated maps for a polyploid forage grass species.

I-Introducción

I.1. Mapeo Genético

El mapeo genético consiste en determinar la posición de un determinado número de loci a lo largo de los cromosomas y de esa manera ordenarlos unos en relación a otros. El ordenamiento se basa en la estimación de la frecuencia de recombinación que ocurre entre cromosomas homólogos durante la profase I de la meiosis, eventos que se evidencian a través de la formación de quiasmas (Collard et al., 2005). La presencia de quiasmas entre cromosomas homólogos indica que ha ocurrido un intercambio de material genético. Se dice que un cromosoma que presenta un solo quiasma tiene en promedio una longitud de 50 centiMorgan (cM). La resolución de un mapa y la habilidad para determinar el orden de los marcadores en el mismo dependen, entre otras cosas, del tamaño de la población de mapeo ya que cuanto más grande es la población es posible obtener mayor resolución (mayor cantidad de eventos de recombinación) y de la cantidad de marcadores moleculares utilizados (Collard et al., 2005). El tamaño de las poblaciones en estudios preliminares se encuentra generalmente en el rango de 50 a 250 individuos (Mohan et al., 1997; Xu, 2010). En la práctica, el tamaño de la población está limitado por el número de semillas del que se dispone o por el número de muestras que es razonable o capaz de procesar (Young, 1994).

La construcción de un mapa de ligamiento requiere de tres requisitos fundamentales, una población segregante, es decir una población derivada de un cruzamiento, una manera de genotipar la misma y una manera de determinar el fenotipo (Semagn et al., 2007).

En relación a la población, el primer paso es la selección de los parentales. Para ello debe tenerse en cuenta el objetivo del proyecto, por ejemplo, generar un mapa marco de una especie, identificar caracteres cualitativos (QTLs), encontrar loci de resistencia a enfermedades u otros. Una vez establecido el objetivo, se realiza la elección de los parentales para generar el cruzamiento (contrastantes en el carácter a mapear), se determina con qué clase de población trabajar y que generaciones se utilizarán para el análisis fenotípico y genotípico (Young, 1994; Collard et al., 2005).

En relación al genotipado, los marcadores moleculares, especialmente los de última generación, son muy apropiados. Los marcadores genéticos derivan de pequeñas regiones de ADN que muestran polimorfismos de secuencia entre individuos dentro de una especie, que pueden provenir de modificaciones en la secuencia de ADN o de la longitud de fragmentos por inserciones, deleciones o acumulación de copias (secuencias repetitivas). Estos polimorfismos son ubicuos y abundantes en todos los organismos vivos y segregan, la mayoría de las veces, de manera mendeliana (Collard et al., 2005). Actualmente, los principales tipos de marcadores son los basados en la técnica de PCR o en técnicas de secuenciación de última generación (NGS) (Kumar et al., 2012). En el primer caso se trata de observar cambios en regiones amplificadas de ADN (ej. AFLPs, SSR o microsatélites) utilizando distintos criterios para la elección de los cebadores (Gupta, et al., 1999). En el segundo caso se utilizan sobre todo polimorfismos de nucleótido simple (SNP, Single Nucleotide Polymorphism) que son variaciones en la secuencia de ADN que afectan a una sola base de una secuencia del genoma. Una de estas variaciones debe darse al menos en un 1 % de la población para ser considerada como un SNP (Rafalski, 2002). Si no se llega al 1 % no se considera SNP y sí una mutación puntual. Otros marcadores que también pueden obtenerse por secuenciación son inserciones-deleciones (InDels) (Ren et al., 2012; Moghaddam et al., 2014; Ratan et al., 2015; Steglich y Nubel, 2017).

Diferentes marcadores moleculares se han utilizado para la construcción de mapas de ligamiento en numerosas especies, generando marcos genéticos para el estudio de caracteres simples y complejos (Lacape et al., 2001; Stein et al., 2007; Jones et al., 2013; Clarke et al., 2016). Además, el desarrollo de mapas de ligamiento ha hecho posible la disección y el etiquetado de genes de caracteres importantes en distintos cultivos. Actualmente los marcadores genéticos se utilizan en investigación básica como en mejoramiento vegetal, para la caracterización de germoplasma, aislamiento de genes, estudios de diversidad poblacional, selección e introgresión asistida, pureza genética de semillas y en la protección de variedades (Remund et al., 2001; Jorasch, 2005; Collard y Mackill, 2008; Procunier et al., 2009; Xu, 2010).

Los SNP son muy abundantes en los genomas y, aunque pueden estar tanto en regiones codificantes como en regiones intrónicas o intergénicas, los SNP que afectan a las regiones

codificantes son los que más impacto tienen sobre la función de una proteína (si bien podrían no alterar la secuencia aminoacídica como consecuencia de la degeneración del código genético). Los SNP se consideran una forma de mutación puntual que ha sido lo suficientemente exitosa evolutivamente para fijarse en una parte significativa de la población de una especie y existen marcadores SNP que detectan el cambio de ese único nucleótido (Rafalski, 2002).

El desarrollo de marcadores moleculares, su imputación a los individuos de la población de mapeo y el análisis de su segregación ha sido tradicionalmente un proceso de alto costo con muchas etapas laboriosas y que consumen mucho tiempo. La aparición de microarreglos de SNPs ha reducido el tiempo y los esfuerzos, pero no existen para muchos cultivos. Como el desarrollo de SNPs requiere información preliminar de secuencias, su aplicación se ve restringida a los cultivos más estudiados. Sin embargo, con el pasar de los años los avances de las técnicas de secuenciación de última generación (NGS) permitieron disminuir considerablemente los costos y ampliar el potencial de datos generados (Kumar et al., 2012). Esto permitió el uso de técnicas de secuenciación como una herramienta para la obtención de marcadores moleculares en un set limitado de individuos, como parentales de poblaciones o progenies seleccionados.

En los últimos años surgió una estrategia denominada genotipado por secuenciación (GBS), que utiliza el potencial de las NGS pero repartido en muchos individuos (Elshire et al., 2011; Poland et al., 2012). La técnica de GBS utiliza el concepto de representación reducida del genoma, que se logra usualmente mediante la utilización de enzimas de restricción que generan una serie de fragmentos comparables entre los individuos de la población. Luego, mediante el uso de secuencias cortas características (código de barras, barcode) se marcan los ADNs provenientes de cada uno de los individuos, se agrupan en un pool y se secuencian en conjunto. Esta técnica ha permitido lograr mapas de ligamiento de alta densidad a bajo costo en cebada, trigo, arroz y alfalfa, entre otros (Poland et al., 2012; Spindel et al., 2013; Li et al., 2014.). Una ventaja adicional de trabajar con SNPs generados por GBS es que luego de la elaboración del mapa de ligamiento es posible chequear el orden de los marcadores con genomas secuenciados de la misma especie o de especies relacionadas para establecer si el orden de los marcadores es conservado o no. Esto se

puede lograr porque se conoce la secuencia origen del SNP y mediante genómica comparativa se puede establecer la sintenia. Los análisis de genética comparativa han demostrado que el contenido y orden de los genes es altamente conservado entre diferentes especies dentro de la familia de las gramíneas, tanto a nivel de mapa como a nivel de megabases (Devos y Gale, 1997). La integración de los mapas de arroz, mijo cola de zorro, caña de azúcar, sorgo, maíz y las triticeas mostraron que algunos rearrreglos cromosómicos caracterizan a los grupos taxonómicos, mientras que surgieron durante o después de la especiación. Por ello puede utilizarse esta información para contribuir al análisis de especies menos investigadas a este nivel. Recientes estudios del grupo de trabajo indican que el 79 % del genoma de *E. curvula* presenta homología con los genomas de *Z. mays* y *S. bicolor* (Carballo, comunicación personal). Estos estudios también demostraron que el genoma de *O. thomaeum*, el más pequeño y más cercano disponible con un elevado nivel de contiguidad, perteneciente a la tribu Chloridoideae, fue cubierto casi completamente (96 %) por los contiguos del genoma de *E. curvula* (José Carballo, comunicación personal).

Como se trabaja con un gran número de marcadores, los análisis se realizan con la ayuda de programas informáticos desarrollados para este propósito (Dwivedi et al., 2007). Existen varios programas informáticos, pero los más utilizados son: MapMaker/EXP (Lander et al., 1987), JoinMap (Stam, 1993), Carthagene (de Givry et al., 2005), GQMol (Cruz y Schuster, 2004), Tassel 5.0 (www.maizegenetics.net/tassel, 2018), paquete Onemap de R (Margarido et al. <https://cran.r-project.org/web/packages/onemap>, 2007), entre otros.

La construcción de mapas de ligamiento en especies poliploides resulta más complicada que en diploides. El mapeo en poliploides presenta problemas característicos respecto a diploides, ya que los métodos estadísticos para el estudio de la segregación son mucho más complejos y se necesitan poblaciones de mapeo con mayor cantidad de individuos para obtener estimaciones fiables de distancia genética (Aversano et al., 2012). La herencia de las especies autoploiploides es polisómica, es decir, los cromosomas homólogos dentro de un mismo grupo se aparean al azar durante la meiosis. Por otro lado, las especies aloploiploides presentan herencia disómica y por ello su genética es similar a la de los diploides, excepto por los múltiples genomas que los componen. A *E. curvula* se lo considera una especie aloploiploide, aunque se ha registrado formación multivalente en

algunos genotipos poliploides, como Tanganyika y Don Eduardo (Poverene, 1988; Vorster y Liebenberg, 1977).

Recientemente, Worthington y col. (2016) desarrollaron los primeros mapas de ligamiento saturados de una especie de apomíctica poliploide utilizando marcadores SNP generados por GBS. Estos mapas saturados luego se utilizaron para evaluar la sintenia con mijo cola de zorro y para identificar los marcadores flanqueantes vinculados a la región genómica específica de aposporia (ASGR).

El último requisito y un punto importante a tener en cuenta, si es que el mapa de ligamiento se utilizará para estudios de asociación con caracteres de importancia agronómica (Ej. rendimiento, resistencia a enfermedades, etc.), es que la población de mapeo debe ser evaluada fenotípicamente, es decir, se deben recopilar datos de rasgos morfológicos, fisiológicos o de comportamiento (Collard, 2005). La evaluación fenotípica dependerá del rasgo a evaluar y del momento fenológico donde se quiere hacer la medición. En el caso particular de la apomixis, hay distintas técnicas disponibles que permiten la caracterización cuali o cuantitativa del carácter y son descritas al final del ítem I.3.

I.2- *Eragrostis curvula* (Pasto llorón)

Eragrostis Wolf es uno de los géneros más diversos de la familia Poaceae. Comprende alrededor de 350 especies y es el género más representado en las Eragrostideae, una tribu cosmopolita compuesta por 80 géneros y alrededor de 1.000 especies distribuidas principalmente en regiones tropicales y templado-cálidas de todo el mundo. La tribu no posee una agrupación natural sino que fue armada por conveniencia y *Eragrostis* en sí mismo es un grupo polifilético. La naturaleza polifilética de *Eragrostis* fue confirmada por análisis de secuencias conservadas, ITS y trnL-F (Roodt-Wilding y Spies, 2006). La característica del género es una panoja con numerosas espiguillas con lemas enteras y glabras. Todas las especies de *Eragrostis*, excepto *E. walteri* (Voigt et al., 2004), poseen anatomía tipo C4 que les permite una mayor eficiencia de fotosíntesis en condiciones de alta temperatura. La mayor concentración de especies se produce en Sudáfrica, de donde proviene el pasto llorón (*Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees). Existen varias especies de interés económico, entre las que sobresale *E. curvula* (forrajera), *E. tef* (alimentación

humana y forraje) y algunas que integran pastizales como *E. chloromelas* y *E. lehmanniana*, estas últimas difíciles de separar de *E. curvula* debido a la existencia de híbridos con características intermedias.

El pasto llorón (Figura 1) se ha distribuido por todo el mundo por sus características como forrajera y como fijadora de médanos en ambientes áridos y de suelos arenosos. En Argentina es extensamente cultivada como forrajera en la zona semiárida templada del país, donde abarca una superficie superior a las 800.000 has (INDEC 2002). Las principales cualidades de esta gramínea son su extraordinaria rusticidad, su capacidad para prosperar en suelos pobres en fertilidad y su aptitud para consolidar suelos erosionables de textura suelta.

El origen de los cultivares de pasto llorón es difícil de determinar, ya que casi todos provienen de selecciones practicadas sobre materiales nativos (Fernández et al., 1991). El INTA ha realizado numerosos estudios técnicos y comparativos de variedades, principalmente en las EEA Anguil y San Luis, donde se reunieron colecciones de más de 70 biotipos introducidos de pasto llorón, a partir de los cuales se seleccionaron los cultivares argentinos (Fernández et al., 1991; Stritzler y Petruzzi, 2000; Bavera y Peñafort, 2005; Torres Carbonell y Marinissen, 2010).

E. curvula incluye genotipos de diferente ploidía (desde 2X hasta 8X, con $X = 10$), donde los diploides son raros en la naturaleza, siendo la mayoría poliploides, existiendo además formas aneuploides. Los diploides se reproducen sexualmente y son autoincompatibles (necesitan polinización cruzada), mientras que los poliploides se reproducen por apomixis y son autocompatibles. Aunque la mayoría de las colecciones realizadas en Sudáfrica están constituidas por materiales apomícticos obligados, también existen unos pocos facultativos (Brix, 1974; Vorster y Liebenberg, 1977). Tetraploides sexuales no han sido encontrados en la naturaleza y solo se conoce un genotipo obtenido experimentalmente del cruzamiento entre dos genotipos diploides (OTA-S, USDA). Los materiales par-poliploides parecen ser mucho más abundantes que los impar-poliploides en el complejo *E. curvula* (Poverene, 1988). La persistencia de los impar-poliploides y aneuploides se debe a la reproducción

apomictica, pero la inestabilidad meiótica que los caracteriza necesariamente debe representar una desventaja adaptativa (Poverene y Curvetto, 1991).



Figura1. A) Detalle de una panoja, B) de una espiguilla y C) de plantas de pasto llorón

El pequeño tamaño de los cromosomas (tamaño medio de 2 a 3 μm), característico de las Eragrostoideas, y la dificultad para obtener preparados suficientemente claros son las causas de que ningún trabajo citológico sobre pasto llorón presente descripciones de cariotipo. Los resultados obtenidos por Poverene (1988) analizando meiosis en anteras de pasto llorón concordaron con las observaciones de Streetman (1970) y Vorster y Liebenberg (1977) en que las meiosis fueron regulares en plantas con bajo nivel de ploidía, mientras que hubo una tendencia a meiosis anormales en los altamente poliploides. En las accesiones tetraploides, la presencia de multivalentes demuestra que existe al menos una homología parcial u homeología entre genomas, pero la mayor parte de los cromosomas se aparean en forma bivalente. Estudios en *E. tef*, especie del genero más estudiada, indican que también es un alotetraploide, vinculado a *E. pilosa* y *E. heterómera*, aunque *E. curvula* puede haber participado en la evolución de *tef* (Ingram y Doyle, 2003; Bekele y Lester, 1981). La constitución alotetraploide está asociada a una mayor capacidad de adaptación y a un incremento en la aptitud biológica comparado con sus diploides progenitores (Leitch y Leitch, 2008).

I.3- Apomixis en Plantas

La apomixis se define como la formación asexual de semilla a partir de tejidos maternos del óvulo, evitando los procesos de meiosis y fertilización, dando lugar a descendientes idénticos a la planta madre (Nogler, 1984; Koltunow, 1993; Tucker y Koltunow, 2009). Aunque a veces se la considera una curiosidad botánica, la apomixis se ha encontrado en más de 400 especies de angiospermas.

Las especies apomícticas han desarrollado mecanismos para evitar las vías sexuales, lo que implica la formación de gametofitos funcionales sin meiosis (apomeiosis), la formación de embriones sin fertilización (partenogénesis) y la formación de un endospermo funcional (Figura 2). Este último puede ocurrir de forma completamente autónoma en algunas especies, pero en otros casos es necesaria la fertilización (Koltunow y Grossniklaus, 2003).

La distribución de la apomixis en las angiospermas no es homogénea, ya que el 75 % de las especies que tienen este modo reproductivo pertenecen a tres familias: Asteraceae, Rosaceae y Poaceae, grupos que colectivamente constituyen sólo el 10 % de las plantas con flor. Algunos autores han postulado que este patrón de distribución puede reflejar la predisposición de cierto grupo de plantas a experimentar los cambios de desarrollo y genéticos que caracterizan a la apomixis (Bicknell y Koltunow, 2004). Existe coincidencia en considerar que la apomixis ha evolucionado varias veces en forma independiente desde ancestros sexuales y puede ser vista como una modificación del programa de reproducción sexual (Hörandl y Hojsgaard, 2012). Este origen polifilético hace que la apomixis se estudie en cada especie en particular y que los genes y mecanismos involucrados en su expresión y regulación sean diversos (Crane, 2001).

Existe una gran diversidad en los mecanismos de formación de una semilla apomíctica. En la figura 2, se pueden apreciar los principales modelos comparados con el modelo típico de origen de una semilla sexual (tipo *Polygonum*). Estudios recientes indican que los distintos mecanismos apomícticos están presentes en los siguientes números para los diferentes tipos de apomixis: la embriogénesis adventicia ha sido reportada en 148 géneros, la aposporia en

110 y la diplosporía en 68 (Hojsgaard et al., 2014). A los dos últimos mecanismos se los clasifica como apomixis gametofítica (Figura 2).

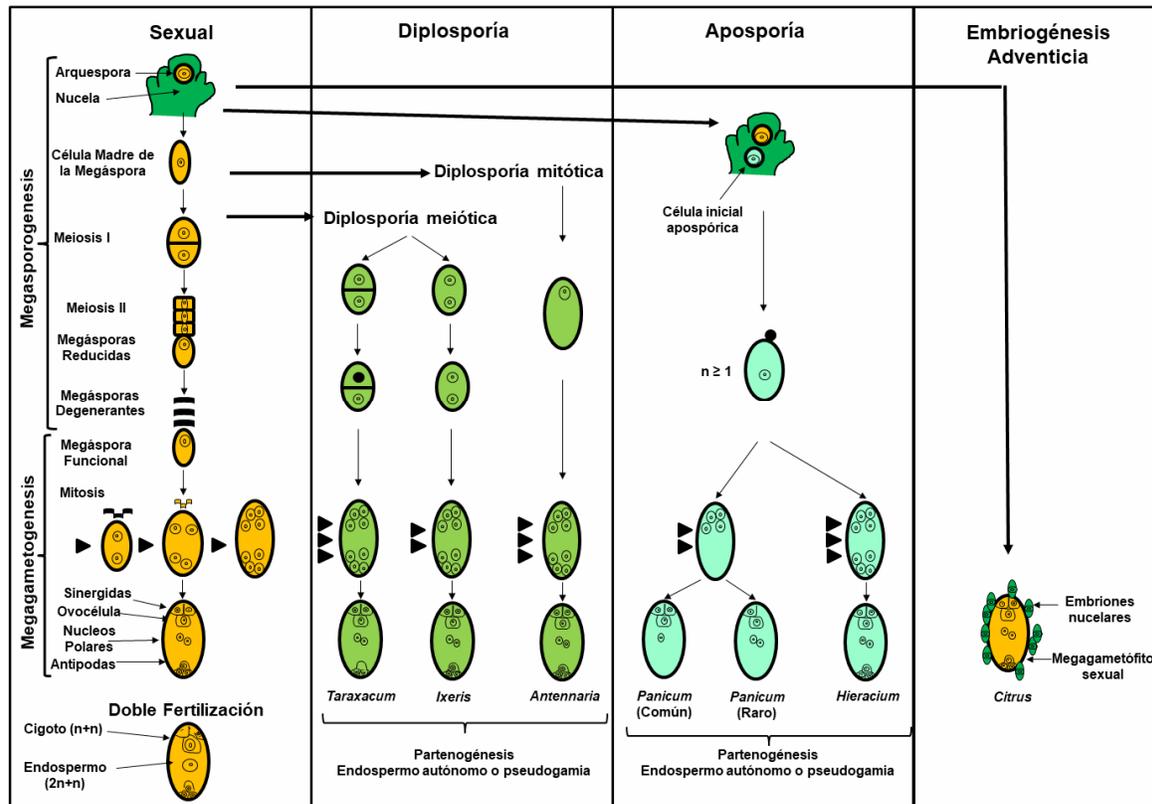


Figura 2. Mecanismos de apomixis (diplosporía, aposporía y embriogénesis adventicia) comparados con los eventos de la reproducción sexual de plantas (Adaptado de Koltunow, 1993).

En todos los mecanismos de apomixis conocidos y en todos los genotipos estudiados en profundidad se ha observado en la gran mayoría algún grado de sexualidad remanente en las plantas apomícticas, por lo que se las debería considerar facultativas. Verdaderos apomícticos obligados son los que forman sólo semillas apomícticas y son muy raros en la naturaleza (Asker y Jerling, 1992).

A pesar de su amplia distribución en las plantas con flor el carácter apomixis no está presente en muchas especies de interés agronómico, a excepción de varias gramíneas forrajeras (Bicknell y Koltunow, 2004). Esto ha llevado a que la mayoría de los estudios

genéticos sobre el mismo deban ser realizados en especies silvestres altamente heterocigotas, generalmente poliploides y poco caracterizadas genéticamente.

Existe una relación estrecha entre la apomixis y la poliploidía, ya que la manifestación de la misma depende fuertemente del nivel de ploidía, tanto que los genotipos diploides (por ejemplo en pasto llorón $2n=2x=20$) son generalmente sexuales y los correspondientes poliploides ($2n=4x=40$ o mayores) son apomícticos (Asker y Jerling, 1992; Savidan, 2000). Sin embargo, la apomixis es común en plantas diploides con embriogénesis adventicia, tales como *Citrus*, *Nothoscordum*, *Sarcococca* y *Euphorbia* (Gustafsson, 1946). La descripción de algunos diploides con apomixis gametofítica parece ser la excepción a la regla y podemos encontrar algunos ejemplos de ello en especies de los géneros *Boechera* (Kantama et al., 2007), *Paspalum* (Norrman et al., 1989; Siena et al., 2008; Delgado et al., 2014), *Potentilla* (Asker y Jerling, 1992) y *Brachiaria* (Naumova et al., 1999).

Se ha observado que generalmente la hibridación y la poliploidía representan dos procesos importantes en la evolución de la apomixis en las angiospermas. Carman (1997) propuso la “teoría de la hibridación” que indica que la hibridación de dos especies con diferentes caracteres reproductivos puede contribuir a la inducción de la apomixis. El híbrido contiene dos sets de genes parentales que están involucrados en el desarrollo del saco embrionario y la embriogénesis. La expresión asincrónica de estos genes duplicados lleva a la iniciación de procesos embriológicos en lugares y momentos aberrantes, produciéndose de esta manera cambios embriológicos que dirigen los procesos reproductivos de sexual a apomíctico.

En el género *Paspalum* la poliploidía parece ser un prerequisite para la expresión efectiva de la apomixis (Quarin y Hanna 1980; Quarin et al., 2001), sin embargo no necesariamente está acompañada de hibridación. El apoyo a estas afirmaciones proviene de estudios citogenéticos en varias especies poliploides, de análisis de segregación llevados a cabo en especies tetraploides apomícticas y de la inducción de tetraploides apomícticos sintéticos. Estudios citogenéticos han revelado que una alta proporción de cromosomas forman asociaciones multivalentes en apomícticos, sugiriendo un origen autopoliploide (Norrman

et al., 1989; Hojsgaard et al., 2008). Análisis genéticos han revelado herencia tetrasómica en tetraploides apomícticos, lo cual también es típico de autopolioides (Pupilli et al., 1997; Stein et al., 2004). En adición, autotetraploides obtenidos por duplicación cromosómica de diploides sexuales se reproducen apomícticamente (Quarin y Hanna, 1980; Quarin et al., 2001). Estos últimos estudios son solo ejemplos, entre muchos otros, que sostienen la hipótesis que la mayoría de las especies de *Paspalum* apomícticas se originaron por autoploidia a partir de genotipos sexuales.

Otras dos características están presentes en las plantas apomícticas. En general son perennes (no anuales) y poseen otros mecanismos de reproducción asexual, tales como estolones, rizomas o bulbos. La otra particularidad es que, en general, son apomícticos facultativos con un variable grado de sexualidad residual (Spillane et al., 2001). Esta sexualidad residual es muy interesante desde un punto de vista evolutivo, ya que permite la creación de nuevas combinaciones genotípicas en poblaciones naturales. Además esta sexualidad residual encontrada en algunas poblaciones tetraploides puede ser utilizada como fuente de variabilidad en el mejoramiento genético de especies forrajeras (Sartor et al., 2011).

Un requisito fundamental cuando se quiere estudiar el modo reproductivo de una especie, la herencia de la apomixis o incluso identificar los genes que determinan el carácter es contar con métodos simples cuali o cuantitativos que permitan la caracterización fenotípica de los parentales y de la progenie. Las metodologías más frecuentes, de acuerdo a Naumova (1997) y Sherwood (2001) son: 1- Citoembriología, basada en la observación de las diferencias en la megasporogénesis y megagametogénesis entre procesos sexuales y apomícticos; 2- Citometría de flujo, basada en el estudio del nivel de ploidía en el endospermo (doble fertilización) y en el embrión de la semilla, de manera de establecer la relación de ploidía entre ambos, ya que esta relación puede variar en semillas provenientes de reproducción sexual y apomíctica) y 3- Pruebas de progenie, ya que dado que las plantas apomícticas producen progenie idéntica a la madre, la uniformidad de los descendientes con la planta madre indica un posible origen apomíctico. Si bien pueden utilizarse diferentes técnicas, las observaciones citoembriológicas son siempre necesarias para

confirmar el origen del saco embrionario y el tipo de apomixis presente (Leblanc y Mazzucato, 2001).

I.4- Control genético de la apomixis - Herencia

Los primeros estudios sobre la herencia de la apomixis (Nogler, 1984) demostraron que la apomixis está bajo control genético, aunque su expresividad puede verse afectada por modificadores genéticos o condiciones ambientales (Savidan, 2001). El estudio de los factores genéticos involucrados en la apomixis se complica por la naturaleza poliploide de la mayoría de las especies apomictas, la disponibilidad adecuada de plantas sexuales compatibles y las dificultades para clasificar la progenie, particularmente porque los componentes de la apomixis pueden segregarse. En *Panicum spp.*, en *Ranunculus spp.* y en *Hieracium spp.* el locus dominante que controla la aposporia co-segrega con la partenogénesis, lo que sugiere que un solo locus controla la apomixis. En otros apomicticos, los loci genéticos que controlan la apomeiosis, la partenogénesis y la formación funcional de endospermo se pueden separar entre sí. Por lo tanto, en estas especies, al menos tres loci distintos están involucrados en la apomixis. Además, el control genético de cada componente de la apomixis puede ser complejo e involucrar a más de un gen. Las especies que exhiben una mezcla de todas las combinaciones de apomixis pueden contener múltiples loci que confieren los diferentes componentes en combinación con los modificadores asociados (Koltunow y Grossniklaus, 2003).

La apomixis es un carácter de desarrollo complejo, como se refleja en su genética. La herencia de la apomixis puede explicarse muy bien por la genética mendeliana, pero todas las complicaciones concebibles para el análisis genético parecen acumularse en los apomicticos: interacciones génicas epistáticas, componentes expresados esporofíticamente y gametofíticamente, modificadores de la expresión, poliploidia, distorsión de la segregación y recombinación suprimida (Ozias-Akins y van Dijk, 2007). A pesar de las complicaciones adicionales como la baja fertilidad del polen, los cruzamientos interespecíficos y la inestabilidad del genoma que se producen en algunas especies, se ha llevado a cabo un gran número de estudios genéticos informativos.

Basados en datos de segregación, los genes que controlan la apomixis parecen ser pocos en número, aunque existe falta de recombinación en las regiones cromosómicas determinantes del carácter, como el locus determinante de la aposporia (ASGR, apospory-specific genomic region). La recombinación suprimida entre caracteres y marcadores moleculares vinculados es un tema recurrente en los mapas genéticos de los apomícticos, particularmente dentro de la familia Poaceae. Esta falta de recombinación se evidencia al comparar los marcadores asociados al ASGR con regiones equivalentes de maíz y arroz, encontrándose en las plantas apomícticas distancias genéticas muy reducidas y grandes distancias físicas en las especies sexuales de referencia. En *Pennisetum squamulatum* se estima que el locus ASGR tiene un tamaño $>$ a 50 Mb, aproximadamente una cuarta parte de un cromosoma (Akiyama et al., 2005). Dado el gran tamaño físico estimado, una conclusión lógica es que múltiples genes pueden ser requeridos para la apomixis, y un mecanismo evolutivo para asegurar su transmisión intacta sería agruparlos en un bloque. Tales patrones evolutivos tienen precedentes, como la autoincompatibilidad en *Brassica* (Boyes et al., 1997). Varios mecanismos podrían estar operando para reducir la recombinación y mantener el desequilibrio de ligamiento, como divergencia en la secuencia de los alelos, un reordenamientos cromosómicos, translocaciones e inversiones y la remodelación de la cromatina para mejorar la formación de heterocromatina.

En el caso de la aposporia, los marcadores identificados parecen encontrarse asociados definiendo una región genómica específica que muestra una alta restricción a la recombinación y está asociada a un efecto pleiotrópico letal o ligada a un alelo con letalidad parcial que afecta a los gametos masculinos (Ozias Akins et al., 1998, Pupilli et al., 2001, Martínez et al., 2003). Esta región se ha identificado y caracterizado en especies como *Pennisetum squamulatum* (Ozias-Akins et al., 1998; Goel et al., 2003; Akiyama et al., 2004), *Tripsacum dactyloides* (Grimanelli et al., 1998), *Paspalum simplex* (Pupilli et al., 2001; Pupilli et al., 2004) y *P. notatum* (Stein, 2006). En *Taraxacum*, se demostró que varios elementos independientes (apomeiosis, partenogénesis y endospermo autónomo) controlan la diplosporia (Záveský et al., 2007). Dado que no existe una correspondencia entre los marcadores moleculares asociados a la aposporia y a la diplosporia (Leblanc et al., 1995; Pessino et al., 1997; Pupilli et al., 2001; Pupilli et al., 2004), los resultados parecen

indicar que ambas formas de apomixis están gobernadas por genes diferentes (Grimanelli et al., 2001; Hand y Koltunow, 2007).

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; Sharbel et al., 2009).

I.5- Apomixis en *E. curvula*

Los primeros estudios sobre el sistema reproductivo del pasto llorón lo describen como apomictico obligado (Brown y Emery, 1958; Leigh, 1960). Streetman (1963) concluyó que el tipo de apomixis presente en *E. curvula* es la diplosporía y 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. 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 apomicticas facultativas, con una baja frecuencia de reproducción sexual. En estudios más recientes (Meier et al. 2011, Rodrigo et al., 2017), realizados sobre distintos genotipos de pasto llorón, se encuentran evidencias de que varios de ellos son facultativos, otros apomicticos obligados y algunos sexuales obligados.

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; Rabeau et al., 1986). La secuencia inicia cuando la célula arqueosporial se diferencia a partir de una célula hipodérmica de la nucela, tanto en plantas sexuales como apomicticas. El desarrollo puede proseguir luego de dos maneras. El desarrollo del saco embrionario sexual es del tipo *Polygonum* (Vorster y Liebenberg, 1984) y el apomictico diplospórico presenta características que lo hacen distinto a otros por lo que se considera como un modelo particular, tipo *Eragrostis* (Crane, 2001). En el proceso

sexual (Figura 3), la célula arquesporial se diferencia a partir de una célula hipodérmica de la nucela que se expande 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 (proliferación de antípodas). 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 de la célula es similar al saco embrionario sexual bi o tetranucleado. Luego, esta megáspora elongada, tras dos divisiones mitóticas sucesivas, forma el saco embrionario tetranucleado, que se compone de una ovocélula, dos sinérgidas y un núcleo polar (Figura 3). En ningún caso se ha observado actividad de las células nucleares, por lo que se ha descartado la aposporia como mecanismo reproductivo en pasto llorón (Streetman, 1963; Voigt y Bashaw, 1972).

