



**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO**

**ESTUDIOS CITOGENÉTICOS EN CITOTIPOS APOMÍCTICOS Y SEXUALES DE
PASPALUM NOTATUM Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE SECUENCIAS
ASOCIADAS A LA AOSPORÍA**

LIC. MARICEL PODIO

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR EN CIENCIAS AGRARIAS

**DIRECTOR
DR. JUAN PABLO A. ORTIZ**

2012

**ESTUDIOS CITOGENÉTICOS EN CITOTIPOS APOMÍCTICOS Y SEXUALES DE
PASPALUM NOTATUM Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE SECUENCIAS
ASOCIADAS A LA AOSPORÍA**

Maricel Podio

Licenciada en Biotecnología - UNR

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido previamente presentada para la obtención de otro título en ésta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario (UNR), y en el Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE-CONICET) Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Nordeste (UNNE), durante el período comprendido entre el 1 de Abril de 2008 y 30 de Noviembre de 2012, bajo la dirección del Dr. Juan Pablo A. Ortiz.

Lic. Maricel Podio
Doctorando

Dr. Juan Pablo A. Ortiz
Director

Defendida el díade de 2013.

Agradecimientos

Quiero agradecer a mi director, el Dr. Juan Pablo Ortiz por darme la oportunidad para poder realizar este trabajo de Tesis. Por su apoyo permanente, por la disponibilidad para discutir los resultados y su positivismo por sobre todas las cosas.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por haber posibilitado realizar mi estudio de posgrado. Y a la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Rosario (FCA-UNR) por permitirme disponer de sus instalaciones.

Quisiera agradecer también a la Dra. Silvina Pessino por estar siempre dispuesta a discutir cada resultado obtenido. Al Dr. Camilo Quarín por todo el apoyo, por el tiempo dedicado y su disposición para analizar los temas de trabajo. Al Dr. Diego Hojsgaard por ayudarme a realizar los preparados de meiosis. Al Dr. Guillermo Seijo por enseñarme los experimentos de hibridación *in situ*, por brindarme un espacio en su laboratorio y por el tiempo dedicado a discutir cada experimento. A todo su grupo de trabajo por recibirme siempre como una más. A la Dra. Ana María González por su colaboración en la preparación del material vegetal para la hibridación *in situ* de tejido. Al Dr. Francisco Espinoza y todos los integrantes de su grupo de trabajo por todo el apoyo y el aguante durante mis estadías en Corrientes. Muy especialmente a la Dra. Marita Sartor, que me ayudó y apoyó durante esta tesis.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Biología Molecular que me aguantaron durante todos estos años: Pía, Mica, Sil, Lucas y especialmente a Juli, Lore y Lu por su amistad y apoyo incondicional siempre.

A mis amigas de la facu y de la vida: Vale, Nati, Bren, Dolo, Letu, Nati y Mariana por acompañarme siempre.

Y por último a mi familia con la que se que siempre puedo contar.

A todos, MUCHAS GRACIAS.

Durante el desarrollo de esta Tesis se han realizado las siguientes contribuciones científicas:

Artículos publicados en revistas:

- Podio, M, Siena, LA, Hosjgaard, D, Stein, J, Quarin, CL, Ortiz, JPA. (2012). Evaluation of meiotic abnormalities and pollen viability in aposporous and sexual tetraploid *Paspalum notatum* (Poaceae). *Plant Systematics and Evolution* 298:1625–1633.

- Podio, M, Rodriguez, MP, Felitti, SA, Stein, J, Martinez, EJ, Siena, LA, Quarin, CL, Pessino, SC, Ortiz, JPA (2012). Sequence characterization, *in silico* mapping and cytosine methylation analysis of markers linked to apospory in *Paspalum notatum*. *Genetics and Molecular Biology* 35 (4): 827-837

- Ochogavía AC, Seijo, JG, González AM, Podio M, Duarte Silveira, E, Machado Lacerda AL, Tavares de Campos Carneiro V, Ortiz JPA, Pessino SC (2011). Characterization of retrotransposon sequences expressed in inflorescences of apomictic and sexual *Paspalum notatum* plants. *Sexual Plant Reproduction* 24 (3): 231-246.

- Felitti SA, Seijo JG, González AM, Podio M, Laspina NV, Siena LA, Ortiz JPA, Pessino SC (2011). Expression of lorelei-like genes in aposporous and sexual *Paspalum notatum* plants. *Plant Mol Biol* 77 (4-5): 337-354.

- Podio M, Felitti, SA, Siena, LA, Delgado, L, Seijo, JG, González, AM, Pessino, SC and Ortiz, JPA (2012) Expression of Somatic Embryogenesis Receptor Kinase-Like genes in sexual and apomictic *Paspalum notatum* genotypes. Enviado a publicación.

Congresos internacionales:

- Podio M, Felitti SA, Siena LA y Ortiz JPA (2010). Cloning a somatic embryogenesis like-kinase (SERK) gene of *Paspalum notatum*. The 6th International Symposium on the Molecular Breeding of Forage and Turf. Buenos Aires. Argentina.

- Felitti SA, Seijo JG, Gonzalez AM, Podio M, Laspina NV, Ortiz JPA y Pessino SC (2010). A GPI-anchored protein down regulated in inflorescences of aposporous *Paspalum*

notatum is the ortholog to the *Arabidopsis thaliana* LORELEI genes. The 6th International Symposium on the Molecular Breeding of Forage and Turf. Buenos Aires. Argentina

Congresos Nacionales:

- Felitti SA, Siena LA, Stein J, Rodríguez MP, Podio M y Ortiz JPA (2008). Identificación de genes candidatos de la apomixis en razas tetraploides de *Paspalum notatum*. X Congreso y XXVIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Fisiología Vegetal (SAFV). Rosario. Argentina.

- Felitti SA; Podio M, Rodríguez MP, Siena LA y Ortiz JPA (2009). Clonado de genes asociados al desarrollo del saco embrionario en *Paspalum notatum* por estrategias de caminata cromosomal. RedBio Argentina. Rosario. Argentina.

- Ochogavía AC, Seijo JG, Gonzalez AM, Cervigni G, Podio M, Laspina N, Duarte Silveira E, Machado Lacerda AL, Carneiro VTC, Pessino SC. (2009). Caracterización de transcritos no codificantes asociados a la expresión de la apomixis en *Paspalum notatum*. RedBio. Rosario. Argentina.

- Podio M, Hojsgaard D, Quarín CL, Ortiz JPA (2009). Alteraciones meióticas en una población F₁ tetraploide de *Paspalum notatum* segregante por el modo de reproducción. XXXVIII Reunión de la Sociedad Argentina de Genética (SAG). San Miguel de Tucumán. Argentina.

- Podio M, Felitti SA, Seijo JG, Gonzalez AM, Siena LA y Ortiz JPA (2011). Aislamiento y caracterización funcional del gen *SERK* (somatic embryogenesis receptor like-kinase) de *Paspalum notatum*. XXXVIII Reunión de la Sociedad Argentina de Genética (SAG). Corrientes. Argentina.

ESTUDIOS CITOGENÉTICOS EN CITOTIPOS APOMÍCTICOS Y SEXUALES DE *PASPALUM NOTATUM* Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE SECUENCIAS ASOCIADAS A LA AOSPORÍA

INDICE

Abreviaturas, símbolos y anglicismos	VI
Resumen	X
Abstract	XII
Introducción General	1
<i>Paspalum notatum</i>	1
Apomixis	3
Definición del término apomixis.....	3
La manipulación de la apomixis y su interés para la agricultura.....	5
Estudios genéticos y moleculares de la apomixis gametofítica en gramíneas	8
Estudios de la expresión de genes asociados a la apomixis	10
Referencias	13
Objetivo general del trabajo de tesis	22
Capítulo I: Estudios citogenéticos en citotipos apomícticos y sexuales de <i>P. notatum</i>	23
Resumen	23
Introducción.....	24
Hipótesis.....	27
Objetivos específicos	27
Materiales y métodos	28
Material vegetal	28
Análisis citogenético y viabilidad del polen	29
Hibridación <i>in situ</i> (FISH)	30
Resultados	32
Análisis de las configuraciones meióticas en anafase I y la viabilidad del polen en plantas tetraploides sexuales y apomícticas de <i>P. notatum</i>	32
Análisis de híbridos F ₁ derivados del cruzamiento entre Q4188 x Q4117	35
Análisis de Hibridación <i>in situ</i> (FISH)	37
Discusión.....	38
Referencias	43
Capítulo II: Aislamiento y estudios de expresión de secuencias homólogas a genes asociados a la aposporía de <i>P. notatum</i>	47

Resumen	47
Introducción.....	49
Hipótesis.....	53
Objetivos	54
Materiales y métodos	54
Material vegetal.....	54
Aislamiento de ADN genómico.....	54
Aislamiento de genes homólogos a partir de Q4117 y Q4188.....	55
Extensión de secuencias por caminata cromosomal	56
Análisis de similitud de secuencias.....	57
Análisis de hibridación Southern.....	57
Extracción de ARN y síntesis de ADNc.....	59
Análisis de expresión por PCR cuantitativo en tiempo real (qRT-PCR).....	59
Experimentos de hibridación <i>in situ</i> de tejidos	61
Mapeo <i>in silico</i> de secuencias correspondientes a genes <i>SERK</i> y <i>EXS</i>	62
Mapeo genético de <i>PnSERKs</i> y <i>PnEXS</i> en <i>P. notatum</i>	63
Experimentos de CAPS.....	63
Experimentos de SSCP.....	63
Experimentos de RFLP	64
Resultados	65
Clonado y estudios de expresión de genes homologos a <i>SERK</i>	65
Clonado de secuencias parciales de <i>PnSERK</i> genómicas.....	65
Análisis de similitud de secuencias de <i>PnSERKs</i> :.....	67
Análisis de dominios proteicos estructurales conservados.....	68
Estudios de filogenia de <i>PnSERKs</i>	69
Análisis del número de copias de genes <i>PnSERK</i>	73
Análisis cuantitativos de expresión de genes <i>SERK</i> en tejido floral	74
Estudios de hibridación <i>in situ</i> de tejidos de genes <i>PnSERK</i>	76
Localización en <i>in silico</i> de las secuencias de <i>PnSERKs</i> sobre el genoma de arroz y maíz.....	81
Localización de los genes <i>PnSERK</i> sobre el mapa genético de <i>P. notatum</i>	86
Clonado y estudios de expresión del gen <i>EXS</i>	86
Clonado de una secuencia parcial del <i>PnEXS</i> genómico.....	86
Análisis de similitud de secuencias de <i>PnEXS</i>	87
Estudios de filogenia de secuencias del gen <i>EXS</i> de <i>P. notatum</i>	88
Análisis de número de copias de <i>PnEXS</i>	92
Análisis cuantitativo de la expresión de <i>PnEXS</i> en <i>tejido floral</i>	93
Estudios de hibridación <i>in situ</i> de tejido	95
Localización <i>in silico</i> de la secuencia de <i>PnEXS</i> sobre el genoma de arroz y maíz.....	97

Localización de la secuencia <i>EXS</i> en el mapa genético de <i>P. notatum</i>	100
Experimentos de CAPS.....	100
Experimentos de SSCP.....	101
Experimentos de RFLP	103
Discusión.....	104
Clonado y estudios de expresión de genes homologos a <i>SERK</i>	104
Clonado y estudios de expresión del gen <i>PnEXS</i>	109
Referencias	111
Capítulo III: Mapeo comparativo y localización de secuencias relacionadas a la aposporía en <i>Paspalum notatum</i>	121
III.1 Analisis de mapeo <i>in silico</i> de secuencias específicas de la aposporía en <i>P. notatum</i> ..	121
Resumen	121
Introducción.....	122
Hipótesis.....	126
Objetivo	127
Materiales y métodos	127
Marcadores moleculares ligados a aposporía.....	127
Mapeo <i>in silico</i> de marcadores ligados a la aposporía en <i>P. notatum</i>	128
Análisis de similitud de secuencias	129
Resultados	129
Análisis de similitud de secuencias	129
Mapeo <i>in silico</i> de marcadores ligados a la aposporía	130
Discusión.....	133
Referencias	136
III.2 Localización de secuencias expresadas diferencialmente entre plantas apomícticas y sexuales de <i>P. notatum</i>	141
Resumen	141
Hipótesis.....	141
Objetivo	142
Introducción.....	142
Materiales y métodos	143
Mapeo de transcritos relacionados a la aposporía.....	143
Desarrollo de SCARs	143
Análisis de ligamiento.....	145
Resultados	145
Mapeo de transcritos relacionados con la aposporía.....	145
Discusión.....	147
Referencias	148
Conclusiones generales	151

Abreviaturas, símbolos y anglicismos

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ácido desoxirribonucleico copia.

AFLP: "Amplified Fragmen Leght Polimorphism". Polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados

ARN: ácido ribonucleico.

ARNasa: ribonucleasa

ARNm: ácido ribonucleico mensajero.

BAC: cromosoma artificial de bacterias.

BLAST: "Basic Local Alignment Search Tool". Herramienta de búsqueda de alineamientos de secuencias básicos.

BrEt: bromuro de etidio

BSA: albúmina sérica bovina

Buffer: solución reguladora, amortiguadora o tampón, que permite controlar la concentración libre de un determinado componente a pesar de un cambio en su concentración total (por ejemplo, pH).

CAPS: "Cleaved Amplified Polymorphic Sequence". Secuencia amplificada y clivada polimórfica.

cM: centiMorgan, unidad de mapeo que expresa la distancia relativa entre los marcadores o genes sobre un cromosoma.

CSPD: disodio 3 - (4 - metoxispiro{1,2 - dioxetano - 3,2'- (5'- cloro) triciclo[3.3.1.1.3,7] decano} - 4 - y 1) fenil fosfato.

CTAB: bromuro de cetiltrimetil amonio

dATP: desoxiadenosina trifosfato.

dCTP: desoxicitosina trifosfato.

dGTP: desoxiguanina trifosfato.

Dig-dUTP: desoxiuridin trifosfato-digoxigenina.

dNTPs: desoxinucleótidos trifosfato.

dTTP: desoxitimina trifosfato.

e-value: Valor esperado. El número esperado de alineamientos en caso de interrogar a la base de datos con una secuencia aleatoria. El menor valor de e-value es el más significativo.

EDTA: ácido etilendiamino-tetracético.

EST: "Expressed Sequence Tag". Etiquetas de secuencias expresadas.

F₁: primera generación en un cruzamiento.

FISH: Hibridación *in situ* fluorescente. Es una metodología que utiliza sondas de ADN marcadas con un fluoróforo para detectar secuencias de ADN directamente sobre los cromosomas. Posee un poder de resolución mayor que las técnicas de citogenética clásica

gr: gramos.

gr/l: gramos por litro.

H₂O_d: agua destilada.

HCl: ácido clorhídrico.

KAc: acetato de potasio.

Kit: equipo comercial.

M: molar.

mA: miliamperios.

Mbp: mega pares de base (10^6 pb).

mg: miligramo (10^{-3} g).

mg/l: miligramos por litro.

MgAc: acetato de magnesio.

MgCl₂: cloruro de magnesio.

ml: mililitro (10^{-3} l).

mM: milimolar (10^{-3} M).

N: normal.

n: número cromosómico haploide de una especie.

2n : número cromosómico diploide de una especie.

NaCl: cloruro de sodio.

NaOH: hidróxido de sodio.

ng: nanogramos (10^{-9} g).

NH₄OAc: acetato de amonio.

nm: nanómetro (10^{-9} m).

°C: grados centígrados.

pb: pares de bases.

PCR: reacción en cadena de la ADN polimerasa.

pg: picogramo (10^{-12} g).

p-value: probabilidad asociada. Valor de probabilidad asociada a un análisis estadístico.

QTLs: loci de características cuantitativas.

RAPD: “Random Amplified Polymorphic DNA”. Polimorfismos por amplificación al azar del ADN.

RFLP: “Restriction Fragment Length Polymorphism”. Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción.

rpm: revoluciones por minuto.

SCAR: “Sequence Characterized Amplified Regions”: amplificación de regiones de secuencia caracterizadas).

SDS: sulfato de dodecil sódico.

SSC: cloruro de sodio-citrato de sodio.

SSR: “Simple sequence repeats” repeticiones de secuencias simples (microsatélites).

T: temperatura.

TAE: Tris-ácido acético-EDTA.

Taq polimerasa: enzima polimerizante del ADN obtenida de *Thermus aquaticus*.

TBE: Tris-ácido bórico-EDTA.

TE: Tris-EDTA.

Tris: N-Tris-(hidroximetil)-aminoetano.

U: unidad de actividad enzimática.

UV: ultravioleta.

V: voltios.

W: watts.

x: número cromosómico básico de una especie.

µg: microgramos (10^{-6} g).

µl: microlitro (10^{-6} l).

χ^2 : prueba de bondad de ajuste Chi cuadrado.

Resumen

ESTUDIOS CITOGENÉTICOS EN CITOTIPOS APOMÍCTICOS Y SEXUALES DE *PASPALUM NOTATUM* Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE SECUENCIAS ASOCIADAS A LA AOSPORÍA

Paspalum notatum Flüggé es una gramínea rizomatosa perenne ampliamente difundida en las regiones tropicales y subtropicales de Sudamérica. Las razas tetraploides naturales de esta especie se reproducen casi exclusivamente por apomixis de tipo apospórica. La aposporía (un componente de la apomixis apospórica) en *P. notatum* es controlada por un locus único (denominado ACL) que presenta segregación distorsionada y supresión de la recombinación. La presencia de inversiones u otras alteraciones cromosómicas fueron propuestas para explicar el tipo de herencia observado para la aposporía. La determinación de la estructura cromosómica que contiene al ACL puede aportar conocimiento sobre la transmisión del carácter a la progenie y contribuir a la identificación de secuencias codificantes asociadas con su expresión. Por otro lado, varios marcadores moleculares completamente ligados a la aposporía y transcriptos de ARNm diferencialmente expresados en inflorescencias de plantas apomícticas y sexuales fueron identificados en *P. notatum* y otras especies de gramíneas. Sin embargo, hasta el momento solo unos pocos de ellos han sido estudiados en detalle a nivel genético y funcional.

El objetivo general de este trabajo de Tesis fue profundizar los estudios tendientes a determinar las características citogenéticas y moleculares del locus responsable de la aposporía en *P. notatum* y caracterizar genes cuya expresión fue asociadas a la apomixis en gramíneas así como secuencias genómicas localizadas específicamente en el locus de la aposporía.

En el Capítulo I se describen los estudios citogenéticos realizados en meiocitos de plantas apomícticas y sexuales de *P. notatum*. Como material vegetal fueron incluidas cinco accesiones apomícticas naturales, tres individuos sexuales obtenidos experimentalmente y 16 híbridos F₁ clasificados por el modo de reproducción. Las observaciones citogenéticas revelaron que tanto las plantas apomícticas como las sexuales presentaron algunas anomalías meióticas como, cromosomas rezagados, puentes de cromatina y micronúcleos. Sin embargo, un análisis cuantitativo de éstas reveló diferencias significativas entre las accesiones apomícticas y sexuales. Asimismo, el análisis de los híbridos confirmó las diferencias observadas en los progenitores con diferente modo de reproducción. Un estudio de FISH reveló que el ACL se encuentra en hemici-gosis, muy próximo a regiones ricas en heterocromatina. Los resultados presentados en este Capítulo demostraron que las plantas apomícticas presentan un mayor número de anomalías meióticas en la anafase I que las sexuales y que estas anomalías se transmiten a la descendencia asociadas con el modo de reproducción. Asimismo fue posible determinar que el locus responsable de la aposporía se transmite solo a uno de los productos de la meiosis I. Esta estructura cromosómica podría explicar la distorsión de la segregación y la supresión de la recombinación asociada a la transmisión de la apomixis en la especie.

En el Capítulo II se describe la caracterización molecular de los genes *SERK* y *EXS* en *P. notatum*. El gen *SERK* (*somatic embryogenesis receptor like kinase*) fue asociado a la apomixis en *Poa pratensis*. A partir del apilamiento de secuencias conocidas fue posible aislar dos secuencias genómicas de *P. notatum* con alta similitud a genes *SERK*: *PnSERK1* (1750 pb) y *PnSERK2* (2050pb). Al menos 3 copias de *PnSERK* están presentes en el genoma de *P. notatum*. Estudios de expresión por PCR en tiempo real (qRT-PCR) en diferentes estadios del desarrollo reproductivo del genotipo Q4188 (sexual) y Q4117 (apomítico) mostraron que *PnSERK2* se expresa a niveles superiores de *PnSERK1* y que muestra diferencias significativas en los estadios de premeiosis, postmeiosis y anthesis entre ambos genotipos. Experimentos de hibridación *in situ* de tejidos, mostraron una expresión contrastante entre el genotipo sexual y el apomítico. Los resultados obtenidos indican que *PnSERK2* presenta una expresión diferencial entre plantas apomíticas y sexuales y podría formar parte de la cascada de genes asociados a la expresión de la apomixis en *P. notatum*. Se analizó también el gen *EXS*. Una secuencia codificante para el dominio *EXS* fue identificada en un clon de BAC conteniendo marcadores moleculares completamente ligados a la aposporía en *P. simplex*. Mediante experimentos similares a los descritos anteriormente se aisló un fragmento de 2298 pb con alta similitud al gen *EXS* de arroz y maíz de los genotipos Q4188 y Q4117. El análisis del número de copias reveló que existen entre 2 y 4 secuencias homólogas en el genoma de *P. notatum*. Estudios de expresión por qRT-PCR no mostraron diferencias significativas entre los genotipos sexuales y apomíticos en distintos estadios del desarrollo reproductivo. Sin embargo, estudios de hibridación *in situ* de tejido mostraron expresión de *EXS* en tejido ovárico del genotipo sexual mientras que solo se observó expresión en células que rodean a los sacos embrionarios en el genotipo apomítico. El análisis de mapeo *in silico*, indicó que *PnEXS* se localiza en regiones que ya han sido reportadas como asociadas a la aposporía. Estos resultados indican que *PnEXS* podría estar diferencialmente regulado en plantas apomíticas y sexuales.

En el Capítulo III se presentan los estudios realizados en la caracterización de secuencias específicas del ACL en *P. notatum* y el mapeo de transcritos de ARNm asociados con el modo de reproducción. Varias de las secuencias correspondientes al ACL mostraron similitud con elementos repetitivos, proteínas hipotéticas, proteínas ribosomales y dominios codificantes. El mapeo de seis transcritos expresados diferencialmente entre plantas apomíticas y sexuales mostró que N54 resultó ligado en repulsión al ACL.

Los resultados obtenidos en esta Tesis permitieron detectar la presencia de un rearrreglo cromosomal que se trasmite a la progenie asociado a la aposporía. Además, se logró localizar el ACL en un único cromosoma de *P. notatum* y determinar su condición hemicigota. Paralelamente, se pudo demostrar que *PnSERK2* se encuentra funcionalmente asociado a la aposporía y que *PnEXS* estaría regulado diferencialmente en plantas apomíticas y sexuales. El análisis de marcadores 100% ligados al carácter puso en evidencia la presencia de secuencias codificantes que podrían estar asociadas a la aposporía.

Abstract

CYTOGENETIC ANALYSIS IN APOMICTIC AND SEXUAL *PASPALUM NOTATUM* AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF SEQUENCES ASSOCIATED WITH AOSPORRY

Paspalum notatum Flüggé is a perennial rhizomatous grass species distributed in tropical and subtropical regions of South America. Natural tetraploid cytotypes reproduce by obligated aposporous apomixis. Apospory (a component of apomictic reproduction) in *P. notatum* is controlled by a single locus (ACL) with distorted segregation ratio and suppression of recombination. The presence of an inversion or other type of chromosomal alteration was proposed to explain the observed segregation fashion of the trait. Disclosing the chromosomal structure of the ACL can contribute to the understanding of the transmission of apospory and the identification of sequences associated with its expression. On the other hand, several molecular markers fully linked to the ACL as well as mRNA transcripts differentially expressed in inflorescences of apomictic and sexual plants were identified in *P. notatum* and other species of grasses. However, only a few of them have been studied in detail at the genetic and functional levels so far.

The objective of this work was to determine the cytogenetic characteristic of apomictic and sexual tetraploid *P. notatum* and to characterize genes whose expression was associated with apomixis in grasses, as well as, a group of genomic sequences mapping at ACL in the species.

Chapter I describes the studies carried out in meiocytes of apomictic and sexual plants of *P. notatum*. Five natural apomictic accessions, three completely sexual experimentally-obtained tetraploid individuals and 16 F₁ hybrids classified by the mode of reproduction were used as plant material. The cytogenetic observations revealed that both sexual and apomictic plants showed meiotic abnormalities as, lagging chromosomes, chromatin bridges and micronuclei. However, a quantitative analysis of these configurations at anaphase I revealed significant differences between apomictic and sexual individuals. The analysis of hybrids confirmed the differences between accessions with different reproductive mode. FISH analysis showed that the ACL is hemizygous and it is placed close to a region rich in heterochromatin. These results indicated that apomictic plants showed a greater number of meiotic abnormalities in anaphase I than sexual ones and that abnormalities were transmitted to the offspring associated with the mode of reproduction. It was also possible to determine that the ACL is transmitted only to one of the products of meiosis I. This chromosomal structure could

explain the segregation distortion and the suppression of recombination associated with transmission of apospory in the species.

Chapter II describes the molecular characterization of genes *SERK* and *EXS* in *P. notatum*. The *SERK* (*somatic embryogenesis receptor like kinase*) gene was associated with apomixis in *Poa pratensis*. Two sequence *PnSERK1* (1750 BP) and *PnSERK2* (2050pb) were isolated. At least 3 copies of *PnSERK* were present in the *P. notatum*. Expression analysis by real time PCR (qRT-PCR) at different stages of the reproductive development of Q4188 (sexual) and Q4117 (apomictic) genotypes showed that *PnSERK2* is expressed at higher levels than *PnSERK1* and showed significant differences between genotypes at premeiosis, postmeiosis and anthesis. *In situ* hybridization with *PnSERK2*, showed a contrasting expression between the apomictic and sexual plants. Results presented in this work indicate that *PnSERK2* participate in the cascade of genes associated with the expression of apomixis in *P. notatum*. On the other hand, a coding sequence showing an EXS domain was identified in a BAC clone containing molecular markers completely linked apospory in *P. simplex*. A fragment of 2298 pb highly similar to the EXS domain of rice and maize was isolated from genotypes Q4188 and Q4117. Copy number analysis revealed that there are between 2 and 4 homologous sequences in the *P. notatum* genome. Expression analysis by qRT-PCR at different stages of the reproductive development showed no significant differences among genotypes. However, *in situ* tissue hybridization showed expression of *EXS* in ovaries of the sexual genotype, while *EXS* was expressed only in the surrounding cells of the embryo sac in the apomictic genotype. *In silico* mapping, indicated that *PnEXS* is located in regions that have associated previously with apospory. These results indicate that *EXS* could be under a different expression control in sexual and apomictic plants.

Chapter III presents studies focused on the characterization of specific sequences mapping at the ACL in *P. notatum* and the localization of mRNA transcripts associated with the mode of reproduction. Several sequences of the ACL showed similarity with repetitive elements, hypothetical proteins, ribosomal proteins and coding domains. Mapping assays of six transcripts differentially expressed between apomictic and sexual plants showed that clone N54 was linked in repulsion to the ACL. This can be a good candidate for further analysis.

The results presented in this Thesis showed the presence of a chromosomal rearrangement associated with apospory that it is transmitted to the progeny. In addition, it was determined that ACL of *P. notatum* is placed in a hemizygous region. Analysis of *PnSERK2* and *PnEXS* indicated that both genes are associated with apomixis. Moreover, analysis of markers 100% linked to the character revealed the presence of coding sequence in this region.

ESTUDIOS CITOGENÉTICOS EN CITOTIPOS APOMÍCTICOS Y SEXUALES DE *PASPALUM NOTATUM* Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE SECUENCIAS ASOCIADAS A LA AOSPORÍA

INTRODUCCIÓN GENERAL

Paspalum notatum

Paspalum es un género perteneciente a la familia de las gramíneas (subfamilia *Panicoidae*, tribu *Panicaceae*) que comprende alrededor de 330 especies distribuidas principalmente en las regiones tropicales y subtropicales de América (Zuloaga y Morrone, 2005). Varios integrantes del género constituyen importantes recursos forrajeros para las regiones tropicales y subtropicales de América, donde se encuentran ampliamente distribuidos, siendo particularmente abundantes en Brasil, este de Bolivia, Paraguay y noreste de Argentina (Burton 1974). *P. notatum* Flüge, de nombre vulgar pasto horqueta o “bahiagrass” (en inglés), es una especie rizomatosa perenne distribuida desde México a Argentina que presenta varios niveles de ploidía y un sistema reproductivo complejo conformado por citotipos diploides autoincompatibles de reproducción sexual y poliploides (3x, 4x, 5x) con reproducción apomíctica, pseudógamos y autocompatibles (Quarin 1992, Tischler y Burson, 1995) (Figura 1). Aproximadamente el 98% de los poliploides son tetraploides, siendo los triploides y pentaploides excepcionales (Tischler y Burson, 1995; Pozzobon y Valls, 1997). La forma diploide (*P. notatum* var. *saurae* Parodi), variedad botánica conocida como pasto horqueta diploide (*Pensacola bahiagrass* en EEUU), es nativa de las cuencas de los ríos Paraná y Uruguay en el noreste de Argentina. Luego de ser introducida accidentalmente a principios del siglo veinte en Florida, es hoy una de las forrajeras cultivadas más importantes de los estados del golfo en el sur de los Estados Unidos. Las poblaciones diploides naturales son poco frecuentes y están restringidas a los suelos sueltos de los márgenes de los ríos Uruguay, Paraná y sus afluentes y en las planicies arenosas de las islas del río Paraná (Gates y col., 2004).

Las razas tetraploides del pasto horqueta constituyen importantes recursos forrajeros de los campos naturales del sur de Brasil, Paraguay, noreste de Argentina y Uruguay. La forma natural de reproducción de estas razas es la apomixis gametofítica. Este tipo de reproducción en *P. notatum* se caracteriza por el desarrollo de sacos embrionarios apospóricos (de tipo *Paspalum*) a partir de células de la nucela. Al momento de la división meiótica de la célula madre de la megáspora (CMM), es posible observar algunas células de la nucela de mayor tamaño y núcleo denso. Estas células constituyen las células iniciales de la aposporía

(AI) a partir de las cuales, por una serie de mitosis, se desarrollan los sacos embrionarios cuyos núcleos son todos no reducidos ($2n$). Al momento de la antesis es posible observar en los sacos apospóricos la célula huevo, una o 2 células sinérgidas y 2 núcleos polares correspondientes a la célula central. Una característica particular de estos sacos es que no presentan antípodas, por lo cual son relativamente fáciles de diferenciar de los sacos meióticos de tipo *Polygonum* que pueden generarse en la misma planta e incluso en el mismo óvulo (Martínez y col., 2001, Ortiz y col., 1997). La reproducción apomíctica se completa con el desarrollo partenogenético del embrión y la formación del endosperma luego de la fertilización de los núcleos polares (pseudogamia) (Quarin y col., 1999). Hasta el presente no se han detectado recombinantes entre estos caracteres, por lo cual se supone que la aposporia y la partenogénesis son controladas por el mismo factor genético o por elementos estrechamente ligados.



Figura 1: *Paspalum notatum*, fotografías de (a) un pastizal natural y de (b) inflorescencias en antesis.

Dada su importancia como forrajera ya se han desarrollado mapas genéticos tanto al nivel diploide como tetraploide de la especie (Ortiz y col., 2001, Stein y col., 2007). El mapa $2x$ fue desarrollado a partir de una población de mapeo F_1 siguiendo una estrategia de mapeo comparativo con marcadores de RFLP. Cuenta con 10 grupos de ligamiento sobre unos 990 cM. En el mismo se identificaron algunas regiones sinténicas (ver más adelante) con los mapas de maíz y arroz (Ortiz y col., 2001). El mapa al nivel tetraploide fue realizado en base a marcadores de AFLP y a la detección de alelos en dosis simples. En el mismo se identificó al grupo de ligamiento que contiene al locus que controla la aposporia por medio de estudios citoembriológicos, genéticos y moleculares (Stein y col., 2007).