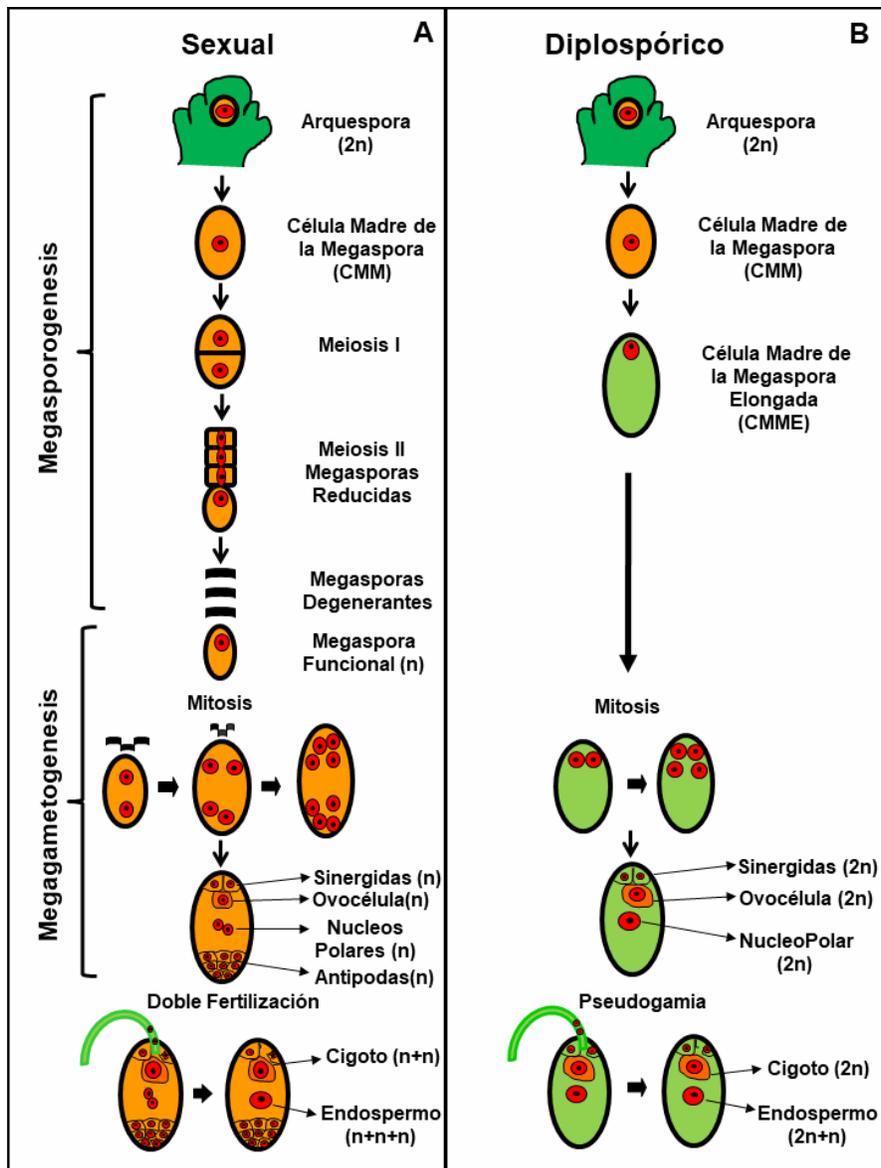


Figura 3. Megagametogénesis en pasto llorón. Proceso sexual (izquierda) y apomítico diplospórico, tipo *Eragrostis* (derecha).

En pasto llorón ya se han evaluado estas técnicas para analizar el modo reproductivo de los distintos genotipos (Zappacosta, 2009; Meier et al., 2011). Las pruebas de progenie con marcadores RAPDs y los estudios citoembriológicos demostraron ser los más adecuados para el análisis del modo de reproductivo, permitiendo la caracterización de plantas apomíticas obligadas, apomíticas facultativas y sexuales (Meier et al., 2011). Con respecto a la citometría de flujo, como en *E. curvula* presenta la particularidad de poseer un saco embrionario con un núcleo polar no reducido y presentar pseudogamia (unión de un

núcleo espermático con el núcleo polar), la relación de ploidías entre el embrión y el endospermo es exactamente la misma, tanto en procesos sexuales como apomícticos (relación embrión/endospermo $2x/3x$). Por tal motivo, esta técnica no logra discriminar entre ambos procesos reproductivos.

I.6- Importancia de la apomixis para la agricultura

La apomixis tiene enormes aplicaciones potenciales en la agricultura, particularmente en la producción de semillas híbridas para mantener el vigor híbrido a lo largo de las generaciones (Vielle-Calzada et al., 1996; Spillane et al., 2001; Kumar, 2017) y se han hecho esfuerzos para transferir este carácter a distintos cultivos, pero ningún éxito hasta el momento (Kandemir y Saygili, 2014). Este potencial de sostener la heterosis a través de las generaciones tendría una enorme repercusión para la agricultura y es la principal razón del interés de la ciencia y de las empresas en conocer la base molecular del carácter. El mayor valor sería en los principales cultivos de cereales y leguminosas o aquellos cultivos donde los híbridos son particularmente valiosos pero difíciles de elaborar.

La apomixis, de amplia distribución en las angiospermas, no está presente en muchas especies de interés agronómico, a excepción de varias gramíneas forrajeras, la mandioca, la manzana, los cítricos, el mango y la frutilla. Por esta razón se han realizado numerosos intentos de introducir la apomixis desde parientes silvestres a especies cultivadas de gran distribución como el maíz, el trigo, el mijo y arroz (Grimanelli et al., 2001; Liu et al., 1994; Roche et al., 2001; Kumar, 2017) han sido retrasados por barreras interespecíficas y ploidías, bloqueando el logro de genotipos agronómicamente aceptables.

Recientemente, un asombroso progreso en la transferencia de esta tecnología a los principales cultivos ha surgido en el arroz al generar una planta con la capacidad de generar semillas apomícticas mediante la edición de los genes críticos involucrados en la sexualidad (Khanday et al., 2019; Wang et al., 2019). Las semillas clonales se produjeron después de cruzar una línea MiMe (que lleva versiones mutantes de los genes REC8, PAIR1 y OSD1) con una línea transgénica que expresa el activador embriogénico BBM1 (Khanday et al., 2019) y por edición simultánea de los genes MiMe (REC8, PAIR1, OSD1) y un inductor haploide (MTL) en la misma línea (llamado FIX) (Wang et al., 2019). Estos logros notables

demuestran la posibilidad de modificar el modo reproductivo de las plantas mediante la edición o incorporación de determinados genes involucrados en vías de la gametogénesis y megagametogénesis. Sin embargo, la eficiencia de ambos sistemas para generar semillas clonales aún está muy lejos de los organismos apomícticos naturales y necesita mejoras adicionales para su aplicación práctica. La investigación de los determinantes de la apomixis en las especies apomícticas se ha retrasado durante mucho tiempo en comparación con otras características de interés agronómico, principalmente porque está presente en plantas silvestres que suelen ser poliploides y altamente heterocigotas, y para las cuales las herramientas comunes de biología molecular y mejoramiento son difíciles de aplicar. Un cuello de botella adicional es el origen polifilético e independiente de la apomixis en numerosos taxa, lo que hace que su control genético sea diferente entre especies no relacionadas.

I.7- Relevancia del tema

La apomixis de tipo *Eragrostis* tiene características particulares que lo convierten en un modelo único e interesante para la transferencia de apomixis, especialmente para cultivos como el maíz, que son muy sensibles a los cambios en la relación de ploidía entre embrión: endospermo, que debe ser igual a 2:3. En nuestro modelo, esta relación es la misma que la tanto en la semilla sexual como en la apomíctica. Esta es una diferencia importante con respecto a otros modelos apomícticos en los que la situación es variable y relajada (el endospermo se puede desarrollar bajo una amplia gama de relaciones) (Hojsgaard, 2018). La relación de ploidía embrión: endospermo es estrictamente 2:3 en varias especies modelo porque en las primeras etapas del desarrollo del embrión y del endospermo, muchos alelos se silencian (imprinting) dependiendo de su origen paterno. Cualquier desviación en la dosis resultará en la detención del desarrollo del endospermo y el aborto de la semilla (Brukhin, 2017).

I.8- Trayectoria del grupo de trabajo en pasto llorón y apomixis

Desde hace más de tres décadas, el grupo de investigación viene trabajando en distintos aspectos de la fisiología, genética y en la implementación de herramientas biotecnológicas para el mejoramiento del pasto llorón (Echenique et al., 1996; Polci, 2000; Echenique et al.,

2001; Díaz et al., 2004; Díaz y Echenique, 2004). Estos proyectos dieron origen a tres materiales vegetales que fueron registrados en el Registro Nacional de Cultivares (RC9191, 9192 y 9193). Con estos nuevos materiales que eran contrastantes en modo reproductivo y fondo genético similar se comenzaron los estudios en la genética y vías de regulación de la apomixis (Cardone et al., 2006; Mecchia et al., 2007; Cervigni et al., 2008a; Cervigni et al., 2008b; Ochogavía et al., 2009). Estos estudios estuvieron basados en la caracterización del modo reproductivo, en la expresión diferencial entre materiales apomicticos y sexuales y la relación entre la apomixis y el estrés (Meier et al., 2011; Selva et al., 2012; Zappacosta et al., 2014; Rodrigo et al., 2017; Selva et al., 2017 y Garbus et al., 2017). Actualmente contamos con una lista de genes candidatos implicados en distintas vías metabólicas, sin embargo, el desarrollo de una población de mapeo y un mapa genético donde ubicar la/s región/es determinantes del carácter son etapas críticas a superar para poder avanzar en la determinación de la base genética de la regulación del carácter. Comprender la herencia de la apomixis que ocurre naturalmente en diferentes taxones es un requisito previo vital para aprovechar su potencial para su expresión exitosa en las plantas cultivadas.

II. Hipótesis y Objetivos

II.1- Hipótesis

La apomixis en *E. curvula* es controlada por una o dos regiones genómicas de herencia mendeliana. En este contexto todo el proceso podría desencadenarse por un efecto pleiotrópico gobernado por una única región o podrían existir más regiones, controlando la diplosporía y la partenogénesis.

II.2-Objetivo general

El objetivo general de esta tesis es estudiar la herencia de la diplosporía en *Eragrostis curvula* y localizar la/s región/nes condicionantes de la misma a través de la obtención de una población de mapeo a nivel tetraploide, segregante para el modo reproductivo, y de la construcción de un mapa genético de alta densidad, basado en marcadores moleculares.

II.3- Objetivos específicos

- 1) Caracterizar diferentes genotipos tetraploides de pasto llorón por métodos citoembriológicos y moleculares, a fin de seleccionar los más adecuados como parentales de la población de mapeo.
- 2) Generar una población de mapeo de *E. curvula* a nivel tetraploide, determinar el nivel de ploidía de las plantas obtenidas y detectar la naturaleza híbrida de las mismas a través de marcadores moleculares.
- 3) Caracterizar fenotípicamente la progenie híbrida obtenida utilizando citoembriología y determinar la herencia del carácter.
- 4) Desarrollar un mapa genético basado en SNPs donde posicionar la/s región/es determinantes de la diplosporía.

III. Materiales y Métodos

III.1- Material vegetal

III.1.1- Genotipos

Los materiales de *Eragrostis curvula* evaluados en esta tesis se mantuvieron en invernáculo y forman parte de la colección existente en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal (CERZOS-UNS), provenientes de INTA Anguil (La Pampa) y del USDA (United States Department of Agriculture). En la Tabla 1.1 se detallan los materiales de pasto llorón utilizados, indicando sigla con la que se les hará referencia, tipo agronómico (según clasificación de Covas, 1991), número cromosómico, modo reproductivo y la procedencia de la semilla.

III.1.2- Cruzamientos realizados

Para la obtención de una población de mapeo se requieren parentales contrastantes en el carácter a evaluar, en nuestro caso modo reproductivo. Se realizaron varios cruzamientos para obtener una población de mapeo (progenie F₁) a nivel tetraploide ($2n = 4x = 40$) y segregante para la diplosporía. El genotipo sexual (OTA-S, USDA accesión PI574506) se cruzó con varios donantes de polen, algunos de ellos apomícticos facultativos (Morpa USDA accesión PI591632, Ermelo USDA accesión PI232986, Don Walter INTA) y un apomíctico obligado (Tanganyika, USDA accesión PI234217). Para realizar los cruzamientos las plantas de ambos parentales se colocaron aisladas en un sector del invernáculo y la polinización fue favorecida acercando y moviendo panojas del dador de polen diariamente. Como no fue posible la castración en el parental femenino (emasculación), a causa del tamaño y la morfología de las espiguillas, una porción de las semillas obtenidas fue producto de autofecundación.

Tabla 1. Materiales de pasto llorón utilizados en el trabajo, indicando la sigla con la cual se hará referencia al material en el texto, el tipo agronómico, número cromosómico, modo reproductivo y origen de las semillas.

Cultivar	Sigla	Tipo agronómico	Número cromosómico (2n)	Modo reproductivo	Origen (*)
Morpa	M _{INTA}	Curvula	40	Apomítico	USDA
Ermelo	E _{INTA}	Curvula	40	Apomítico	USDA
Tanganyika	T _{INTA}	Curvula	40	Apomítico	INTA
Tanganyika	T _{USDA}	Curvula	40	Apomítico	USDA
Don Walter	DW	Conferta	40	Apomítico	INTA
OTA-S	OTA	Conferta	40	Sexual	USDA

(*) INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria), USDA (United States Department of Agronomy).

III.1.3- Siembra de las semillas y establecimiento de las plantas F₁

Las semillas provenientes de los cruzamientos, luego de dos meses de almacenadas a 4 °C, se sembraron en almácigos con tierra estéril y luego de un mes las plantas se trasladaron a macetas individuales. Con esta metodología germinaron solo unas pocas semillas y muchas de las plántulas murieron al poco tiempo de emerger, por lo que se decidió germinar las semillas *in vitro* y mantener las plántulas en estas condiciones hasta que pudieran ser trasladadas al invernáculo. Para ello las semillas se sumergieron en alcohol 70 % por 5 min, lavandina al 50 % por 10 min seguido por tres lavados en agua destilada estéril. Luego de esto las semillas se sembraron en placas (50 semillas/placa) con medio de cultivo de

Murashige y Skoog (Murashige y Skoog, 1962), compuesto de 4,33 gr de sales MS (Sigma), 30 gr de sacarosa, 8 gr de agar y 1 ml de vitaminas MS (vitaminas MS, 1 mg/ml, Sigma), en 1 L de agua destilada y se llevaron a cámara de cultivo a 25 °C en oscuridad. Luego de aproximadamente 30 días, las plantas se pasaron a vasos plásticos de 330 ml con mezcla orgánica (Grow Mix-profesional; Terrafertil S.A., Moreno, Argentina). Durante los primeros 15 días del trasplante, a fin de evitar la deshidratación, se colocó una cubierta transparente sobre las plantas. Las mismas fueron mantenidas en cuarto de cultivo durante dos meses, posteriormente fueron trasladadas a invernadero y trasplantadas a macetas de 5 y 10 L con un fotoperíodo natural de 15 h de luz en el período de floración de primavera.

A raíz de que las plantas madre no fueron emasculadas, para confirmar que las plantas F₁ fueran realmente híbridas, a los individuos de la progenie se los analizó con marcadores moleculares (RAPD) y sus patrones de amplificación se compararon con los de ambas plantas parentales. Se consideraron plantas híbridas aquellas que presentaron al menos tres marcadores paternos.

Los RAPD se amplificaron siguiendo los protocolos descritos por Rodrigo y col. (2017) y las secuencias de los cebadores se muestran en la Tabla Suplementaria 1. Las amplificaciones se llevaron a cabo en un volumen final de 25 µl, conteniendo 50 ng de ADN, 200 ng de primer, 2 U *Taq* polimerasa (InVitroGen, Brasil), 62,5 mM de Cl₂Mg, 0,2 mM de cada uno de los dNTPs y solución tampón 1X (InVitroGen, Brasil) en un termociclador Biorad (MyCycler, Estados Unidos), utilizando un programa que consistió en 6 min de desnaturalización inicial a 94 °C, seguido de 40 ciclos de 15 seg a 94 °C, 45 seg a 36 °C y 1 min a 72 °C; además de un paso final de extensión de 6 min a 72 °C. Los fragmentos amplificados se separaron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 6 % y se corrieron a una potencia de 40 W durante 90 min. Las bandas fueron visualizadas por tinción con nitrato de plata y digitalizadas.

1.4- Estimación del tamaño del genoma de lo parentales y determinación del nivel de ploidía de las plantas obtenidas

En el caso de las mediciones de ploidía las hojas fueron maceradas en una caja de Petri con 1 ml de solución de extracción tamponada de Otto I (Otto, 1990). La composición de la solución tampón fue la siguiente: 4,5 g de ácido cítrico monohidratado 0,1 M 1 ml Tween 20 al 0,5 % v/v en 200 ml de agua destilada. Posteriormente la suspensión de núcleos es pasada por un filtro de nylon de 42 μm y vertida sobre el tubo receptor plástico, al cual se le adicionan 2 ml de solución tampón de tinción Otto II (28,65 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ en 200 ml de agua destilada y DAPI 4 mg/ml). La intensidad relativa de fluorescencia en el citómetro de flujo fue calculada a través de la medición de más de 1.000 núcleos por muestra, utilizando como control el genotipo diploide Victoria, los genotipos parentales tetraploides (OTA-S y Don Walter) y el genotipo heptaploide Don Eduardo. Esto se determinó en un citómetro de flujo Partec PA (Partec GmbH, Münster, Alemania) con una absorbancia de 350 nm (Johnston et al., 1999) y una emisión de 450 nm (Doležel, 1995) en el Instituto de Floricultura del INTA.

Para la estimación del tamaño del genoma se siguió el siguiente protocolo: aproximadamente 0,5 cm^2 de tejido foliar fresco, junto con una cantidad igual de tejido foliar de *Secale cereale* cv. Dankovske (estándar con genoma de tamaño conocido), se cortó en trozos pequeños con hoja de afeitar en buffer de extracción (5 μM Tris, 2 μM Na_2EDTA , 80 μM KCl, 20 μM NaCl, 15 μM β -mercaptoethanol y 0,1 % [v/v] Triton X-100, pH 7.5). La suspensión de núcleos se filtró e incubó en 100 μl de una solución de tinción que contenía yoduro de propidio (100 mg/l) y RNasaA. La suspensión de núcleos teñida se analizó utilizando un citómetro de flujo (Partec, Sysmex). El tamaño del genoma fue estimado en base al valor correspondiente al estándar utilizado, *S. cereale* cv. Dankovske, que presenta un contenido de ADN 2C de 16,19 pg (Doležel et al., 1998).

III.2- Observaciones citoembriológicas

Las panojas se colectaron en el momento de presentar los primeros signos de antesis, tiempo en el cual es posible encontrar todo el rango del desarrollo del saco embrionario, desde la célula arqueospórica hasta la posible fertilización (Brown y Emery, 1958;

Streetman, 1963). Estas fueron inmediatamente fijadas en FAA (10 % formol, 5 % ácido acético, 50 % alcohol y 35 % agua destilada) donde se conservaron hasta el momento de su utilización. Luego se procedió a la inclusión de las espiguillas, por separado, en parafina (Paraplast), montado y corte en micrótopo en secciones de 10 μ m de espesor de acuerdo a la técnica de Johansen (1940). Las secciones se tiñeron con safranina-fast green. Los preparados fueron observados en un microscopio óptico Nikon Eclipse TE300. Para el fenotipado se siguieron los criterios establecidos en Meier y col. (2011), donde para diferenciar entre procesos sexuales y apomíticos se tiene en cuenta la presencia o no de meiosis o degenerantes y la cantidad y posición de los núcleos en el saco embrionario (Tabla 2).

Tabla 2. Características de la megasporogénesis y megagametogénesis propias de los procesos sexuales y apomíticas utilizadas para el fenotipado (de acuerdo a Meier et al., 2011).

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

Para caracterizar una planta como sexual o apomítica, se siguieron los criterios propuestos por Savidan (2000) donde las plantas se consideran sexuales cuando solo presentan procesos sexuales en los pistilos observados y apomíticos cuando se observa al menos un proceso apomítico. Se contabilizaron al menos 30 pistilos con sacos embrionarios en estadios óptimos para cada una de las plantas F₁ evaluadas para el modo reproductivo.

III.3- Extracción de ADN

Se utilizó un protocolo de extracción rápida a partir de material fresco (Zappacosta et al., 2011). El ADN genómico se extrajo utilizando la siguiente solución reguladora: 50 mM Tris-HCl 1M pH 8, 10 mM EDTA 0,5 M pH 8, 100 mM ClNa 5 M, 10 % SDS y 10 mM β -mercaptoetanol. Para la extracción se partió de material fresco (aprox. 100 μ g) de plantas de aproximadamente tres meses de edad. Se cortaron hojas en pequeñas porciones y se colocaron en un mortero con nitrógeno líquido y se homogeneizaron. El producto obtenido se transfirió a un tubo Eppendorf de 1,5 ml con 700 μ l de solución tamponada de extracción y se incubó durante 20 min a 65 °C con agitación lenta (estufa con agitador vertical). Posteriormente se agregaron 200 μ l de 5 M $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{K}$ 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 μ 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 μ 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 100 μ l de solución TE 1X. La concentración y calidad de ADN se determinó en un espectrofotómetro (Spectroquant Pharo 300-Merck) con lecturas a DO260 y DO280.

III.4- Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de amplificación (AFLP)

Para ello se siguió el protocolo de Vos y col. (1995) con algunas modificaciones. Alícuotas de 500 ng de ADN genómico fueron simultáneamente digeridas con las enzimas de restricción *Pst*I y *Mse*I. Los fragmentos fueron ligados a adaptadores para *Pst*I y *Mse*I y constituyeron las plantillas para las siguientes amplificaciones. Los cebadores para la pre-amplificación, para contenían un nucleótido selectivo, P+A y M+A respectivamente. Los productos de la pre-amplificación fueron diluidos (1:6) en 10 mM Tris y 0,1 mM EDTA y fueron usados como plantillas para la segunda ronda de amplificación, donde se utilizaron combinaciones de cebadores para ambos adaptadores conteniendo tres nucleótidos

selectivos, P+3 y M+3, respectivamente. Las secuencias de los adaptadores y los cebadores se encuentran en la Tabla Suplementaria S1.

Se utilizaron 20 combinaciones de cebadores y los programas utilizados para la amplificación fueron los indicados por Vos y col. (1995). Para aumentar la confiabilidad de los datos, se realizaron por duplicado. Luego de las amplificaciones, los productos de PCR fueron mezclados con solución de siembra (98 % (v/v) formamida, 10 mM EDTA, 0,025 % (p/v) azul de bromofenol y 0,025 % (p/v) xilencianol) en proporción 6:1, desnaturalizados a 95 °C durante 5 min e inmediatamente llevados a hielo. Seis microlitros de las muestras desnaturalizadas fueron cargadas en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 6 % (p/v). Los productos de amplificación fueron visualizados con tinción de plata y digitalizados para el posterior análisis.

III.5- Microsatélites (EST-SSRs)

Los microsatélites de pasto llorón se desarrollaron a partir de ESTs con el programa SSR Discovery a partir de los transcriptomas previamente secuenciados por el grupo de trabajo (Cervigni et al., 2008a; Garbus et al., 2017). La secuencia de los cebadores utilizados se encuentra en la Tabla Suplementaria 1. Para la amplificación se utilizó el siguiente protocolo: solución tampón 1X, 2,5 mM Cl₂Mg, 0,125 mM (c/u) dNTPs, 10 mM de cebador, 1,6 U Taq polimerasa (InVitroGen) y 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 min, 18 ciclos de 94 °C 30 seg, 68 °C 30 seg (-1 °C/ciclo), 72 °C 1 min, 30 ciclos de 94 °C 30 seg, 50 °C 30 seg, 72 °C 1 min, 72 °C 10 min, en un ciclador MJ Research 100. Los productos de amplificación se separaron en geles de acrilamida al 6 % que se tiñeron con plata y digitalizados para el posterior análisis.

III.6- Genotipado por Secuenciación (GBS)

III.6.1- Extracción de ADN

Para la extracción del ADN requerido para GBS se utilizó un protocolo que nos asegurara una excelente calidad de ADN, tanto en las relaciones de absorbancia 260/280, como en la

integridad del mismo. Se tomaron porciones basales de hojas frescas (porción cercana al tallo), se cortaron en pequeñas porciones con tijera y se colocaron en tubos Eppendorf de 1,5 ml que tenían 2 bolitas de acero de 3 mm. Los tubos se sumergieron en nitrógeno líquido y luego se colocaron en un lizador Tissuelyser II (Qiagen, EE.UU.) donde se aplicaron 2 pulsos de 45 seg con una frecuencia de 25,5 movimientos por segundo. Inmediatamente después se agregaron 0,8 ml de buffer de extracción (100 mM Tris HCl pH 8; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA pH 8; 2 % (w/v) CTAB y β -mercaptoetanol 0,5 ml / 100 ml de buffer) y se incubaron los tubos durante 30 min a 65 °C, invirtiéndolos regularmente. Luego se agregaron 0,4 ml de cloroformo y se dejaron 10-15 min a temperatura ambiente, luego de lo cual se centrifugaron a 12.000 RPM durante 10 min. El sobrenadante (fase acuosa) se traspasó a un nuevo tubo Eppendorf de 1,5 ml y el ADN se precipitó con 0,8 vol de isopropanol (0,64 ml), a temperatura ambiente, invirtiendo el tubo un par de veces para que se mezcle. Inmediatamente después se centrifugó 1 min a 12.000 RPM y el pellet se lavó primero con etanol 70 % y luego con etanol absoluto. Luego de secar el pellet a temperatura ambiente bajo campana o flujo laminar durante 1 hora, el ADN se resuspendió en 70 μ l de TE conteniendo 20 μ g/ml de ARNasa.

III.6.2- Selección de individuos y diseño de muestras para GBS

El ADN fue enviado al Biotechnology Center (University of Wisconsin-Madison, EE.UU.; <https://www.biotech.wisc.edu/services>) donde se realizó la construcción de la librería y su secuenciado. Los ADNs se enviaron en una placa acorde a las especificaciones realizadas por el servicio de secuenciación (50 μ l de 150 ng ADN/ μ l).. El ADN de los genotipos parentales se envió por cuadruplicado a fin de aumentar la cantidad de lecturas y hacer más eficiente la búsqueda de SNPs, se incluyeron 86 individuos de la población y dos controles (una muestra blanco sin ADN, solo con agua, y una muestra del cv. Victoria, diploide sexual cuyo genoma se ha secuenciado y se encuentra en proceso de ensamblado en el grupo de trabajo, Tesis Doctoral Ing. Agr. José Carballo (Tabla 3).

Tabla 3. Diseño de la placa con muestras de ADN enviadas al servicio de secuenciación de la University of Wisconsin-Madison (OTA-2 y DW-19 son los parentales de la población, Z002-Z271 son los individuos de la población y Blanco y Victoria son dos controles).

ADN	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DW	Z016	Z031	Z103	Z119	Z155	Z194	Z208	Z216	Z224	Z259	Blanco
B	OTA-S	Z017	Z032	Z105	Z122	Z158	Z195	Z209	Z217	Z225	Z260	Victoria
C	Z002	Z020	Z033	Z109	Z128	Z160	Z197	Z210	Z218	Z226	Z262	DW-19
D	Z007	Z021	Z034	Z111	Z131	Z162	Z198	Z211	Z219	Z229	Z263	OTA-S
E	Z008	Z024	Z039	Z112	Z138	Z167	Z203	Z212	Z220	Z237	Z266	DW
F	Z009	Z025	Z056	Z113	Z140	Z171	Z205	Z213	Z221	Z251	Z268	OTA-S
G	Z011	Z028	Z057	Z115	Z146	Z174	Z206	Z214	Z222	Z252	Z269	DW
H	Z012	Z030	Z100	Z116	Z154	Z191	Z207	Z215	Z223	Z258	Z271	OTA-S

Al arribar las muestras al Biotechnology Center, la concentración de ADN fue nuevamente verificada utilizando el kit Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA kit (Life Technologies, Grand Island, EE.UU.).

III.6.3- Elección de la enzima de restricción

La selección de la enzima de restricción, que debe dejar 2 o 3 pb libres, ser de corte poco frecuente en la fracción genómica repetitiva y generar fragmentos de tamaño relativamente uniforme, es de crítica importancia. Para ello se probaron las enzimas *ApeKI*, *PstI*, *NsiI* y la combinación de las enzimas *PstI/MspI* y *NsiI/MspI*. *ApeKI* es una endonucleasa de restricción tipo II que reconoce secuencias degenerantes de 5 pb (GCWGC, siendo W una A o T) y es parcialmente sensible a la metilación. Las enzimas *NsiI* (ATGCA|T) y *PstI* (CTGCA|G) son de corte poco frecuente e insensibles a la metilación. *MspI* (C|CGG) es una enzima de corte frecuente que reconoce sitios de 4 pb (Elshire et al., 2011, Poland et al., 2012, Fu et al., 2016). En la prueba se digirieron 50 ng de ADN genómico durante 2 hs utilizando 10 veces la concentración de reacción de la enzima recomendada por el fabricante (New England Biolabs, Ipswich, MA, EE.UU.). Los fragmentos producto de cada corte enzimático fueron visualizados utilizando un BioAnalyzer 2100 (Agilent).

III.6.4- Construcción y secuenciado de las librerías de GBS

Un esquema básico del protocolo utilizado para realizar GBS se muestra en la Figura 4. La construcción de la librería y su secuenciado se realizó en el Biotechnology Center (UWBC) de acuerdo al protocolo descrito por Elshire y col. (2011), con algunas modificaciones. Brevemente, 50 ng de ADN fueron digeridos utilizando la enzima de restricción seleccionada previamente *ApeKI* (New England Biolabs, Ipswich, MA, EE. UU.), después de lo cual se ligaron con la enzima T4 ligasa (New England Biolabs, Ipswich, MA, EE. UU.) a los adaptadores con barcode disponibles para el secuenciado utilizando la plataforma Illumina. Las 96 muestras fueron agrupadas y amplificadas para proporcionar cantidades de fragmentos adecuados para la secuenciación, eliminándose los dímeros de adaptadores mediante purificación con perlas SPRI (Solid Phase Reversible Immobilization magnetic beads). La calidad y cantidad del ADN de la librería preparada se evaluó utilizando el chip de alta sensibilidad del bioanalizador Agilent (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, EE.UU.) y el kit de ensayo Qubit® dsDNA HS (Life Technologies, Grand Island, NY, EE.UU.), respectivamente. La generación de clusters se realizó utilizando los kits HiSeq SR Cluster v3 cBot (Illumina Inc, San Diego, CA, EE.UU.). La celda de flujo se secuenció en una sola lectura de 100 pb utilizando el kit HiSeq SBS v4 (Illumina Inc., San Diego, CA, EE.UU.) en un secuenciador HiSeq2500 (Illumina Inc., San Diego, EE.UU.). A raíz de que un porcentaje importante de las secuencias generadas presentaban adaptadores en tándem (provocaba que las secuencias limpias resultantes sean cortas), el servicio de secuenciación decidió hacer nueva limpieza de la librería con beads (perlas) y una nueva secuenciación. Ambas secuenciaciones se sumaron en el análisis bioinformático para la obtención de SNPs.

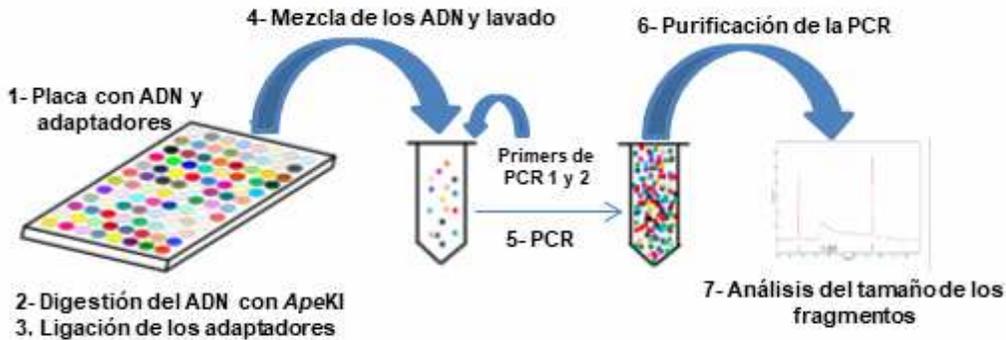


Figura 4. Pasos para la elaboración de la biblioteca GBS. Nota: Se pueden procesar simultáneamente hasta 96 muestras de ADN. (1) Las muestras de ADN, los adaptadores con barcode y los pares de adaptadores comunes se colocan en la placa y se secan; (2-3) las muestras luego se digieren con *ApeKI* y los adaptadores se ligan a los extremos de los fragmentos de ADN genómico; (4) la ligasa T4 se inactiva por calentamiento y una alícuota de cada muestra se agrupa y se pasa por una columna de exclusión por tamaño para eliminar los adaptadores que no reaccionaron; (5) se añaden cebadores apropiados con sitios de unión en los adaptadores ligados y se realiza una PCR para aumentar el conjunto de fragmentos; (6-7) Los productos de PCR se purifican y los tamaños de los fragmentos de la librería resultante se verifican en un analizador de ADN. Adaptado de Elshire y col. (2011).

III.6.5- Filtrado de datos de las secuencias crudas

Los datos de secuenciación sin procesar generalmente contienen varios tipos de errores y artefactos, como errores de denominación de base, bases de baja calidad, contaminación con adaptadores y lecturas duplicadas. Por lo tanto, es necesario realizar la evaluación de la calidad y la corrección de lecturas mediante filtrado o recorte de lecturas o regiones de baja calidad. Para ello, las lecturas de 100 pb obtenidas de la plataforma Illumina Hi-Seq 2500 se recortaron utilizando el software Cutadapt version 1.14 (Martin, 2011) con los parámetros: low-quality ends ($-q = 20$); ii) maximum error rate ($-e = 0.1$); iii) overlap length ($-O = 1$) y iv) adapter ($-a = AGATCGGAAGAGC$), luego, las secuencias limpias resultantes se evaluaron con el software FastQC version 0.11.5 (Andrews et al., 2011). Usando los códigos de barras (barcode) proporcionados por el servicio de secuenciación y las lecturas filtradas, se procedió a la búsqueda *de novo* de SNPs (SNPs discovery) y la

llamada de genotipos (genotype calling) utilizando el software Tassel 5.0 UNEAK (Glaubitz et al., 2014) con los siguientes parámetros: i) minimum number of reads (-s = 40.0000.000); ii) enzyme used to create the GBS library (-e = *ApeKI*); iii) minimum count of a tag to be output (-c = 10); iv) error tolerance rate in the network filter (-e = 0.02); v) minimum minor allele frequency (-mnMAF = 0.01); vi) maximum minor allele frequency (-mxMAF = 0.5); vii) minimum call rate (-mnC = 0.6) y viii) maximum call rate (-mxC = 1). Este método no requiere una secuencia de referencia, ya que la búsqueda de SNPs se realiza directamente dentro de pares de etiquetas de secuencia (tags) coincidentes y se filtra a través del análisis de red.