Apomixis

Definición del término apomixis

La apomixis es un modo de reproducción asexual, por semillas, que conduce a la generación de progenies genéticamente idénticas a la planta madre (Nogler 1984). Este tipo de reproducción ha sido observada en al menos 400 especies de plantas que abarcan 35 familias diferentes, siendo muy común en las Gramíneas, Compuestas, Rosáceas y Rutáceas (Hanna y Bashaw 1987). Nogler (1984) dividió los mecanismos de la apomixis de acuerdo al origen de los embriones asexuales en dos categorías: la ruta esporofítica y la ruta gametofítica. En la ruta esporofítica, también llamada embrionía adventicia, los embriones se originan directamente a partir de células de la nucela o de los tegumentos del óvulo, sin que se forme un saco embrionario (Koltunow y col., 1995). Comúnmente se forman embriones somáticos (esporofíticos) múltiples que comparten el ovario junto con el embrión de origen sexual y utilizan su endosperma para desarrollarse (Koltunow 1993).

En la apomixis gametofítica se forman sacos embrionarios cuyos núcleos no están reducidos (contienen un número $2n$ de cromosomas), a partir de uno de los cuales se desarrolla un embrión por partenogénesis, sin fecundación. De acuerdo con el origen del saco embrionario y el embrión, la apomixis gametofítica puede presentar dos formas (Figura 2): *diplosporía* cuando la propia célula arqueosporial es la involucrada en el proceso; y *aposporía*, cuando la célula que forma el saco embrionario es una célula somática del óvulo, generalmente de la nucela. La apomixis gametofítica ha sido más profundamente estudiada que la apomixis esporofítica, principalmente por ser el tipo presente en las gramíneas, donde muchas especies son de valor agronómico (Ozias-Akins y Van Dijk 2007). Por otra parte, la apomixis gametofítica está casi siempre asociada a la poliploidía. Se han descrito algunos casos excepcionales de diploides naturales apomícticos, aunque en estudios posteriores fueron cuestionados (Asker y Jerling 1992; Savidan 2000, Holm y Ghatnekar 1996; Holm y col., 1997). En el caso especial de las gramíneas se han observado sacos de tipo apospórico en baja frecuencia en citotipos diploides de los géneros *Brachiaria* y *Paspalum*, aunque en la mayoría de los casos no se ha demostrado aún si finalmente generan progenies por apomixis. Los únicos ejemplos bien documentados de apomixis al nivel diploide corresponden a *Boechera holboellii* (Koltunow y Grossniklaus 2003) y *Paspalum rufum* (Siena y col., 2008).

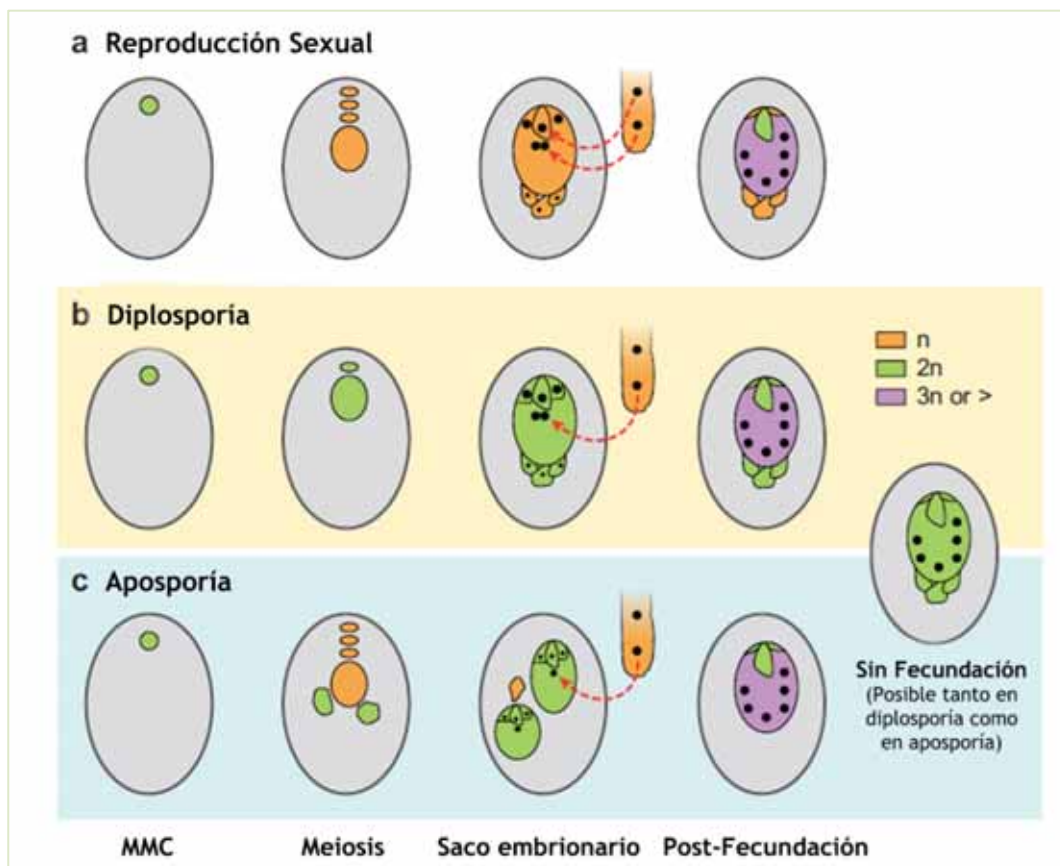


Figura 2: Representación esquemática de diferentes tipos de apomixis gametofítica (diplosporía y aposporía) y comparación con el proceso sexual. (adaptado de Ozias-Akins y Van Dijk, 2007).

Debido a que la apomixis gametofítica concierne fundamentalmente a procesos que se desarrollan en el óvulo, el estudio del carácter se basa en la comparación con la forma normal de reproducción de las angiospermas. Actualmente se considera que este tipo de reproducción ha evolucionado como un sistema alternativo a la sexualidad a través de la reformulación de los programas de desarrollo del ovario (Grimanelli y col., 2001). Asimismo se especula en que la vía apomíctica no funciona completamente en forma independiente de la vía sexual, por lo tanto, los genes que la controlan podrían no ser genes nuevos sino genes que exhiben una regulación alterada o distinta a la presente en los genotipos sexuales (Ozias-Akins y Van Dijk 2007).

La manipulación de la apomixis y su interés para la agricultura

La reproducción sexual y la variabilidad genética son los fundamentos de la agricultura moderna. En base a estos conceptos se crean continuamente nuevos y mejores cultivares altamente productivos que han logrado mantener aumentos en la producción de alimentos en forma constante durante los últimos 100 años. Algunas variedades ya mejoradas fueron modificadas genéticamente con genes de caracteres agronómicos específicos mediante técnicas de ingeniería genética. Esto ha posibilitado la incorporación de rasgos nuevos que han llevado a un incremento en la superficie cultivada y han aumentado la seguridad de las cosechas. Sin embargo, en algunas regiones del mundo diversos motivos ecológicos y socioeconómicos limitan el acceso de estos materiales a los sistemas agrícolas. Por lo tanto, mientras los países desarrollados tienen grandes excedentes en su producción de alimentos como consecuencia de la aplicación de las nuevas tecnologías, los países en desarrollo se enfrentan con una creciente demanda de alimentos no satisfecha. Con una comunidad global estimada en 8 mil millones de personas para la mitad del siglo XXI, son necesarios nuevos enfoques para incrementar los logros de la agricultura actual (Ortiz y Pessino 2002). En particular la apomixis, una forma natural de reproducción clonal por semillas, puede tener un gran impacto para la agricultura y el mejoramiento de cultivos.

El fitomejoramiento usando la apomixis podría ser extremadamente rápido y responder a microambientes específicos, condiciones de cultivo particulares, entornos socioeconómicos diferentes y mercados cambiantes. Incluso, podría permitir la inclusión al germoplasma de cultivares locales adaptados y otros relativamente salvajes que de otra manera serían excluidos de los programas de mejoramiento convencionales (Spillane y col., 2004).

Debido a que este tipo de reproducción genera progenies genéticamente idénticas a la planta madre por semillas, en teoría cualquier combinación genética que la porte formará poblaciones genéticamente uniformes que mantendrían el vigor híbrido a través de sucesivas generaciones (Burton y Forbes, 1960). La fijación del vigor híbrido a través de la apomixis es un objetivo anhelado por los agricultores. Se ha estimado que la estabilización de combinaciones heteróticas de manera rápida y económica, solo para el caso del arroz híbrido, resultaría en un beneficio estimado de más de 2,5 millones de dólares por año. Por otro lado, dado que este tipo de reproducción elimina las restricciones que impone la meiosis, su uso controlado permitiría la generación de híbridos intergenéricos e interespecíficos que serían incapaces de reproducirse por la vía sexual. También permitiría la propagación por semillas de cultivos que tradicionalmente se multiplican vegetativamente (Vielle-Calzada y col., 1996, Spillane y col., 2004). Por otro lado, la producción de cultivos clonales esta limi-

tada por el ataque de patógenos (principalmente virus y endófitos) que se acumulan luego de sucesivas rondas de propagación vegetativa y lo cual limita seriamente el intercambio de germoplasma entre países. La utilización de la apomixis en estos cultivos podría proveer una opción adicional aportando los beneficios de la propagación clonal por semillas y generando así material libre de enfermedades que puede ser fácilmente conservado y transportado. Asimismo, el uso de semillas apomícticas, como una alternativa a la propagación vegetativa, proporcionaría también una baja en los costos y un aumento en los rendimientos. Un ejemplo, de esto estaría dado por las semillas de papa. El uso de tubérculos como materiales de siembra desvía alrededor del 10% de la cosecha mundial de papa de uso alimentario que es destinado a la siembra. Aunque los sistemas de semillas de papas han encontrado algunos problemas (por ejemplo, bajas tasas de germinación, tubérculos no uniformes y aumento de las necesidades de riego), también hay ejemplos de gran éxito. Es por ello que la tecnología de la apomixis podría hacer la siembra de semillas de papas una opción más atractiva para los criadores y cultivadores de la misma. Los beneficios relacionados con la propagación de la tecnología de la apomixis podría beneficiar a los productores de papa en aproximadamente 3.2 millones de dólares al año (Spillane y col., 2004).

Estas características hacen que la identificación de los mecanismos genéticos y moleculares que controlan a este tipo de reproducción y la transferencia del carácter ha especies de gran cultivo sean metas perseguidas por varios laboratorios alrededor del mundo.

Aunque la introducción de las características de la apomixis a cultivos parece ser una propuesta atractiva para la agricultura, todavía deben abordarse varias cuestiones antes de que esta tecnología pueda ser desarrollada e implementada.

Se han planteado varias estrategias para modificar genéticamente los elementos de la apomixis en plantas de cultivo. Todas estas idealmente necesitan un profundo conocimiento tanto del desarrollo sexual como del apomíctico, ya que los mismos están estrechamente relacionados entre sí. La desregulación de la expresión de los principales genes del desarrollo podría permitir la síntesis de elementos de la apomixis de *novo* en las especies sexuales. Actualmente, los enfoques se centran en identificar promotores o potenciadores (enhancers) involucrados en una serie de células (por ejemplo, la célula huevo) y/o en etapas específicas del desarrollo (por ejemplo megasporogénesis) que se podrían utilizar para expresar o silenciar genes que confieren elementos de la apomixis. Alternativamente, los genes responsables de la reproducción clonal en plantas apomícticas naturales podrían ser expresados en

células reproductivas de plantas sexuales, sin embargo estos genes no han sido aún identificados.

Básicamente, existen dos tipos de procedimientos para transferir la apomixis a especies sexuales: (i) la hibridación interespecífica entre una planta sexual y un pariente silvestre apomítico y (ii) la transformación genética de cultivares sexuales con genes considerados disparadores del carácter. La primera estrategia para transferir la apomixis al maíz fue propuesta hace más de 35 años atrás por D. F. Petrov (Petrov y col., 1979). El sistema se basaba en cruzamientos interespecíficos entre maíces tetraploides y *Tripsacum dactiloides* (una especie apomítica diplospórica). Los híbridos apomíticos obtenidos fueron retrocruzados con el maíz a fin de recuperar el genoma completo de esta especie. Parte de estos trabajos fueron realizados por el Dr. B. Kindiger en Oklahoma, EEUU (Kindiger y col., 1996) e intentos similares fueron desarrollados en México por el Dr. Y. Savidan (en el IRD - CIMMYT) (Savidan, 2000). El principal inconveniente de este sistema es que al recuperar el genoma de maíz, los híbridos obtenidos resultaron completamente macho estériles. Esto impidió avanzar con el recupero del genoma de maíz, lo cual representa un cuello de botella importante para esta metodología. Una dificultad adicional consiste en la obligación estricta de la relación genómica 2 materna: 1 paterna necesaria para desarrollar el endosperma en maíz, que impide la formación de semilla en los híbridos (Savidan, 2000). De la misma manera, un programa iniciado a finales de los años 70' intentó transferir la apomixis al mijo (*Pennisetum glaucum*, sexual) a partir de *P. squamulatum* (una especie apomítica de tipo apospórica) (Hanna y col., 1993). A partir de la generación de grandes poblaciones segregantes fue posible detectar individuos parcialmente macho-fértiles en las retrocruzas lo cual permitió progresar hasta la generación de BC7. Estas plantas son muy similares al mijo, pero forman muy pocas semillas viables, aparentemente debido al deficiente desarrollo del endosperma (Morgan, 1998). Un ejemplo exitoso de mejoramiento de una especie apomítica es el caso de *Panicum máximum Jacq.* El cultivar 'Natsukaze' fue la primera variedad apomítica híbrida generada a partir de cruzamientos entre una planta sexual y un genotipo tetraploide apomítico (Sato y col., 1990). Por otro lado, cultivares forrajeros apomíticos de *Brachiaria ssp.* y *Paspalum spp.* derivados de la selección directa de genotipos superiores fueron desarrollados en Brasil (Miles y do Valle, 1996) y Argentina (Urbani y col., 2002). Recientemente se ha obtenido también el primer cultivar híbrido apomítico de *Paspalum notatum* (Acuña C. comunicación personal).

La segunda estrategia sigue siendo hipotética debido a que no se han identificado aún los genes responsables del fenotipo apomítico.

Estudios genéticos y moleculares de la apomixis gametofítica en gramíneas

La apomixis es un carácter genéticamente controlado que está fuertemente asociado a la poliploidía (Savidan y col., 2000). A pesar de su amplia distribución en las plantas con flores la apomixis gametofítica no está presente en especies de interés agronómico, a excepción de algunas gramíneas forrajeras (Carneiro y col., 2006). Esto implica que los estudios genéticos del carácter deban realizarse en especies silvestres altamente heterocigotas, poliploides y poco caracterizadas genéticamente (Catanach y col., 2006). Las gramíneas son una de las familias en donde la apomixis ha sido mejor estudiada. En este grupo de especies, este carácter está controlado por unos pocos genes ligados de herencia simple (revisado en Ozias-Akins y Van Dijck 2007). En varias especies se ha determinado que la apomixis se transmite en forma distorsionada (tanto por las gametas femeninas y masculinas) y que existe una fuerte supresión de la recombinación alrededor del locus responsable de la aposporía (Ozias-Akins y Van Dijck 2007). Tradicionalmente los análisis citoembriológicos de las plantas madres y las pruebas de progenies han sido las metodologías más usadas para determinar el modo de reproducción (sexual o apomítico) en especies apomíticas (Marshall y Brown, 1974). En los últimos años se han identificado marcadores moleculares ligados a la apomixis en híbridos de maíz-*Tripsacum* (Leblanc y col., 1995, Kindiger y col., 1996), *Pennisetum* (Ozias-Akins y col., 1993, 1998) y *Brachiaria* (Pessino y col., 1998,1999). Asimismo se han identificado marcadores de RAPD y AFLP fuertemente ligados al carácter en *Paspalum notatum* (Martínez y col., 2003, Stein y col., 2004, Stein y col., 2007) y *Panicum máximum* (Ebina y col., 2005). Asimismo, los marcadores moleculares han sido utilizados para la realización de análisis de progenies y estudios del tipo de herencia en *Poa pratensis* (Huff y Bara 1993, Mazzucato y col., 1995), *P. notatum* (Ortiz y col., 1997, Stein y col., 2004, Rebozzio y col., 2012) y *P. simplex* (Pupilli y col., 2001, Hosjgaard y col., 2011).