III.6.6- Análisis de la segregación de los marcadores SNP

Para la construcción de los mapas de ligamiento se utilizaron los marcadores que cumplieron con los siguientes requisitos: 1) ser heterocigotos en un progenitor y homocigotos en el otro; 2) tener un valor p de la prueba de Chi^2 mayor que alfa; 3) se excluyeron los SNPs con alelos inesperados, 4) solo se incluyeron los SNP con segregación de dosis única (1: 1), 5) se consideraron homocigotas los individuos con SNPs que tuvieran al menos 5 lecturas. Aquellos que tenían menos de 5 lecturas se consideraron datos faltantes, 6) se excluyeron los SNPs con más del 5 % de datos faltantes. Esta selección de SNPs se realizó con el software Excel. Los marcadores que cumplían estos requisitos se dividieron en los dos conjuntos de datos de marcadores de cada parental para la construcción de los mapas de ligamiento.

III.7- Construcción de los mapas de ligamiento

Se construyeron mapas de ligamiento genético por separado para ambos parentales de la población, OTA-S y Don Walter, utilizando el software JoinMap 4.1 (Van Ooijen, 2006) con la opción de población CP (población de hermanos completos F_1 , con padres de polinización cruzada) y siguiendo la estrategia de pseudo-testcross de dos vías (Van Ooijen, 2006). Para garantizar una alta calidad en el mapa de ligamiento de cada parental, se seleccionaron aquellos SNPs que segregaban en un solo parental, es decir que un parental era homocigota para ese SNP y el otro heterocigota. Aquellos SNPs para los cuales ambos parentales eran heterocigotas (código "hk x hk" en Joinmap) no se consideraron en este

estudio, ni tampoco los SNPs para los cuales ambos progenitores eran homocigotas (no hubo segregación). Se armaron planillas Excel de cada parental por separado y se codificaron en el formato requerido por Joinmap (códigos "lm x ll" y "nn x np" para cada parental). Una vez cargados en Joinmap, se usó la opción de eliminación de marcadores idénticos y se agrupó el resto de los marcadores con un LOD (logaritmo de probabilidades) de 7 o superior (a intervalos de 0,5). En cada grupo de ligamiento, los marcadores se ordenaron utilizando el algoritmo de regresión con el mínimo nivel de LOD de 1,0 y frecuencia de recombinación máxima inferior a 0,4. Las distancias fueron estimadas utilizando la función de mapeo de Kosambi (Kosambi, 1944). Para el resto de los parámetros se usaron los valores de "default" del software.

III.8- Análisis de sintenia

Las secuencias extendidas de los SNPs mapeados se compararon contra los genomas de *Oropetium thomaeum* (VanBuren et al., 2018), *Cenchrus americanus* (Varshney et al., 2017, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA294988>), *Setaria italica* (Bennetzen et al., 2012; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA32913>), *Zea mays* (Jiao et al., 2017), *Panicum hallii* (Bioproject: PRJNA250527) y *Oryza sativa* (Kawahara et al., 2013). Los marcadores que se alinearon en una posición única en los genomas ($P < e^{-4}$), con identidad $> 80 \%$ y una cobertura query > 70 , se utilizaron para asignar cada grupo de ligamiento a un cromosoma y para identificar los grupos de homologos / homeologos. Para ello se utilizó el software BLAST 2.7.1 (Altschul et al., 1990). Para graficar la sintenia entre los mapas y los genomas de referencia se utilizó el software Circos v0.69 (Krzywinski et al., 2009).

IV- Resultados

IV.1- Cruzamientos realizados y semillas F₁ obtenidas

Dada la importancia de disponer de una población para mapear las regiones que controlan la apomixis en pasto llorón, con el grupo de trabajo del CERZOS hemos realizado numerosos cruzamientos durante varios años tendientes a la obtención de la misma. La primera dificultad fue disponer de un parental femenino sexual a nivel tetraploide, a fin de poderlo cruzar con el donante de polen apomítico (Zappacosta, 2009). En el año 2003 se obtuvieron dos plantas tetraploides a partir de la duplicación de un diploide sexual que derivaba de un tetraploide apomítico (Cardone et al., 2006). Esas plantas fueron clasificadas como sexuales dada la variación que presentaba su progenie con marcadores moleculares. En aquel momento no se analizó el modo reproductivo por citoembriología, cuando se hizo, en el año 2007 se determinó que las plantas eran altamente sexuales, pero presentaban sacos apomíticos (Zappacosta et al., 2014), por lo cual se decidió no utilizarlas como parentales femeninos en las cruza para obtener la población segregante. En el año 2008 se logró introducir la accesión OTA-S (accesión PI 574506 del USDA, Estados Unidos), un genotipo 100 % sexual (Voigt, 1976; Meier et al, 2011). Este material vegetal fue utilizado como parental femenino en cruzamientos con plantas del cv. Tanganyika (accesión PI 234217 del USDA), obteniéndose una importante producción de semilla (Tabla 4). En la siembra de estas semillas se observaron problemas de germinación y vigor en las plántulas, lo cual dio por resultado un bajo número de plantas normales (Tabla 4). El análisis molecular de la progenie mediante marcadores AFLPs (Figura 5) para verificar la naturaleza híbrida de los individuos obtenidos reveló que gran parte de los plantas eran producidas por autofecundación (Figura 2).

Tabla 4. Número de semillas germinadas, germinadas sin tallo o sin raíz, plantas necróticas y plantas normales obtenidas de tres grupos de semillas provenientes del cruzamiento OTA-S x Tanganyika USDA, sobre medio de cultivo MS.

Cruzas	Número de semillas	Semillas germinadas	Plantas sin raíz/tallo	Plantas necróticas	Plantas normales	Porcentaje de plantas normales
ene-feb 2009	650	313	76	97	140	45
sep-nov 2009	1400	499	68	225	206	41
ene-mar 2010	663	312	132	137	111	36
Total	2713	1124	276	459	445	

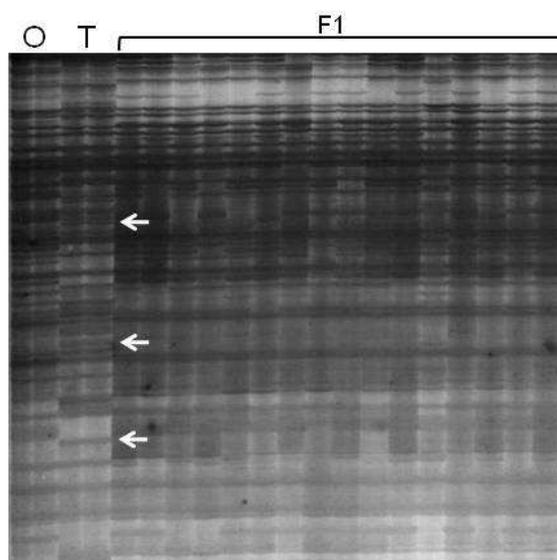


Figura 5. Patrones de amplificación de marcadores AFLPs de plantas de pasto llorón derivadas del cruzamiento OTA-S x Tanganyika USDA. A la izquierda del gel se observan los patrones de bandas parentales por duplicado y a su derecha los de las plantas descendientes F_1 . O: OTA-S; T: Tanganyika USDA. Las flechas en color blanco indican bandas polimórficas del padre.

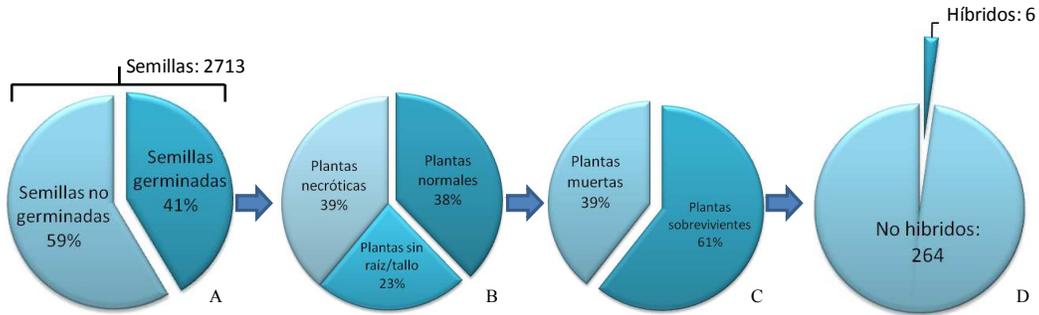


Figura 6. Porcentaje de plantas híbridas de pasto llorón obtenidas del cruzamiento OTA-S x Tanganyika USDA. A: Porcentaje de semillas germinadas y no germinadas; B: Porcentaje de plantas de desarrollo normal, plantas necróticas y plantas sin raíz/tallo; C: Porcentaje de plantas normales que sobrevivieron; D: Número final de plantas híbridas y no híbridas.

Dado el bajo porcentaje de individuos híbridos obtenidos del cruzamiento OTA-S x Tanganyika-USA, se evaluaron otros cultivares tetraploides como donantes de polen. Para ello, en el año 2014 se evaluaron individuos de los cultivares tetraploides ($2n = 4x = 40$) Morpa (accesión PI 591632 del USDA), Ermelo (accesión PI 232986 del USDA), Tanganyika (INTA) y Don Walter (INTA), los dos últimos genotipos provenientes del Banco de Germoplasma del INTA (EEA Anguil, La Pampa). En el caso de los tres primeros cultivares (Morpa, Ermelo y Tanganyika-INTA) se obtuvieron pocas semillas, pero cuando se trillaron las cruces de OTA-S x Don Walter se obtuvo un gran número de semillas. Este cultivar posee una ventaja adicional sobre los anteriores, que es un mayor parentesco con OTA-S, ya que ambos pertenecen al tipo agronómico conferta (Poverene, 1988; Covas, 1991). El análisis citoembriológico de Don Walter reveló que es un apomítico facultativo que posee un 75 % de sacos apomíticos y un 25 % de sacos sexuales. Con la semilla obtenida se procedió a la siembra *in vitro* en medio MS, transplante y análisis por marcadores moleculares para identificar plantas híbridas.

A fin de identificar los individuos híbridos se seleccionaron tres primers RAPDs, que presentaban polimorfismos entre los parentales. Los resultados se presentan en las Figuras 7 y 8.

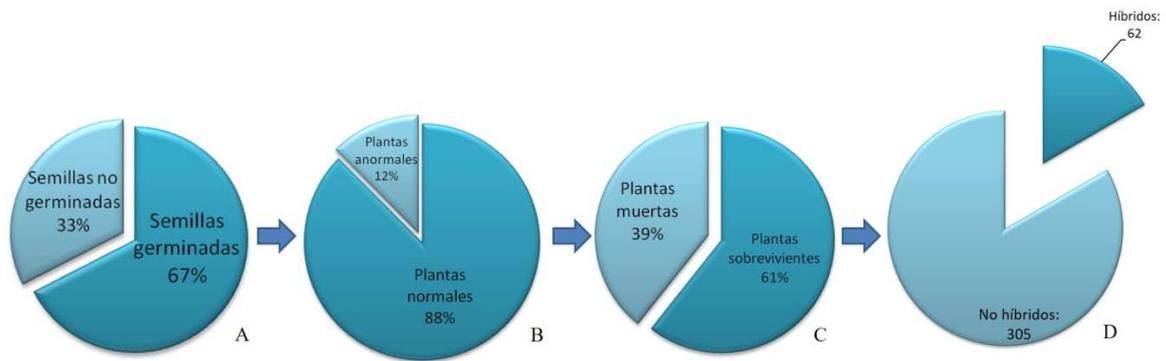


Figura 7. Porcentaje de plantas híbridas de pasto llorón obtenidas del cruzamiento OTA-S x Don Walter INTA. A: Porcentaje de semillas germinadas y no germinadas; B: Porcentaje de plantas de desarrollo normal, y plantas con desarrollo anormal; C: Porcentaje de las plantas normales que sobrevivieron; D: Número final de plantas híbridas y no híbridas.

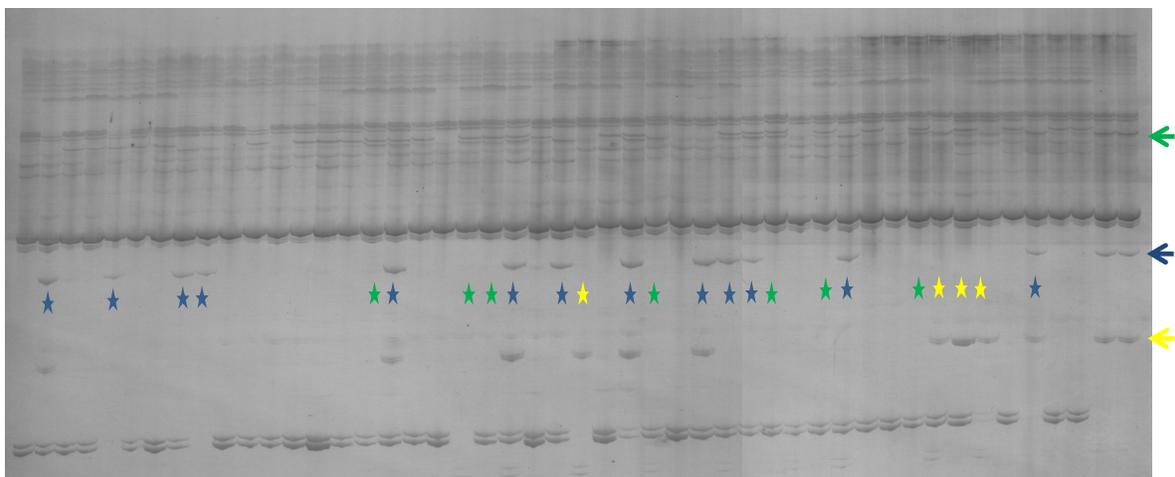


Figura 8. Patrones de amplificación de RAPDs (primer 248) de plantas de pasto llorón derivadas del cruzamiento OTA-S x Don Walter revelado en gel de acrilamida al 6 %. A la derecha del gel se observan los patrones de bandas parentales por duplicado y a su izquierda los de las plantas descendientes F_1 . O: OTA-S; DW: Don Walter-INTA. Las flechas en color indican bandas polimórficas del padre y las estrellas la presencia de marcadores paternos en la descendencia.

Finalmente se obtuvieron 367 plantas derivadas del cruzamiento entre los cultivares OTA-S y Don Walter. El origen híbrido se verificó en una primera etapa con marcadores RAPD y se seleccionaron 86 plantas. Posteriormente, luego de un análisis con marcadores AFLPs,

19 de estas plantas fueron eliminadas, ya que provendrían de autopolinización del progenitor femenino. Más adelante, y luego de la secuenciación, otros cinco individuos fueron eliminados debido a baja cobertura del GBS (ver más adelante en punto IV.3.3.3). En función de las consideraciones anteriores, la población para generar el mapa de ligamiento quedó finalmente constituida por 62 plantas híbridas. El análisis de ploidía realizado con el citómetro de flujo indicó que todas las plantas obtenidas eran del mismo nivel de ploidía que los parentales, es decir tetraploides.

IV.2 - Observaciones citoembriológicas

Una vez que los híbridos florecieron se realizó la colecta de panojas para la caracterización del modo reproductivo por citoembriología. En la Figura 9 se pueden observar las estructuras típicas usadas para la clasificación de los pistilos en procesos sexuales o apomícticos (diplospóricos). En la Tabla 5 se muestran los resultados de la observación de los cortes de 1.905 pistilos y en la Figura 10 se puede observar el porcentaje de procesos apomícticos y sexuales en 61 individuos de la población de mapeo, ya que una planta no floreció. Siguiendo el criterio de que una planta es considerada apomíctica cuando posee por lo menos un pistilo con reproducción apomíctica (Savidan, 2000), los 61 individuos de la población analizados se reparten en 27 sexuales y 34 apomícticos. Estos números, analizados con un test χ^2 (34:27, $\chi^2 = 0.37$), muestran una proporción 1:1 (apomixis/sexualidad), lo que indica un modo de herencia mendeliana siendo la apomixis dominante sobre sexualidad. A su vez se puede observar en la Figura 10 que el porcentaje de procesos apomícticos en las plantas apomícticas es variable (0-97 %), existiendo todo un gradiente de expresión de la apomixis.

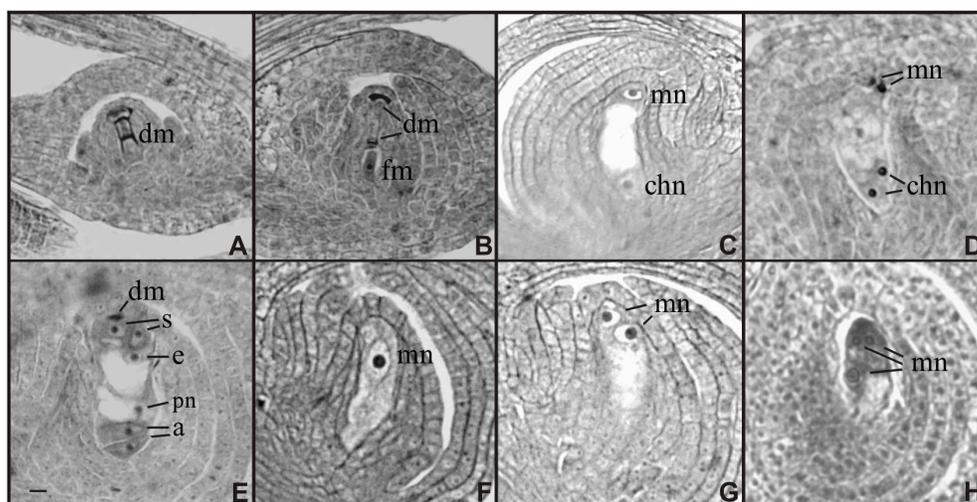


Figura 9. Desarrollo del saco sexual (A, B, C, D, E) y diplospórico (F, G, H) en plantas de pasto llorón. Bar: 10 μ m. Secciones teñidas con safranina-fast green. (A) Tres células de una tétrada lineal de megasporas. (B) Megaspora funcional calazal y megasporas degenerantes. (C) Saco binucleado. (D) Saco tetranucleado. (E) Saco octanucleado maduro. (F) Célula madre de la megáspora elongada. (G) Saco binucleado. (H) Saco tetranucleado maduro. a: antípodas, chn: núcleos calazales, dm: megasporas degenerantes, e: ovocélula, fm: megaspora funcional, mn: núcleo micropilar, pn: núcleo polar, s: sinérgidas.

Tabla 5. Pistilos de plantas híbridas de pasto llorón provenientes de la cruce OTA-S x Don Walter, observados con la tinción de safranina-fast green para caracterizar a la plantas por su modo reproductivo en apomícticas o sexuales. Sex: Pistilos sexuales; Apo: Pistilos apomícticos; % Apo: Porcentaje de pistilos apomícticos; % Sex: Porcentaje de pistilos sexuales; A-S: Clasificación de la planta por su modo reproductivo (A: Apomíctica, S: Sexual).

Genotipo	Apo	Sex	Total	% Apo	% Sex	A-S	Genotipo	Apo	Sex	Total	% Apo	% Sex	A-S
DW	59	21	80	74	26	A	Z138	9	14	23	39	61	A
OTA	0	28	28	0	100	S	Z140	0	52	52	0	100	S
Z002	22	3	25	88	12	A	Z146	31	15	46	67	33	A
Z005	20	4	24	83	17	A	Z154	3	7	10	30	70	A
Z007	13	0	13	100	0	A	Z155	0	26	26	0	100	S
Z008	8	25	33	24	76	A	Z157	0	27	27	0	100	S
Z016	0	40	40	0	100	S	Z158	0	52	52	0	100	S
Z017	18	3	21	86	14	A	Z160	0	25	25	0	100	S
Z020	0	21	21	0	100	S	Z161	0	18	18	0	100	S

Z022	42	13	55	76	24	A	Z162	0	11	11	0	100	S
Z024	17	9	26	65	35	A	Z164	0	37	37	0	100	S
Z025	0	26	26	0	100	S	Z167	0	40	40	0	100	S
Z027	0	5	5	0	100	S	Z171	0	22	22	0	100	S
Z028	0	74	74	0	100	S	Z174	0	27	27	0	100	S
Z030	23	3	26	88	12	A	Z191	4	19	23	17	83	A
Z031	17	2	19	89	11	A	Z194	32	3	35	91	9	A
Z032	21	5	26	81	19	A	Z196	30	20	50	60	40	A
Z033	0	23	23	0	100	S	Z197	48	5	53	91	9	A
Z034	0	43	43	0	100	S	Z203	17	2	19	89	11	A
Z036	6	0	6	100	0	A	Z208	0	20	20	0	100	S
Z039	0	8	0	0	100	S	Z210	24	2	26	92	8	A
Z056	0	35	35	0	100	S	Z218	1	30	31	3	97	A
Z057	15	16	31	48	52	A	Z219	0	40	40	0	100	S
Z103	19	23	42	45	55	A	Z221	0	50	50	0	100	S
Z105	23	12	35	66	34	A	Z222	6	0	6	100	0	A
Z109	7	1	8	88	13	A	Z227	2	13	15	13	87	A
Z111	37	7	44	84	16	A	Z237	21	7	28	75	25	A
Z113	0	51	51	0	100	S	Z252	20	4	24	83	17	A
Z119	0	44	44	0	100	S	Z259	30	1	31	97	3	A
Z122	2	12	14	14	86	A	Z269	1	30	31	3	97	A
Z128	0	34	34	0	100	S	Z271	22	2	24	92	8	A
Z131	0	33	33	0	100	S	Total	670	1245	1907			

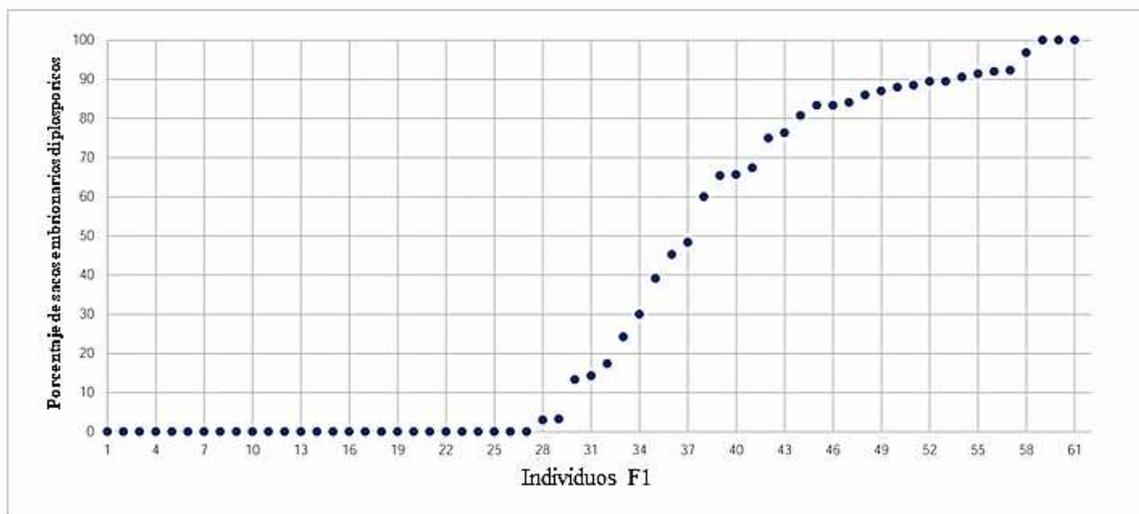


Figura 10. Porcentaje de sacos embrionarios diplospericos y sexuales en los individuos de la población de mapeo de pasto llorón (OTA-S x Don Walter).

Cabe aclarar que con este análisis, donde los individuos de la población de mapeo fueron caracterizados como sexuales o diplospóricos es posible mapear regiones condicionantes de

la diplosporía (capacidad de formar sacos no reducidos), pero no la capacidad de desarrollar embriones a partir de estos sacos (partenogénesis). Esto se considerará más adelante dentro del grupo de trabajo como parte de la tesis de la Ing. Agr. Jimena Gallardo.

IV.3- Marcadores Moleculares

IV.3.1 - Marcadores AFLP

Las 12 combinaciones de primers de AFLPs utilizadas permitieron identificar 93 bandas polimórficas en los parentales de la población (36 para OTA-S y 57 para DW). Con estos marcadores fue posible identificar 19 plantas no híbridas, las cuales habían sido seleccionadas positivamente con los marcadores RAPD. En la Figura 11 se muestra un patrón de amplificación típico, revelado en geles de poliacrilamida al 6 % teñidos con plata.

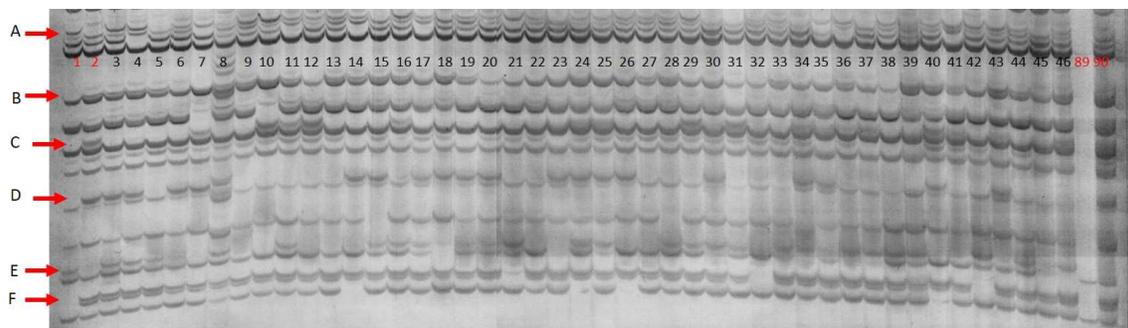


Figura 11. Patrón de amplificación de AFLP típico revelado en geles de poliacrilamida al 6 % teñidos plata. O: OTA-S; DW: Don Walter-INTA; calles 3-48: individuos de la población F₁. Las flechas en color indican bandas polimórficas en los parentales.

IV.3.2 - Marcadores EST-SSR

Los marcadores EST-SSR se obtuvieron a partir de primers desarrollados en nuestro laboratorio en base a transcriptomas florales de *E. curvula* desarrollados previamente (Cervigni et al., 2008a; Garbus et al., 2017). De aquí se seleccionaron 9 primers que resultaron polimórficos entre los parentales de la población. Como este tipo de patrones de amplificación son complejos de analizar, debido a la presencia de múltiples bandas, se analizaron las bandas independientemente y se codificaron como presencia/ausencia, como se realiza en un marcador dominante. Otros autores han tomado el mismo criterio para

evaluar este tipo de marcadores codominantes en poliploides (Ebina et al., 2007; Cidade et al., 2013; Armando et al., 2015). En total se genotiparon 11 marcadores en toda la población (seis presentes en OTA-S, SSR1-SSR6 y cinco presentes en Don Walter, SSR1 a SSR5). En la Figura 12 se muestra un patrón de amplificación típico, revelado en gel de poliacrilamida al 6 % teñido con plata.

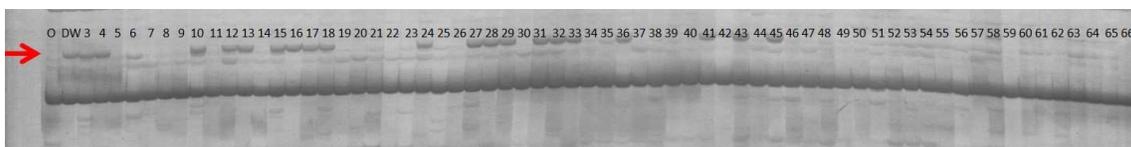


Figura 12. Patrón de amplificación de SSR en gel de poliacrilamida al 6 % teñido con plata. O: OTA-S; DW: Don Walter-INTA; calles 3-66: individuos de la población F₁. La flecha en color indica una banda polimórfica entre los parentales.

IV.3.3 - GBS y Marcadores SNP

IV.3.3.1- Elección de la enzima de corte

El primer paso antes de realizar la librería para GBS fue la elección de la enzima de restricción para generar los fragmentos de tamaño adecuado. En la La Figura 13 se muestra que la enzima *ApeKI* y la combinación de las enzimas *PstI/MspI* y *NsiI/MspI* logran cortar el ADN de la muestra control (mezcla de ADN de los parentales) en fragmentos de aproximadamente 200 pb, mientras que las enzimas *PstI* y *NsiI* en forma independiente no lo logran.

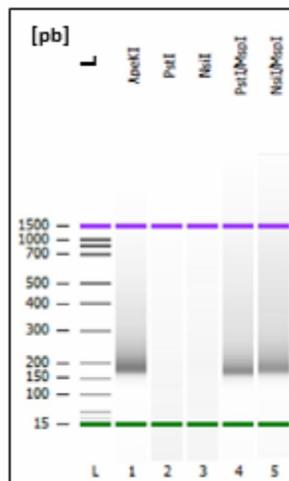


Figura 13. Electroforesis de fragmentos de ADN de pasto llorón digeridos con las enzimas *ApeKI*, *PstI*, *NsiI* y la combinación de las enzimas *PstI/MspI* y *NsiI/MspI*. L: Marcador de peso molecular.

La distribución de los fragmentos de ADN obtenidos de la digestión con *ApeKI* se puede observar en la Figura 14, como un pico entre 184 y 187 pb. En la Tabla 6 esto se correlaciona con la mayor concentración de fragmentos de esos tamaños, que sumados acumulan 19,56 ng/ul. En el caso de las enzimas combinadas, como se puede ver en la Figura 15 y Tablas 7 y 8, se lograron fragmentos de similar tamaño pero en menor cantidad. En base a estos análisis se optó por utilizar la enzima *ApeKI* para la construcción de la librería de ADN para GBS.

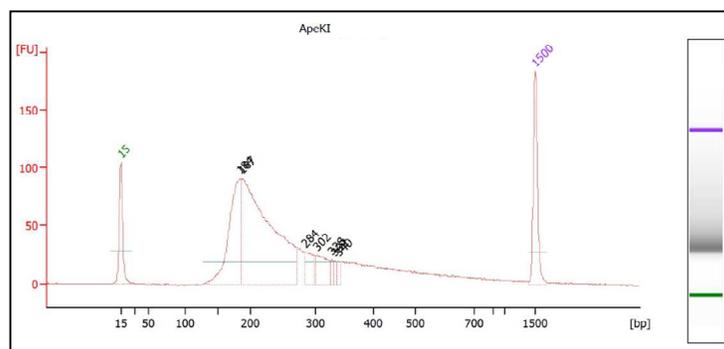
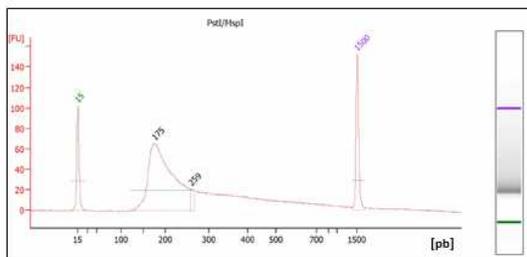


Figura 14. Tamaño de los fragmentos de ADN de una mezcla de los parentales de la población de mapeo de *E. curvula* (OTA-S x Don Walter) obtenidos de la digestión con *ApeKI* analizados con el BioAnalyzer 2100.

Tabla 6. Análisis de fragmentos de ADN de una mezcla de los parentales de la población de mapeo de *E. curvula* (OTA-S x Don Walter) cortados con *ApeKI*.

Pico	Tamaño [pb]	<i>ApeKI</i>		Observaciones
		Conc. [ng/μl]	Molaridad [nmol/l]	
1	15	4.20	424.2	Marcador inferior
2	184	5.34	43.9	
3	187	14.22	115.0	
4	284	0.99	5.3	
5	302	1.23	6.2	
6	328	0.21	1.0	
7	332	0.23	1.0	
8	340	0.28	1.2	
9	1,500	2.10	2.1	Marcador superior

A



B

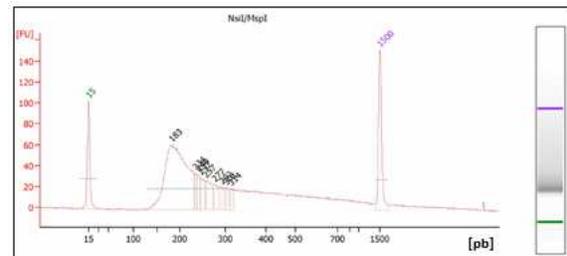


Figura 15. Tamaño de los fragmentos de ADN de una mezcla de los parentales de la población de mapeo de *E. curvula* (OTA-S x Don Walter) obtenidos de la digestión con *PstI/MspI* (A) y *NsiI/MspI* (B) analizados con el BioAnalyzer 2100.

Tabla 7. Análisis de fragmentos de ADN de una mezcla de los parentales de la población de mapeo de *E. curvula* (OTA-S x Don Walter) cortados con *PstI/MspI*.

Pico	Tamaño [pb]	<i>PstI/MspI</i>		Observaciones
		Conc. [ng/μl]	Molaridad [nmol/l]	
1	15	4.20	424.2	Marcador inferior
2	175	16.51	142.8	
3	259	0.57	3.3	
4	1,500	2.10	2.1	Marcador superior

Tabla 8. Análisis de fragmentos de ADN de una mezcla de los parentales de la población de mapeo de *E. curvula* (OTA-S x Don Walter) cortados con *NsiI/MspI*.

Pico	Tamaño [pb]	<i>NsiI/MspI</i>		Observaciones
		Conc. [ng/μl]	Molaridad [nmol/l]	
1	15	4.20	424.2	Marcador inferior
2	183	12.19	100.9	
3	234	0.58	3.7	
4	240	0.63	4.0	
5	247	0.96	5.9	
6	257	1.23	7.2	
7	277	0.65	3.6	
8	292	0.49	2.6	
9	301	0.44	2.2	
10	314	0.36	1.7	
11	1,500	2.10	2.1	Marcador superior

IV.3.3.2- Análisis de secuencias Illumina

El informe de secuenciación FastQC entregó un tamaño de secuencias de 101 pb (Figura 16), con una concentración de CG del 59 % (Figura 17). Sin embargo, se identificó la presencia de un alto contenido de adaptadores (Figura 18), es decir que las secuencias tenían copias en tándem de adaptadores en los extremos. A raíz de este resultado, el servicio de secuenciación de la Universidad de Wisconsin decidió realizar una nueva limpieza de la librería con perlas magnéticas y una nueva ronda de secuenciación. En esta nueva secuenciación se obtuvieron resultados similares, por lo que se optó por usar las secuencias obtenidas en las dos rondas de secuenciación, eliminar los adaptadores de las secuencias obtenidas y las secuencias que quedaron demasiado cortas para el análisis posterior fueron eliminadas (Tassel UNEAK necesita secuencias de 64 pb para buscar SNP).

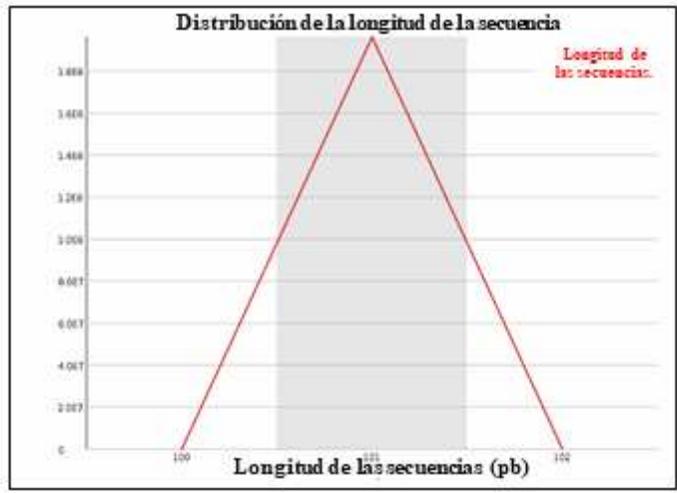


Figura 16. Distribución del largo (en pb) de las secuencias obtenidas de la librería de ADN de pasto llorón utilizando la plataforma Illumina.

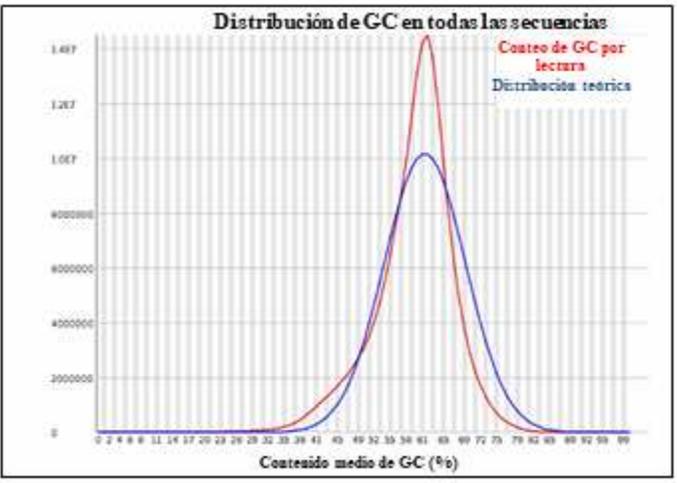


Figura 17. Contenido de GC/secuencia de los fragmentos de librerías de ADN de pasto llorón obtenidas utilizando la plataforma Illumina.

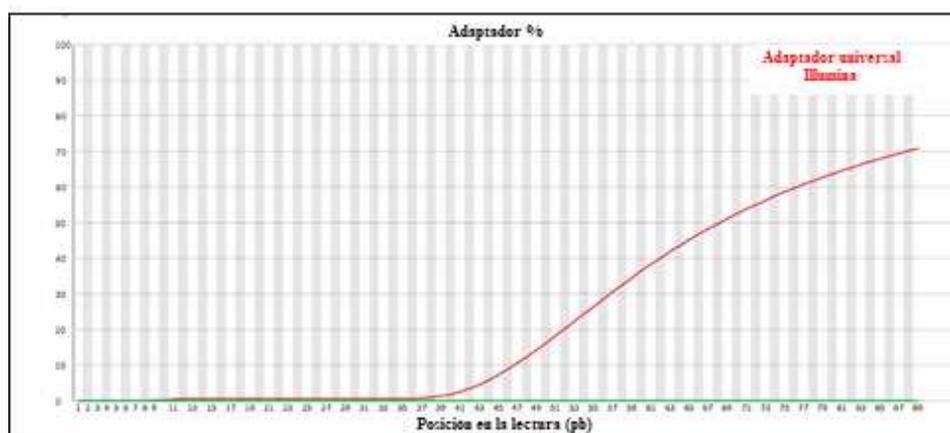


Figura 18. Contenido de adaptadores dentro los fragmentos de pasto llorón secuenciados con la plataforma Illumina.

IV.3.3.3- Filtrado de los SNPs

El conjunto de las dos rondas de secuenciación produjo 366.193.356 lecturas de 100 pb. Como se mencionara en el ítem anterior, se eliminaron 33.350.780 lecturas de baja calidad y sin el sitio de corte de la *ApeKI*, quedando 332.842.576 lecturas que fueron analizadas con el software Tassel UNEAK para identificar SNPs (*de novo* SNP discovery y SNP calling). En este paso se eliminaron cinco individuos de la población (Z116, Z154, Z217, Z223 y Z252) por su bajo número de lecturas. La profundidad de cobertura para cada muestra se detalla en la Tabla Suplementaria S2.

La búsqueda de SNPs con el software Tassel UNEAK identificó 178.559 SNPs. Estos datos fueron posteriormente analizados con Excel para eliminar los SNPs que no cumplieran con los criterios descritos en la sección Materiales y Métodos. El primer paso fue eliminar los marcadores con datos faltantes en las plantas parentales quedando 106.105 SNP. Luego se seleccionaron los SNP segregantes que eran heterocigotos en uno de los progenitores y homocigotos en el otro, lo que dió como resultado 28.074 y 33.765 SNP para OTA-S y Don Walter, respectivamente. Luego se eliminaron los SNPs con alelos inesperados en la progenie, por ejemplo, algunos SNPs con alelos C/G en uno de los parentales y C/C en el otro presentaban individuos de la descendencia con G/G que no eran esperados. Una explicación para la aparición de estos alelos inesperados podría ser la falta de cobertura en esa región del genoma o errores en la secuenciación. Como no se puede adjudicar el error a

los alelos parentales o de la descendencia, la sola presencia de un individuo de la progenie con alelos inesperados hizo eliminar el SNP de los análisis subsiguientes. Se identificaron y eliminaron 5.426 y 5.340 SNPs con alelos inesperados para OTA-S y Don Walter, respectivamente. Posteriormente se analizó la segregación y solo se conservaron los SNPs que presentaban una segregación 1:1 acorde a un test χ^2 . Finalmente, se eliminaron los SNPs que presentaron más de un 5 % de datos faltantes (missing data). El número final de marcadores SNP para OTA-S fue de 1.447 y de 2.192 para Don Walter. La Tabla 9 muestra los resultados obtenidos luego de cada paso del proceso de filtrado de marcadores.

Tabla 9. Pasos del proceso de filtrado de marcadores y número de SNPs seleccionados para cada parental de la población de mapeo de *E. curvula* (OTA-S y Don Walter).

Marcadores SNP	OTA-S	Don Walter
Heterocigotas en cada parental	28.074	33.765
Sin alelos inesperados	22.648	28.425
Alelos de dosis simple (segregación 1:1)	9.829	11.991
Datos perdidos \leq 5 %	1.447	2.192

IV.4 – Mapa de ligamiento

En la construcción de los mapas de ligamiento se utilizaron SNPs (3.639 marcadores), SSRs (11 marcadores) y AFLPs (93 marcadores) distribuidos en cada parental como se muestra en la Tabla 10. El número final de marcadores para cada mapa fue 1.489 para OTA-S y 2.255 para Don Walter. En este último también se sumó el fenotipo (modo reproductivo) con el nombre de APO (diplosporía).

Tabla 10. Número total de marcadores para cada parental de la población de mapeo de *E. curvula* (OTA-S x Don Walter).

Tipo de Marcador	OTA-S	Don Walter
SNPs	1.447	2.192
SSRs	6	5
AFLPs	36	57
Diplosporía		1
Total	1.489	2.255

Usando valores de LOD entre 7 y 8,5 se armaron 40 grupos de ligamiento para Don Walter, constituidos por 2.019 marcadores (Tabla 11), con una distancia promedio entre marcadores de 0,98 cM. Solo 236 marcadores (10,46 %) quedaron sin asignarse a ningún grupo de ligamiento. La longitud de los grupos de ligamiento se encontró en el rango de 15 a 93 cM y la distancia genética mas larga entre marcadores fue de 0 a 14,2 cM. El promedio de marcadores por grupo fue de 50,5, quedando conformados los grupos de ligamiento por entre 7 y 123 marcadores. En la Figura 19 se presentan los 40 grupos de ligamiento de Don Walter, con el orden y nombre de los marcadores y la distancia entre ellos (en cM).

Tabla 11. Distribución de los 40 grupos de ligamiento generados en ambos parentales de la población de mapeo de *E. curvula* (OTA-S x D. Walter), número de marcadores por grupo y longitud de los mismos (en cM).

LG	OTA-S		Don Walter	
	Nº de marcadores	Longitud (cM)	Nº de marcadores	Longitud (cM)
1	43	33,3	123	64,1
2	28	30,6	103	70,4
3	47	40,8	66	57,9
4	101	63,0	118	65,7
5	65	63,2	109	53,7
6	62	36,1	103	82,1
7	57	49,1	97	65,9
8	54	29,5	94	93,0
9	53	72,5	84	75,5
10	45	23,7	75	71,4
11	46	43,9	73	68,6
12	45	47,6	65	61,4
13	42	27,5	63	79,2
14	42	46,4	62	56,3
15	41	76,7	62	63,0
16	37	31,3	61	56,0
17	32	21,2	58	56,2
18	31	26,8	54	55,4
19	30	41,1	51	31,4
20	29	52,3	50	35,4

21	24	28,6	46	64,7
22	19	39,3	45	32,6
23	18	29,6	36	40,7
24	17	43,5	35	31,5
25	16	55,6	33	27,9
26	15	25,8	31	65,2
27	13	20,4	28	62,6
28	8	20,1	28	23,1
29	8	28,5	21	30,0
30	7	29,4	20	29,1
31	7	9,8	19	42,9
32	7	39,2	17	34,8
33	6	14,3	13	32,7
34	3	8,3	13	40,4
35	3	15,7	13	32,0
36	3	32,0	13	18,9
37	3	14,7	12	34,3
38	3	16,7	9	36,8
39	2	1,6	9	18,4
40	2	5,0	7	15,0
Total	1.114	1.335,0	2.019	1.976,2

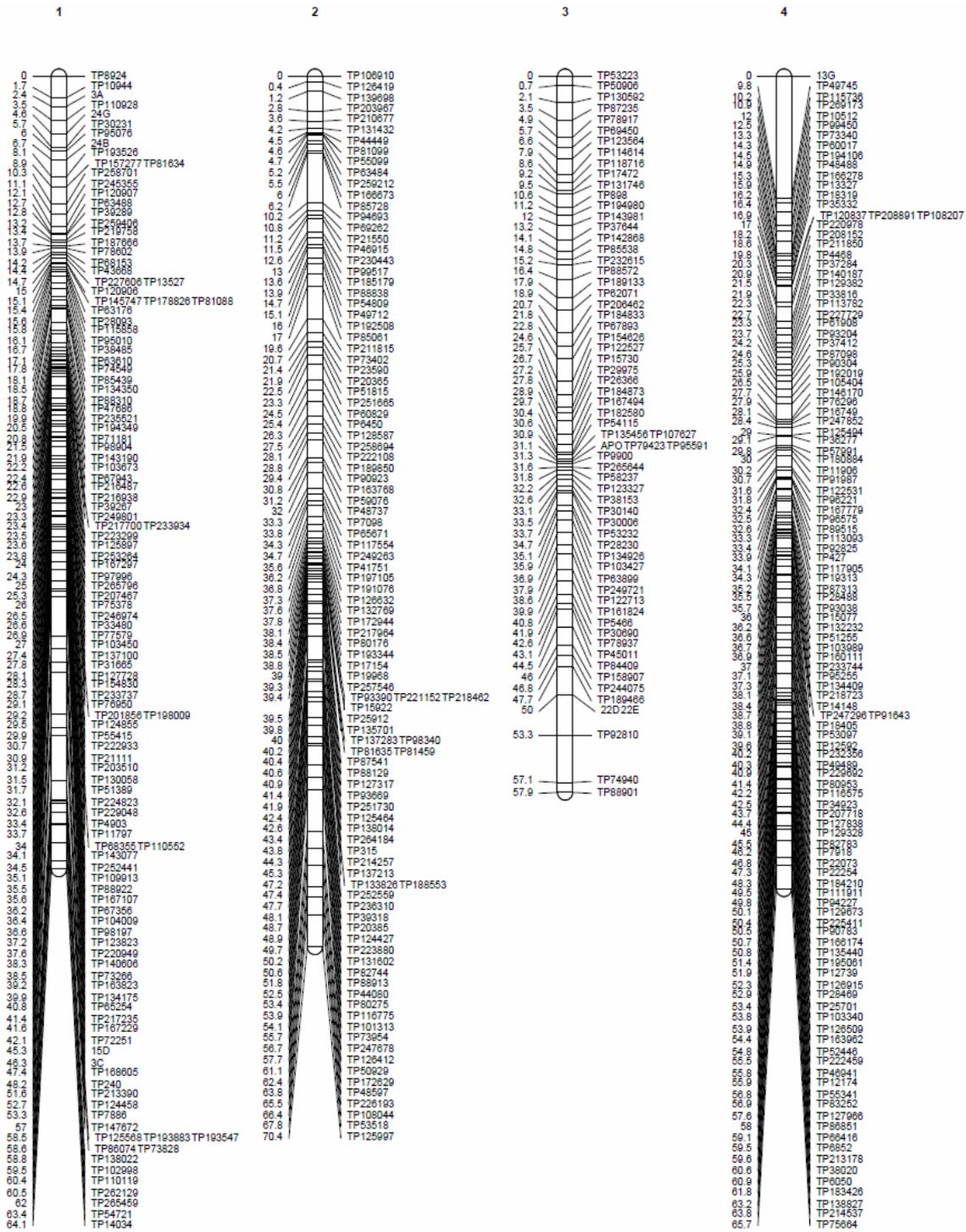


Figura 19 (continúa)

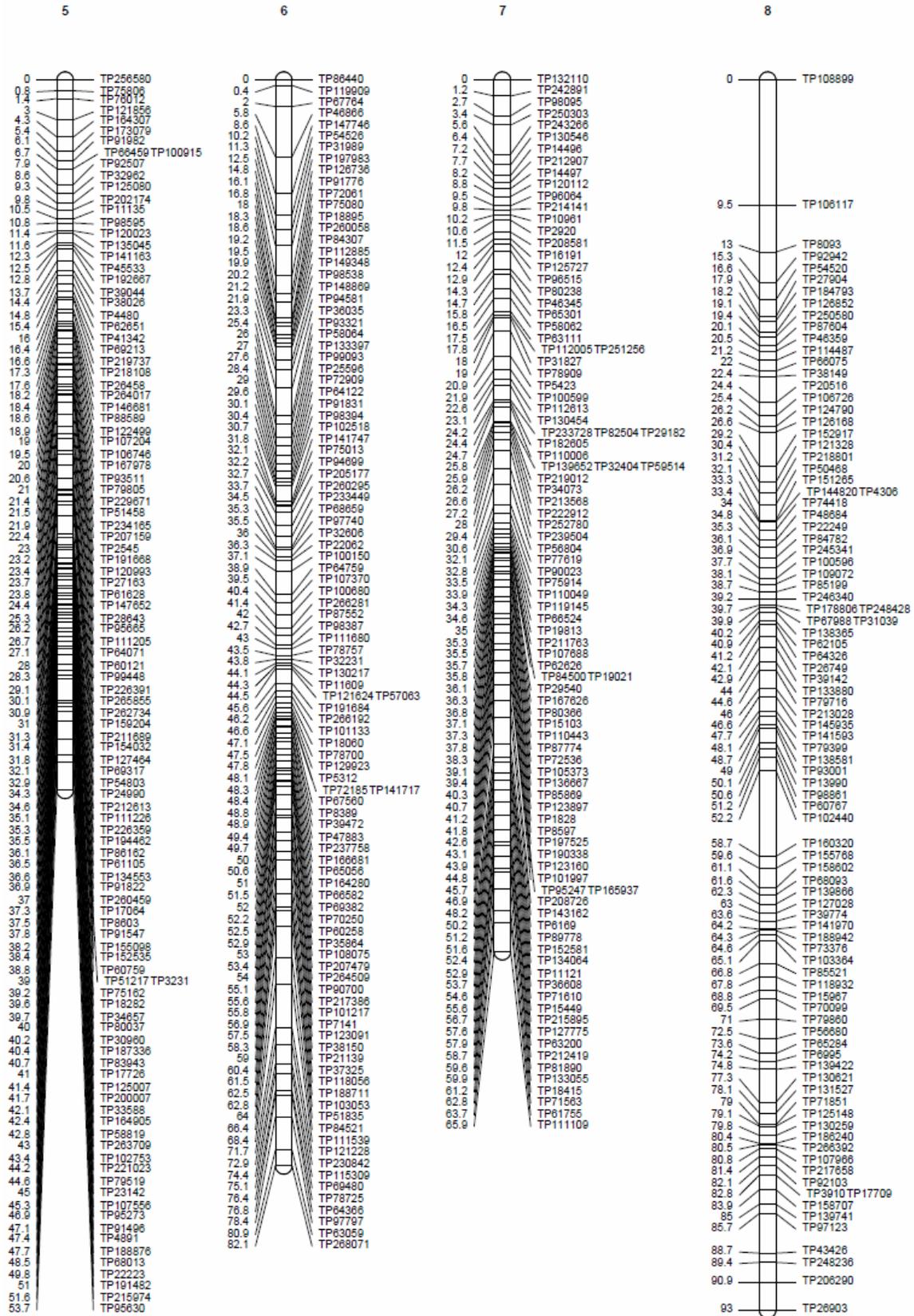


Figura 19 (continúa)

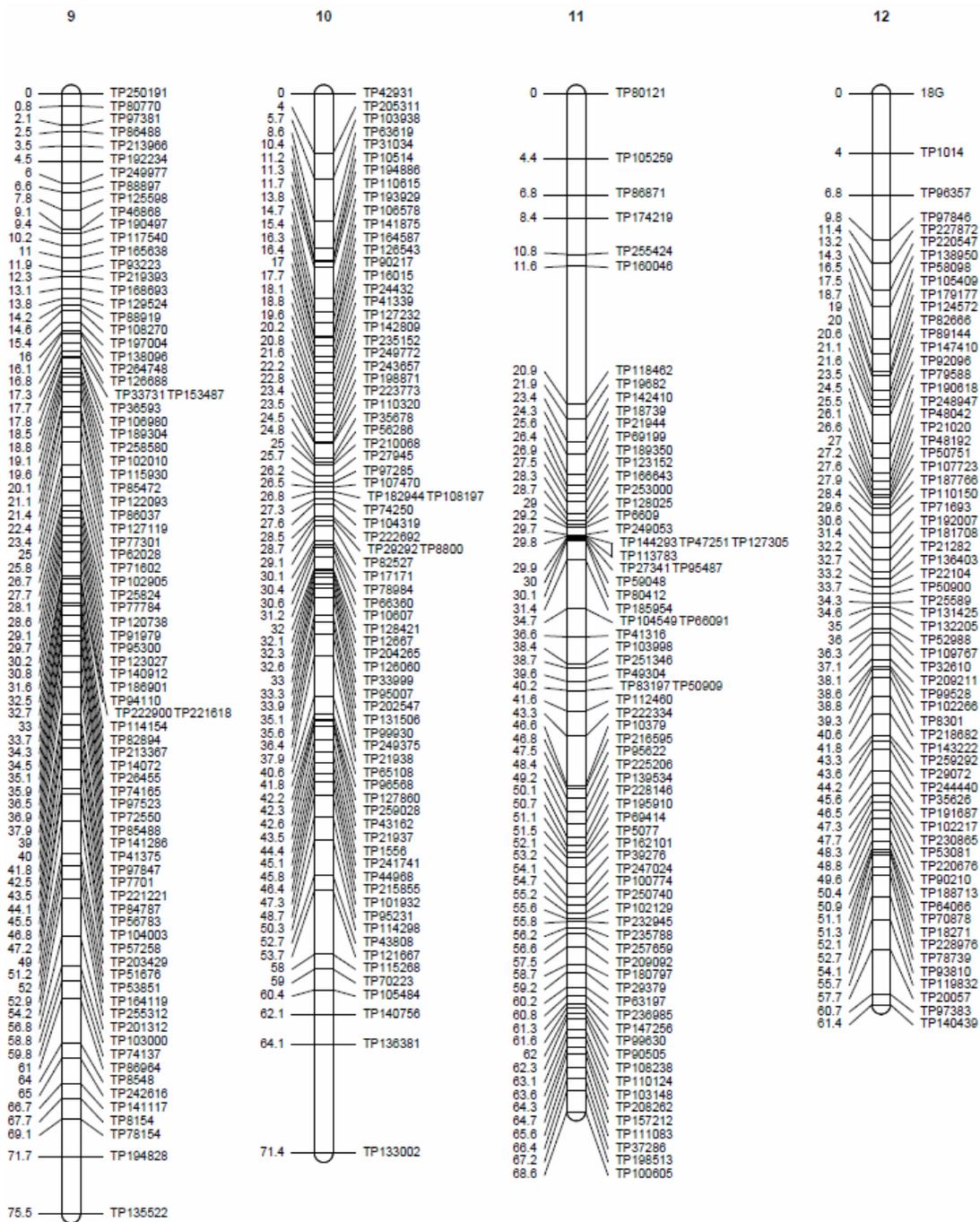


Figura 19 (continúa)

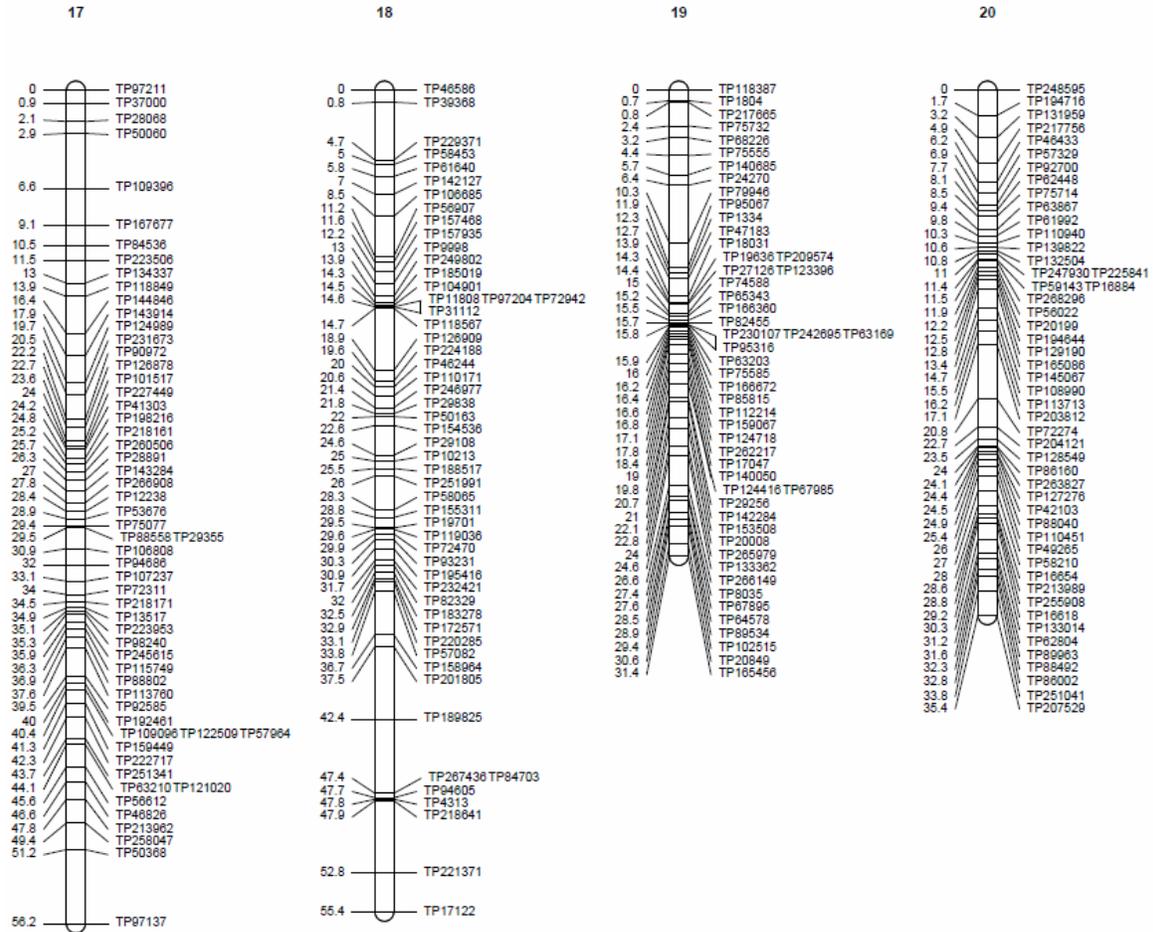


Figura 19 (continúa)

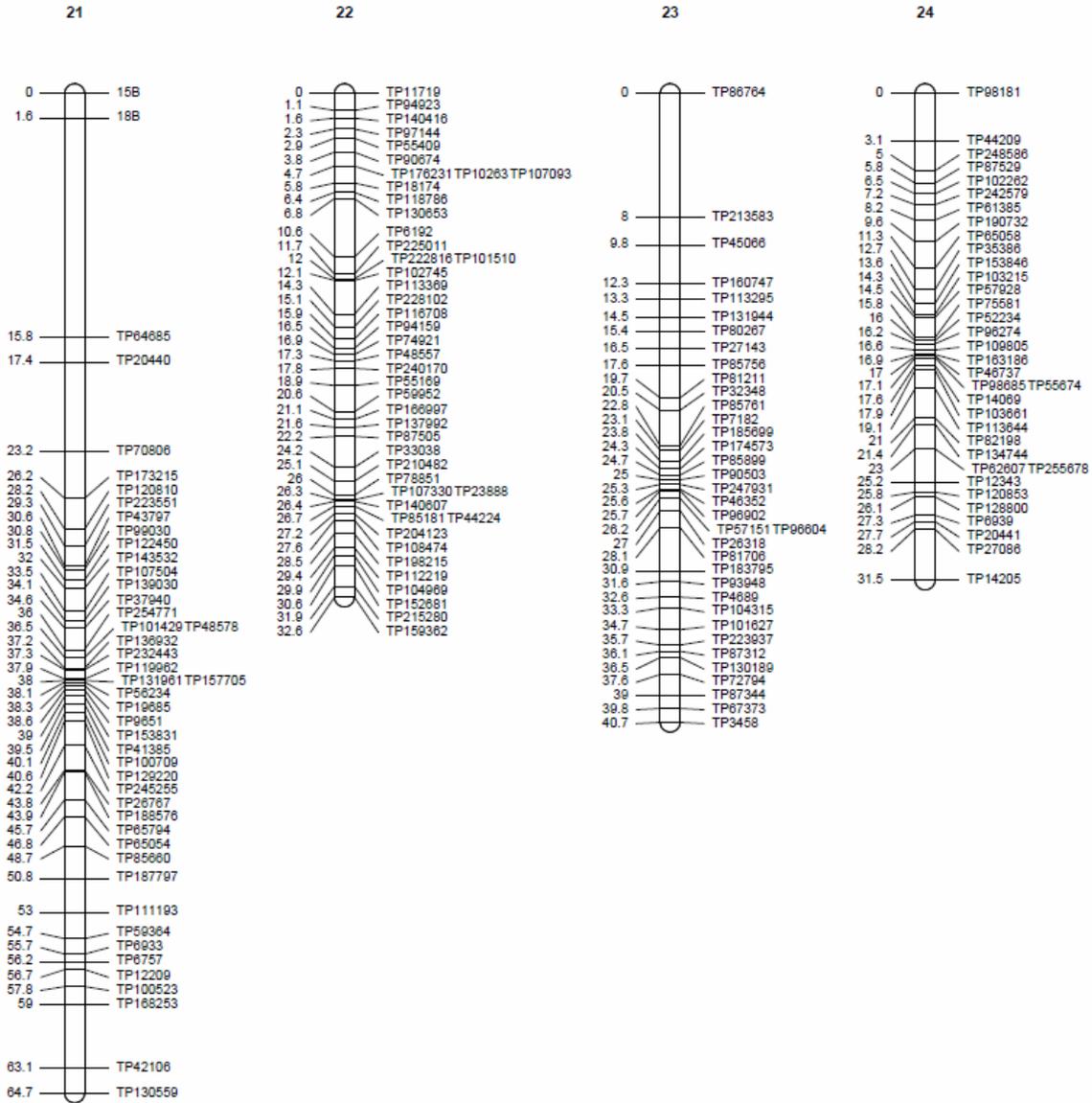


Figura 19 (continúa)

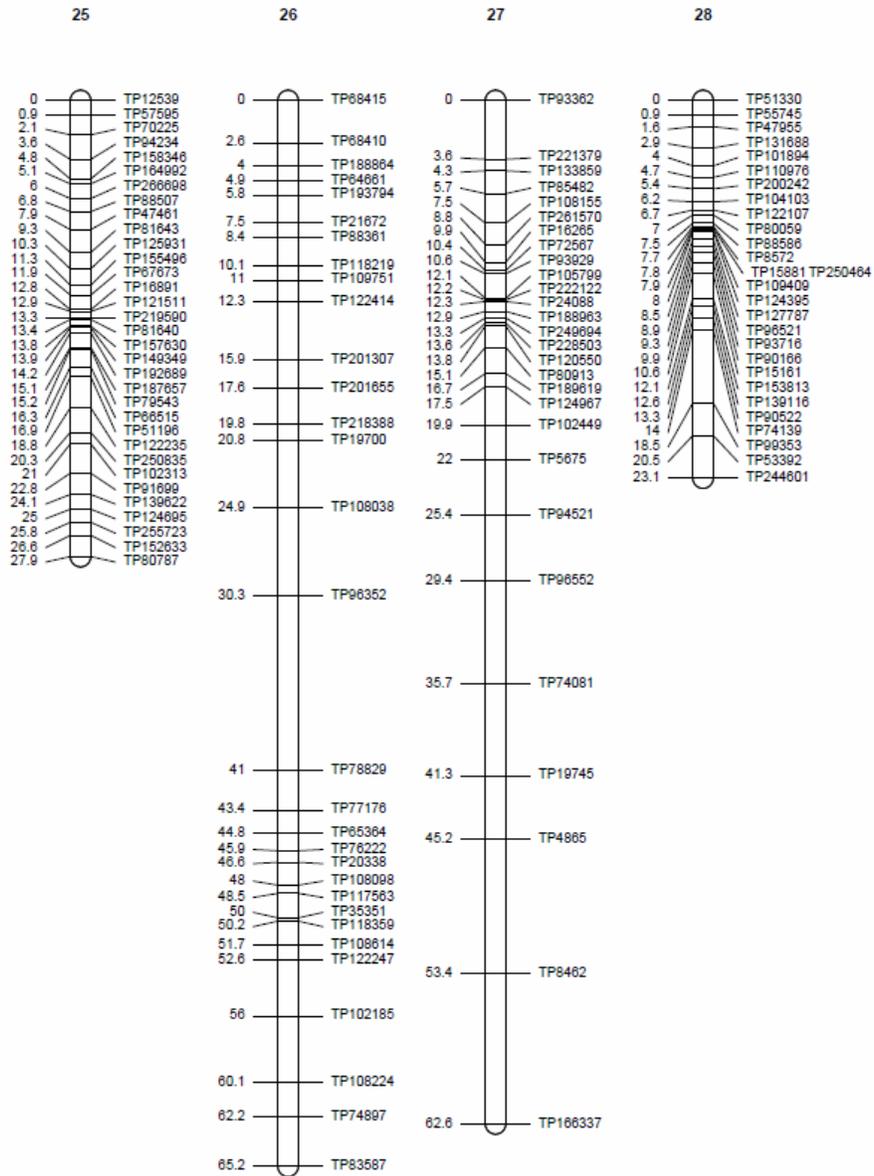


Figura 19 (continúa)

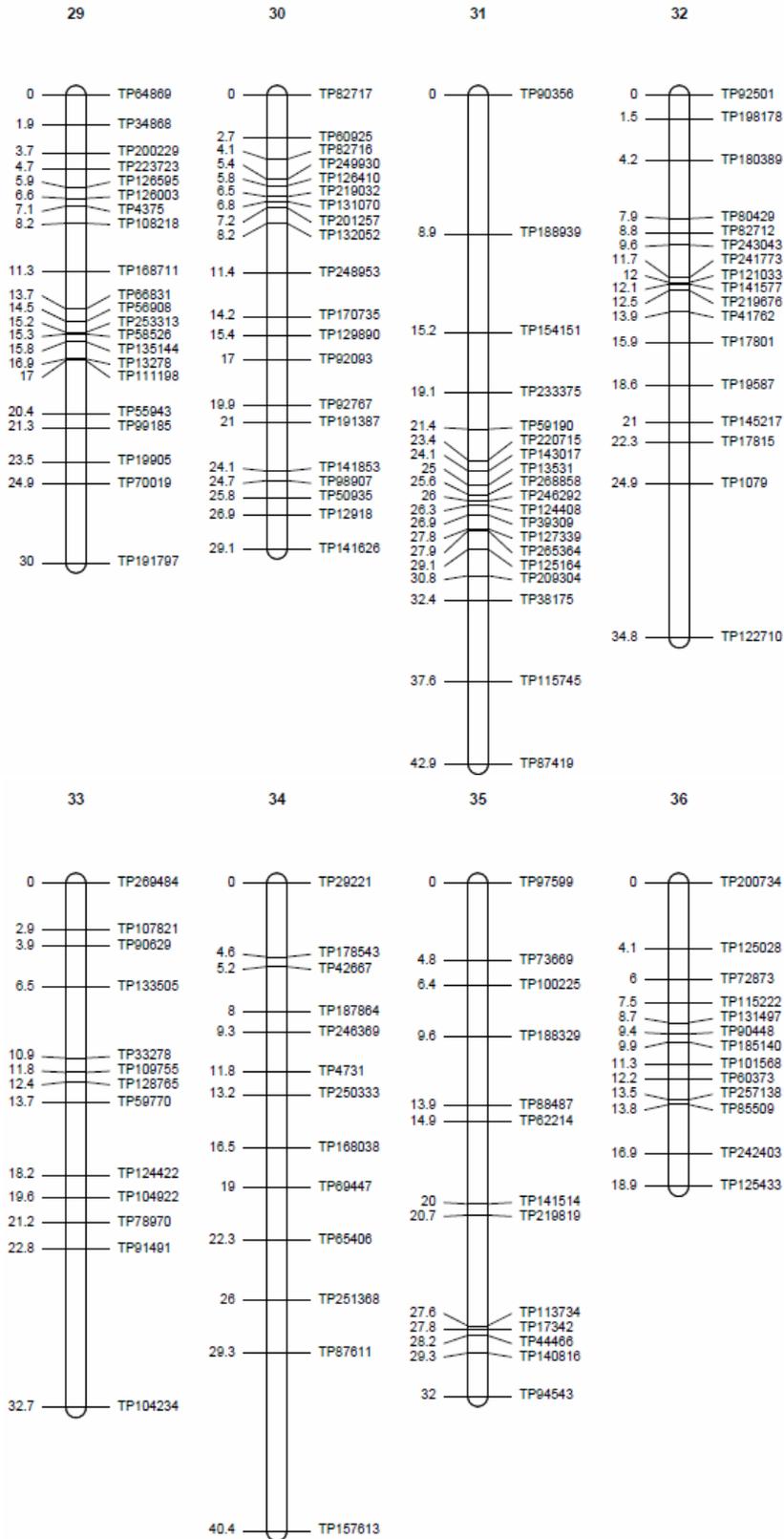


Figura 19 (continúa)

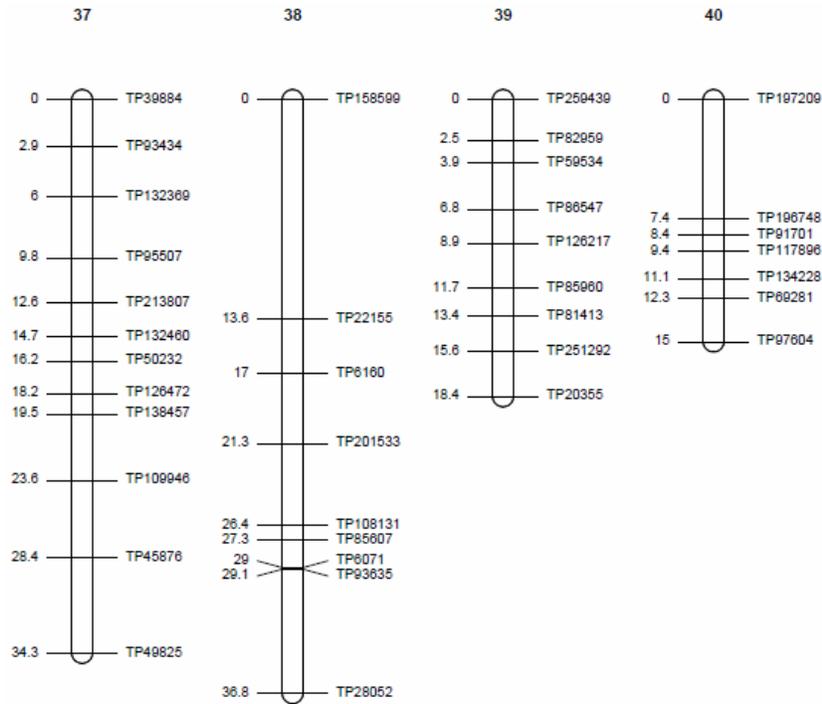


Figura 19. Mapa de ligamiento del genotipo apomíctico cv. Don Walter de pasto llorón. Los grupos de ligamiento se construyeron utilizando el programa Joinmap 4.1. El nombre de los marcadores se encuentra a la derecha y la distancia entre marcadores (en cM) a la izquierda de cada grupo de ligamiento.