En el caso especial de *P. notatum* los estudios realizados hasta el presente indican que en las razas tetraploides la aposporía está controlada por un locus simple dominante (Aaaa) con segregación distorsionada (Martínez y col., 2001). El mismo está localizado en una región genómica que muestra una marcada supresión de la recombinación y apareamiento preferencial de cromosomas (Martínez y col., 2003, Stein y col., 2004). El locus responsable de la aposporía fue localizado en un grupo de ligamiento de aproximadamente 25 cM donde se asignaron 25 marcadores moleculares (RADP, RFLP y AFLP), 15 de los cuales cosegregan estrictamente con el carácter (Stein y col., 2007). Estimaciones del tamaño físico de este locus basadas en datos derivados del mapeo genético, indican que podría consti-

tuir un fragmento cromosómico de aproximadamente 35 Mpb que puede contener numerosos genes estrictamente ligados. En la Figura 3, se muestra el grupo de ligamiento que contiene de la aposporía de acuerdo a lo informado por Stein y col. (2007).

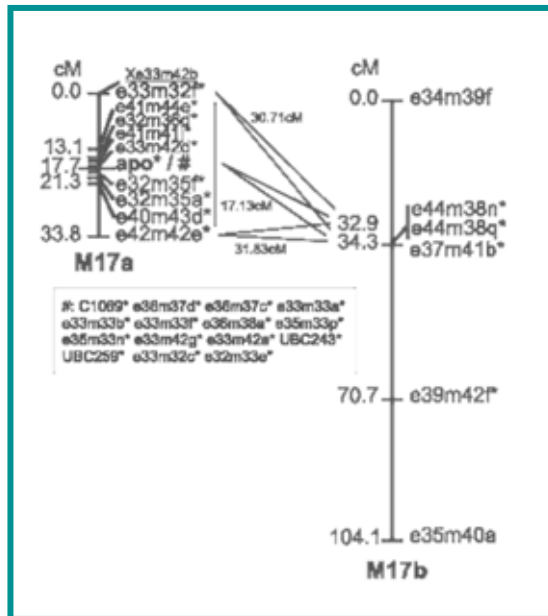


Figura 3: Grupos de ligamiento asociados a la aposporía en *P. notatum*. M17a: grupo conteniendo el locus responsable de la aposporía (apo) y 25 marcadores (AFLP, RFLP y RAPD) en fase de acoplamiento. M17b: grupo homólogo con marcadores ligados al locus apo en fase de repulsión. Tomado de Stein y col., 2007.

Debido a las características genéticas y físicas (gran tamaño, ausencia de recombinación, constitución compleja) del grupo la utilización de estrategias de genética directa para la identificación y clonado de los genes que controlan el carácter son de difícil implementación y resultado incierto. Por esto, una alternativa es intentar abordar el tema por estudios de mapeo comparativo y análisis de expresión de genes relacionados. Estudios comparativos determinaron que regiones sinténicas al locus aposporía de *P. notatum*, *P. malacophyllum* y *P. simplex* se localizan en el cromosoma 12 de arroz, (Pupilli y col., 2004; Stein y col., 2007, Hosjgaard 2011, Podio y col., 2012). Además, específicamente en *P. notatum* sectores del cromosoma 2 de arroz resultaron asociados a la aposporía, ya que sondas que mapean en este cromosoma resultaron completamente ligadas a la aposporía en esta especie (Pupilli y col., 2004, Stein y col., 2007).

Recientemente a partir de una genoteca en BAC de *P. simplex* se aisló el clon 346H10 que contiene secuencias 100 % ligadas a la aposporía en la especie (Calderini y col., 2006) y experimentos de FISH con dicho clon (346H10) determinaron que el locus-apo se encuentra en una región no pericentromérica (Calderini y col., 2006). La secuenciación de 346H10 reveló 2 sectores codificantes que resultaron homólogos a los dominios *EXS* y *PKD* (dominio de proteína quinasa) (Calderini y col., 2006).

Estudios de la expresión de genes asociados a la apomixis

Una de las teorías del surgimiento de la apomixis propone que este tipo de reproducción surge como una desregulación en la expresión de los genes involucrados en la vía canónica sexual y no a partir de un nuevo mecanismo de desarrollo (Koltunow y Grossniklaus, 2003). Posiblemente, la apomixis sea el resultado de una desregulación en el momento y el lugar de la expresión de genes relacionados con la sexualidad como consecuencia de una expresión ectópica y/o heterotrófica. Evidencias que soportan esta hipótesis fueron observadas en *Tripsacum* (Grimanelli y col., 2003) y más recientemente por un análisis llevado a cabo en *Boechera* (Sharbel y col., 2009, 2010).

Durante las últimas dos décadas la investigación en este tema se ha centrado en el estudio de las bases genéticas y los mecanismos moleculares que regulan la reproducción apomíctica, mediante la determinación del control genético del carácter en plantas apomícticas naturales, o a través de la identificación de genes en especies sexuales modelo relacionados con mecanismos del desarrollo de componentes de la apomixis, tales como la formación de los gametos femeninos no reducidos, o el desarrollo autónomo del embrión o del endosperma.

La estrategia basada en la comparación de las secuencias expresadas entre los genotipos apomícticos y sexuales fue utilizada en varias especies. Hasta el momento se han aislado transcritos de ARNm diferencialmente expresados en inflorescencias de plantas apomícticas y sexuales en varias especies de gramíneas apomícticas tales como *Pennisetum ciliare* (Singh y col., 2007), *Pennisetum squamulatum* (Vielle-Calzada y col., 1996), *Brachiaria* (Leblanc y col., 1997, Dusi 2001, Rodrigues y col., 2003, Duarte Silveira y col., 2012), *Paspalum notatum* (Pessino y col., 2001, Laspina y col., 2008), *Panicum maximum* (Chen y col., 1999, Yamada-Akiyama y col., 2009), *Poa pratensis* (Albertini y col., 2004, 2005), *Paspalum simplex* (Polegri y col., 2010) y *Eragrostis curvula* (Cervigni y col., 2008), junto con

otras especies no gramíneas como *Hieracium* (Guerin y col., 2000) y *Boechera* (Sharbel y col., 2009). Este tipo de análisis presenta la dificultad de no contar con líneas completamente isogénicas que permitan simplificar la búsqueda de genes candidatos, sin embargo, un número considerable de transcritos hallados como diferenciales resultaron ser coincidentes entre las diversas especies apomícticas, reduciéndose así los posibles genes involucrados. Varios de los genes identificados parecen corresponder a genes con funciones regulatorias como factores de transcripción y proteínas de unión a ADN, otros integran cascadas de transducción de señales del tipo ERK (*extracelular receptor kinase*), o factores de respuesta a auxina (ARF) (Laspina y col., 2008, Polegri y col., 2010). Asimismo, se ha determinado que algunos tipos de retrotransposones se encuentran expresados diferencialmente entre los individuos sexuales y apomícticos (Albertini y col., 2004; Laspina y col., 2008; Cervigni y col., 2008) lo cual podría indicar una participación de éstos elementos en vías regulatorias relacionadas con la apomixis y la sexualidad (Ochogavía y col., 2011). Actualmente, se han comenzado a realizar estudios mas detallados sobre algunos de estos genes diferencialmente expresados, con el objetivo de identificar la localización física en el genoma de las especies apomícticas, los niveles de expresión y la localización de los transcritos en los diferentes estadios del desarrollo reproductivo (Felitti y col. 2011). Estudios de este tipo pueden determinar si estos genes diferencialmente expresados se encuentran involucrados en el inicio del desarrollo de la apomixis o participan en sucesos posteriores de las cascadas de señalización implicadas en esta vía.

Por otro lado, si la apomixis surge como una desregulación de los genes implicados en la sexualidad es posible estudiar aquellos genes involucrados en las vías de formación de las células madres de la megáspora, la partenogénesis y el desarrollo del endosperma, en plantas sexuales y realizar estudios funcionales con mutantes de estos genes en especies modelos como *Arabidopsis thaliana*. Esta estrategia ha llevado a conocer la función de varios genes posiblemente asociados con el carácter. Uno de los interrogantes mas enigmáticos es cuál y cómo es el mecanismo por el cual se producen las células iniciales de la aposporía a partir de células de la nucela en los genotipos apospóricos. Una de las hipótesis más estudiadas es la existencia de un mecanismo inhibitorio en las células nucelares, generando una única célula diferenciada capaz de convertirse en CMM en los genotipos sexuales, el cual podría estar relajado durante el desarrollo de la aposporía. El estudio de mutantes capaces de formar más de una CMM ha sido uno de los principales sistemas de análisis para el estudio de la aposporía. En el maíz, el mutante homocigótico *múltiple archesporial cell1* (MAC1) fue uno de los primeros en ser estudiado ya que puede desarrollar muchos megasporocitos en un solo óvulo, lo cual indica que este gen podría estar implicado en la de-

terminación de la CMM, sin embargo todavía no se ha podido dilucidar su posible rol en la aposporía (Sheridan y col., 1999, Wang y col., 2012). Del mismo modo, en arroz se han identificado dos genes asociados a limitar el número de megaesporocitos y microesporocitos: *MULTIPLE SPOROCTE 1 (MSP1)* y *TAPETUM-DETERMINANT-LIKE (TDL1A)* (Nonomura y col., 2003, Zhao y col., 2008). Los mutantes en estos genes producen un exceso de microesporocitos y megaesporocitos. Lo cual los hace muy interesantes en el estudio de la aposporía. *MSP1* codifica para una proteína del tipo quinasa con repeticiones ricas en leucina (LRR-RLK) (Nonomura y col., 2003) que en plantas ha sido identificada como proteínas transmembranas involucradas en una compleja serie de rutas de señalización relacionadas con el programa del desarrollo. En arábido (*Arabidopsis thaliana*), la mutante producida por la combinación de tres genes específicos de la meiosis conocida como MIMÉ resultó en una división celular similar a la mitosis, lo que resulta en la formación de sacos embrionarios no reducidos (D'Erfurth y col., 2009). Sin embargo, la supresión simultánea de tres genes: *spo11*, *rec8* y *osd1*; sólo conduce a la producción de gametos no reducidos masculinos y femeninos pero no presentan partenogénesis, y por lo tanto no producen descendencia por apomixis.

Por otro lado, el silenciamiento de ciertos genes involucrados en la vía de la reproducción sexual normal que se heredan como una unidad podrían estar controlados epigenéticamente (Grimanelli 2012). En arábido y maíz se han descrito dos mutantes *ago9* y *ago104*, que dan origen a un mayor número de células arquesporales en el óvulo, indicando que estarían involucradas en el cambio de destino de células somáticas a células arquesporales. AGO104 y AGO9 pertenecen a la familia Argonauta. Las proteínas AGOs actúan como efectores en el silenciamiento génico postranscripcional y transcripcional a través de modificaciones de la cromatina por medio de ARN de interferencia (Mallory y Vaucheret, 2010), con funciones específicas durante la reproducción (Bourchis y Voinnet 2010, Feng y col 2010). Por otro lado, fenotipos mutantes para *dmt102* y *dmt103*, dos DNA metiltransferasas implicadas en la regulación del estado de la cromatina, presentan características similares a la apomixis (García-Aguilar y col., 2010) ya que producen la formación de sacos embrionarios adicionales y gametas no reducidas, similares a las mutantes *ago9*, apoyando la teoría de la metilación del ADN dependiente de ARN como un papel esencial en la identidad de las células germinales.

Otro de los componentes de la apomixis, la partenogénesis, es otro objeto de estudio. El receptor del tipo quinasa *SERK1* en *Arabidopsis thaliana* incrementa el potencial embrionario de los óvulos y las células huevo. La embriogénesis somática puede ser inducida en di-

versos tejidos por la sobre expresión de ciertos factores de transcripción que también pueden ser inducidos por estrés celular (Curtis y Grossniklaus 2008). Albertini y col (2005) estudiaron que genes con alta similitud a genes SERK se expresaban diferencialmente entre genotipos sexuales y apomícticos, y pudieron asociar al gen *SERK* a la apomixis apospórica debido a que este presentaba una distribución espacial diferencial entre individuos apomícticos y sexuales.

El cambio hacia el modo de reproducción apomíctica completamente funcional necesita combinar tres pasos: la desviación de la meiosis o la generación de CMM a partir de células somáticas, el desarrollo partenogenético de la célula huevo y la generación del endosperma con una alteración en el nivel de ploidía. Es de esperar que la investigación en especies modelo apomícticas y sexuales genere el conocimiento necesario para posibilitar ingeniería *de novo* de la apomixis. Al centrarse en los tres elementos de la apomixis: apomeiosis, la partenogénesis y la formación del endospermo, debería ser posible desarrollar conjuntos de transgenes que disparen cada uno de estos elementos y combinarlos para generar plantas apomícticas a partir de plantas sexuales (Pupilli y Barcaccia 2012).

Referencias

Albertini E, Marconi G, Barcaccia G, Raggi L, Falcinelli M (2004) Isolation of candidate genes in *Poa pratensis* L. *Plant Mol Biol* 56: 879-894

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

Asker SE; Jerling L (1992). Apomixis in plants. Boca Raton, USA: CRC Press.

Botstein D, R L White, M Skolnick, R W Davis (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet.* 32(3): 314-331.

Bourc'his D, Voinnet O (2010): A small-RNA perspective on gametogenesis, fertilization, and early zygotic development. *Science*, 330:617-622.

Burton GW (1974) Recurrent restricted phenotypic selection increases forage yields of Pensacola bahiagrass. *Crop Science*, Madison, 14: 831-835.

Burton GW; Forbes, I. (1960) The genetics and manipulation of obligate apomixis in common Bahia Grass (*Paspalum notatum* Flüggé) Proceedings of the Eighth International Grassland Congress, pp. 66-71.

Calderini O, Chang SB, de Jong H, Busti A, Paolocci F, Arcioni S, de Vries S, Abma-Henkens MHC, Klein Lankhorst RM, Donnison IS, Pupilli F (2006). Molecular cytogenetics and DNA sequence analysis of an apomixis-linked BAC in *P. simplex* reveal a nonpericentromere location and partial microcolinearity with rice. *Theor Appl Genet* 112:1179 -1191

Carneiro VTC, Dusi D, Ortiz JPA (2006) Apomixis: Occurrence, Applications and Improvements. *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology* . Global Science Books. 1: 564-571.

Catanach AS, Erasmuson SK, Podivinsky E, Jordan BR, Bicknell R. (2006). Deletion mapping of genetic regions associated with apomixis in *Hieracium*. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 103, 18650-18655.

Cervigni GD, Paniego N, Diaz M, Selva JP, Zappacosta D, Zanazzi D, Landerreche I, Martelotto L, Felitti S, Pessino S, Spangenberg G, Echenique V (2008) Expressed sequence tag analysis and development of associated markers in a near-isogenic plant system of *Eragrostis curvula*. *Plant Mol Biol* 67:7-10.

Chen L; Miyazaki C; Kojima A; Saito A; Adachi T (1999). Isolation and characterisation of a gene expressed during early embryo sac development in apomictic Guinea grass (*Panicum maximum*). *Journal of Plant Physiology* 154, 55-62.

Curtis and Grossniklaus (2008). Molecular control of autonomous embryo and endosperm development. *Sex Plant Reprod Review* 21:79-88

D'Erfurth I, Jolivet S, Froger N, Catrice O, Novatchkova M, Mercier R (2009). Turning meiosis into mitosis. *PLoS Biol* 7:e1000124

Duarte Silveira E, Arrais Guimara L, Dusi D, Rodrigues da Silva F, Florencio Martins N, Mota do Carmo Costa M, Alves-Ferreira M, Tavares de Campos Carneiro V (2012). Expressed sequence-tag analysis of ovaries of *Brachiaria brizantha* reveals genes associated with the early steps of embryo sac differentiation of apomictic plants. *Plant Cell Rep* 31:403-416. DOI 10.1007/s00299-011-1175-y.

Dusi DMA (2001) Apomixis in *Brachiaria decumbens* Stapf. PhD thesis, University of Wageningen, Wageningen, 167: 151-162.

Ebina M, Nakagawa H, Yamamoto T, Araya H, Tsuruta S, Takahara M, Nakajima K (2005) Co-segregation of AFLP and RAPD markers to apospory in guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.). *Grassland-Science* 51, 71-78.