El carácter diplosporía (APO) se ubicó en el grupo de ligamiento 3 del mapa de Don Walter, cosegregando con cuatro marcadores SNP (TP135456, TP107627, TP79423 y TP95591) que presentan una frecuencia de recombinación de 0 con el locus APO (Figura 14). Esta falta de recombinación en el entorno del locus esta en concordancia con estudios realizados en otras especies, donde se ha informado una zona de baja recombinación en el entorno del locus APO (Ozias-Akins y van Dijk, 2007; Albertini et al., 2010; Ortiz et al., 2013). En la Figura 20 se muestra un detalle de los marcadores que flanquean a la región determinante del carácter diplosporía en *E. curvula*.

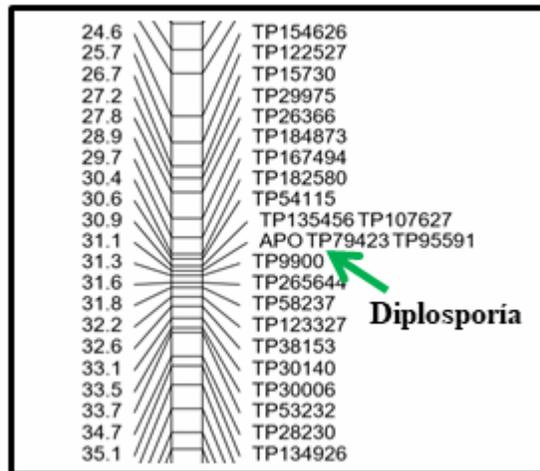


Figura 20. Fragmento del grupo de ligamiento 3 del cv. Don Walter de pasto llorón donde se ubica el locus APO, determinante de la diplosporia.

En el caso del mapa materno (OTA-S) se utilizaron para su construcción 1.447 SNPs, 36 AFLPs y 6 SSRs, todos ellos de segregación 1:1. Con los marcadores se formaron 40 grupos de ligamiento utilizando valores de LOD entre 7,0 y 9,0 (Figura 21), constituido por un total de 1.114 marcadores, con una distancia promedio entre marcadores de 1,2 cM. Trescientos setenta y cinco marcadores (25,2 %) quedaron sin asignarse a ningún grupo de ligamiento. La longitud de los grupos de ligamiento se encontró en un rango de 5 a 72 cM y la distancia genética entre marcadores fue de 0 a 20,7 cM. El promedio de marcadores por grupo fue de 27,85, pero se identificaron grupos conformados entre 2 y 101 marcadores.

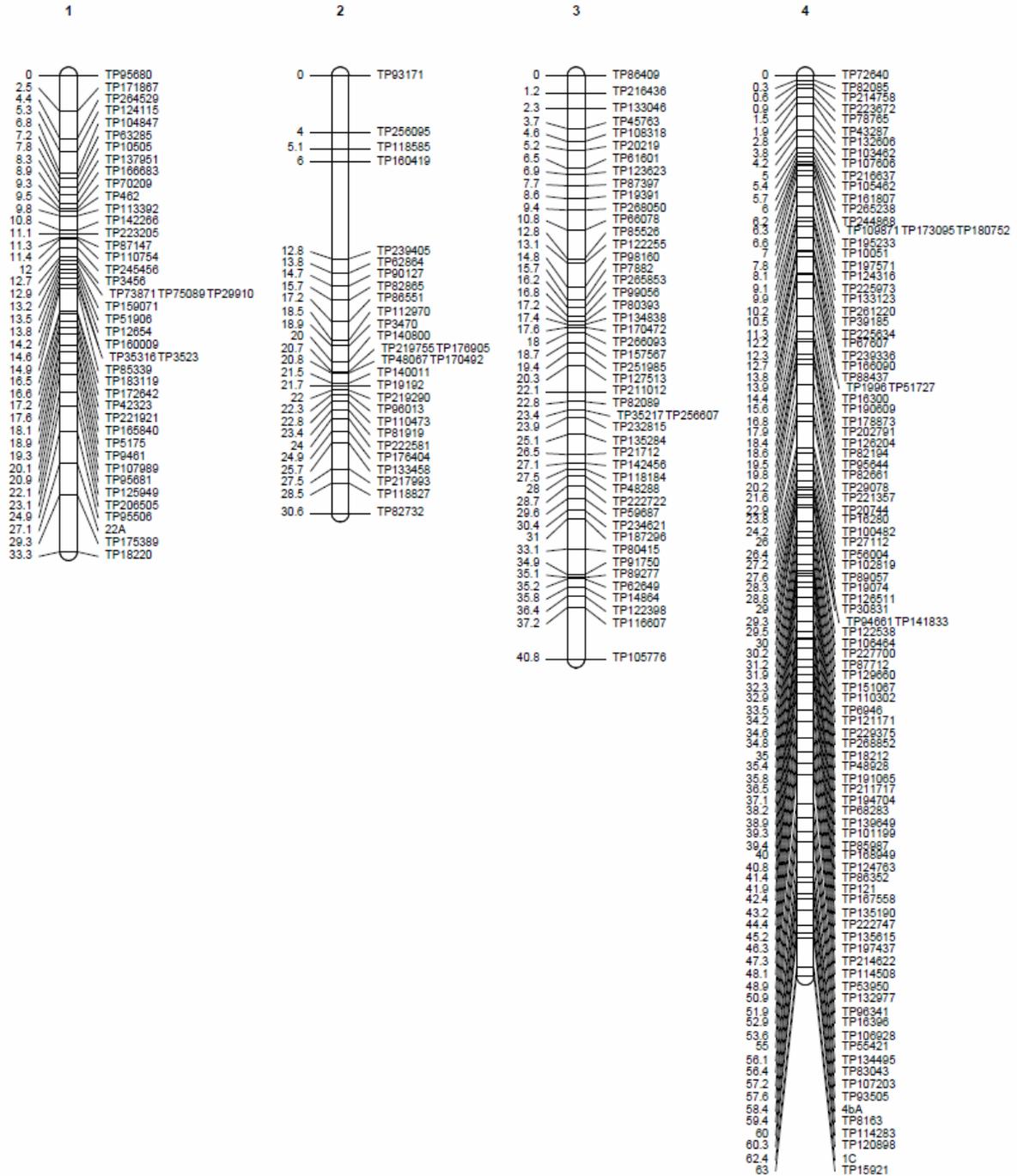


Figura 21 (continúa)

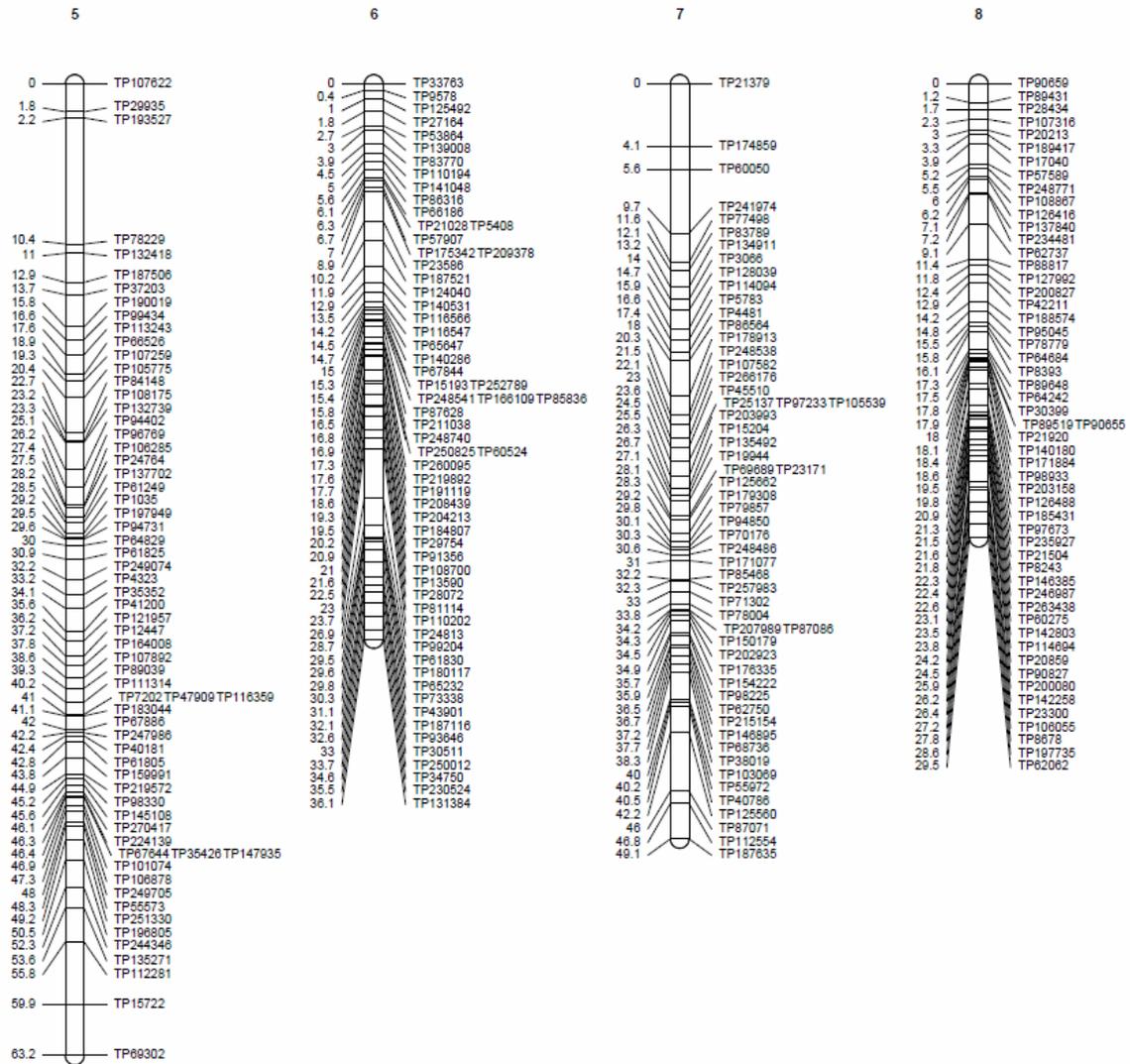


Figura 21 (continúa)

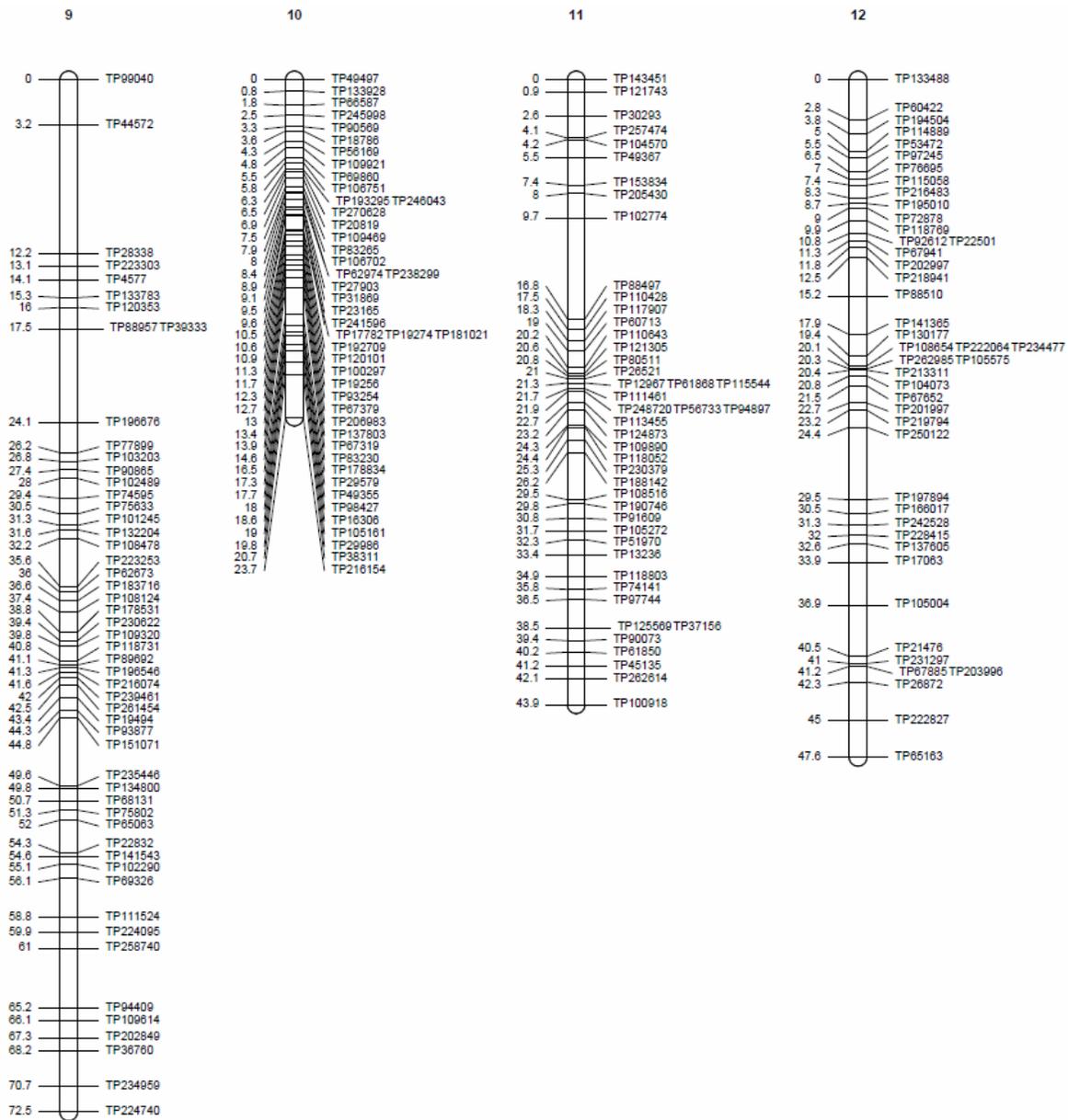


Figura 21 (continúa)

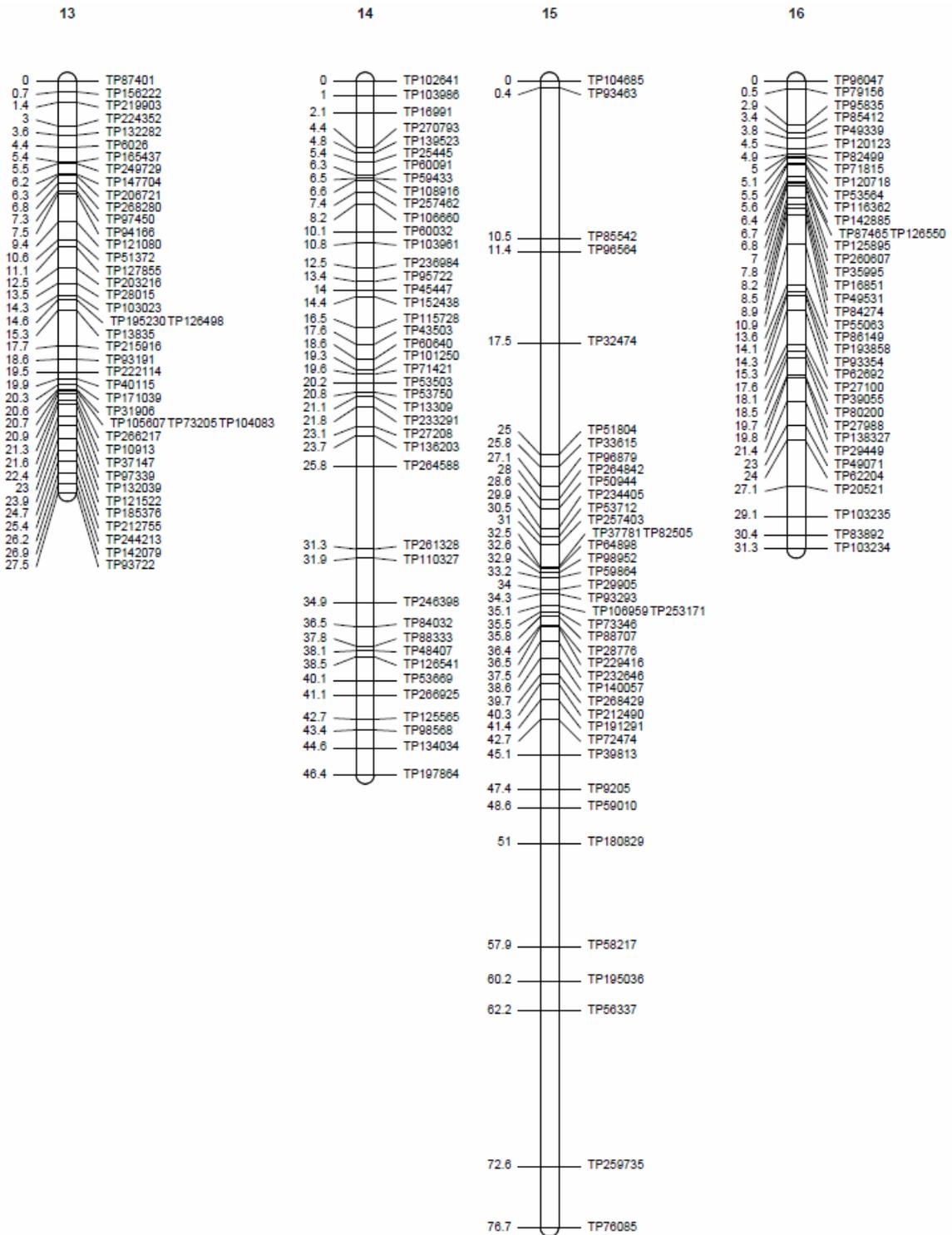


Figura 21 (continúa)

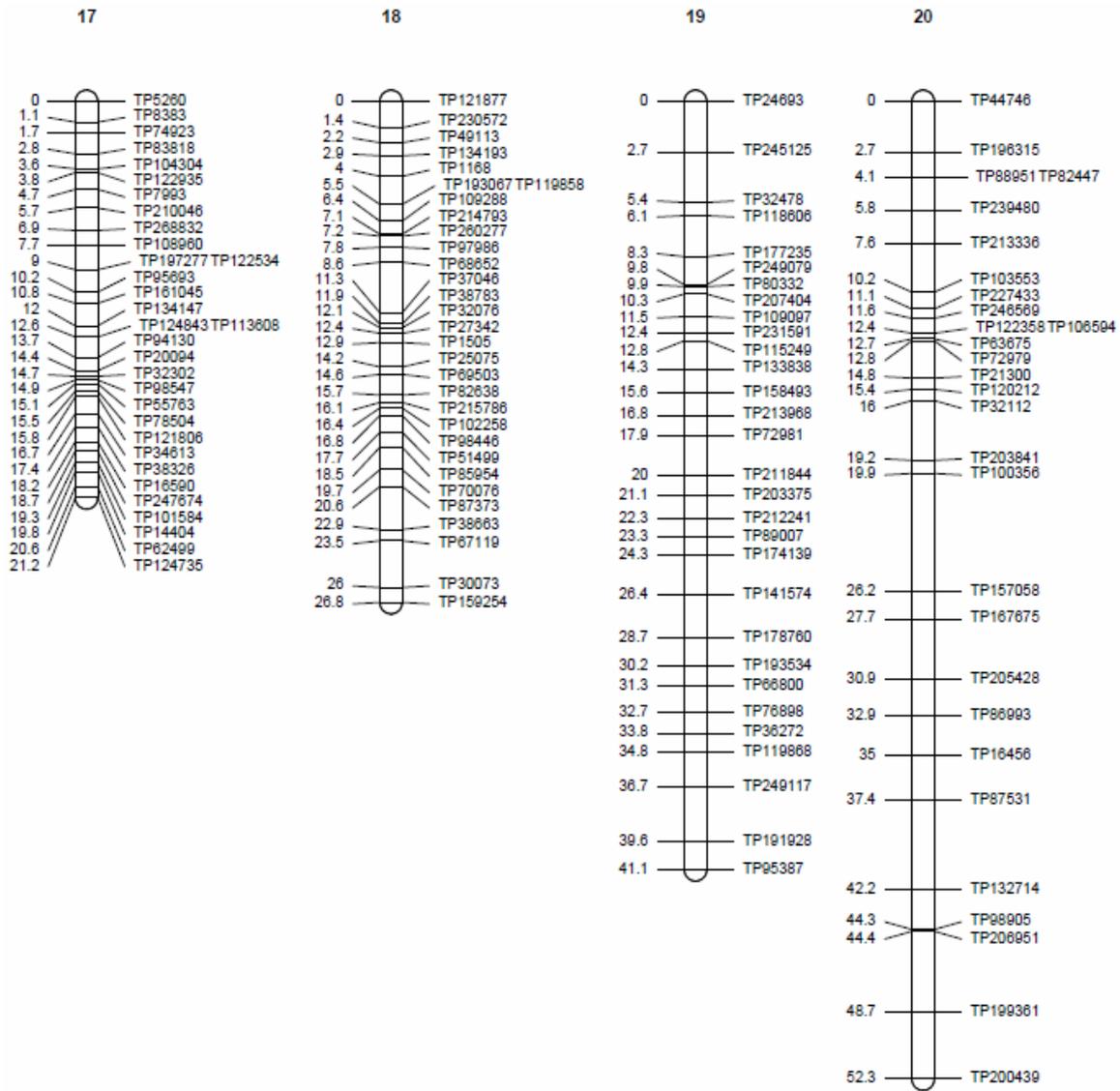


Figura 21 (continúa)

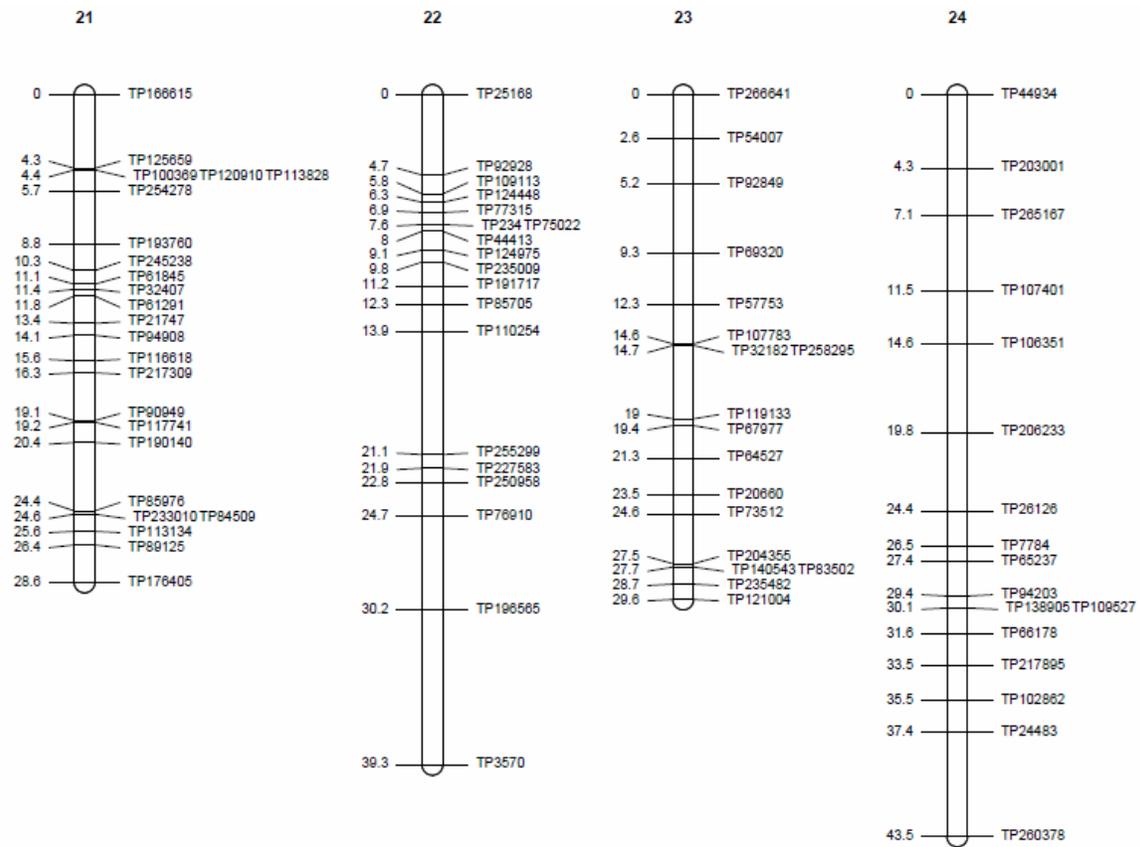


Figura 21 (continúa)

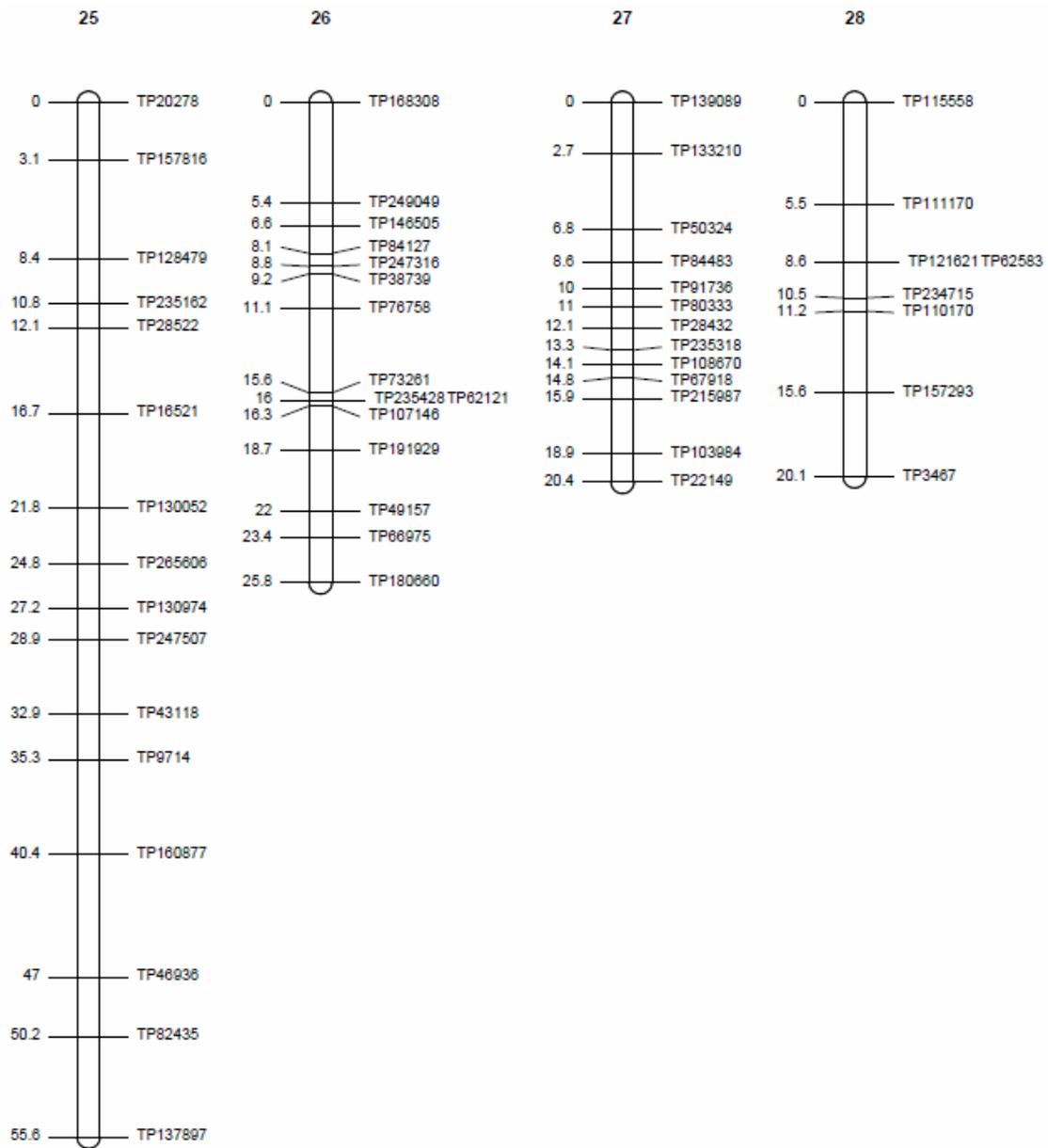


Figura 21 (continúa)

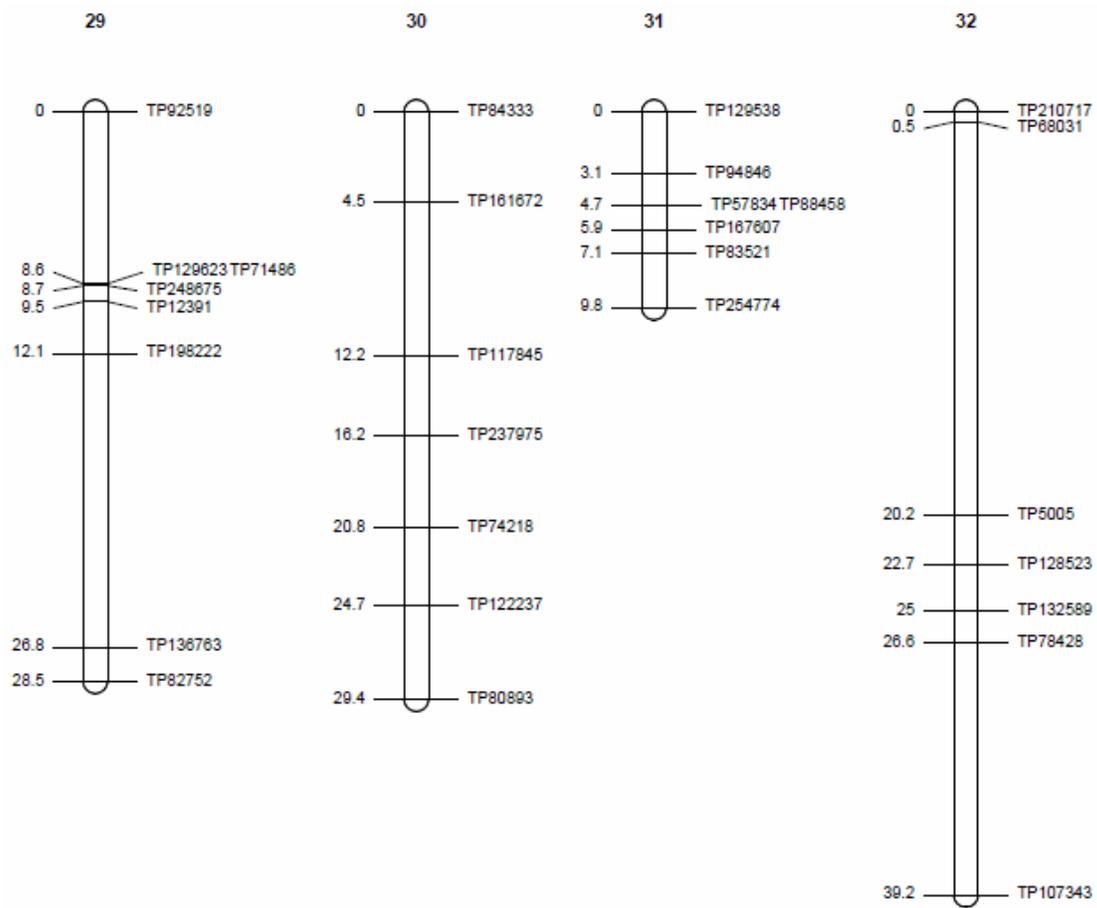


Figura 21 (continúa)

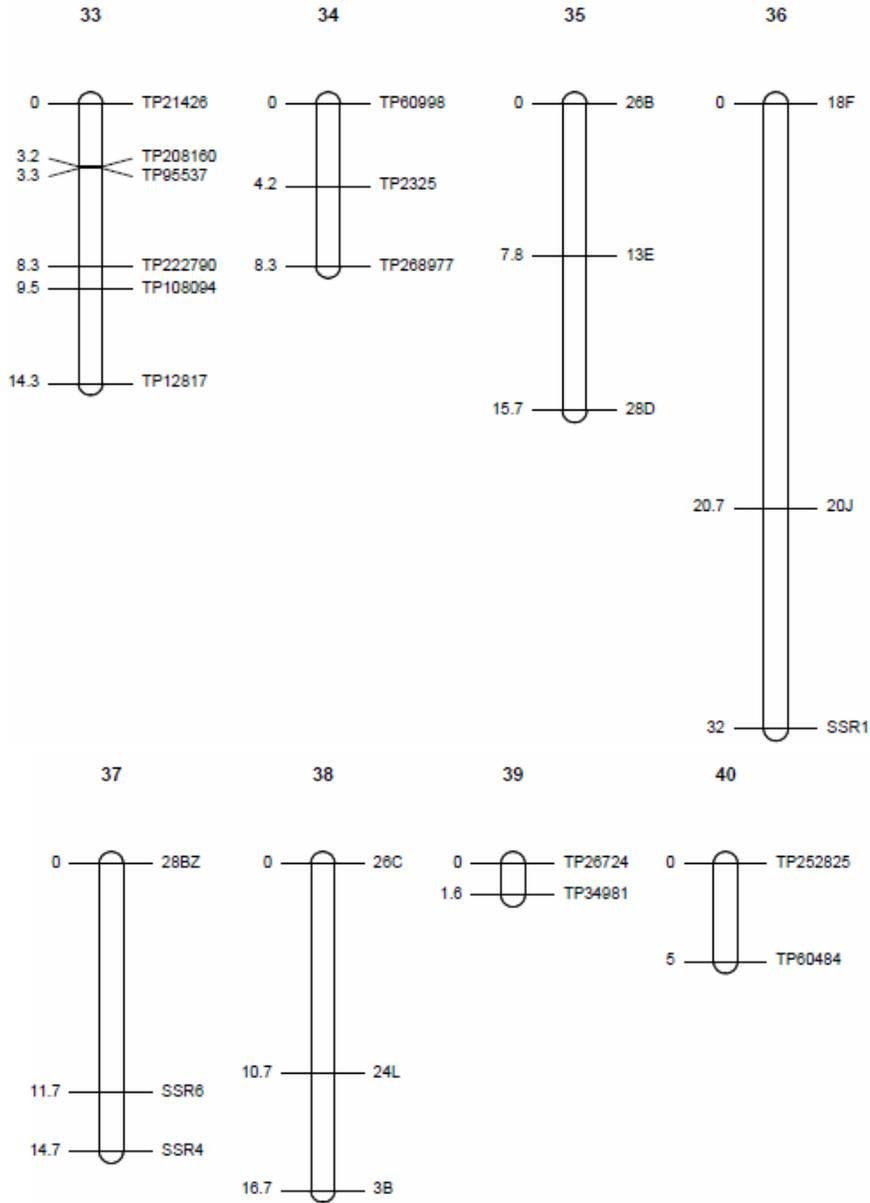


Figura 21. Mapa de ligamiento de *E. curvula* cv. OTA-S. Los grupos de ligamiento se construyeron utilizando el programa Joinmap 4.1. El nombre de los marcadores se encuentra a la derecha y la distancia entre marcadores (en cM) a la izquierda de cada grupo de ligamiento.

IV.5 – Sintenia

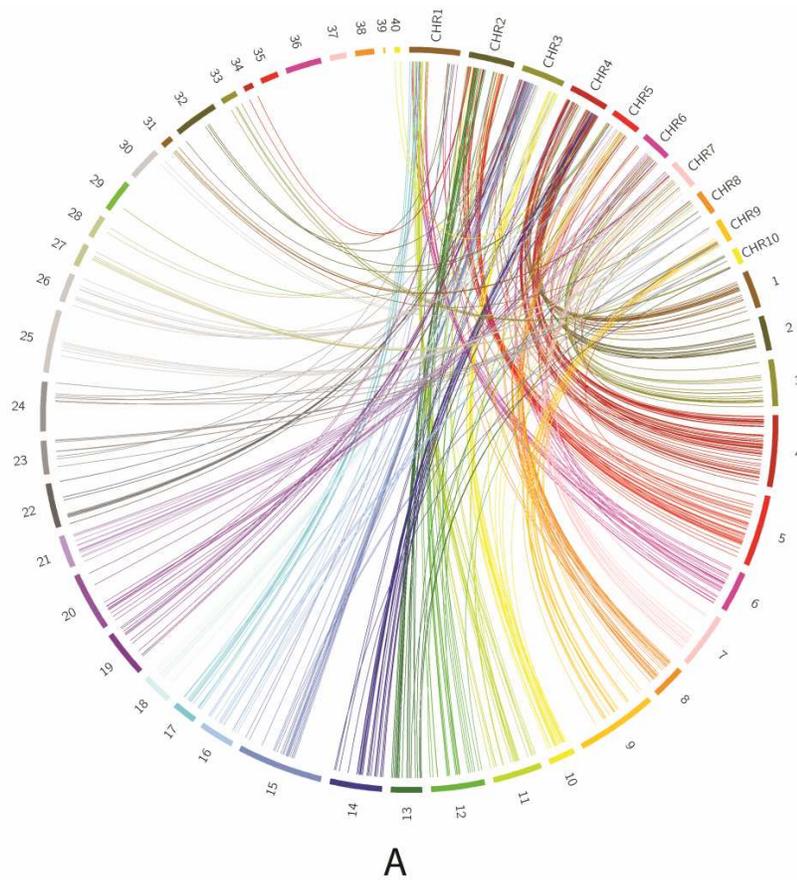
Para identificar los grupos de homólogos/homeólogos las secuencias extendidas de los SNPs mapeados se compararon contra los genomas de *Oropetium thomaeum*, *Cenchrus americanus*, *Setaria italica*, *Zea mays*, *Panicum hallii* y *Oryza sativa*. Teniendo en cuenta

que los genomas de referencia utilizados solo se encuentran disponibles como haplotipos (número básico de cromosomas) el análisis realizado nos permitió identificar grupos de cromosomas homólogos y homeólogos juntos, sin discriminar entre ambos, por eso de aquí en adelante se los denomina grupos de homólogos / homeólogos.

Utilizando como referencia para el análisis la especie más cercana, de la que se dispone un genoma secuenciado de alta calidad (contiguidad), *Oropetium thomaeum* se encontró que 477 (40 %) marcadores de OTA-S y 900 (45 %) marcadores de Don Walter fueron asignados a posiciones únicas (mejor coincidencia) con los parámetros mencionados anteriormente en Materiales y Métodos (identidad > 80 % y cobertura de consulta > 70). Aunque el orden de los marcadores y sus posiciones en el genoma de *O. thomaeum* no están altamente conservados en *E. curvula*, el análisis de los gráficos de Circos mostró que los marcadores de cada grupo de ligamiento tienden a agruparse en el mismo cromosoma (Figuras 22A y 22B). Como un ejemplo podemos mencionar el grupo de ligamiento 4 de OTA-S que presenta homología con el cromosoma 4 de *O. thomaeum* (líneas rojo oscuro en la Figura 22A). En el caso del mapa de Don Walter, el grupo de ligamiento 5 presenta homología casi completa con el cromosoma 3 de *O. thomaeum* (líneas rojas en la Figura 22B). Sin embargo, también es posible observar grupos de ligamiento que presentan homología con más de un cromosoma, como es el caso del GL8 de Don Walter cuyas líneas en la Figura 22B se dirigen mayoritariamente a los cromosomas 7 y 8 de *O. thomaeum*. En la Figura 23 puede observarse que los marcadores del grupo de ligamiento 3 de Don Walter (que contiene el APO locus determinante de la diplosporía) son sinténicos con el cromosoma 5 de *O. thomaeum*. Ya que la representación de sintenia en los Circos no es tan fácil de visualizar se elaboró la Tabla 12, donde se muestran los grupos de homólogos / homeólogos. Para la construcción de los grupos de homólogos / homeólogos se consideró que si la mayoría de las homologías (número de marcadores con homología) supera en tres veces al resto se considera que el GL presenta homología solo con un cromosoma y se lo considera como grupo de ligamiento exclusivo. Los grupos de ligamiento compartido son aquellos que presentan homología con dos o tres cromosomas (en ningún caso con un número de marcadores tres veces mayor al resto). Este análisis nos permitió identificar grupos de homólogos / homeólogos para cada mapa de ligamiento, establecer la relación

entre los dos mapas y validar los mapas genéticos de *E. curvula* saturados. En las Tablas Suplementarias S3 y S4 se presentan los datos detallados de los SNPs que presentaron homología en cada grupo de ligamiento.

El mismo estudio de sintenia con los genomas de las otras especies relacionadas (*Cenchrus americanus*, *Oryza sativa*, *Panicum hallii*, *Setaria italica* y *Zea mays*), arrojó resultados similares a los descritos anteriormente (Tablas Suplementarias S5 y S6).



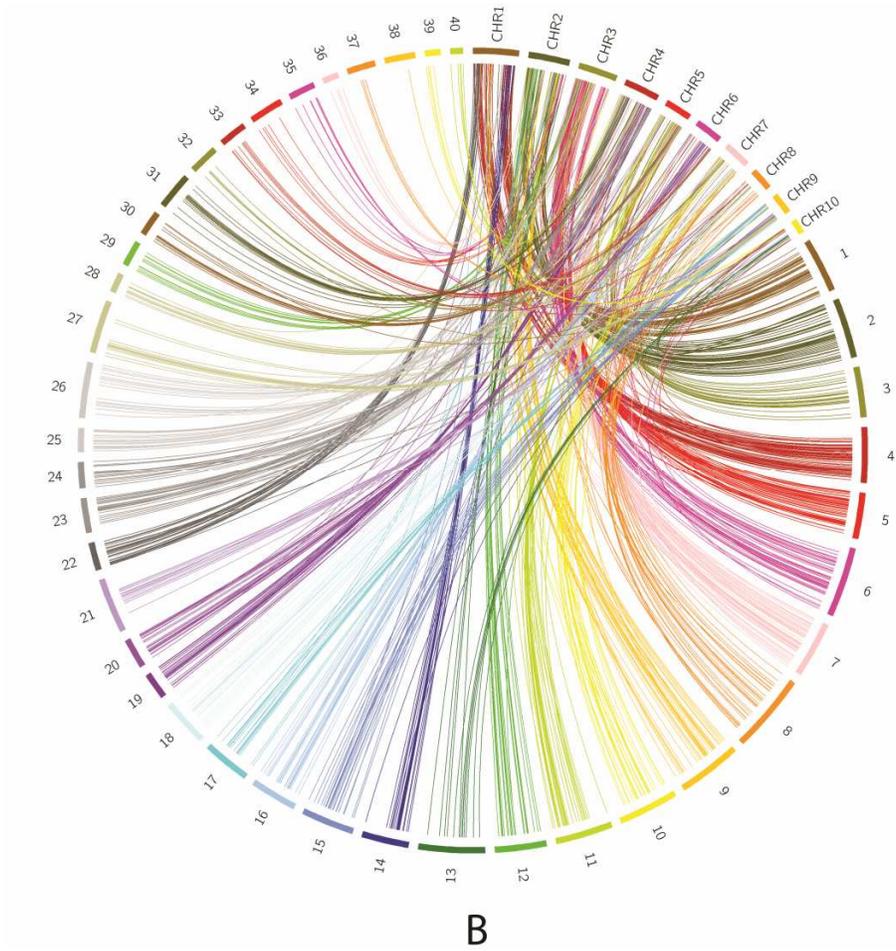


Figura 22. Gráficos de circo mostrando las relaciones de sintenia entre los grupos de ligamiento de *E. curvula* (A:OTA-S, B:Don Walter) y los cromosomas de *O. thomaeum*. Números del 1 al 40 representan los grupos de ligamiento de cada parental de la población de mapeo de *E. curvula* y los códigos CHR1 a CHR10 representan los cromosomas de *O. thomaeum*.

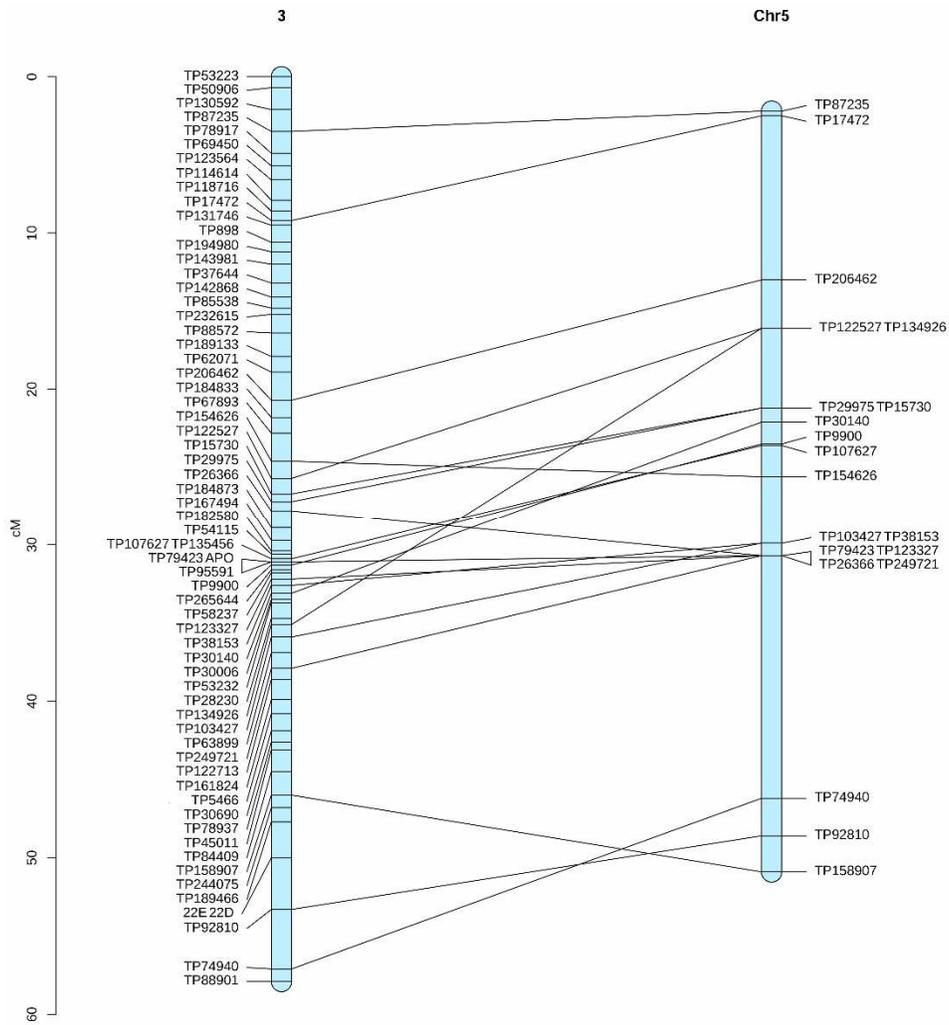


Figura 23. Comparación del grupo de ligamiento 3 de *E. curvula* (Don Walter) con el cromosoma 5 de *O. thomaeum*.

Tabla 12. Grupos de homólogos / homeólogos obtenidos mediante la comparación con el mapa físico de *O. thomaeum*. GL Exclusivo hace referencia a GLs que presentaron homología principalmente con un cromosoma (número de homologías por lo menos tres veces superior) y GL Compartido a GLs que presentaron homología con más de un cromosoma.

Cromosoma <i>O. thomaeum</i>	OTA-S		Don Walter	
	GL Exclusivo	GL Compartido	GL Exclusivo	GL Compartido
1	6, 11, 17	16, 32	1, 4, 14, 22	
2	5, 12, 13, 34	16, 24	2, 9, 12, 36	13, 34, 35
3	10, 15, 18, 19, 22, 28	16, 32	5, 6, 25, 29	34, 35
4	1, 2, 4, 14, 40	24	7, 19, 23, 31	24, 40
5	8, 26, 29	32	3, 11, 26, 30	
6	3, 20		16, 20, 28, 33	
7	7, 21, 31		10, 18, 32, 38	8
8	25	16	21, 37	8
9	9, 23, 30		15, 17, 27	40
10	27, 33	24	39	13, 24, 35

IV.6-Tamaño del genoma

Finalmente, se evaluó el contenido absoluto del ADN genómico en los genotipos parentales de la población de mapeo. El análisis de citometría de flujo arrojó un tamaño de genoma haploide estimado de 1.312 Mbp para OTA-S y 1.195 Mbp para Don Walter.

V- Discusión

El análisis de segregación del modo reproductivo en nuestra población de mapeo tetraploide de *E. curvula* reveló una proporción de 1:1 de individuos diplospóricos contra sexuales. Este tipo de herencia apoya la hipótesis de que la diplosporía está controlada por un solo factor genético dominante en *E. curvula*, como se describe para otras especies apomícticas diplospóricas, como *Taraxacum officinale* (Vijverberg et al., 2004) y *Tripsacum dactyloides* (Grimanelli et al., 1998). Voigt y colaboradores realizaron estudios tendientes a dilucidar el control genético de la apomixis en pasto llorón (Voigt y Bashaw, 1972; Voigt y Burson, 1992) y fenotiparon, por test de progenie, descendientes F₂ midiendo varios caracteres morfológicos, obteniendo una proporción de descendencia apomíctica versus sexual de 1:1,4. Estos autores observaron que cuando el grado de sexualidad es bajo, las pruebas de progenie suelen dar resultados equívocos. Por esta razón en un estudio posterior (Poverene y Voigt, 1995) se evaluó el uso de isoenzimas para realizar pruebas de progenie trabajando con individuos previamente caracterizados para el carácter, obteniéndose buenas correlaciones entre las pruebas de progenie con isoenzimas y la caracterización por citoembriología y morfología. En 1992, Voigt y Burson, proponen un modelo genético simple para la herencia de la apomixis en pasto llorón, donde la apomixis es dominante sobre la sexualidad y es controlada por un solo gen. Éste análisis asume que la sexualidad es el modo básico de reproducción y que la apomixis es derivada y puede suprimir, pero no eliminar la sexualidad. También señalan la presencia adicional de otros genes que controlan el nivel de expresión de la apomixis en plantas que contienen el gen determinante del carácter.

Voigt y col. (Voigt y Bashaw, 1972; Voigt y Burson, 1992) clasificaron las plantas en apomícticas, altamente sexuales y sexuales, sin embargo, hay que tener en cuenta que aquellas plantas que demuestran tener algún grado de reproducción apomíctica, aunque sea bajo, deben considerarse apomícticas en el análisis anterior, ya que tienen el potencial para expresar el carácter (Savidan, 2000). Teniendo en cuenta esta última premisa, volvimos a analizar los resultados de Voigt y col. y la proporción cambió a 1.7: 1 (96:56). Los resultados obtenidos en el presente estudio utilizando observaciones citoembrológicas y

marcadores moleculares (ambos métodos son más confiables que el análisis morfológico) mostraron una herencia 1:1 del carácter, señalando la presencia de un solo locus en el control de la diplosporía en pasto llorón y que este carácter es dominante sobre la sexualidad. Aún se desconoce si la expresión de este carácter se basa en un solo gen o en genes relacionados que cosegregan, siendo esta última hipótesis más probable (genes que cosegregan). Queda pendiente la evaluación de la partenogénesis, componente necesario para la obtención de semillas apomícticas.

En otras especies diplospóricas, aunque las regiones que controlan los diferentes componentes de la apomixis (apomeiosis, partenogénesis y endospermo autónomo o pseudogámico) están separadas físicamente, estas regiones se heredan como un solo locus (*T. dactyloides*) o independientemente (*E. annuus*) (Grimanelli et al., 1998; Noyes et al., 2007). En el caso de la aposporía, que es un mecanismo más frecuente de apomixis que la diplosporía, se ha identificado una región dominante y de herencia simple (Akiyama et al., 2004; Calderini et al., 2006, Okada et al., 2011; Ortiz et al., 2013), aunque en *Poa pratensis*, se cree que existen dos factores genéticos independientes que controlan la aposporía y la partenogénesis (Albertini et al., 2001). En *Pennisetum squamulatum* y en especies del género *Paspalum*, la ASGR (región genómica específica de aposporía) muestra falta de recombinación, formando un bloque extenso (50 Mbp en *P. squamulatum*; Akiyama et al., 2004) que se hereda de forma completa, asegurando así que todos sus componentes se hereden de forma simultánea (Ozias-Akins et al., 1998; Labombarda et al., 2002; Stein et al., 2007). Diversos autores han informado la presencia de elementos repetitivos, pseudogenes y regiones heterocromáticas en el ASGR. Koltunow y Grossniklaus (2003) plantearon la hipótesis de que las secuencias repetitivas actúan como una señal para el silenciamiento de los factores involucrados en la vía reproductiva sexual, lo que altera la expresión de los procesos reproductivos sexuales y posiblemente causa la apomixis. Más recientemente, Kotani y col. (2013) informaron que las extensas estructuras de secuencias repetitivas asociadas con el locus de aposporía en *Hieracium* no son necesarias para la apomixis. Por lo tanto, es posible que estas características estructurales y la divergencia de alelos se produzcan como consecuencia de la reproducción asexual y la

falta de recombinación, que podrían haber evolucionado para mantener los elementos genéticos necesarios para la apomixis en un bloque.

Aunque varias publicaciones describen la presencia de genes candidatos en diversas especies apomícticas, los cuales se expresan de forma diferencial o desempeñan roles funcionales en el desarrollo apomíctico (Albertini et al., 2005; Cervigni et al., 2008b; Selva et al., 2012; Corral et al., 2013; Siena et al., 2014; Conner et al., 2015; Pellegrini, 2016; Worthington et al., 2016; Garbus et al., 2017; Selva et al., 2017), se sabe muy poco sobre el tipo de regulación, las vías comunes entre diferentes especies apomícticas y los mecanismos subyacentes de la apomixis.

En este trabajo se construyeron dos mapas de ligamiento genético para *E. curvula*, uno para el parental sexual (OTA-S) y otro para el apomíctico (Don Walter). Estos mapas son los más saturados para el género *Eragrostis* de que se dispone y uno de los mapas más saturados para especies poliploides forrajeras y para apomícticos que se han logrado hasta la fecha (Jessup et al., 2003; Stein et al., 2007; Thaikua et al., 2016; Worthington et al., 2016). No obstante, se necesitan estudios adicionales para permitir que estos mapas de ligamiento alcancen la alta resolución de los mapas genéticos de las especies modelo, que incluyen miles de marcadores mapeados con alta precisión. Una de las mayores limitaciones en esta tesis para la construcción de los mapas de ligamiento fue el pequeño número de individuos en la población de mapeo, que fue sólo de 62 individuos. Trabajos de referencia, como el de Wu y col (1992), mencionan que las poblaciones deben tener un tamaño mínimo de 75 individuos, lo cual fue difícil de lograr para *E. curvula* debido a diversos factores, como el complejo modo reproductivo de esta especie, la incapacidad para realizar la castración (emasculación) debido al tamaño de las espiguillas y a su morfología, y la alta frecuencia de autopolinización en el único genotipo sexual tetraploide disponible (OTA-S). Además, otros genotipos utilizados como donantes de polen resultaron incompatibles con la planta materna o dieron un bajo número de híbridos. A pesar de estas limitaciones, el mapa obtenido en este estudio tiene un alto nivel de saturación de marcadores, lo que es consistente con los datos recopilados por otros autores que utilizan modelos y técnicas similares (Worthington et al., 2016, Huang et al., 2018).

Varios mapas de ligamiento de especies poliploides se basan exclusivamente en marcadores que segregan en una proporción de 1:1, alelos de dosis simple (Li et al., 2014; Thaikua et al., 2016; Worthington et al., 2016). El uso de estos marcadores permiten simplificar el modelo de herencia y utilizar software de mapeo para diploides, tales como JoinMap. Estos marcadores poseen otras ventajas adicionales sobre marcadores con otros tipos de segregación, principalmente en especies poliploides no exploradas para las cuales el modo de herencia es incierto, ya que los marcadores de herencia simple permiten crear un mapas de ligamiento "sin supuestos" (Bourke et al., 2018a). Otro fundamento para la utilización de Joinmap y marcadores de herencia simple es que *E. curvula* es considerada una especie alopoliploide y las especies alopoliploides tienen herencia disómica por lo cual la genética es similar a la de los diploides, excepto por la presencia de múltiples genomas. A *E. curvula* se lo considera una especie alopoliploide, aunque se ha registrado formación multivalente en algunos genotipos poliploides, como Tanganyika y Don Eduardo (Poverene, 1988 Vorster y Liebenberg, 1977), por lo que algunos autores como Burson y Voigt (1996) consideran a esta especie como alopoliploide segmental. Sin embargo, los multivalentes no son frecuentes en los genotipos parentales de la población de mapeo, donde se ha demostrado el apareamiento preferencial entre los cromosomas homólogos primarios (Poverene, 1988). La suposición de que todos los marcadores tienen una herencia disómica 1:1 podría ser una simplificación excesiva ya que los marcadores con un patrón de segregación diferente no se consideraron para la construcción de los mapas de ligamiento y esto puede provocar algún sesgo en los resultados. Sin embargo, al ser el presente estudio el primer mapa para una especie poco estudiada (orphan crop) consideramos que es una aproximación válida, que irá perfeccionándose en próximos estudios (Tesis de la Ing. Agr. Jimena Gallardo).

Como se mencionara en la Introducción, existen softwares diseñados específicamente para construir mapas de ligamiento en especies poliploides, como polymapR (Bourke et al., 2018b), TetraploidSNPMap (Hackett et al., 2017) y PERGOLA (Grandke et al., 2017). El problema con estas herramientas es que están diseñadas para procesar marcadores con valores de dosis alélica, que no están disponibles para los datos de GBS. En el futuro, se

anticipa el desarrollo de herramientas que utilizarán el recuento de las lecturas de SNP, aunque actualmente no están disponibles (Bourke et al., 2018a).

Para la elaboración de los mapas de ligamiento de cada parental se tomó el criterio de armar tantos grupos de ligamiento como el número cromosómico (40). Aunque entendemos que la teoría sugiere armar tantos grupos de ligamiento como pares de homólogos (Xu, 2010), en nuestro caso 20, se asumió el criterio de armar 40 grupos dado el alto nivel de heterocigocidad (Zappacosta et al., 2011) y el elevado número de marcadores en algunos de los grupos de ligamiento, que no permitía la elaboración del mapa de ligamiento por el método de regresión del Joinmap (acepta hasta unos 300 marcadores por grupo de ligamiento). Otros autores han tomado el mismo criterio y definieron tantos grupos de ligamiento como el valor $2n$ de cromosomas (Li et al., 2014; Worthington et al., 2016) y posteriormente identificaron los cromosomas homólogos y homeólogos mediante la comparación con genomas secuenciados de especies emparentadas.

Los tamaños de los mapas de ligamiento de OTA-S y Don Walter son muy diferentes (1.335 cM versus 1.976,2 cM, respectivamente) y esta variación no tiene relación con las diferencias en el tamaño del genoma que se estimaron (1.312 Mbp y 1.195 Mbp para los genomas haploide respectivamente). Por lo tanto, esta variación podría reflejar tasas de recombinación diferencial entre los genotipos. De hecho, estudios en plantas modelo han demostrado el impacto de la divergencia entre los genomas y las tasas de recombinación, con una tasa de recombinación más baja relacionada con los niveles más altos de divergencia del genoma (Chetelat et al., 2000; Opperman et al., 2004; Li et al., 2006). Además, se sabe que las tasas de recombinación difieren entre los sexos tanto en plantas como en animales (Lorch, 2005). Por ejemplo, Huang y col. (2018) encontraron que el mapa genético masculino de la mandarina era notablemente más grande que el parental femenino de la población de mapeo.

Al buscar la sintenia entre los mapas de ligamiento de *E. curvula* con genomas de otras especies relacionadas, se lograron identificar grupos de homólogos / homeólogos. Los mejores resultados (mayor cantidad de SNPs con homología) se obtuvieron comparando

con el mapa físico de *O. thomaeum*, el pariente más cercano con genoma secuenciado de alta calidad. Utilizando esta información, además de obtener grupos homólogos / homeólogos para cada mapa, se consiguió establecer qué grupos de cada mapa serían equivalentes.

En trabajos previos ya se había descrito que OTA-S solo presenta sacos embrionarios tipo *Polygonum* (Meier et al., 2011), mientras que Don Walter es un genotipo apomítico facultativo, con 60 a 100 % de sacos embrionarios diplospóricos (Rodrigo et al., 2017). Como ocurre en la mayoría de las plantas apomíticas conocidas, estas plantas son facultativas y pueden cambiar su programa de desarrollo y pasar de la vía asexual a la vía sexual (Brukhin, 2017). Las plantas apomíticas de la población de mapeo mostraron diferentes niveles de expresión de la diplosporía, con un rango de 3 al 100 % de los pistilos observados que tienen sacos embrionarios apomíticos. Aunque no es frecuente, algunos estudios como el de Noyes (2005) en *Erigeron* también encontraron un gradiente completo en la expresión de la diplosporía. El tener la población de mapeo caracterizada de forma cuantitativa, es posible la búsqueda de regiones genómicas con efectos cuantitativos, lo que no es posible de realizar si los individuos están caracterizados solo de forma cualitativa. Otro hallazgo importante a favor de la presencia de regiones que regulan este carácter es que la expresión del carácter depende en gran medida de las condiciones ambientales (Zappacosta et al., 2014; Rodrigo et al., 2017), aumentando ante condiciones de estrés la cantidad de sacos sexuales en individuos facultativos. Esto a su vez podría ser indicativo de regulación a nivel epigenético.

VI - Conclusiones

En esta tesis se partió de la hipótesis “la apomixis en *E. curvula* es controlada por una región genómica de herencia mendeliana. En este contexto todo el proceso podría desencadenarse por un efecto pleiotrópico gobernado por una única región o podrían existir más regiones, controlando la diplosporía y la partenogénesis”.

La fenotipificación de la población F₁ mostró que la segregación de la diplosporía en *E. curvula* sigue una proporción 1:1 (diplospóricos : sexuales), indicando que la herencia del carácter sigue un modelo mendeliano simple, de un solo gen o región genómica. También se pudo corroborar que la apomixis es dominante sobre la sexualidad. Por lo tanto la hipótesis de herencia simple para la diplosporía se cumple, adeudando el estudio de la partenogénesis.

La diferente proporción de sacos sexuales/apomíticos observados en los diferentes híbridos estarían indicando además la presencia de regiones reguladoras o de algún tipo de factor epigenético controlando el carácter, por lo tanto se propone para el futuro analizar el carácter como uno cuantitativo.

En esta tesis también se logró obtener el primer mapa genético de *E. curvula*. Este mapa es el mapa más saturado para el género *Eragrostis* y uno de los más saturados para una especie forrajera poliploide y para especies apomíticas construidos hasta la fecha.

El grupo de ligamiento 3 de Don Walter contiene el locus responsable de la diplosporía, con lo cual se corrobora la hipótesis de una región o locus. Este estudio también permitirá, junto a la secuenciación de genomas a nivel diploide y tetraploide y el análisis de genes candidatos (se dispone de cuatro) que se están llevando a cabo por el grupo de trabajo, delimitar la región involucrada en la diplosporía y conocer su arquitectura y contenido génico.