Felitti SA, Seijo JG, Gonzalez AM, Podio, M, Laspina NV, Siena LA, Ortiz JPA, Pessino SC (2011) Expression of lorelei-like genes in aposporous and sexual *P. notatum* plants. *Plant Mol Biol*. DOI 10.1007/s11103-011-9814-9.

Feng S, Jacobsen SE, Reik W (2010) Epigenetic reprogramming in plant and animal development. *Science*, 330:622-627.

Garcia-Aguilar M, Michaud C, Leblanc O, Grimanelli D (2010) Inactivation of a DNA methylation pathway in maize reproductive organs results in apomixis-like phenotypes. *Plant Cell* 22:3249-3267.

Gates RN, CL Quarin, and CGS Pedreira. (2004). Bahiagrass. p. 651-680. In LE. Moser, B.L. Burson, and L.E. Sollenberger (ed.) Warm-season (C4) grasses. Agron. Monogr. 45. ASA, CSSA, SSSA, Madison, WI.

Grimanelli D (2012) Epigenetic regulation of reproductive development and the emergence of apomixis in angiosperms. *Current Opinion in Plant Biology* 15:57-62.

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

Guerin J y col., (2000) A DEFICIENS homologue is down-regulated during apomictic initiation in ovules of *Hieracium*. *Planta*, 210: 914-920.

Hanna WW, Bashaw EC (1987) Apomixis: its identification and use in plant breeding (1987) *Crop Sci*. 27: 1136-1139.

Hanna WW; Dujardin M; Ozias-Akins P; Lubbers E; Arthur L (1993) Reproduction, cytology, and fertility of pearl millet (*Pennisetum squamulatum*) BC4 plants. *Journal of Heredity* 84: 213-216.

Hojsgaard HD, Martínez EJ, Acuña CA, Quarín CL, Pupilli F (2011) A molecular map of The apomixis-control locus in *Paspalum procurrentes* and its comparative analysis with other species of *Paspalum*. *Theor Appl Genet* 123:959-971.

Holm L, Doll J, Holm E, Pancho J, Herberger J (1997) The wild rices. In: *World Weeds: Natural Histories and Distribution*, pp. 531- 547. John Wiley & Sons, Inc, New York.

Holm, S. and Ghatnekar, L. (1996). Apomixis and sexuality in hexaploid *Potentilla argentea*. *Hereditas* 125: 53-60

Huff DR and Bara JM, (1993). Determining genetic origins of aberrant progeny from facultative apomictic Kentucky bluegrass using a combination of flow cytometry and silver stained RADP markers. *Theor Appl Genet* 87: 201 - 208.

Kindiger B; Bai D; Sokolov V (1996) Assignment of a gene(s) conferring apomixis in *Tripsacum* to a chromosome arm: cytological and molecular evidence. *Genome* 39: 1133-1141.

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

Koltunow AM, Grossniklaus U. (2003). Apomixis: a developmental perspective. *Annu. Rev.Plant Biol.* 54: 547-74.

Koltunow AM; Bicknell RA; Chaudhury AM (1995) Apomixis: molecular strategies for the generation of genetically identical seeds without fertilisation. *Plant Physiology* 108: 1345-1352.

Kuo M-H, Allis CD (1999) In Vivo Cross-Linking and Immunoprecipitation for Studying Dynamic Protein:DNA Associations in a Chromatin Environment. *Methods* 19: 425-433.

Laspina NV, Vega T, Seijo JG, Gonzalez AM, Martelotto LG, Stein J, Podio M, Ortiz JPA, Echenique VC, Quarín CL, Pessino SC (2008) Gene expression analysis at the onset of aposporous apomixis in *Paspalum notatum*. *Plant Mol Biol* 67: 615-628.

Leblanc O; Armstead I; Pessino,SC; Ortiz JPA; Evans C; doValle CB; Hayward MD (1997) Non- radioactive mRNA fingerprinting to visualise gene expression in mature ovaries

of *Brachiaria* hybrids derived from *B. brizantha*, an apomictic tropical forage. *Plant Science* 126: 49-58.

Leblanc O; Grimanelli D; Gonzalez-de-Leon D; Savidan, Y (1995) Detection of the apomictic mode of reproduction in maize-*Tripsacum* hybrids using maize RFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics* 90: 1198-1203.

Mallory A, Vaucheret H (2010) Form, function, and regulation of ARGONAUTE proteins. *Plant Cell* 22: 3879-3889.

Marshall DR, Brown AHD (1974) Estimation of the level of apomixis in plant populations. *Heredity* 32: 321-333

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

Martínez EJ, Urbani MH, Quarín CL, Ortiz JPA (2001) Inheritance of apospory in bahiagrass, *Paspalum notatum*. *Hereditas* 135: 9-25

Mazzucato A (1995). Italian germplasm of *Poa pratensis* L. II. Isozyme progeny test to characterize genotype for their mode of reproduction. *J Genet Breed* 49: 119-126.

Miles JW and CB Do Valle. (1996). Manipulation of apomixis in *Brachiaria* breeding. In: *Brachiaria: Biology, Agronomy and Improvement*. Miles, Maass, Valle (eds.). CIAT/EMBRAPA publication. (CIAT Publication N° 259). Chapter 11:164-177.

Morgan RN; Ozias-Akins P; Hanna WW (1998) Seed set in an apomictic BC3 pearl millet. *International Journal of Plant Science* 159: 89-97.

Nogler, G.A. (1984) Gametophytic apomixis. In: *Embryology of Angiosperms* [edited by Johri, B.M.]. Springer-Verlag, Berlin, Germany.

Nonomura K, Miyoshi K, Eiguchi M, Suzuki T, Miyao A, Hirochika H, Kurata N (2003) The MSP1 gene is necessary to restrict the number of cells entering into male and female sporogenesis and to initiate anther wall formation in rice. *Plant Cell* 15: 1728-1739.

Ochogavía AC, Seijo JG, González AM, Podio M, Laspina NV, Duarte Silveira E, Machado Lacerda AL, Tavares de Campos Carneiro V, Pessino S (2011) Characterization of retrotransposon sequences expressed in inflorescences of apomictic and sexual *Paspalum notatum* plants, *Sex Plant Reprod* 24: 231-246.

Ortiz JP, Pessino SC, Leblanc B, Hayward MD, Quarin CL (1997) Genetic fingerprint for determining the mode of reproduction in *Paspalum notatum*, a subtropical apomictic forage grass. *Theor Appl Genet* 95: 850-856

Ortiz JPA y Pessino CL (2002) Apomixis and its potential role in agriculture. *AgboatNet* 4. *ABN 081*.

Ortiz, JPA.; Pessino, SC; Bhat, V; Hayward, MD; Quarin, CAL. (2001). A genetic linkage map of diploid *Paspalum notatum*. *Crop Science, Madison* 4: 1-4.

Ozias-Akins P, van Dijk PJ. (2007) Mendelian genetics of apomixis in plants. *Annu Rev Genet* 41: 509-537.

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 divergent locus that may have no allelic form in sexual genotypes. *Proceedings of National Academy of Sciences, USA* 95: 5127-5132.

Ozias-Askins, P, Lubbers EL, Hanna WW, and McNay JW. 1993. Transmission of the apomictic mode of reproduction in *Pennisetum*: co-inheritance of the trait and molecular markers. *Theor Appl Genet* 85: 632-638.

Pessino, SC; Espinoza, F; Martínez, EJ; Ortiz, JPA; Valle, E; Quarín, CL. (2001) Isolation of cDNA clones differentially expressed in flowers of apomictic and sexual *Paspalum notatum*. *Hereditas* 134: 35-42.

Pessino, SC; Evans, C; Ortiz, JPA; Armstead, I; do Valle, CB; Hayward, MD. (1998) A genetic map of the apospory-region in *Brachiaria* hybrids: identification of two markers closely associated with the trait. *Hereditas* 128: 153-158.

Pessino, SC; Ortiz, JPA; Hayward, MD; Quarín, CL. (1999) The molecular genetics of gametophytic apomixis. *Hereditas* 130: 1-11.

Petrov, DF; Belousova, NI; Fokina, ES (1979) Inheritance of apomixis and its elements in corn-*Tripsacum* hybrids. *Genetika* 15: 1827-1836.

Podio M, Rodriguez, M, Felitti, S, Stein, J, Martinez, E, Siena, L, Quarin, C, Pessino, S, Ortiz, JPA (2012) Sequence characterization, *in silico* mapping and cytosine methylation analysis of markers linked to apospory in *Paspalum notatum*. *Genetics and Molecular Biology*. <http://www.scielo.br/pdf/gmb/2012nahead/2012-055.pdf>.

Polegri L, Calderini O, Arcioni S, Pupilli F (2010) Specific expression of apomixis-linked alleles revealed by comparative transcriptomic analysis of sexual and apomictic *Paspalum simplex* Morong flowers. *J Exp Bot* 61:1869-1883

Pozzobon MT y Valls JFM (1997) Chromosome number in germoplasma accessions of *Paspalum notatum* (Gramineae). *Braz J Genetics* 20: 29.34.

Pupilli F, Busti A, Quarin CL y Arcioni S (2001) The chromosome segment related to apomixis in *Paspalum simplex* is homeologous to the telomeric region of the long arm of rice chromosome 12. *Molecular Breeding* 8: 53-61

Pupilli F, Martínez EJ, Busti A, Calderini O, Quarin CL, Arcioni S (2004) Comparative mapping reveals partial conservation of synteny at the apomixis locus in *Paspalum* spp. *Mol Genet Genomics* 270: 539-48

Pupilli F, Barcaccia G. 2012. Cloning plants by seeds: inheritance models and candidate genes to increase fundamental knowledge for engineering apomixis in sexual crops. *Journal of Biotechnology* 159: 291-311.

Quarin CL (1992) The nature of apomixis and its origin in *Panicoid* grasses. *Apomixis Newsletter* 5: 8-15

Quarin, CL (1999). Effect of pollen source and pollen ploidy on endosperm formation and seed set in pseudogamous apomictic *Paspalum notatum*. *Sex Plant Reprod* 11:331-335.

Rebozzio RN, Rodriguez MP, Stein J, Quarin CL, Ortiz JPA and Espinoza F (2012) Validation of molecular markers linked to apospory in tetraploid races of bahiagrass, *Paspalum notatum* Flüggé. *Mol Breed* 29:189-198.

Rodrigues JCM, Cabral GB, Dusi DMA, de Mello LV, Ridgen DJ y Carneiro VTC (2003)

Identification of differentially expressed cDNA sequences in ovaries of sexual and apomictic plants of *Brachiaria brizantha*. *Plant Molecular Biology* 53:745-757.

Sato H, Shimizu N, Nakagawa H, Nakajima K (1990) A new registered cultivar "Natsukase" of guineagrass. *Japan Agricultural Research Quarterly* 23, 196-201

Savidan, Y. (2000) Apomixis: genetics and breeding. *Plant Breeding Reviews* [edited by Janick, J. London, UK: JohnWiley& Sons, Inc. pp. 18-36.

Sharbel TF, Voigt ML, Corral JM, Thiel T, Varshney A, Kuhmlehn J, y col., (2009). Molecular signatures of apomictic and sexual ovules in the *Boechera holboellii* complex. *Plant J* 58: 870-882.

Sharbel TF, Voigt ML, Corral JM, Galla G, Kuhmlehn J, Klukas C, y col., (2010): Apomictic and sexual ovules of *Boechera* display heterochronic global gene expression patterns. *Plant Cell* 22: 655-671

Sheridan WF, Golubeva EA, Abrhamova LI, Golubovskaya I (1999) The *mac1* mutation alters the developmental fate of the hypodermal cells and their cellular progeny in the maize anther. *Genetics* 153:933-941

Siena LA, Sartor ME, Espinoza F, Quarín CL, Ortiz JPA (2008). Genetic and embryological evidences of apomixis at the diploid level in *Paspalum rufum* support recurrent auto-polyploidization in the species. *Sex Plant Reprod* 21: 205-215

Singh M, Burson BL and Finlayson SA (2007). Isolation of candidate genes for apomictic development in buffelgrass (*Pennisetum ciliare*). *Plant Molecular Biology* 64: 673-682.

Spillane C, Curtis MD, Grossniklaus U (2004) Apomixis technology development-virgin births in farmers' fields? *Nat Biotechnol* 22: 687-691

Stein J, Pessino SC, Martinez EJ, Rodriguez MP, Siena LA, Quarín CL, Ortiz JPA (2007) A genetic map of tetraploid *Paspalum notatum* Flüggé. (bahiagrass) based on single-dose molecular markers. *Mol Breeding* 20: 153-166

Stein J, Quarin CL, Martínez EJ, Pessino SC, Ortiz JPA (2004) Tetraploid races of *Paspalum notatum* show polysomic inheritance and preferential chromosome pairing around the apospory-controlling locus. *Theor Appl Genet* 109: 186-191

Tischler CR y Burson BL (1995) Evaluating different bahiagrass cytotypes for heat tolerance and leaf epicuticular wax content. *Euphytica* 84: 229-235.

Urbani MH, Quarin CL, Espinoza F, Penteadó MIO, Rodrigues IF (2002) Cytogeography and reproduction of the *Paspalum simplex* polyploid complex. *Plant Sys Evol* 236: 99-105.

Vielle-Calzada JP, Crane CF, Stelly DM (1996) Apomixis: the asexual revolution. *Science* 274: 1322-1323

Vos PR, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters, A, Pot J, Peleman J, Kuiper M y M Zabeau (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl Acids Res* 23: 4407-4414.

Wang CR, Nan GL, Kelliher T, Timofejeva L, Vernoud V, Golubovskaya IN, Harper L, Egger R, Walbot V and Cande WZ. (2012) Maize multiple archesporial cells 1 (*mac1*), an ortholog of rice TDL1A, modulates cell proliferation and identity in early anther development. *Development* 139, 2594-2603 / doi:10.1242/dev.077891.

Williams JGK, Kubelik AR, Livak DL, Rafalski JA y Tingey SV (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl Acids Res* 18: 6531- 6536.

Yamada-Akiyama H, Akiyama Y, Ebina M, Xu QiuSheng, Tsuruta S, Yazaki J, Kishimoto N, Kikuchi S, Takahara M, Takamizo T, Sugita, S, Nakagawa H, (2009). *Journal of plant physiology* 66 (7): 750-761

Zhao DZ, Wang GF, Speal B, Ma H (2002) The *EXCESS MICROSPOROCYTES1* gene encodes a putative leucine-rich repeat receptor protein kinase that controls somatic and reproductive cell fates in the *Arabidopsis* anther. *Genes Dev* 16:2021-2031.

Zuloaga FO, Morrone O (2005). Revisión de las especies de *Paspalum* para América del Sur Austral (Argentina, Bolivia, Sur de Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay). *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* 102: 1-297.

OBJETIVO GENERAL DEL TRABAJO DE TESIS

El objetivo general del trabajo de tesis fue profundizar el conocimiento de las características citogenéticas del locus responsable de la aposporía en *Paspalum notatum* y caracterizar genes cuya expresión fue asociada a la apomixis en gramíneas así como secuencias genómicas localizadas específicamente en el locus de la aposporía en la especie.

CAPÍTULO I:

ESTUDIOS CITOGENÉTICOS EN CITOTIPOS APOMÍCTICOS Y SEXUALES DE *PASPALUM NOTATUM*

Resumen

El carácter aposporía en las razas tetraploides de *P. notatum* es controlado por un locus único con segregación distorsionada. La presencia de inversiones u otras alteraciones cromosómicas que afectan la meiosis durante la microsporogénesis de la raza apospórica fueron propuestas como responsables de la distorsión de la segregación del carácter. El objetivo de este trabajo fue evaluar cuantitativamente las aberraciones en la anafase I de la meiosis y la viabilidad del polen de plantas apomícticas y sexuales de *P. notatum*, así como también, determinar la localización física del locus responsable de la aposporía por medio de experimentos de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) en células madres del polen. Como material vegetal se utilizaron cinco accesiones apomícticas naturales y tres individuos tetraploides completamente sexuales obtenidos experimentalmente. Asimismo, se analizaron 16 híbridos F₁ (8 apomícticos y 8 sexuales) derivados de un cruzamiento experimental. Para el análisis de hibridación FISH, se utilizó como sonda el clon de BAC 346H10 de *P. simplex*, el cual contiene secuencias 100% ligadas a la aposporía en dicha especie. Los preparados cromosómicos, realizados en distintos estadios de la meiosis, fueron coloreados con DAPI y posteriormente hibridados con el clon de BAC 346H10 marcado con digoxigenina. Las señales de hibridación se detectaron mediante la reacción con el fluoróforo TRICT. Las observaciones citogenéticas revelaron que ambos grupos de plantas presentan anomalías meióticas tales como, cromosomas rezagados, puentes de cromatina y micronúcleos. En promedio, el 44,36 % y 29,66 % de los meiocitos de individuos apospóricos y sexuales presentaron anomalías meióticas en la anafase I, respectivamente. La comparación del número observado de meiocitos normales y anormales en los grupos de plantas apomícticas y sexuales resultó altamente significativa. Los estudios de viabilidad del polen en estos materiales evidenciaron una proporción significativamente mayor de polen no viable en los genotipos apomícticos. Se observó asimismo una correlación positiva entre ambas variables ($r = 0.71$; $r^2 = 0.50$) en las plantas apomícticas. El análisis de los híbridos confirmó un número significativamente mayor de anomalías en las progenies apomícticas en comparación

con las sexuales. Sin embargo, la proporción de polen viable fue similar para ambos grupos. En este caso las variables no mostraron correlaciones significativas. El estudio de FISH sobre los meiocitos reveló que el locus responsable de la aposporía en *P. notatum* se encuentra en hemigosis al igual que en otras especies apospóricas. Asimismo se observó que está posicionado muy próximo a regiones ricas en heterocromatina. Un hecho particular fue la visualización de la migración del locus responsable de la aposporía (ACL) solo hacia uno de los polos de las células durante la anafase I de la microesporogénesis. Los resultados presentados en este Capítulo indican que los individuos apomícticos presentan un rearrreglo cromosomal que afecta el comportamiento de la meiosis ausente en los genotipos sexuales obtenidos experimentalmente. Este rearrreglo es transmitido a la progenie asociado con el modo de reproducción. La posible asociación entre las anomalías meióticas y la herencia de la aposporía se discute al final del Capítulo. Asimismo, fue posible confirmar que el control del carácter aposporía corresponde a un locus único que estaría situado en regiones asociadas a heterocromatina y localizado en una región hemigota.

Introducción

A pesar de la existencia de cierta sexualidad residual en algunas accesiones tetraploides naturales, es decir que poseen capacidad para generar sacos embrionarios meióticos y descendientes por vía sexual, hasta el presente no se han colectado individuos completamente sexuales en la naturaleza (Martínez y col., 2001, Espinoza y col., 2006). Sin embargo, varios genotipos tetraploides completamente sexuales han sido generados experimentalmente por duplicación cromosómica de diploides sexuales mediante el uso de colchicina o por cruzamientos con genotipos altamente sexuales con una accesión apomíctica natural (Quarin y col., 2003). Estos individuos han permitido la generación de poblaciones tetraploides segregantes por el modo de reproducción que fueron utilizadas para el estudio de la herencia de la aposporía y la caracterización de la región genómica responsable de la misma (Martínez y col., 2001, Martínez y col., 2003, Stein y col., 2004).

Estudios genéticos en estas razas demostraron que la aposporía se hereda como un alelo dominante, con una marcada distorsión de la segregación (Martínez y col., 2001). En todos los cruzamientos realizados entre los individuos sexuales y apospóricos, se obtuvieron un menor número de progenies apospóricas que la esperada (Martínez y col., 2001, Stein y col., 2004). El exceso de progenies sexuales fue atribuido a un efecto letal pleiotrópico con penetrancia incompleta del alelo responsable de la aposporía, o a cierto/s factor/es letales

ligados al carácter que causan la letalidad gamética cuando se presenta en el estado homocigótico (Martínez y col., 2001). Experimentos llevados a cabo utilizando diploides y tetraploides sexuales como progenitores femeninos y una planta apomíctica triploide como dadora de polen, demostraron que la aposporía sólo puede ser transmitida por el polen a través de los gametos diploides o hipodiploides (Martínez y col., 2007). Este patrón de segregación es coincidente con observaciones realizadas en otras especies apomícticas como *P. simplex* (Pupilli y col., 2001), *Pennisetum squamulatum*, *Tripsacum dactyloides* y *Brachiaria decumbens* (revisado por Grossniklaus y col., 2001) por lo cual podría constituir una característica común de la región genómica que controla el carácter en estas especies. El análisis genético a través de marcadores moleculares reveló también que el ACL se localiza sobre un bloque cromosómico que muestra restricción de la recombinación y apareamiento preferencial de cromosomas (Martínez y col., 2003, Stein y col., 2004, Stein y col., 2007). Asimismo, varios estudios determinaron que el ACL contiene secuencias asociadas con elementos repetitivos que se acumularían en dicha región debido a la falta de recombinación (Calderini y col., 2006, Akiyama y col., 2004 y 2005; Goel y col., 2003). Se especula que con el tiempo la presencia de estos elementos llevaría a un aislamiento de dicho fragmento cromosómico y por lo tanto, a problemas en el apareamiento durante la meiosis. La presencia de un factor letal asociado con la aposporía fue propuesto en principio por Nogler (1984) en *Ranunculus auricomus*, una especie con apomixis apospórica, para la cual propuso que la apomixis es monogénica y dominante, y que solo puede ser transmitida en estado heterocigota a través de gametas diploides o poliploides (Nogler 1984). Análisis genéticos llevados a cabo en *P. notatum* con la ayuda de marcadores moleculares también han revelado que el locus responsable de la aposporía se localiza en un bloque génico que presenta restricción de la recombinación y apareamiento preferencial de cromosomas (Martínez y col., 2003, Stein y col., 2004).

Exámenes citogenéticos durante la microsporogénesis del genotipo Q4188 (tetraploide sexual) y la accesión Q4117 (apomíctico natural), progenitores de una población de mapeo segregante para la aposporía, mostraron que el genotipo Q4117 presenta anomalías meióticas durante la anafase I que no fueron observadas en Q4188 (Stein y col., 2004). Dado que los cromosomas homólogos de un bivalente con frecuencia se encuentran retrasados luego de la metafase I y a la presencia de puentes de cromatina, estas anomalías fueron atribuidas a reordenamientos genéticos de uno de los cromosomas del padre apomíctico que podrían corresponder a una inversión paracéntrica situada cerca del centrómero (Stein y col., 2004). Además, basándose en un enfoque de mapeo comparativo, Pupilli y col., (2004) encontraron que la translocación de segmentos cromosomales de los cromosomas 2 y 12 de arroz podría estar involucrada en la constitución del segmento que lleva los factores de la

apomixis en la especie. La presencia de una inversión o translocación en el padre apomítico (Q4117) podría explicar tanto, la distorsión en la segregación de la aposporía, probablemente causada por una supervivencia diferencial de meiocitos que llevan el control de la característica, y la supresión de la recombinación en torno al locus responsable del carácter observada en la especie. Una de las hipótesis formuladas para explicar la supresión de la recombinación en el ACL de estas especies se refiere a su localización física cercana a regiones heterocromáticas como por ejemplo áreas pericentroméricas o periteloméricas (Ozias-Akins y col., 1998; Pupilli y col., 2001). Se ha determinado que las regiones próximas al centrómero están constituidas por heterocromatina densa que prácticamente carece de entrecruzamientos en trigo (Delaney y col., 1995), tomate (Sherman y Stack 1995) y cebada (Künzel y col., 2000). Por otro lado, estudios de mapeo comparativo con arroz y maíz sugieren que el ACL podría tener una localización (sub)distal en *P. simplex* (Pupilli y col., 2001) y *Brachiaria* (Pessino y col., 1997). Alternativamente, se ha sugerido que la restricción de la recombinación puede estar dada por la heterocigosidad causada por una inversión u otro tipo de reordenamientos cromosómicos (Goel y col., 2003; Ozias-Akins y col., 1998; Pupilli y col., 2001, Stein y col., 2004). En presencia de este tipo de rearrreglo cromosómico, al aparearse ciertas regiones de cromosomas homólogos originan puentes de cromatina y micronúcleos, que pueden generar una segregación cromosómica desequilibrada y por ende conducir a la esterilidad (Calderini y col., 2006).

Por otro lado, se han elaborado diferentes hipótesis sobre la funcionalidad de los genes contenidos en el locus de la apomixis: si el locus responsable de la aposporía se localiza sobre una región de heterocromatina, los determinantes genéticos de la aposporía probablemente se encuentren inactivos (Bender 2004), alternativamente, si lo ocurrido es un reordenamiento génico en el cromosoma que contiene al locus responsable de la aposporía, el grupo de genes relacionados con este modo de reproducción podría ubicarse en una región diferente del cromosoma resultando en una desregulación de los genes responsables del desarrollo sexual (Goel y col., 2003). Diferentes estrategias han tratado de identificar los genes responsables de la aposporía en diversas especies, no obstante, dado la carencia de recombinación, su gran tamaño y la imposibilidad de generar un mapa genético denso en estas especies, aún no se ha podido dilucidar cuales son los genes implicados en dicho proceso. Por consiguiente, es importante determinar la localización física del locus responsable de la aposporía e intentar establecer sus patrones de segregación durante la meiosis. La técnica adecuada para este fin es hibridación *in situ* fluorescente (FISH) con secuencias específicas del ACL.

El primer intento de localizar el locus responsable de la aposporía lo realizó Goel y col.,(2003) en dos especies apomícticas: *Pennisetum squamulatum* y *Cenchrus ciliaris*. Estos autores encontraron que existe un único cromosoma que contiene al locus responsable de la aposporía en los genotipos apomícticos, y que el mismo estaría ausente en el genotipo sexual. No obstante, *P. squamulatum* podría presentar secuencias homólogas en otro cromosoma (Akiyama y col., 2004). Por otro lado, se determinó que el locus de la aposporía se posicionaba próximo a los telómeros en *P. squamulatum* y cercanos a los centrómeros en *C. ciliaris* (Akiyama y col 2004), es decir cercano a zonas ricas en heterocromatina. Esta posición diferencial entre estas dos especies relacionadas dio lugar a un estudio más detallado de la estructura en la cual se localizaba, observándose un cambio estructural (inversión) en el cromosoma que contiene el locus de la aposporía, que podría haber ocurrido durante la divergencia de *C. ciliaris* y *P. squamulatum* (Akiyama y col., 2005). Análisis similares en *P. simplex* indicaron que el ACL de esta especie se localiza sobre dos cromátidas hermanas de uno de los dos cromosomas que forman un bivalente (estado hemicingota), en una región pobre de heterocromatina lejana al centrómero (Calderini y col., 2006).

Hipótesis

- El carácter apomixis está asociado a un rearrreglo cromosomal (inversión y/o translocación) que afecta el apareamiento de los cromosomas en la meiosis y la transmisión del carácter a la descendencia.
- En *Paspalum notatum* el locus responsable de la aposporía (ACL) se encuentra localizado en una región hemicingota no pericentromérica (brazos cromosomales) de gran tamaño, rodeada por regiones de heterocromatina.

Objetivos específicos

- Analizar las configuraciones cromosómicas en la anafase I de la meiosis de individuos apospóricos colectados en una amplia región geográfica e individuos sexuales obtenidos experimentalmente.

- Cuantificar la viabilidad del polen de las accesiones apomícticas y sexuales y determinar si este carácter se correlaciona con la proporción observada de anomalías en la anafase I en ambos grupos.

- Analizar las estructuras meióticas de progenies F₁ sexuales y apospóricas derivadas del cruzamiento entre los individuos Q4188 y Q4117 y determinar si existe asociación con el modo de reproducción.

- Cuantificar la viabilidad del polen de las progenies apomícticas y sexuales y determinar si este carácter se correlaciona con la proporción observada de anomalías en la anafase I entre los grupos.

- Determinar la localización física del locus responsable de la aposporia en *P. notatum* mediante experimentos de hibridación FISH con un clon de BAC conteniendo secuencias específicas de la aposporia en una especie relacionada.

Materiales y métodos

Material vegetal

El material vegetal utilizado en este trabajo incluyó 8 accesiones de *P. notatum* tetraploide. Cinco de ellas son apomícticas naturales y tres, son genotipos sexuales, generados experimentalmente (Tabla I.1). Las plantas apomícticas naturales fueron colectadas en diferentes regiones geográficas comprendiendo cuatro países distintos: Paraguay, Bolivia, Brasil y México. Por otra parte, las accesiones sexuales fueron obtenidas de manera experimental a través de diferentes métodos. El genotipo Q4188 fue generado a partir de la cruce entre los genotipos Q3664 x Q3853. El parental Q3664 se originó a partir del cruzamiento entre una planta tetraploide sexual (PT-2), inducido por tratamiento con colchicina de un genotipo diploide sexual (*Paspalum notatum* var. *saurae*), y un individuo altamente sexual de bahia-grass de estigmas blancos (SWSB) (Quarin y col., 2003). La planta Q4205 fue seleccionada de una progenie resultante de la autofecundación del genotipo Q3664. Por otra parte, el genotipo C4-4X es un autotetraploide obtenido *in vitro* a partir de callos derivados de inflorescencias inmaduras de un genotipo diploide (sexual) natural tratados con colchicina (Quarin y col., 2001). El modo de reproducción de cada planta fue previamente determinado por estudios de óvulos seccionados teñidos con safranina y fast green, utilizando la técnica de clarificado de ovarios y observación de los sacos embrionarios por microscopía de contraste de interferencia diferencial (Young y col 1979) (Tabla I.1).

Se analizaron además, 16 plantas F₁ (8 plantas apomícticas y 8 plantas sexuales) derivadas del cruzamiento entre Q4188 (madre, sexual) y Q4117 (dador de polen, apomíctico). Estas plantas forman parte de una población de mapeo desarrollada por el Ing. Camilo L. Quarín y colaboradores en el Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE) - Facultad de Ciencias Agrarias, UNNE, Corrientes, Argentina y utilizada para la construcción de un mapa de ligamiento genético de la especie a nivel tetraploide (Stein y col., 2007). Los individuos F₁ fueron clasificados de acuerdo a su modo de reproducción en apomícticos (generan sacos embrionarios de tipo apospórico) o sexuales (producen exclusivamente sacos embrionarios meióticos) usando los marcadores moleculares de RAPD UBC243-377 y UBC259-1157, previamente detectados como completamente ligados al carácter aposporia en una población derivada de los mismos genotipos parentales por Martínez y col., (2003), y por análisis citoembriológicos en el momento de la antesis (Stein y col., 2004). Todas estas plantas experimentales corresponden a la colección de germoplasma del género *Paspalum* del Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE), Corrientes, Argentina, y Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario, Argentina.

Tabla 1.1: Identificación, origen y modo de reproducción de las accesiones de *Paspalum notatum* tetraploide.

Accesión	Origen (área de colección)	Modo de Reproducción
Q3775	Tamaulipas, México	Apomixis ^a
Q3776	Villa Tunari, región de Chapare, Bolivia	Apomixis ^a
Q4012	Tres Lagoas, Brasil	Apomixis ^b
Q4117	State of Río Grande do Sul, Brasil	Apomixis ^a
N160	Pedro Juan Caballero, Amambay, Paraguay	Apomixis ^b
Q4188	Experimental	Sexual ^c
Q4205	Experimental	Sexual ^c
C4-4x	Experimental	Sexual ^d

^aMartínez y col., (2001), ^bEspinoza y col., (2006), ^cQuarín y col., (2003), y ^dQuarín y col., (2001).

Análisis citogenético y viabilidad del polen

Para la realización de los análisis citogenéticos se recolectaron inflorescencias inmaduras (espiguillas blanquecinas dentro del tallo principal) de todas las accesiones listadas en la

Tabla I.1. Asimismo, se colectaron inflorescencias inmaduras de 8 progenies F_1 sexuales y 8 progenies F_1 apomícticas derivadas del cruzamiento entre Q4188 y Q4117. El material extraído fue fijado por 24 horas en una solución de etanol absoluto: ácido acético (3:1), posteriormente fue transferido a una solución de etanol 70% y finalmente fue almacenado a -20°C . Bajo la lupa se separaron las espiguillas del raquis y se disectaron las anteras. Las células madre del polen fueron analizadas en preparados obtenidos por aplastamiento y tinción con Carmín acético (Carmín 10 mg/ml, ácido acético 45%) y hechos permanentes con Terpentina de Venecia de acuerdo a lo descrito por Quarín y col. (1984). Se analizaron al menos 30 meiocitos por individuo en anafase I. Asimismo, se determinó el número de cromosomas presentes en las plantas F_1 , en el estadio de metafase I y anafase I.