Este mapa y la población de que se dispone también facilitará estudios adicionales que ayuden a identificar los genes que regulan la apomixis. También debería permitir mapear

otros caracteres que contrastan en los genotipos parentales y son factores limitantes para la producción de pasto llorón, como la calidad del forraje. Finalmente, también podría ser posible mapear los genes involucrados en la tolerancia al estrés biótico y abiótico. Estos son caracteres críticos para el mejoramiento de esta especie forrajera, que se siembra en zonas de producción marginales.

VII - Bibliografía

Akiyama Y, Conner J, Goel S, Morishige D, Mullet J, Hanna W, et al. (2004). High resolution physical mapping in *Pennisetum squamulatum* reveals extensive chromosomal heteromorphism of genomic region associated with apomixis. *Plant Physiology* 134:1733-41.

Akiyama Y, Hanna W, Ozias-Akins P (2005). High-resolution physical mapping reveals that the apospory-specific genomic region (ASGR) in *Cenchrus ciliaris* is located on a heterochromatic and hemizygous region of a single chromosome. *Theoretical Applied Genetics* 111:1042-51.

Albertini E, Porceddu A, Ferranti F, Reale L, Barcaccia G, Falcinelli M (2001). Apospory and parthenogenesis may be uncoupled in *Poa pratensis* L.: cytological and genetic evidences. *Sexual Plant Reproduction* 14: 213-217.

Albertini E, Marconi G, Reale L, Barcaccia G, Porceddu A, Ferranti F, et al. (2005). SERK and APOSTART: candidate genes for apomixis in *Poa pratensis*. *Plant Physiology* 138:2185-2199.

Albertini E, Barcaccia G, Mazzucato A, Sharbel TF, Falcinelli M (2010). Apomixis in the era of biotechnology. Pua EC, Davey MR (Eds.) *Plant developmental biology - Biotechnological perspectives*, vol 1. Springer, Berlin 405-436.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215:403-410.

Andrews S (2011). FastQ Screen [Online]. Available online at: http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastq_screen/

Armando LV, Tomas MA, Garayalde AF, Carrera AD (2015). Assessing the genetic diversity of *Panicum coloratum* var. *makarikariense* using agro-morphological traits and microsatellite-based markers. *Annals of Applied Biology* 167:373-386.

Asker SE., Jerling L (1992). *Apomixis in Plants*. Boca Raton, USA, CRC Press.

Aversano R, Ercolano MR, Caruso I, Fasano C, Rosellini D, Carputo D (2012). Molecular tools for exploring polyploid genomes in plants. *International Journal of Molecular Sciences* 13:10316-10335.

Bavera GA., Peñafort CH (2005). El pasto llorón (lovegrass) *Eragrostis curvula* (Schrad) Nees. *Cursos de Producción Bovina de Carne*, FAV UNRC. www.produccion-animal.com.ar

Bekele E, Lester R (1981) Biochemical assessment of the relationships of *Eragrostis tef* (Zucc) Trotter with some wild *Eragrostis* species (Gramineae). *Annals of Botany* 48:717-725.

Bennetzen JL, Schmutz J, Wang H, Percifield R, Hawkins J, Pontaroli AC, et al. (2012). Reference genome sequence of the model plant *Setaria*. *Nature Biotechnology* 30:555-61.

Bicknell R, Koltunow A (2004). Understanding apomixis: recent advances and remaining conundrums. *Plant Cell* 16:S228-245.

Bourke PM, Voorrips RE, Visser RG, Maliepaard C (2018a). Tools for genetic studies in experimental populations of polyploids. *Frontiers in Plant Science* 9:513.

Bourke PM, van Geest G, Voorrips RE, Jansen J, Kranenburg T, Shahin A, et al. (2018b). PolymapR—linkage analysis and genetic map construction from F₁ populations of outcrossing polyploids. *Bioinformatics* 1:7.

Boyes D, Nasrallah M, Vrebalov J, Nasrallah J (1997). The self-incompatibility (S) haplotypes of *Brassica* contain highly divergent and rearranged sequences of ancient origin. *Plant Cell* 9:237-247.

Brix K (1974). Sexual reproduction in *Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees. *Zeitschrift für Pflanzenzüchtung*, 71:25-32.

Brown W, Emery W (1958). Apomixis in the Gramineae: Panicoideae. *American Journal of Botany* 45:253-263.

Brukhin V (2017). Molecular and genetic regulation of apomixis. *Russian Journal of Genetics* 53:943-964.

Cardone S, Polci P, Selva JP, Mecchia M, Pessino S, Hermann P, Cambi V, Voigt P, Spangenberg G, Echenique V (2006). Novel genotypes of the subtropical grass *Eragrostis curvula* the study of apomixis. *Euphytica* 151:263-272.

Calderini O, Chang S, de Jong H, Busti A, Paolocci F, Arcioni S, et al. (2006). Molecular cytogenetics and DNA sequence analysis of an apomixis-linked BAC in *Paspalum simplex* reveal a non pericentromere location and partial microcollinearity with rice. *Theoretical Applied Genetics* 112:1179-1191.

Carman JG (1997). Asynchronous expression of duplicate genes in angiosperms may cause apomixis, bispority, tetraspority, and polyembryony. *Biological Journal of the Linnean Society* 61:51-94.

Cervigni GD, Paniego N, Díaz M, Selva JP, Zappacosta D, Zanazzi D, et al. (2008a). Expressed sequence tag analysis and development of gene associated markers in a near-isogenic plant system of *Eragrostis curvula*. *Plant Molecular Biology* 67:1-10.

Cervigni GD, Paniego N, Pessino S, Selva JP, Diaz M, Spangenberg G, et al. (2008b). Gene expression in diplosporous and sexual *Eragrostis curvula* genotypes with differing ploidy levels. *Plant Molecular Biology* 67:11-23.

Chetelat RT, Meglic V, Cisneros P (2000). A genetic map of tomato based on BC1 *Lycopersicon esculentum* x *Solanum lycopersicoides* reveals overall synteny but suppressed recombination between these homeologous genomes. *Genetics* 154:857-867.

Cidade FW, Vigna BB, De Souza FH, Valls JFM, Dall'Agnol M, Zucchi MI., et al. (2013). Genetic variation in polyploid forage grass: Assessing the molecular genetic variability in the *Paspalum* genus. *BMC Genetics* 14:50.

Clarke, W. E., Higgins, E. E., Plieske, J., Wieseke, R., Sidebottom, C., Khedikar, Y., et al. (2016). A high-density SNP genotyping array for *Brassica napus* and its ancestral diploid species based on optimised selection of single-locus markers in the allotetraploid genome. *Theoretical Applied Genetics* 129:1887-1899.

Collard BC, Jahufer MZ, Brouwer JB, Pang EC (2005). An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: the basic concepts. *Euphytica* 142:169-196.

Collard BC, Mackill DJ (2008). Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 363:557–572.

Conner JA, Mookkan M, Huo H, Chae K, Ozias-Akins P (2015). A parthenogenesis gene of apomict origin elicits embryo formation from unfertilized eggs in a sexual plant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112:11205-11210.

Corral JM, Vogel H, Aliyu OM, Hensel G, Thiel T, Kumlehn J, et al. (2013). A conserved apomixis-specific polymorphism is correlated with exclusive exonuclease expression in premeiotic ovules of apomictic *Boechera* species. *Plant Physiology* 163, 1660-1672.

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, ed. Fernández O, Brevedan R, Gargano A. (CERZOS and Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina), pag. 7-17.

Cruz CD, Schuster I (2004). GQMOL: aplicativo computacional para análise de dados moleculares e de suas associações com caracteres quantitativos. Versão 2.1. Viçosa: UFV. Disponible en: <www.ufv.br/dbg/gqmol/gqmol.htm>.

Crane CF (2001). Classification of Apomictic Mechanisms. En: Savidan Y, Carman J, Dresselhaus T. (eds) The flowering apomixis: from mechanisms to genetic engineering. Mexico DF: CIMMYT, IRD, European Commission DG VI (FAIR).

Delgado L, Galdeano F, Sartor ME, Quarín CL, Espinoza F, Ortiz JPA (2014). Analysis of variation for apomictic reproduction in diploid *Paspalum rufum*. *Annals of Botany* 113:1211-1218.

de Givry S, Bouchez M, Chabrier P, Milan D, Schiex T (2005). Carthagene: multipopulation integrated genetic and radiated hybrid mapping. *Bioinformatics* 21:1703-4.

Devos KM, Gale MD (1997). Comparative genetics in the grasses. *Plant Molecular Biology* 35:3-15.

Díaz M, Echenique V (2004). Biotechnology in forage crops and pasture plants. En: *Advances in Plant Physiology*, Ed. A. Hemantaranjan. Scientific Publishers, Vol 6, India.

Díaz M, Echenique V, Schrauf G, Cardone S, Polci P, Lutz E, Spangenberg G (2004). Aplicación de herramientas biotecnológicas para el mejoramiento de especies forrajeras. *Revista de Investigaciones Agropecuarias* 33:77-104

Doležel J, Greilhuber J, Lucretti S., Meister A, Lysak MA, Nardi, et al. (1998). Plant genome size estimation by flow cytometry: Inter-laboratory comparison. *Annals of Botany* 82 (Suppl. A):17-26.

Doležel J, Göhde W (1995). Sex determination in dioecious plants *Melandrium album* and *M. rubrum* using high resolution flow cytometry. *Cytometry* 19:103–106.

Dresselhaus T (2001). Mexico, D.E: CiMMYT, IRD, European Commission OC VI (FAIR) 24-43.

Dwivedi KK, Bhat BV, Gupta MG, Bhat SR, Bhat V (2007). Identification of a SCAR marker linked to apomixis in buffelgrass (*Cenchrus ciliaris* L.). *Plant Science* 172:788-795.

Ebina M, Kouki K, Tsuruta SI, Akashi R, Yamamoto T, Takara M, et al. (2007). Genetic relationship estimation in guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.) assessed on the basis of simple sequence repeat markers. *Grassland Science* 53:155-164.

Elshire RJ, Glaubitz JC, Sun Q, Poland JA, Kawamoto K, Buckler ES, et al. (2011) A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PLoS ONE* 6:e19379.

Echenique V, Polci P, Mroginski L (1996). Plant regeneration in weeping lovegrass through inflorescence culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 46:123-30.

Echenique V, Díaz M, Polci P, Mroginski L (2001). Embryogenic cell suspensions from different explants and cultivars of *Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees. *Biocell* 25:131-38.

Fernández O, Brevedan R, Gargano A (1991). El pasto llorón, su biología y su manejo. CERZOS y Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina, 393 pág.

Fu, Y., Peterson GW, Dong YB (2016). Increasing genome sampling and improving SNP genotyping for genotyping-by-sequencing with new combinations of restriction enzymes. *G3* (Bethesda) 6:845-856.

Garbus I, Romero JR, Selva JP, Pasten MC, Chinestra C, Carballo J, et al. (2017). De novo transcriptome sequencing and assembly from apomictic and sexual *Eragrostis curvula* genotypes. *PloS One* 12:e0185595.

Glaubitz JC, Casstevens TM, Lu F, Harriman J, Elshire RJ., Sun Q, Buckler ES. et al. (2014). TASSEL-GBS: a high capacity genotyping by sequencing analysis pipeline. *PloS One* 9:e90346.

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.

Grandke F, Ranganathan S, van Bers N, de Haan JR, Metzler D (2017). PERGOLA: fast and deterministic linkage mapping of polyploids. *BMC bioinformatics* 18:12.

Grimanelli D, Leblanc O, Espinosa E, Perotti E, González de León D, Savidan Y (1998). Non-Mendelian transmission of apomixis in maize-*Tripsacum* hybrids caused by a transmission ratio distortion. *Heredity* 80:40-47.

Grimanelli D, Leblanc O, Perotti E, Grossniklaus U (2001). Developmental genetics of gametophytic apomixis. *Trends in Genetics* 17:597-604.

Grimanelli D, García M, Kaszas E, Perotti E, Leblanc O (2003). Heterochronic expression of sexual reproductive programs during apomictic development in *Tripsacum*. *Genetics* 165:1521-1531.

Gustafsson A (1946). Apomixis in higher plants. Part I. The mechanisms of apomixis. *Lunds Univ. årsskr. N. F. Avd.* 42:1-66.

Hackett CA, Boskamp B, Vogogias A, Preedy KF, Milne I (2017). TetraploidSNPMap: Software for linkage analysis and QTL mapping in autotetraploid populations using SNP dosage data. *Journal of Heredity* 108:438-442.

Hand ML, Koltunow A (2014). The genetic control of apomixis: asexual seed formation. *Genetics* 197:441-450.

Hojsgaard D, Klatt S, Baier R, Carman JG, Hörandl E (2014). Taxonomy and biogeography of apomixis in angiosperms and associated biodiversity characteristics. *Critical Review in Plant Science* 33:414-427.

Hojsgaard D (2018). Transient activation of apomixis in sexual neotriploids may retain genomically altered states and enhance polyploid establishment. *Frontiers in Plant Science* 9:230.

Hojsgaard DH, Schegg E, Valls JFM, Martinez EJ, Quarin CL (2008). Sexuality, apomixis, ploidy levels, and genomic relationships among four *Paspalum* species of the subgenus *Anachyris* (Poaceae). *Flora* 203:535-547.

Horandl E, D Hojsgaard (2012). The evolution of apomixis in angiosperms: A reappraisal. *Plant Biosystems* 146:681-93.

Huang M, Roose ML, Yu ., Du D, Yu Y, Zhang Y, et al. (2018). Construction of high-density genetic maps and detection of QTLs associated with Huanglongbing tolerance in citrus. *Frontiers in Plant Science* 9:1694.

INDEC. 2002. Encuesta Nacional Agropecuaria 2001. Ministerio de Economía, Instituto Nacional de Estadísticas y Censos, 15 pag.

Ingram A, Doyle J (2003). The origin and evolution of *Eragrostis tef* (Poaceae) and related polyploids: Evidence from nuclear waxy and plastid rps16. *American Journal of Botany* 90:116-122.

Jessup RW, Burson BL, Burow GB, Wang YW, Chang C, Li Z, et al. (2003). Segmental allotetraploidy and allelic interactions in buffelgrass (*Pennisetum ciliare* Link syn. *Cenchrus ciliaris* L.) as revealed by genome mapping. *Genome* 46:304-313.

Jiao Y, Peluso P, Shi J, Liang T, Stitzer MC, Wang B, et al. 2017. Improved maize reference genome with single-molecule technologies. *Nature* 546:524-527.

Johansen DA (1940). *Plant microtechnique*. McGraw-Hill Book Company, Inc.; London.

Johnston JS, Bennett MD, Rayburn AL, Galbraith DW, Price HJ (1999). Reference standards for determination of DNA content of plant nuclei. *American Journal of Botany* 86:609–613.

Jones DB, Jerry DR, Khatkar MS, Raadsma HW, Zenger KR (2013). A high-density SNP genetic linkage map for the silver-lipped pearl oyster, *Pinctada maxima*: a valuable resource for gene localisation and marker-assisted selection. *BMC Genomics* 14:810.

Jorasch P (2004). Intellectual property rights in the field of molecular marker analysis. En: *Molecular Marker Systems in Plant Breeding and Crop Improvement*. Springer, Berlin, Heidelberg, pag. 433-471.

Kantama L, Sharbel T, Schranz M, 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. *Proceedings National Academy of Sciences* 104:14026-14031.

Kandemir N, Saygili I (2014). Apomixis: new horizons in plant breeding. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 39:549-556.

Kawahara Y, de la Bastide M, Hamilton JP, Kanamori H, McCombie WR, Ouyang S, et al. (2013). Improvement of the *Oryza sativa* Nipponbare reference genome using next generation sequence and optical map data. *Rice* 6:4.

Khanday I, Skinner D, Yang B, Mercier R, Sundaresan V (2019). A male-expressed rice embryogenic trigger redirected for asexual propagation through seeds. *Nature* 565:91.

Koltunow A (1993). Apomixis: embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. *Plant Cell* 5:1425-1437.

Koltunow A, Grossniklaus U (2003). Apomixis: a developmental perspective. *Annual Review of Plant Biology*. 54:547-574.

Kosambi D (1944). The estimation of map distance from recombination values. *Annals of Eugenics* 12:172-175.

Kotani Y, Henderson ST, Suzuki G, Johnson SD, Okada T, et al. (2013). The LOSS OF APOMEIOSIS (LOA) locus in *Hieracium praealtum* can function independently of the associated large-scale repetitive chromosomal structure. *New Phytologist* 201:973-981.

Krzywinski M, Schein J, Birol I, Connors J, Gascoyne R, Horsman D, et al. (2009). Circos: an information aesthetic for comparative genomics. *Genome Research* 19:1639-1645.

Kumar S, Banks TW, Cloutier S (2012) SNP discovery through next-generation sequencing and its applications. *International Journal of Plant Genomics* e831460.

Kumar S (2017) Epigenetic control of apomixis: A new perspective of an old enigma. *Advances in Plants & Agriculture Research* 7:00243.

Labombarda P, Busti A, Cáceres ME, Quarin CL, Pupilli F, Arcioni S (2002). An AFLP marker tightly linked to apomixis reveals hemizygoty in a portion of the apomixis-controlling locus in *Paspalum simplex*. *Genome* 45:513-519.

Lacape J-M, Nguyen TB, Thibivilliers S, Bojinov B, Courtois B, Cantrell RG, Burr B, and Hau B, 2003. A combined RFLP-SSR-AFLP map of tetraploid cotton based on a *Gossypium hirsutum* X *Gossypium barbadense* backcross population. *Genome* 46:612-626.

Lander E, Green P, Abrahamson J, Barlow A, Daly M, Lincoln S, Newburg L (1987). Mapmaker an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1:174-181.

Leblanc O, Mazzucato A (2001). Screening procedures to identify and quantify apomixis. En: Savidan Y, Carman J, Dresselhaus T. (eds) *The flowering apomixis: from mechanisms to genetic engineering*. Mexico DF: CIMMYT, IRD, European Commission DG VI (FAIR), pag. 121-136.

Leblanc O, Peel J, Carman J, Savidan Y (1995). Megasporogenesis and megagametogenesis in several *Tripsacum* species (Poaceae). *American Journal of Botany* 82:57-63.

Leigh J (1960). Some aspects of anatomy, ecology and physiology of *Eragrostis*. Tesis Ph. D., Universidad de Witwatersrand, Johannesburg, Sudáfrica

Leitch A, Leitch I (2008). Perspective - genomic plasticity and the diversity of polyploid plants. *Science* 320:481-483.

Li WB, Hartung JS, Levy L (2006). Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus huanglongbing. *Journal of Microbiological Methods* 66:104-115.

Li X, Wei Y, Acharya A, Jiang Q, Kang J, Brummer EC (2014). A saturated genetic linkage map of autotetraploid alfalfa (*Medicago sativa* L.) developed using genotyping-by-sequencing is highly syntenous with the *Medicago truncatula* genome. *G3 (Bethesda)* 4:1971-1979.

Liu Z, Wang R, Carman J (1994). Hybrids and backcross progenies between wheat (*Triticum aestivum* L.) and apomictic Australian wheatgrass [*Elymus rectisetus* (Nees in Lehm.) A. Löve and Connor]: karyotypic and genomic. *Theoretical Applied Genetics* 89:599-605.

Lorch PD (2005). Sex differences in recombination and mapping adaptations. *Genetica* 123:39-47.

Margarido GR, Souza AP, Garcia AA (2007). OneMap: software for genetic mapping in outcrossing species. *Hereditas* 144:78-79.

Martin M (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal* 17:10-12.

Martínez E, Hopp E, Stein J, Ortiz JP, Quarín C (2003). Genetic characterization of apospory in tetraploid *Paspalum notatum* based on the identification of linked molecular markers. *Molecular Breeding* 12:319-327.

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*). *Journal of Plant Physiology* 164:1051-1061.

Meier M, Zappacosta D, Selva JP, Pessino S, Echenique V (2011). Evaluation of different methods for assessing the reproductive mode of weeping lovegrass plants, *Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees. *Australian Journal of Botany* 59: 253-261.

Moghaddam SM, Song Q, Mamidi S, Schmutz J, Lee R, Cregan P, Osorno JM, McClean PE (2014) Developing market class specific InDel markers from next generation sequence data in *Phaseolus vulgaris* L. *Frontier in Plant Science* 5:185.

Mohan M, Nair S, Bhagwat A, Krishna TG, Yano M, Bhatia CR, Sasaki T (1997). Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. *Molecular Breeding* 3: 87-103.

Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum* 15:473-497.

Naumova T (1997). Apomixis in tropical fodder crops: cytological and functional aspects. *Euphytica* 96:93-9.

Naumova TN, Hayward MD, Wagenvoort M (1999). Apomixis and sexuality in diploid and tetraploid accessions of *Brachiaria decumbens*. *Sexual Plant Reproduction* 12:43-52.

Nogler G (1984). Gametophytic apomixis. En: Johri B (ed) *Embryology of Angiosperms*. Springer Verlag, Berlin 475-518.

Noyes RD (2005). Inheritance of apomeiosis (diplospory) in fleabanes (*Erigeron*, Asteraceae). *Heredity* 94:193.

Noyes RD, Baker R, Mai B (2007). Mendelian segregation for two-factor apomixis in *Erigeron annuus* (Asteraceae). *Heredity* 98:92-98.

Norrmann G, Quarin C, Burson B (1989). Cytogenetics and reproductive behavior of different chromosome races in six *Paspalum* species. *Journal of Heredity* 80:24-28.

Ochogavía AC, Cervigni G, Selva JP, Echenique V, Pessino S (2009). Variation in cytosine methylation patterns during ploidy level conversions in *Eragrostis curvula*. *Plant Molecular Biology* 70:17-29.

Okada T, Ito K, Johnson SD, Oelkers KO, Suzuki G, Houben A, et al. (2011). Chromosomes carrying meiotic avoidance loci in three apomictic eudicot *Hieracium* subgenus *Pilosella* species share structural features with two monocot apomicts. *Plant Physiology* 157:1327-1341.

Opperman R, Emmanuel E, Levy AA (2004). The effect of sequence divergence on recombination between direct repeats in *Arabidopsis*. *Genetics* 168:2207-2215.

Ortiz JPA, Quarin CL, Pessino SC, Acuña C, Martínez EJ., Espinoza F, et al. (2013). Harnessing apomictic reproduction in grasses: what we have learned from *Paspalum*. *Annals of Botany* 112:767-787.

Otto F (1990). DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. En: Crissman H, Darzynkiewicz Z, eds. *Methods in cell biology*. New York, NY: Academic Press, pag. 105-110.

Ozias-Akins P, Roche D, Hanna WW (1998). Tight clustering and hemizygoty of apomixis-linked molecular markers in *Pennisetum squamulatum* implies genetic control of apospory by a divergent locus that may have no allelic form in sexual genotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:5127-5132.

Ozias-Akins P, van Dijk PJ (2007). Mendelian genetics of apomixis in plants. Annual Review of Genetics. 41:509-537.

Pellegrini L (2016). Investigating APOSTART gene function through the characterisation of *Arabidopsis thaliana* mutants. Ph.D. Thesis, University of Perugia, Perugia.

Pessino S, Ortiz J, Leblanc O, do Valle C, Hayward M (1997). Identification of a maize linkage group related to apomixis in Brachiaria. Theoretical Applied Genetics 94:439–44.

Poland JA, Brown PJ, Sorrells ME, Jannink JL (2012). Development of high-density genetic maps for barley and wheat using a novel two-enzyme genotyping-by-sequencing approach. PloS ONE 7:e32253.

Polci PA (2000). Cultivo de tejidos para la obtención de variantes somaclonales de pasto llorón, *Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees. Tesis de Doctorado en Biología, Universidad Nacional del Sur, Argentina.

Poverene M (1988). Contribución citogenética y quimiosistemática a la taxonomía del pasto llorón, *Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees s. lat. Tesis Doctoral, Universidad Nacional del Sur.

Poverene M, Curvetto N (1991). Citogenética. En: El pasto llorón, su Biología y Manejo, Eds. O. Fernández, R. Bredan y A. Gargano. CERZOS y Dpto. Agronomía-UNS, Argentina, Cap. 3, pag. 19-38.

Procurier D, Prashar J, Chen S, Wolfe G, Fox D, Liakat S, et al. (2009). Rapid ID technology (RIDT) in plants: High-speed DNA fingerprinting in grain seeds for the identification, segregation, purity and traceability of varieties using labautomation robotics. Journal of the Association for Laboratory Automation 14:221-231.

Pupilli F, Cáceres ME, Quarin CL, Arcioni S (1997). Segregation analysis of RFLP markers reveals a tetrasomic inheritance in apomictic *Paspalum simplex*. *Genome* 40:822-828.

Pupilli F, Lobombarda P, Cáceres M, Quarin 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. *Molecular Breeding* 8:53–61.

Pupilli F, Martínez E, Busti A, Calderini O, Quarin C, Arcioni S (2004). Comparative mapping reveals partial conservation of synteny at the apomixis locus in *Paspalum* spp. *Molecular Genetics and Genomics* 270:539-548.

Quarin C, Hanna WW (1980). Effect of three ploidy levels on meiosis and mode of reproduction in *Paspalum hexastachyum*. *Crop Science* 20:69-75.

Quarin CL, Espinoza F, Martínez E, Pessino, S, Bovo O (2001). A rise of ploidy level induces the expression of apomixis in *Paspalum notatum*. *Sexual Plant Reproduction* 13:243-249.

Rabeau T, Longly B, Louant B (1986). Ontogenèse des sacs embryonnaires non réduits chez *Eragrostis curvula*. *Canadian Journal of Botany* 64:1778-1785.

Rafalski A (2002). Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. *Current Opinion in Plant Biology* 5:94-100.

Ratan A, Olson TL, Loughran TPJr, Miller W (2015). Identification of indels in next-generation sequencing data. *BMC Bioinformatics* 16:42.

Remund KM, Dixon DA, Wright DL, Holden LR (2001). Statistical considerations in seed purity testing for transgenic traits. *Seed Science Research*, 11:101-119.

Ren Y, Zhao H, Kou Q, Jiang J, Guo S, Zhang H, Hou W, Zou X, Sun H, Gong G, Levi A, Xu Y (2012) A high resolution genetic map anchoring scaffolds of the sequenced watermelon genome. PLoS One 7:e29453.

Roche D, Hanna W, Ozias-Akins P (2001). Gametophytic apomixis, polyploidy and supernumerary chromatin. Sexual Plant Reproduction 13:343-49.

Rodrigo JM, Zappacosta DC, Selva JP, Garbus I, Albertini E, Echenique V (2017). Apomixis frequency under stress conditions in weeping lovegrass (*Eragrostis curvula*). PloS One, 12:e0175852.

Roodt-Wilding R, Spies J (2006). Phylogenetic relationships in southern African chloridoid grasses (Poaceae) based on nuclear and chloroplast sequence data. Systematic Biology 4:401-415.

Sartor ME, Quarin CL, Urbani M, Espinoza F (2011). Ploidy levels and reproductive behaviour in natural populations of five *Paspalum* species. Plant Systematic and Evolution 293:31-41.

Savidan Y. (2000). Apomixis: genetics and breeding. Plant Breeding Reviews 18:13-86.

Selva JP, Pessino SC, Meier MS, Echenique VC (2012). Identification of candidate genes related to polyploidy and/or apomixis in *Eragrostis curvula*. American Journal of Plant Sciences. 3:403-416.

Selva JP, Siena L, Rodrigo JM, Garbus I, Zappacosta D, Romero JR, et al. (2017). Temporal and spatial expression of genes involved in DNA methylation during reproductive development of sexual and apomictic *Eragrostis curvula*. Scientific Reports 7:15092.

Semagn K, Bjørnstad Å, Ndjioudjop MN (2007). Principles, requirements and prospects of genetic mapping in plants. African Journal of Biotechnology 525:2569-2587.

Sharbel TF, Voigt ML, Corral JM, Thiel T, VarshneyA, Kumlehn J, Vogel J, Rotte B (2009) Molecular signatures of apomictic and sexual ovules in the *Boechera holboellii* complex. *Plant Journal* 58:870-882.

Sherwood R (2001). Genetic analysis of apomixis. En: The flowering apomixis: from mechanisms to genetic engineering. Eds. Y. Savidan, J. Carman y T. Dresselhaus, Mexico D.F., European Commission DG VI (FAIR) Cap. 5, pag. 65-82.

Siena LA, Sartor ME, Espinoza F, Quarin, CL, Ortiz JPA (2008). Genetic and embryological evidences of apomixis at the diploid level of *Paspalum rufum* support recurrent auto-polyploidization in the species. *Sexual Plant Reproduction* 21:205.210.

Siena LA, Ortiz JPA, Leblanc O, Pessino S (2014). PnTgs1-like expression during reproductive development supports a role for RNA methyltransferases in the aposporous pathway. *BMC Plant Biology* 14:297.

Spindel J, Wright M, Chen C, Cobb J, Gage J, Harrington S, Lorieux M, Ahmadi N, McCouch S (2013). Bridging the genotyping gap: using genotyping by sequencing (GBS) to add high-density SNP markers and new value to traditional bi-parental mapping and breeding populations. *Theoretical and Applied Genetics* 126:2699-2716.

Spillane C, Vielle-Calzada J, Grossniklaus U (2001). APO2001: a sexy apomixer in *Coma*. *Plant Cell*, 13, 1477-1490.

Stam P (1993). Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package: JoinMap. *Plant Journal* 3:739-744.

Stalker HT, Wright LN (1975). Reproduction of *Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees. *Journal of Arizona Academy of Science* 10:106-110.

Steglich M, Nubel U (2017). The challenge of detecting indels in bacterial genomes from short-read sequencing data. *Journal of Biotechnology* 250:11-15.

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. *Theoretical and Applied Genetics* 109:186–91.

Stein J (2006). Estudios de localización y herencia de genes relacionados con la apomixis en razas tetraploides de *Paspalum notatum*. Tesis doctoral, Universidad Nacional de Rosario.

Stein J, Pessino C., Martínez EJ, Rodríguez MP, Siena L, Quarín CL, et al. (2007). A genetic map of tetraploid *Paspalum notatum* Flüggé (bahiagrass) based on single-dose molecular markers. *Molecular Breeding* 20:153-166.

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.

Stritzler N P, Petrucci HJ (2000). Gramíneas perennes estivales introducidas en zonas semiáridas, resultados y perspectivas. En: Actas del Congreso Nacional de Ganadería Pampeana, pág. 13-17.

Thaikua S, Ebina M, Yamanaka N, Shimoda K, Suenaga K, Kawamoto Y (2016). Tightly clustered markers linked to an apospory-related gene region and QTL mapping for agronomic traits in *Brachiaria* hybrids. *Grassland Science* 62:69-80.

Torres Carbonell C, Marinissen A (2010). Hoja técnica Pasto llorón I: Tecnología para la zona de Bahía Blanca. Oficinas de Extensión INTA Bahía Blanca y Coronel Rosales. EEA INTA Bordenave. N°12.

Tucker MR, Koltunow AMG (2009). Sexual and asexual (apomictic) seed development in flowering plants: molecular, morphological and evolutionary relationships. *Functional Plant Biology* 36:490-504.

VanBuren R, Wai CM, Keilwagen J, Pardo J (2018). A chromosome-scale assembly of the model desiccation tolerant grass *Oropetium thomaeum*. *Plant Direct* 2:e00096.

Van Ooijen J W (2006). JoinMap R 4. Software for the calculation of genetic linkage map in experimental populations. Kyazma B.V., Wageningen, Netherlands.

Varshney RK, Shi C, Thudi M, Mariac C, Wallace J, Qi P, et al. (2017). Pearl millet genome sequence provides a resource to improve agronomic traits in arid environments. *Nature Biotechnology* 35: 969-976.

Vielle-Calzada J, Crane C., Stelly D (1996). Apomixis: The asexual revolution. *Science* 274:1322-1323.

Vijverberg K, Van der Hulst R, Lindhout P, Van Dijk PJ (2004) A genetic linkage map of the diplosporous chromosomal region in *Taraxacum* (common dandelion; Asteraceae). *Theoretical and Applied Genetics* 108:725-732.

Voigt P (1976). Registration of OTA-S weeping lovegrass germplasm (Reg. No. GP 8). *Crop Science* 16:886-886.

Voigt P, Bashaw E (1972). Apomixis and sexuality in *Eragrostis curvula*. *Crop Science* 12:843-847.

Voigt P, Bashaw E (1973). Facultative apomixis in *Eragrostis curvula*. *Agronomy Abstracts* 65:16.

Voigt P, Bashaw E (1976). Facultative apomixis in *Eragrostis curvula*. *Crop Science* 16:803-805.

Voigt P, Burson B (1992). Apomixis in *Eragrostis*. *Proceeding Apomixis Workshop*, Atlanta, USA, USDA-ARS, ARS-104:8-11.

Voigt P, Rethman N, Poverene M (2004). Lovegrasses. En: *American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, Warm-Season (C4) Grasses, Agronomy Monograph Cap. 45*, pag. 1027-1056.

Vorster T, Liebenberg H (1977). Cytogenetic studies in the *Eragrostis curvula* complex. *Bothalia* 12:215-21.

Vorster T, Liebenberg H. 1984. Classification of embryo sacs in the *Eragrostis* Complex. *Bothalia* 15:167-174.

Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van De Lee T, Hornes M, et al. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23:4407-4414.

Wang C, Liu Q, Shen Y, Hua Y, Wang J, Lin J, et al. (2019). Clonal seeds from hybrid rice by simultaneous genome engineering of meiosis and fertilization genes. *Nature Biotechnology*, 1.