Para el estudio de viabilidad de polen se cosechó polen maduro de cada individuo sexual y apomíctico, directamente sobre un portaobjeto conteniendo unas gotas del reactivo de Alexander (Alexander 1980). El colorante tiñe de manera diferencial los granos de polen viables (púrpura) y los no viables (translúcidos y verdes). Se analizaron en promedio 900 granos de polen maduro por planta. Todas las observaciones se llevaron a cabo utilizando un microscopio de transmisión de luz Nikon E200.

La comparación del número de anafases I normales y anormales, así como, la cantidad de polen viable y no viable presente en los genotipos sexuales y apomícticos, se realizó a través de una prueba de Chi-cuadrado. La correlación entre las proporciones de anafases anormales y el polen no viable fue evaluada usando el coeficiente r . Para este análisis, las proporciones fueron transformadas a arcoseno antes del análisis. Los valores de probabilidad (p-value) menores a 0,05 fueron considerados significativos. Para todos estos análisis se utilizó el programa Infostat (<http://www.infostat.com.ar>).

Hibridación *in situ* (FISH)

Preparados de células en meiosis

Se recolectaron inflorescencias inmaduras (espiguillas blanquecinas dentro del tallo principal) de los genotipos Q4188 (sexual) y Q4117 (apomíctico). Se fijaron por 24 horas en una solución de etanol absoluto: ácido acético (3:1) y luego se transfirieron a una solución de etanol 70%, para finalmente conservarlas a -20°C . Bajo la lupa se separaron las espiguillas del raquis y se disectaron las anteras.

Preparados de células en mitosis

Se recolectaron meristemas de raíz de los genotipos Q4117 y Q4188. Se los trató con α -bromonaftaleno durante 2 horas y luego se transfirieron a una solución de etanol absoluto: ácido acético (3:1) y se conservaron a -20°C .

En ambos casos, las paredes celulares fueron digeridas con una mezcla de enzimas que contiene citohelicasa 0,3% p/v, celulasa RS 0,3% p/v, pectinasa Y23 0,3% p/v en buffer citrato durante 40 minutos a 37°C . Después de dos lavados en agua el material vegetal fue transferido a un portaobjeto limpio. El material fue disgregado con una aguja fina, cubierta con ácido acético (45%). Las células fueron aplastadas (squash) y posteriormente se les retiró el cubreobjetos con CO_2 y fueron secadas en estufa a 37°C durante 24 horas. El clon de BAC 346H10 (1 ug) se marcó con DIG-11-dUTP utilizando un kit de marcación de RO-CHE (DIG-Nick Translation Mix, Catálogo #11745816910, Roche, Alemania) utilizando el protocolo del fabricante.

El pre-tratamiento de los preparados, la desnaturalización de los cromosomas y de la sonda, las condiciones para la hibridación *in situ* (hibridación de sondas de ADN contenidas en una concentración de 2,5-3,5 ng/ul), los lavados de post-hibridación, bloqueo y detección indirecta por anticuerpos conjugados a fluorocromos se realizaron de acuerdo a Moscone y col., (1996). El primer conjunto de anticuerpos fue ratón anti-biotina (Dakopatts, Dako, California, EE.UU.) y conejo anti-ratón, conjugado con isotiocianato de tetrametil-rodamina (TRITC) (Dakopatts) en PBS (0,13 mol/l de NaCl, 0,007 mol/L Na_2HPO_4 , 0,003 mol/l de NaH_2PO_4), 3% (m/v) de albúmina sérica bovina (BSA). Los preparados fueron teñidos y montados en un medio con Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, California, EE.UU.) que contiene 2 ug/ml de 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI). La contratinción con DAPI con posterioridad al FISH dio lugar a un patrón de bandeo C, con bandas de heterocromatina principales fluorescentes con mayor intensidad, ayudando así a la identificación de cromosomas (Moscone y col., 1996, 1999).

Los cromosomas fueron observados y fotografiados con un microscopio Leica DMLB de fluorescencia (Leica, Heerbrugg, Suiza) equipado con un ordenador con sistema de cámara digital. Las imágenes rojas y azules fueron capturadas en blanco y negro con filtros adecuados para TRITC y la excitación DAPI, respectivamente. Las imágenes digitales fueron pseudo-coloreadas y combinadas usando IM 1000 software de Leica, luego importados a Adobe Photoshop CS (Adobe, San José, California, EE.UU.) para su procesamiento final.

Resultados

Análisis de las configuraciones meióticas en anafase I y la viabilidad del polen en plantas tetraploides sexuales y apomícticas de *Paspalum notatum*

Se realizaron observaciones de las configuraciones cromosómicas en la anafase I de la meiosis durante la microsporogénesis de las accesiones apomícticas y los genotipos sexuales de la especie. En total se analizaron 335 meiocitos de las accesiones apomícticas y 124 de los genotipos sexuales (Tabla I.2). La presencia de irregularidades meióticas tales como cromosomas retrasados, puentes de cromatina y micronúcleos fueron contabilizadas en cada individuo de acuerdo a lo informado por Stein y col., (2004).

Tabla I.2: Análisis de las anafase I, la viabilidad del polen y modo de reproducción de las accesiones tetraploides de *Paspalum notatum*.

Accesión	Número Total de Células	Meiocitos con Anafases Normales (%)	Meiocitos con Anafases Anormales				Polen Viable	Óvulos con SEA (%)
			Total (%)	Crom. Rezagados	Puentes de Cromatina	Micro-núcleos		
Q3775 ^a	93	62 (66.7)	31 (33.3)	16	2	13	73.6	87.0 ^c
Q3776 ^a	32	14 (43.8)	18 (56.2)	11	1	6	nd	85.0 ^c
Q4012 ^a	126	67 (53.2)	59 (46.8)	12	18	29	61.2	100.0 ^d
Q4117 ^{a*}	40	24 (60.0)	16 (40.0)	9	-	7	64.4	92.0 ^c
N160 ^a	44	24 (54.5)	20 (45.5)	6	6	8	59.6	50.0 ^d
Q4188 ^{b*}	40	28 (70.0)	12 (30.0)	7	-	5	77.6	0.0 ^e
Q4205 ^b	40	30 (75.0)	10 (25.0)	8	1	1	61.2	0.0 ^e
C4-4x ^b	44	29 (66.0)	15 (34.0)	14	1	-	79.1	0.0 ^f

^a apospóricos; ^s sexuales; ^{c, d, e y f} de acuerdo a: Martínez y col., 2001; Espinoza y col., 2006; Quarin y col., 2003 y Quarin y col., 2001, respectivamente. ^{*}parentales de la población F₁ segregante para la aposporia generada por Stein y col., (2004). SEA: saco embrionario apospóricos.

En ambos grupos de plantas, se observaron meiocitos con anafases regulares, con una segregación normal de cromosomas homólogos hacia los polos (Figura I.1a). En promedio las accesiones apomícticas y sexuales presentaron un 55,6 % y 70,3 % de células en anafase I con configuraciones normales, respectivamente. Sin embargo, en todos los individuos se observó algún tipo de irregularidad meiótica. Entre éstas observamos: cromosomas reza-

gados, separación temprana de cromátidas en univalentes, cromosomas rezagados, cromosomas enfrentados “cara a cara” en la placa ecuatorial y puentes de cromatina entre bivalentes (Figura I.1b-f). Los promedios de meiocitos con anomalías en anafase I en individuos apomícticos y sexuales fueron 44,4% y 29,7% respectivamente (Tabla I.2).

En la telofase I, ambos grupos de plantas mostraron cromosomas agrupados en los polos, con la presencia de micronúcleos. En su mayoría, los micronúcleos fueron pequeños sugiriendo que estos constituyen fragmentos cromosómicos (Figura I.1 g, h). Particularmente, la accesión apomíctica Q3775 y la Q4012 mostraron una alta frecuencia de células con cromosomas rezagados y micronúcleos. La accesión Q4012, también presentó el mayor número de células con puentes de cromatina (Tabla I.2). Es de destacar que si bien en las plantas sexuales, se observaron asimismo cromosomas rezagados, solo se observaron dos puentes de cromatina en todo el grupo analizado. Cabe señalar que en los genotipos sexuales, los cromosomas rezagados estaban localizados dispersos por el citoplasma, mientras que en las accesiones apomícticas, la mayoría de ellos se presentaron enfrentados “cara a cara” en la parte central de la célula, indicando una separación tardía de un bivalente (Figura I.1 i). Por otro lado, la proporción de meiocitos anormales detectados en los genotipos parentales (Q4117 y Q4188) fueron similares a los descritos por Stein y col. (2004), indicando que el comportamiento meiótico sería característico de cada genotipo.

La comparación del número de meiocitos con anafases I normales y anormales entre los genotipos sexuales y apomícticos fue significativamente diferente ($\chi^2 = 6.55$; $p = 0.01$). Estos resultados indican que los individuos apomícticos presentan un rearrreglo genético que estaría afectando la meiosis, y que estaría ausente en los genotipos sexuales obtenidos experimentalmente analizados en este trabajo.

Debido a que los rearrreglos cromosómicos pueden comprometer la viabilidad del polen (Quillet y col., 1995; Madlung y col., 2005), se realizó una evaluación cuantitativa de la producción de polen viable en ambos grupos de plantas. Un total de 7.677 y 6.201 granos de polen fueron analizados en plantas apomícticas y sexuales, respectivamente. En promedio, las accesiones apomícticas mostraron un 64,7% de polen viable, mientras que los genotipos sexuales presentaron un 72,6% de polen viable (Tabla I.2).

La comparación del número total de granos de polen viable y no viable entre ambos grupos reveló diferencias altamente significativas ($\chi^2 = 115$; $p < 0.001$). La incidencia de las anomalías meióticas sobre la viabilidad del grano de polen fue evaluada por el coeficiente de correlación (r) entre la frecuencia de meiocitos con anafases I normales y la fre-

cuencia de polen no viable. Los resultados obtenidos indican que existe una correlación positiva entre ambas variables en las accesiones apomícticas ($r= 0.71$; $r^2 = 0.50$) y una relación negativa en los genotipos sexuales ($r= -0.93$; $r^2 = 0.86$).

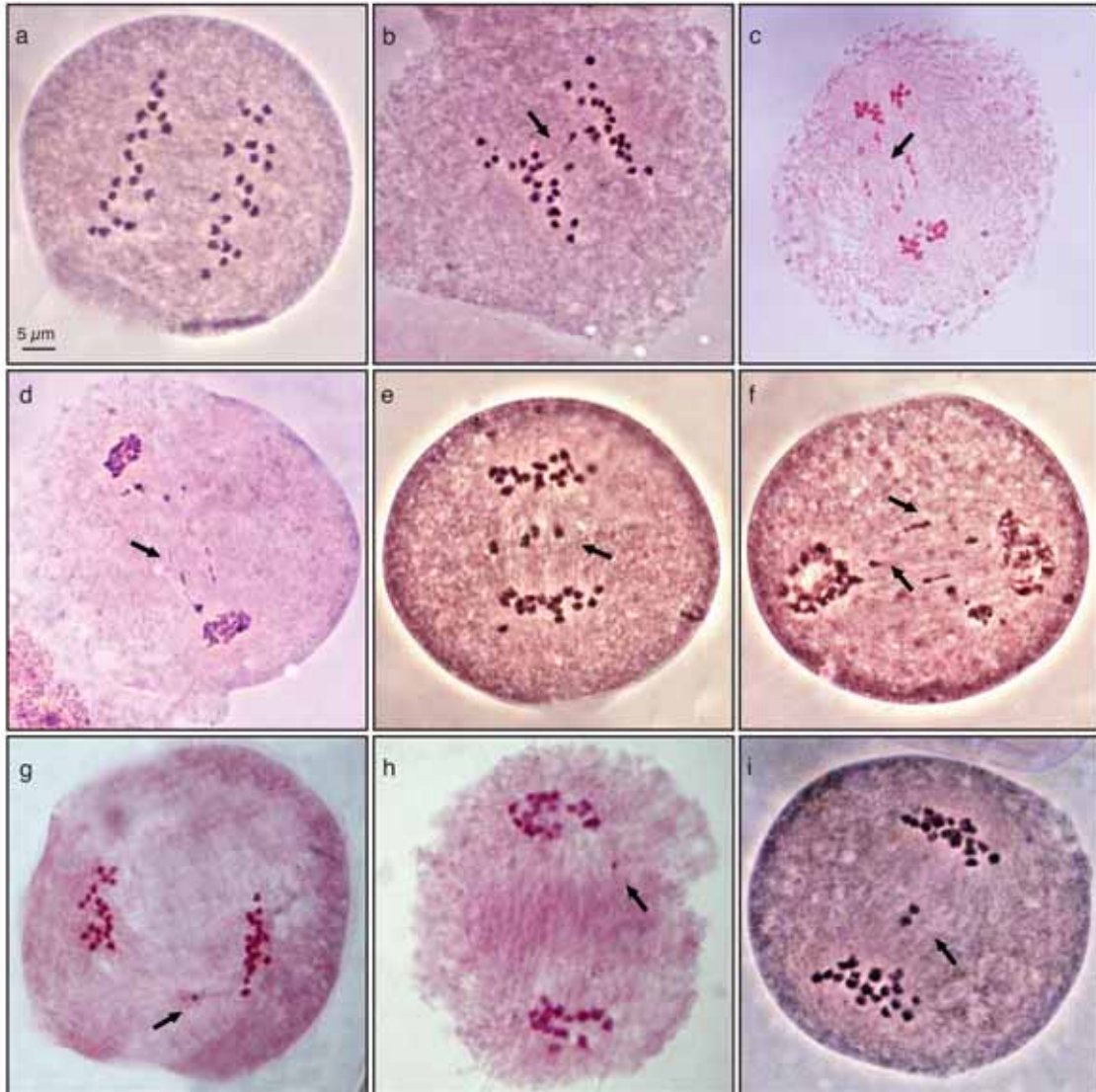


Figura 1.1: Comportamiento meiótico en razas tetraploides de *Paspalum notatum* apospórico y sexual. a) Anafase I en el genotipo sexual Q4188 mostrando una segregación cromosómica normal (20:20), b) anafase I con un puente de cromatina entre bivalentes (flecha) en la accesión apomíctica Q4117, c) y d) telofase I temprana con cromosomas rezagados y puentes de cromatina (flecha) en la accesión apomíctica Q4012, e) y f) anafase I y principios telofase I con cromosomas rezagados (flecha) en el genotipo Q3776, g) y h) meiocitos en telofase I temprana con presencia de micronúcleos (flecha) en el individuo Q3775; i) Anafase I con dos cromosomas rezagados que se encuentran enfrentados “cara a cara” en la parte central de la células en la accesión apomíctica Q3775.

Análisis de híbridos F₁ derivados del cruzamiento entre Q4188 x Q4117

Con el objetivo de observar las características de la anafase I de los meiocitos de híbridos apomícticos y sexuales, se tomaron 16 plantas F₁ (8 apomícticas y 8 sexuales) derivadas de la cruce entre el genotipo sexual Q4188 y el genotipo apomíctico Q4117. El número de cromosomas de cada individuo fue determinado en metafase I y anafase I. El conteo cromosómico confirmó la presencia de 40 cromosomas en cada individuo (Figura I.2 a-f). El análisis del comportamiento cromosómico en la metafase I mostró asociaciones típicas de autoploidos, tales como univalentes, bivalentes, trivalentes y cuadrivalentes (Figura I.2 a, b y c).