Worthington M, Heffelfinger C, Bernal D, Quintero C, Zapata YP, Perez JG, et al. (2016). A parthenogenesis gene candidate and evidence for segmental allopolyploidy in apomictic *Brachiaria decumbens*. *Genetics* 203:1117-1132.

Wu KK, Burnquist W, Sorrells ME, Tew TL, Moore PH, Tanksley SD (1992). The detection and estimation of linkage in polyploids using single-dose restriction fragments. *Theoretical and Applied Genetics* 83:294-300.

Young ND (1994). Constructing a plant genetic linkage map with DNA markers. En; DNA-based markers in plants. Springer, Dordrecht, pag. 39-57.

Xu Y (2010). *Molecular Plant Breeding*. CABI International, Wallingford, Oxfordshire.

Zappacosta D (2009). Contribución al conocimiento de la taxonomía y del modo reproductivo del pasto llorón, *Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees. Tesis de Doctorado en Agronomía, Universidad Nacional del Sur, Argentina.

Zappacosta D, Ochogavía AC, Rodrigo JM, Romero JR, Meier MS, Garbus I, et al. (2014). Increased apomixis expression concurrent with genetic and epigenetic variation in a newly synthesized *Eragrostis curvula* polyploid. *Scientific Reports* 4:4423.

Záveský L, Jarolímová V, Stěpánek J (2007). Apomixis in *Taraxacum paludosu* (section Palustria, Asteraceae): Recombinations of apomixis elements in inter-sectional crosses. *Plant Systematics and Evolution* 265:147-63.

VIII – Material Suplementario

Tabla Suplementaria S1: Secuencia de cebadores de RAPD, SSR y AFLP utilizados.

Nombre	Secuencia 5'-3'
Cebador RAPD 232	CGGTGACATC
Cebador RAPD 245	CGCGTGCCAG
Cebador RAPD 304	AGTCCTCGCC
Cebador RAPD 331	AGTCCTCGCC
Cebadores SSR 10159	F: TAGCCAGATGACCTCCAC R: CCTGCTCTCCTCCGAC
Cebadores SSR 13665	F: TGCCTGGACCTCTACTA R: ACTGCTTCAGCCTCATCTT
Cebadores SSR 13776	F: TCCAACATCAACCAGTAA R: GTAGCTCTTGCCGAACC
Cebadores SSR 15838	F: AGTGGAGGAAGATGTAGCC R: ACAGAGTTGAAGGAGCAGAG
Cebadores SSR 18079	F: GACAGGACCCCTCTTCC R: AGGACTCCCAGCTCAGAT
Cebadores SSR 20053	F: CCACCAACCAATTATCCTAA R: GATCTCGCGACAACCC
Cebadores SSR 20164	F: GAACTACCTGCAGATCAAGG R: TGCACTTTGTTGTCATCTTC
Cebadores SSR 27968	F: ACTTGCAGAAATCACAAAGG R: GGATCGTGTGATTGAAGTT
Cebadores SSR 30246	F: TCTTCTTCAGCCCCTTG R: ACGTCGTCGTCATCCTC
Adaptador <i>Pst</i> I	GAC TGC GTA GGT GCA CCT ACG CAG TCT ACG AG
Adaptador <i>Mse</i> I	GAC GAT GAG TCC TGA G ATG AGT CCT GAG TA
<i>Pst</i> I +1 cebador de pre-amplificación	GAC TGC GTA CAT GCA GA
<i>Mse</i> I +1 cebador de pre-amplificación	GAT GAG TCC TGA GTA AA
<i>Pst</i> I +3 P36 cebador de amplificación selectiva	GAC TGC GTA CAT GCA GACC
<i>Pst</i> I +3 P37 cebador de amplificación selectiva	GAC TGC GTA CAT GCA GACG
<i>Pst</i> I +3 P40 cebador de amplificación selectiva	GAC TGC GTA CAT GCA GAGC
<i>Pst</i> I +3 P41 cebador de amplificación selectiva	GAC TGC GTA CAT GCA GAGG
<i>Mse</i> I +3 M31 cebador de amplificación selectiva	GAT GAG TCC TGA GTA AAAA
<i>Mse</i> I +3 M38 cebador de amplificación selectiva	GAT GAG TCC TGA GTA AACT
<i>Mse</i> I +3 M39 cebador de amplificación selectiva	GAT GAG TCC TGA GTA AAGA
<i>Mse</i> I +3 M43 cebador de amplificación selectiva	GAT GAG TCC TGA GTA AATA
<i>Mse</i> I +3 M45 cebador de amplificación selectiva	GAT GAG TCC TGA GTA AATG

Tabla Suplementaria S2. Número de lecturas, cantidad de bases, cobertura sobre el genoma (calculado sobre un valor estimado de 1.250 Mb) y código de barras (barcode) de cada muestra.

Población	Número de lecturas	Bases	Cobertura sobre el genoma (1.250 Mb)	Código de barra
OTA-S	8686226	96302141	0,0770417	TTCTC - CGCCTTAT - TAACGA - TTCCTGGA
Don Walter	6032130	85668723	0,0685350	CTCC - GTCGATT - TACAT - TCTGTGA
Z002	7384611	93448324	0,0747587	GCTTA
Z007	4588128	79385667	0,0635085	AACGCCT
Z008	3290499	64043291	0,0512346	AGGC
Z009	2192540	48372739	0,0386982	TCGTT
Z011	5041626	78367157	0,0626937	TGGCTA
Z012	3413555	62471714	0,0499774	TGCTGGA
Z016	6421475	84386552	0,0675092	TGCA
Z017	2405340	55402434	0,0443219	AGCCC
Z020	5204427	79505163	0,0636041	CTTCCA
Z021	2389801	51051466	0,0408412	AATATGC
Z024	2665440	55271073	0,0442169	GATC
Z025	4048032	71402419	0,0571219	ACCTAA
Z028	2774892	56949093	0,0455593	ACGTGTT
Z030	3946910	67310291	0,0538482	AACCGAGA
Z031	3569332	64063151	0,0512505	ACTA
Z032	2796563	58818606	0,0470549	GTATT
Z033	3610063	66703303	0,0533626	GAGATA
Z034	2490973	53530015	0,0428240	ACGACTAC
Z039	2858932	57459187	0,0459673	TCAC
Z056	2758106	54898642	0,0439189	ATATGT
Z057	1771737	47841938	0,0382736	ATTAATT
Z100	4183334	70607085	0,0564857	ACAGGGAA
Z103	5706918	83505023	0,0668040	CAGA
Z105	3732574	67924952	0,0543400	CTGTA
Z109	2496781	56375384	0,0451003	ATGCCT
Z111	3362015	65290408	0,0522323	GGTGT
Z112	2953192	59059757	0,0472478	AGGAT
Z113	3223946	63462614	0,0507701	ATCGTA
Z115	2625251	56673112	0,0453385	ATTGGAT
Z116	43	2300	0,0000018	ACGTGGTA
Z119	3182001	58137442	0,0465100	AACT

Z122	3793850	66734225	0,0533874	ACCGT
Z128	2097744	53189133	0,0425513	TATTTTT
Z131	2389376	52184428	0,0417475	TAGCATGC
Z138	7899592	88710417	0,0709683	ATTGA
Z140	5244109	76257866	0,0610063	CATCGT
Z146	2277674	52499198	0,0419994	CATAAGT
Z154	141	7843	0,0000063	CCATGGGT
Z155	5150415	77459966	0,0619680	GCGT
Z158	5495090	74397819	0,0595183	GTAA
Z160	4353305	74562985	0,0596504	CTTGCTT
Z162	3211307	59640185	0,0477121	AGTGGA
Z167	4570508	72282386	0,0578259	CATCT
Z171	4358408	72420309	0,0579362	CGCGGT
Z174	2940174	60183907	0,0481471	CGCTGAT
Z191	4161339	70808221	0,0566466	CGCGGAGA
Z194	3944315	72536068	0,0580289	TGCGA
Z195	3686441	67622753	0,0540982	GGTTGT
Z197	2686593	59686691	0,0477494	ATGAAAC
Z198	3980163	73468911	0,0587751	TAGGCCAT
Z203	3047491	62246625	0,0497973	CCTAC
Z205	4090934	73436653	0,0587493	CTATTA
Z206	5595417	81710657	0,0653685	CGGTAGA
Z207	3594271	66766676	0,0534133	CGTGTGGT
Z208	4621284	74193184	0,0593545	CGAT
Z209	4749631	79372014	0,0634976	CCAGCT
Z210	2393924	57468554	0,0459748	AAAAGTT
Z211	5109761	79165108	0,0633321	TGCAAGGA
Z212	3842303	69380082	0,0555041	GAGGA
Z213	4610694	75581028	0,0604648	GCCAGT
Z214	5633506	83532422	0,0668259	CTACGGA
Z215	3118270	61964249	0,0495714	GCTGTGGA
Z216	3666689	68932120	0,0551457	CGCTT
Z217	437881	18511153	0,0148089	TTCAGA
Z218	6347847	84840536	0,0678724	GAATTCA
Z219	6789993	87989046	0,0703912	TGGTACGT
Z220	4281545	73754554	0,0590036	GGAAC
Z221	4158009	67709438	0,0541676	GGAAGA
Z222	3853240	68031641	0,0544253	GCGGAAT
Z223	310	15123	0,0000121	GGATTGGT
Z224	3281913	66014094	0,0528113	TCACC
Z225	2868647	62083088	0,0496665	TAGGAA

Z226	2988142	61808129	0,0494465	GAACTTC
Z229	3465220	65469815	0,0523759	TCTCAGTC
Z237	5534614	78628033	0,0629024	GTCAA
Z251	3481431	64853943	0,0518832	GTACTT
Z252	1735	93014	0,0000744	TAGCGGA
Z258	3692875	67866726	0,0542934	GTGAGGGT
Z259	3390186	66991778	0,0535934	CTAGC
Z260	3739979	69460685	0,0555685	GCTCTA
Z262	3784315	71015867	0,0568127	GGACCTA
Z263	5520355	83011046	0,0664088	CCGGATAT
Z266	2407760	56759379	0,0454075	TAATA
Z268	3777322	67925757	0,0543406	GTTGAA
Z269	2905223	61593101	0,0492745	TCGAAGA
Z271	3430260	66868799	0,0534950	TATCGGGA
Total	328261542	5683418629	4,5467349	

Tabla Suplementaria S3. Detalle del analisis de sintenia entre los grupos de ligamiento de OTA-S y el mapa fisico *O. thomaeum*. En amarillo se indican los grupos de ligamiento que presentaron homología preferencial con un cromosoma (grupos de ligamiento especificos) y en verde los que presentaron homología con dos o tres cromosomas (grupos de ligamiento compartido).

OTA-S GL	Cromosomas de <i>O. thomaeum</i>										Otros
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1				17			1				
2			1	9				1			
3				2		12	1				contig_108
4	1		2	44	2	2	1	1			
5	1	29			1	1			1		
6	15		1	2	2	2					
7						1	14				
8		2	2	2	19	1					
9							2		15		
10		1	14		2		2	1		1	
11	14	2			2			2			
12		14	2	1		1	1			1	
13	1	13	1		1		1			1	
14			1	19	2		1			1	
15	1		12	1	1					2	

16	3	2	3	1					7			
17	12								1			
18			8									contig_2
19			12									
20		2					11					contig_89
21					1		11		1	1		
22			8	1								
23	1	2							6			
24		1		1				2		1		
25								5				
26			1		8							
27										5		
28			2									
29					1							
30									2			contig_89
31							3	1				
32	1		2		1							
33										4		
34		2										
35												Sin homología
36												Sin homología
37												Sin homología
38												Sin homología
39												Sin homología
40				2								

Tabla Suplementaria S4. Detalle del análisis de sintenia entre los grupos de ligamiento de DW y el mapa físico *O. thomaeum*. En amarillo se indican los grupos de ligamiento que presentaron homología preferencial con un cromosoma (grupos de ligamiento específicos) y en verde los que presentaron homología con dos o tres cromosomas (grupos de ligamiento compartido).

DW GL	Cromosomas de <i>O. thomaeum</i>										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Others
1	48	1	1			2			1	1	contig_2
2		43		2			1	1	1	6	
3			1		20	1	1	1			
4	51	4			1		2			1	
5	3		46		1	1	1			1	contig_23, contig_66

6			37		1	2	2			3	
7	4	2	2	37				1		2	
8			2	3	2		19	8			
9	3	18			2	1	1				contig_10(2),contig_148
10	1	2	1		1	3	17		1		
11			3	2	23		2	1			
12		22					1				contig_1
13		5							2	7	
14	18		1	1					2		contig_57
15	2	3		1		2	1		15		
16	1					20	1			1	
17		2							18		contig_60
18		1	1	1			14				
19		1		19	2	3					
20	1	1	1		1	17	1				
21					1			12		2	
22	20	2		1				1			
23		2	1	20			1				
24	1			17						10	
25			18		2						
26	1				15						
27							1		14		contig_89
28	1					11					contig_91
29			13								
30					11				1		
31				15							
32						1	3			1	
33						6		2			
34		3	2								
35		2	2						1	2	
36		4									contig_1
37								2			
38							1				
39										4	
40			1	3					3		

Tabla Suplementaria S5. Analisis de Sintenia entre los grupos de ligamiento de Don Walter (DW GL) con los mapas fisicos de *Cenchrus americanus*, *Oryza sativa*, *Panicum hallii*, *Setaria italic* y *Zea mays*. En amarillo se indican los grupos de ligamiento que presentaron homología preferencial con un cromosoma (grupos de ligamiento específicos) y en verde los que presentaron homología con dos o tres cromosomas (grupos de ligamiento compartido).

DW	<i>Cenchrus americanus</i> (cromosomas)						
GL	CM007982	CM007983	CM007984	CM007985	CM007986	CM007987	CM007988
1	1	18	15	1	10	3	3
2	5	11	6	1	1		11
3	16			6	1	1	
4	2	19	21	1	3	7	
5	4	1	1	3	1	36	4
6	6	4		4		28	1
7	7	8	2	3	20	5	3
8	7	3	3	2	1	1	13
9	2	3	4	3	2	2	6
10		3	1	3	1	2	9
11	24		1	1		2	2
12	1	8	1		2		6
13	1			6	1	4	2
14		8	1	1	8		1
15	4	3		7	1	2	5
16		1	18		2	1	2
17	2	1	1	11	1		2
18	1	2	1	1	1		6
19	2				22	2	
20	1		15		2		2
21		1		2	3	2	
22		1	20	2	1		
23	1	14	1	1			1
24	1		3	1	11		
25	2					16	1
26	11		2				
27	3	2	1	3		2	
28			3	1		2	
29					1	9	
30	3	1				1	2
31		10			1		
32	1	1		1	1	1	1
33			1	1	2		
34	3		1				
35	1	1		1	1	1	2
36				1	2	1	
37	2						
38	1					1	
39		4					
40		1				1	

DW	<i>Oryza sativa</i> (cromosomas)												Otros
LG	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1		15		4	1	1	1	2		13		2	
2	1	1	2	1	2	23	2	1	12	1			
3	3	1			14			1					
4	1	22		6	3	3	1	2	1	18	1		
5	28	1	3		8	1	1					2	
6	22	1	1	2	4		3	1	2				
7	4		25		1	2		1	2				
8	6		7	1	1	1	4			1	4		AC155918
9			1	1	2	8	1		7				
10	3			2		2	7	1					
11	2	1			18	3	1	2	3				
12	1	1	3			10	4		6				
13		1				1		1			2	5	
14		6		1		1		1		7	1		
15	2	2	1			2	2	8	2				
16	2	2	2	13				1				1	
17			2		1			9	3				
18	1	1	1			4	6			1			
19	1		14				1	1		1	2	1	
20	1	4		14		1		1					
21							1			1	6	1	
22		9	1	1				1					
23	1		13		2		1		1				
24			13	1						2			
25	12				2		1		1		1		
26	1				8				1				
27							1	12	1				
28				6		1							
29	11												
30					4								
31			8	1			1						
32							1					1	
33				8									
34												3	
35		2				2						1	
36						3		1					
37		1									1		
38	1												
39						3							
40		1											

DW	<i>Panicum hallii</i> (cromosomas)									
LG	NC-038042	NC-038043	NC-038044	NC-038045	NC-038046	NC-038047	NC-038048	NC-038049	NC-038050	Otros
1	30	1	3			1	2		16	NW_020356358
2	1	16	2	30		1			3	
3		1	15		1	2		1	1	
4	32		1	3	5		3		22	
5		1	6	1	45	2	1			
6		3	2	3	35		1		3	
7			2	1	2	2			40	
8		13	2	2	1		2	8	1	
9		15		12		1	1		2	
10		14	1			1	3	2	2	
11	1	3	22		1		1		4	
12		15		11						NW_020356368
13			6			2		2		
14	11			1		1			12	
15		3		2		12	2	1	2	NW_020356210
16	1	1	1				25		1	
17						20	2	1	4	
18	2	12	4	1	1	1				
19			1					1	24	
20	4	2					18		1	
21					1	1		10		
22	19					2		1		
23	2	1			2			1	16	
24			2	1	1			1	15	
25			2		18					
26	2		14							
27		1				12				
28							14			
29					13					
30			3		3					
31	1							1	11	
32		1	1	1				1		
33							9			
34		1	3							
35		1	2	1			1	1	2	
36				4					1	
37						1		4		
38			1							
39			2	5						
40			1						2	

DW	<i>Setaria italica</i> (cromosomas)								
GL	Scaffold_1	Scaffold_2	Scaffold_3	Scaffold_4	Scaffold_5	Scaffold_6	Scaffold_7	Scaffold_8	Scaffold_9
1	24	1	3	1		1		2	19
2		16		30	1	1	1		4
3	1	2	15	1	3		3		2
4	30	2		2	2		5		24
5	1	3	2		47		1	2	
6	1	3			44	1	1		3
7	4	2	6	1	3				36
8	2	17	2				1	8	2
9		11	1	11			1	1	
10	1	18	1		3		3	1	
11		2	24		4				4
12	1	11	2	10				1	2
13		1	8	1	3		1		2
14	12						4		11
15		3			1	12	2		2
16	1		2				20		
17		2		1		18	1		3
18		12	4	2				1	1
19					1			24	
20	3			2			18		
21				1			2	8	
22	19		1			2		3	
23			1		2	1			20
24					1				16
25	1	1	1		14		1	2	2
26	2		12				1		
27		1				12			
28			9				5		
29					11				
30			5						
31					1				11
32		2	1						1
33			6				4		
34						1	3		
35		2	3	1			1	2	1
36				3					
37								4	
38			1						
39		1		4					
40									3

DW	<i>Zea mays</i> (cromosomas)									
GL	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	9	1	1	1	24	1		1	1	
2	2			2	1	10	11	1	18	
3			2	2		11		5	1	
4	14		1	9	13	1	1	2	6	2
5			18		1	1	3	20	1	1
6	2	1	18	1	2	2	1	16		
7	27		2	1	7				6	2
8	1	8		3	1		10	3	1	1
9	1	7		1		3	6		6	
10		3	1		1		11	2		1
11	1	2		2	2	9		7	2	
12		5	1	1	2	4	6	2	4	
13	4		1					1		4
14	8	2		3	4					1
15	4	3		3	4	4		1		
16		12	1	1	1	1			3	4
17	4	1	1	5					1	
18	2	5	2	1	1		7			
19	12		1	1			1		6	
20	2	9		1		3	1		1	11
21	2	2	1	5						1
22		1		10	8					
23	11		1	1	6		1			
24	13								4	
25			11					8	1	
26		2				6		8		1
27	7	1	1	2		1	1			
28		9								5
29			6					5		
30						2		2		
31	4				4				1	
32	1	1	1						1	
33		5		1			1			2
34						1				2
35	1		1	4					1	
36	1	1			1	1				
37				1						
38							1			
39						2			2	
40							1			

Tabla Suplementaria S6. Analisis de Sintenia entre los grupos de ligamiento de OTA-S con lo mapas fisicos de *Cenchrus americanus*, *Oryza sativa*, *Panicum hallii*, *Setaria italic* y *Zea mays*. En amarillo se indican los grupos de ligamiento que presentaron homología preferencial con un cromosoma (grupos de ligamiento específicos) y en verde los que presentaron homología con dos o tres cromosomas (grupos de ligamiento compartido).

OTA-S	<i>Cenchrus americanus</i> (cromosomas)						
	GL	CM007982	CM007983	CM007984	CM007985	CM007986	CM007987
1		10		3	3	1	1
2			1	1	7		
3	1		10		1		
4		7	1	2	27	1	5
5		3	9	1	5	1	6
6		4	14	1	3	1	1
7			1	1	3	2	15
8	12	2		3		4	1
9	5	3	3	4			2
10			1		1	13	1
11		4	11				
12	2	6	2	1	2	1	3
13	2	3	2	2	2	2	6
14	1	3			15		1
15	2	3	2			10	
16	2	1	3	3	1	3	
17	2	1	8				
18	1				2	6	
19		1				11	
20	2	2	6	3	1	1	1
21					1		12
22	1	1			1	8	
23	2	2		1		1	
24	2			1		2	2
25	2		2	1			
26	6		3			1	
27		2				1	
28							
29	2						
30				1			
31	1			1	1		3
32		1		1		1	1
33				2			
34		1					
35							
36							
37							
38							
39						1	
40					1		

OTA-S	<i>Oryza sativa</i> (cromosomas)											
GL	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1			11				1					
2	1	1	8	1						1		
3				9	1	2		1				
4	1	1	34		2	1	3				1	
5	1	1			2	11	2		7	1		
6	2	9		1				2	1	2		
7		1					12	1				
8	1		2		14							
9				1			2	10	1	1		
10	14	1						1	1	1		
11		11	1	1	1	1	1	1		2		
12	3			1	2	4	1		4	2		2
13		1			1	1		3	10	1		1
14			13				1					2
15	8	1	1		2	2	2					
16	3	2				1					6	2
17		7		1		1	2					
18	5					1				1		1
19	9		1					1				1
20	2	2		2				2	1		1	
21		1		1		1	5					
22	5		2							1		
23								4	1	1		
24			1					1	1		3	3
25					1						5	
26	1		1	2	2							
27						4				1		
28												
29					1							
30						2						
31				1	1		1				1	
32	2	1					1					
33												3
34						1		1				
35												
36												
37												
38												
39	1											
40			2									

OTA-S	<i>Panicum hallii</i> (cromosomas)									
GL	NC-038042	NC-038043	NC-038044	NC-038045	NC-038046	NC-038047	NC-038048	NC-038049	NC-038050	Otros
1			1						15	
2								2	9	
3		1					15		1	
4	1		1	1	1	1	1	2	41	
5		9	1	12	2		8		1	
6	15	1			1	1	1		4	
7		12		1	1	1		5	1	
8			20		1		1		2	
9		2			1	18	1			
10			1		16				1	
11	14			1			1		6	
12		8	1	6					1	
13	2	12		3	1	2	2		1	NW_020356287
14				1		1	1	1	15	
15			2	2	10		2		2	
16	2	1			4	2		8	2	
17	12				1				1	
18					11				1	
19			1		8		1	1		
20		1					12			
21		10					1		1	
22		2			9					
23	1					3			2	
24		1						5		NW_020356164
25								6		
26	2		5		1		1			
27				2						
28										
29			2							
30		1				1				
31		2						2		
32	1				1				1	
33			3							
34				1		1				
35										
36										
37										
38										
39					1					
40									2	

OTA-S	<i>Setaria italica (cromosomas)</i>								
GL	Scaffold_1	Scaffold_2	Scaffold_3	Scaffold_4	Scaffold_5	Scaffold_6	Scaffold_7	Scaffold_8	Scaffold_9
1				1	1				12
2						1	1		8
3		4	3		1		15		1
4	1	1		1				3	43
5	2	10	1	11	1		3		
6	11		1	1	1	1			4
7	1	13	2	1	1				
8	2	1	18	1	1		1		1
9	1	2				15	1		2
10		1	1		15				1
11	8	1		4					5
12		10		5	2		2		2
13		14	1	3		2		2	4
14		1					1		16
15		2	2	2	11			1	1
16	2				4	1		9	1
17	9					3			2
18					8				1
19		1	1		12				
20	1	1			1		8		1
21		10			2				
22		1			9				
23	1				5				1
24			1				2	3	
25								5	
26	2		4		1				
27				2	1				
28		2							
29			3						
30						1			
31		3							1
32	2				1				
33			4						
34						1			
35									
36									
37									
38									
39					1				1
40									2

OTA-S	<i>Zea mays</i> (cromosomas)									
GL	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	7				7		1	1		
2	2				1				4	
3	3	7			1				2	4
4	17	2	2	4	2	1	1	1	10	1
5		6		1	1	1	4	5	11	1
6	2	1		1	8	3	2	1	1	
7	1	2		2		1	14		1	
8						9	1	4	1	1
9	12	1		2			2		1	
10	1	2	7		1			4	1	
11	1		3	3	13					1
12	1	3			2		7		3	1
13		3		2	2	2	6	1	2	1
14	9		1		1		4		6	
15	1		4		1			6	2	
16				6		1		4	1	
17	1	2			7		2			
18	1		4					5		
19			8					2		
20		5			2		1	1		4
21		3				1	5		1	
22			7		2			1	1	
23	2			3				1		
24				1		1	1			3
25		3		1						
26			1		3	3		1		
27		1							3	
28										
29						3				
30										2
31		1		1			1			
32		1	1	1			1		1	
33	3							1		
34		1	1							
35										
36										
37										
38										
39										
40									1	

IX - Publicaciones generadas durante el desarrollo de la tesis

Publicaciones en revistas científicas

1- **Meier M**, Zappacosta D, Selva JP, Pessino S, Echenique V (2011). Different methods for assessing the reproductive mode of weeping lovegrass plants, *Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees. Australian Journal of Botany 59:253–261.

2- Zappacosta D, **Meier M**, Carrera A, Pacheco G, Cardone S, Selva JP, Echenique V (2011). Molecular markers to study the variability within the *Eragrostis curvula* complex. Phytom 80:211-220

3- Selva JP, Pessino S, **Meier M**, Cervigni G, Zappacosta D, Echenique V (2012). Identification of transcripts controlled by ploidy and/or diplosporous apomixis in *Eragrostis curvula*. American Journal of Plant Sciences 3:403-416.

4- Luciani G, Sobanski M, **Meier M**, Polci P, Miranda R, Echenique V (2012). Weeping lovegrass yield and nutritional quality provides an alternative to beef cattle feeding in semiarid environments of Argentina. Crop Science 52:1955–1965.

5- Zappacosta D, Ochogavía A, Rodrigo JM, Romero J, **Meier M**, Polci P, Garbus I, Pessino S, Echenique V (2014) Increased apomixis expression concurrent with genetic and epigenetic variation in a newly synthesized *Eragrostis curvula* polyploid. Scientific reports, 4, 4423.

Publicaciones en Revistas de Divulgación:

1- Echenique V, Pessino S, Díaz M, Selva JP, Luciani G, Zappacosta D, Cervigni G, **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(2):147-164.

2- **Meier M**, Zappacosta D, Selva JP, Cervigni G, Echenique V. La apomixis, su estudio y sus posibles usos. 2008. AgroUNS, año V (9), pag. 10-13.

3- Echenique V, Pessino SC, **Meier M**, Selva JP, Ochogavia A, Zappacosta D, Romero JR, Rodrigo JM, Garbus I, Terenti C, Diaz A (2012) Apomixis en *Eragrostis curvula*. Ciencias Agronómicas 20:77.

4- Zappacosta D, **Meier M**, Terenti C, Rodrigo JM, Echenique V (2012) Poblaciones de mapeo en pasto llorón - éxitos y fracasos. Ciencias Agronómicas 20:81.

Capítulos de Libros:

1- Spangenberg G, **Meier M**, Echenique V (2010). Mejoramiento de Plantas Forrajeras en la Era Genómica. En: Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. Ed. V. Echenique, C. Rubinstein y L. Moroginski. Ediciones INTA, Buenos Aires, Argentina, pag. 389-402.

2- Echenique V, Selva JP, **Meier M**, Roncallo P, Schrauf G (2010). Genómica. En: Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. Ed. V. Echenique, C. Rubinstein y L. Moroginski. Ediciones INTA, Buenos Aires, Argentina, pag. 100-120.

Presentaciones a congresos

Internacionales

1- **Meier M**, Zappacosta D, Echenique V. Evaluación del test de deposición de calosa para el fenotipado de una población de mapeo para la región de la diplosporía en pasto llorón. REDBIO 2007, VI Encuentro Latinoamericano y del Caribe de Biotecnología Agropecuaria, Viña del Mar, Chile, 22 al 26 de Octubre de 2007.

2- Zappacosta D, Carrera A, Cardone S, Pacheco G, Cervigni G, Paniago N, **Meier M**, Piñuel L, Mitilli M, Echenique V. “Diferenciación de genotipos de pasto llorón (*Eragrostis curvula*) por marcadores RAPDs, AFLP y microsatélites”. REDBIO 2007, VI Encuentro Latinoamericano y del Caribe de Biotecnología Agropecuaria, Viña del Mar, Chile, 22 al 26 de Octubre de 2007.

3- Cervigni G, Selva J, Mecchia M, Ochogavía A, Paniago N, Cardone S, Polci P, Felitti S, Martelotto L, Díaz M, Zappacosta D, **Meier M**, Voigt P, Spangenberg G, Pessino S, Echenique V. “Genetic, epigenetic and transcriptional changes associated to ploidy and

diplospory in *Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees”. W16: Apomixis. Plant and Animal Genomes XVI Conference, 12-16 de enero de 2008, San Diego, USA.

4- Selva JP, Cervigni G, Ochogavía A, Zappacosta D, **Meier M**, Pessino S, Echenique V. “Global analysis of the genome, transcriptome and epigenome in the diplosporous grass *Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees.” XXth International Congress on Sexual Plant Reproduction, Brasilia, Brasil, 4 al 8 de Agosto de 2008.

5- Luciani G, Díaz M, **Meier M**, Selva JP, Zappacosta D, Sobanski M, Cervigni G, Miranda R, Echenique V. “Preliminary Studies on Forage Quality from Cultivars of Weeping Lovegrass [*Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees] Adapted to Marginal Regions of Argentina”. 2009 Annual Meetings Information, Pittsburgh, PA, USA, 1 al 5 de Noviembre, 2009.

6- **Meier M**, Zappacosta D, Sartor M, Selva JP, Pessino S, Echenique V. “Different techniques for assessing the reproductive mode of weeping lovegrass plants, *Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees”. The 6th International Symposium on the Molecular Breeding of Forage and Turf - MBFT 2010, Buenos Aires, Argentina, 15 al 19 de Marzo, 2010.

7- Selva JP, Pessino S, **Meier M**, Zappacosta D, Echenique V. “Identification of transcripts controlled by ploidy and/or diplosporous apomixis in *Eragrostis curvula*”. The 6th International Symposium on the Molecular Breeding of Forage and Turf - MBFT 2010, Buenos Aires, Argentina, 15 al 19 de Marzo, 2010.

8- Rodrigo JM, Ochogavía A, **Meier M**, Zappacosta D, Pessino S, Echenique V. “Effects of stress and genomic plasticity on the reproductive mode of facultative apomictic plants of weeping lovegrass [*Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees]”. The 6th International Symposium on the Molecular Breeding of Forage and Turf - MBFT 2010, Buenos Aires, Argentina, 15 al 19 de Marzo, 2010.

9- Luciani G, Sobanski M, **Meier M**, Miranda R, Echenique V. “Nutritional Quality from Weeping Lovegrass [*Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees] Adapted to Marginal Regions of Argentina”. The 6th International Symposium on the Molecular Breeding of Forage and Turf - MBFT 2010, Buenos Aires, Argentina, 15 al 19 de Marzo, 2010.

10- **Meier M**, Rodrigo JM, Zappacosta D, Echenique V. “Efecto mentor en pasto llorón, *Eragrostis curvula*”. XV Congreso Latinoamericano de Genética. 28 - 31 de octubre de 2012. Rosario, Santa Fe, Argentina.

Nacionales

1- Echenique V, Zappacosta D, Cervigni G, Selva JP, Ochogavía A, **Meier M**, Paniego N, Pessino S. “Cambios genéticos, epigenético y transcripcionales asociados a la diplosporía en *Eragrostis curvula*. XXXVII Congreso Argentino de Genética. Tandil, Buenos Aires. 21-24 Septiembre de 2008.

2- Rodrigo JM, **Meier M**, Zappacosta D, Echenique V. “Expresión de la apomixis bajo estrés hídrico en pasto llorón”. XL Congreso Argentino de Genética y I Jornadas Regionales SAG-NEA. 18-21 de septiembre 2011. Corrientes, Corrientes.

X- Financiamiento

El financiamiento de este trabajo de tesis fue por los proyectos listados a continuación, cuya titular es la Dra. Viviana Echenique:

- PIP 112 – 200801 - 01517: Identificación y mapeo de genes relacionados con la diplosporía en *Eragrostis curvula*. IR: V. Echenique (2009 – 2011).

- H2020-MSCA-RISE-2014. ID 645674. Plant Reproduction for Crop Improvement (PROCROP). Research and Innovation Staff Exchange (RISE) H2020-MSCA-RISE-2014. Proyecto de Cooperación Internacional Financiado por la UE. IR: Emidio Albertini, UNIPG, Perugia, Italia. Nodos Participantes: Italia (UNIPG, UNIMIL, Polo GGB), Francia (IRD), Argentina (UNR/ICAR, CERZOS). Nodo CERZOS: IR Viviana Echenique.

- PICT Raíces 2014 - 1243. Secuenciación del genoma de *Eragrostis curvula* a fin de identificar genes relacionados con el modo reproductivo y calidad del forraje. IR: Dra. Viviana Echenique (CERZOS) y Dr. Mario Cáccamo (TGAC, UK).

PGI (2017- 2020) Universidad Nacional del Sur - Secuenciación del genoma de *Eragrostis curvula* a fin de identificar genes relacionados con el modo reproductivo y calidad del forraje.