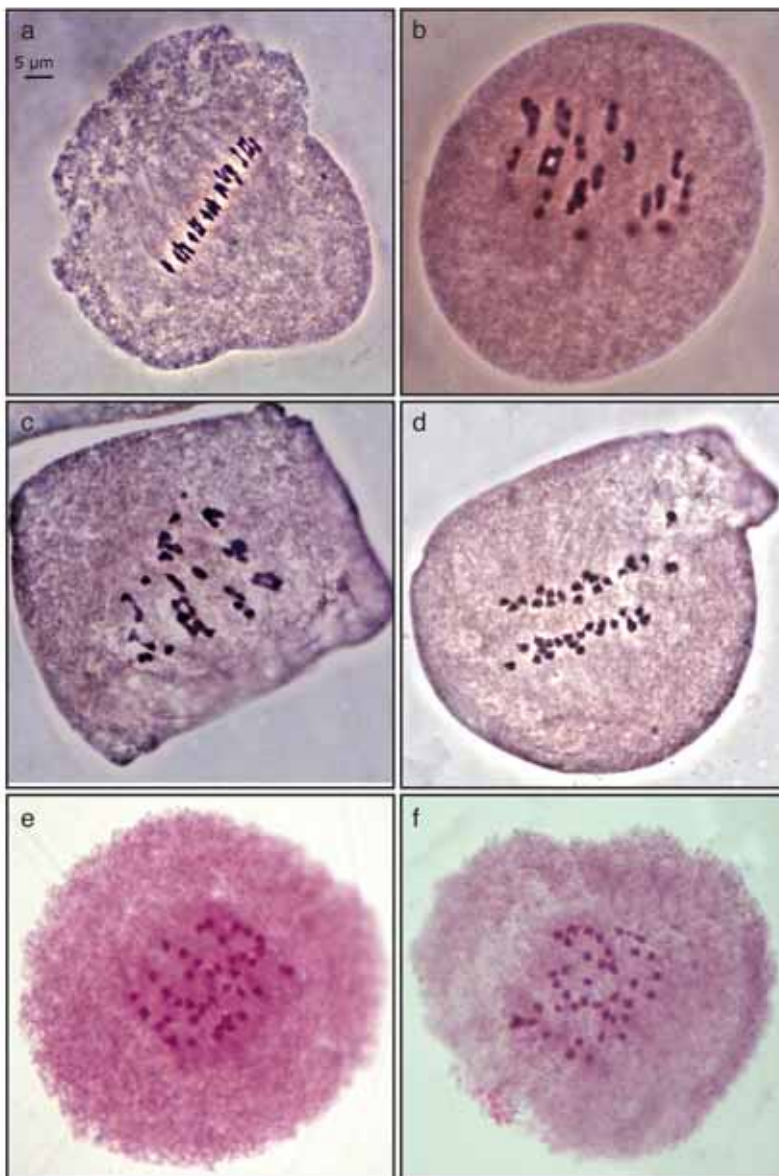


Figura I.2: Análisis citogenético de híbridos F₁ de *P. notatum*.

a) Metafase I mostrando 40 cromosomas dispuestos en configuraciones de bivalentes y multivalentes alineados en la región ecuatorial, b) y c) Metafase I con los 40 cromosomas asociados como univalentes, bivalentes, trivalentes y cuadrivalentes, d) anafase I temprana que muestra 40 cromosomas en la región ecuatorial, 20 cromosomas se desplazan a cada polo celular; e y f) células en anafases I aplastadas desde los polos, de las plantas F₁ # 19 (apospórica) y # 1 (sexual), que muestran 40 cromosomas, respectivamente.

El análisis de las configuraciones cromosómicas en la anafase I fue realizado sobre un total de 322 y 275 meiocitos apomícticos y sexuales respectivamente (Tabla I.3). Los híbridos apomícticos mostraron un 72% de células en anafases I anormales, mientras que las plantas sexuales presentaron un 41,5% (Tabla I.3). Llamativamente, el conjunto de las progenies apomícticas mostró una proporción de anormalidades mayor a la observada en el progenitor apomíctico (Q4117) y el resto de las accesiones apomícticas naturales observadas. La comparación del número total de células en anafase I normales y anormales de los híbridos F₁ sexuales y apomícticos, reveló diferencias altamente significativas entre ambos grupos ($\chi^2 = 73.0$; $p < 0.001$). Estos resultados sugieren que los híbridos apomícticos han probablemente heredado el rearrreglo cromosomal observado en el parental apomíctico y por lo tanto ellos presentan un aumento en el número de anormalidades meióticas con respecto a los híbridos sexuales.

Tabla I.3: Análisis de las anafases I, viabilidad del polen y modo de reproducción de los híbridos de *Paspalum notatum* tetraploide.

Accesión	Número Total de Células	Meiocitos con Anafases Normales (%)	Meiocitos con Anafases Anormales				Polen Viable	Óvulos con SEA (%)
			Total (%)	Crom. Rezagados	Puentes de Cromatina	Micronúcleos		
#9 ^a	33	8 (24.2)	25 (75.8)	9	4	12	78.0	90.0
#19 ^a	94	18 (19.1)	76 (80.9)	48	1	27	78.1	80.0
#23 ^a	32	8 (25.0)	24 (75.0)	11	0	13	66.1	85.0
#27 ^a	58	24 (41.4)	34 (58.6)	7	4	23	78.1	80.0
#40 ^a	13	6 (46.2)	7 (53.8)	1	1	5	-	70.0
#74 ^a	39	10 (25.6)	29 (74.3)	22	2	5	73.7	65.0
#86 ^a	19	6 (31.6)	13 (60.4)	5	3	5	84.7	80.0
#112 ^a	34	4 (11.8)	30 (88.2)	15	8	7	75.8	95.0
#1 ^b	53	25 (47.1)	28 (52.8)	26	2	0	75.0	0.0
#5 ^b	6	6 (100)	0 (0.0)	0	0	0	70.7	0.0
#47 ^b	51	30 (58.8)	21 (41.2)	16	2	3	75.5	0.0
#55 ^b	6	1 (16.7)	5 (83.3)	4	0	1	82.1	0.0
#77 ^b	11	5 (45.5)	6 (54.5)	6	0	0	77.6	0.0
#83 ^b	33	14 (42.4)	19 (57.6)	11	2	6	83.6	0.0
#88 ^b	109	81 (74.3)	28 (25.7)	16	3	9	69.3	0.0
#108 ^b	6	5 (83.3)	1 (16.7)	1	0	0	79.2	0.0

^a apomíctico ^b sexual

El análisis de la viabilidad del polen en las plantas F_1 fue llevado a cabo observando un total de 10.516 y 13.556 granos de polen de híbridos apomícticos y sexuales, respectivamente. Los individuos presentaron, en promedio un porcentaje de 76,3% para los genotipos apomícticos y 76,6% para los individuos sexuales. La comparación del número total de granos de polen viables y no viables entre los híbridos apomícticos y sexuales no mostró diferencias significativas entre los grupos ($\chi^2 = 1.8$; $p < 0.179$). Un análisis de correlación entre las proporciones de células en anafase I anormales y los granos de polen no viables indicó que no existe correlación entre ambas variables, tanto en los genotipos apomícticos ($r = 0.23$, $r^2 = 0.05$) como en los sexuales ($r = -0.68$; $r^2 = 0.46$).

Análisis de Hibridación *in situ* (FISH)

Las observaciones de los cromosomas teñidos con DAPI mostraron figuras típicas de preparados en metafase y marcaron numerosas regiones heterocromáticas densamente teñidas en azul en sectores pericentroméricos. Los resultados de la hibridación FISH con el clon de BAC 346H10 que contiene secuencias 100% ligadas al locus responsable de la aposporía en *Paspalum simplex*, sobre cromosomas en meiosis del genotipo Q4117 se muestran en la figura I.3. Como se puede apreciar no hay presencia de hibridaciones inespecíficas (Figura I.3 a-f). Sobre los cromosomas en metafase I de los meiocitos analizados, se observa que la región de mayor hibridación se produce sobre dos cromátidas hermanas presentes en un bivalente, en regiones adyacentes a zonas de heterocromatina (Figura I.3 a, b, c y d). Asimismo, fue posible distinguir otras señales de hibridación de menor intensidad a lo largo de los demás cromosomas, lo cual puede interpretarse como la hibridación de las secuencias repetitivas presentes en el clon de BAC (Figura I.3 b, c y d). En el estadio de anafase I, se destaca la segregación de uno de estos cromosomas hibridados hacia uno de los polos (Figura I.3 e y f).

A partir de los resultados obtenidos en los experimentos de hibridación FISH sobre meiocitos del genotipo Q4117 pueden extraerse tres conclusiones fundamentales: (1) el ACL se encuentra en dos cromátidas hermanas de un bivalente, (2) localizado en la región distal de un cromosoma, próximo a regiones heterocromáticas, (3) el cual segrega a un único polo en la anafase I.

La hibridación sobre el genotipo sexual, en las mismas condiciones experimentales, no mostró hibridaciones significativas por lo cual no fue posible determinar la existencia de se-

cuencias homólogas en esta raza. Esto confirmaría el carácter hemicigota de la región analizada.

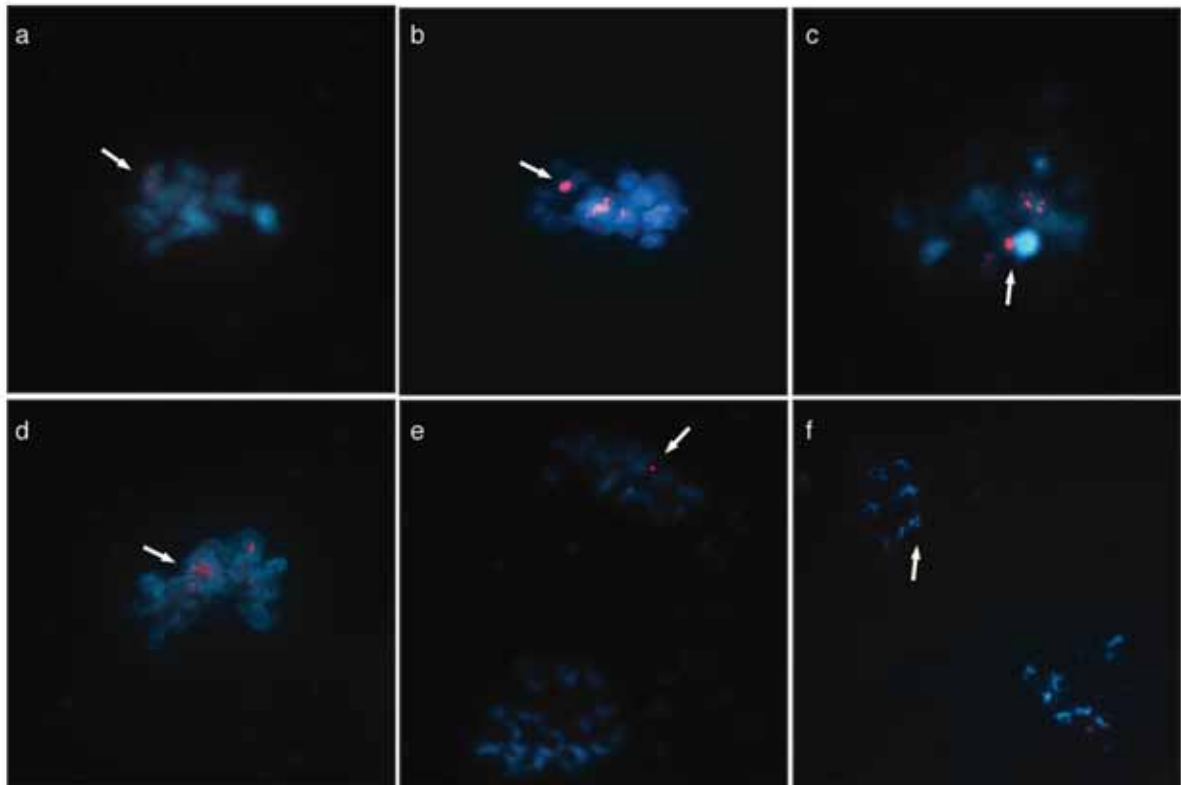


Figura 1.3. Análisis de hibridación *in situ* fluorescente de preparados en meiosis del genotipo apomíctico Q4117. Los cromosomas se tiñeron con DAPI (azul). Los bloques fluorescentes brillantes corresponden a las regiones de heterocromatina. La señal dada por el clon de BAC 346H10 se muestra de color rojo. Obsérvese la ausencia de señales de fondo. a) Metafase I, se manifiesta una hibridación en dos cromátidas hermanas de un bivalente (flecha); b, c y d) Metafase I, se observa una fuerte hibridación sobre un bivalente y otras regiones más débiles también hibridadas, posiblemente debido a que la sonda contiene secuencias repetitivas; e y f) Anafase I, se observa hibridación solo en uno de los polos y sobre un único cromosoma.

Discusión

En este capítulo se evaluaron las anomalías meióticas presentes en la anafase I y la viabilidad del polen en cinco accesiones apospóricas y tres genotipos completamente se-

xuales de *P. notatum*. Además, se analizaron 16 híbridos F₁ clasificados por su modo de reproducción para determinar si estas anomalías meióticas se transmiten asociadas al modo de reproducción. Por otro lado, se realizaron experimentos de hibridación *in situ* (FISH) con la finalidad de localizar el ACL en el genoma de *P. notatum*.

Los resultados obtenidos indicaron que las accesiones apospóricas naturales presentan un mayor número de células con anomalías meióticas en anafase I y menor viabilidad del polen que los genotipos sexuales. Particularmente, es interesante observar que en las accesiones apospóricas, estas variables están correlacionadas positivamente, indicando que las anomalías detectadas podrían ser las responsables de la menor viabilidad del polen que presentan estas plantas. Un comportamiento meiótico similar y una baja viabilidad del polen fue descrito en genotipos apomícticos tetraploides de *Brachiaria brizantha* Stapf y *Brachiaria decumbens* Stapf (Mendes-Bonato y col., 2002a; Mendes-Bonato y col., 2002b).

La mayoría de los meiocitos anormales presentaron cromosomas rezagados y puentes de cromatina confirmando las observaciones informadas por Stein y col., (2004). La presencia de puentes de cromatina junto a fragmentos (micronúcleos) es una evidencia indirecta de la existencia de inversiones (Brown 1972), por lo tanto el gran número de anomalías meióticas encontrado en las accesiones apospóricas podría ser debido a una estructura cromosómica aberrante que está ausente en los genotipos sexuales analizados. Debido a que las accesiones tetraploides estudiadas en este trabajo se encuentran extensamente esparcidas geográficamente, esta estructura parecería estar conservada en individuos originados sobre toda el área de distribución de la especie. La ausencia de este rearrreglo cromosomal en los genotipos tetraploides sexuales puede ser explicada por el origen de estas plantas. El genotipo Q4188 fue generado a partir de la cruce entre los genotipos Q3664 x Q3853. El parental Q3664 se originó a partir de la cruce entre una planta tetraploide sexual (PT-2), inducido a través de un tratamiento por colchicina de un genotipo diploide sexual (*Paspalum notatum* var. *saurae*), y un individuo altamente sexual de estigmas blancos (WSB) (Quarin y col., 2003). La planta Q4205 fue seleccionada de una progenie resultante de la autofecundación del genotipo Q3664. Por otra parte, el genotipo C4-4X es un autotetraploide obtenido *in vitro* a partir de un callo tratado con colchicina generado a partir de inflorescencias jóvenes de un genotipo diploide sexual natural (Quarin y col., 2001). Por lo tanto, es muy probable que estos genotipos no hayan recibido el cromosoma que contiene el rearrreglo (inversión o traslocación) que está presente en las accesiones tetraploides apomícticas naturales y, por lo tanto, presenten solo algunas anomalías cromosómicas propias de su condición poliploide. Esto explicaría también el modo de reproducción completa-

mente sexual de estos genotipos, si se asume que los determinantes de la apomixis están presentes en el cromosoma aberrante.

El análisis de la progenie F_1 corroboró las diferencias encontradas entre los genotipos apomícticos y sexuales, ya que los híbridos apospóricos presentaron una mayor cantidad de meiocitos con anormalidades meióticas que lo observado en los híbridos sexuales. Inclusive, los híbridos apospóricos exhibían un mayor número de anormalidades que sus progenitores apospóricos. Este hecho puede ser debido a la fusión de los genomas femenino y masculino durante la formación del híbrido, lo cual podría disminuir la posibilidad de un apareamiento regular de cromosomas. Resultados similares se han obtenido en híbridos interespecíficos generados entre un genotipo sexual de *Brachiaria ruziziensis* Germain y Evrad y un genotipo tetraploide apomíctico de *B. brizantha* (Felismino y col., 2010).

El análisis del polen, en accesiones naturales y genotipos sexuales, confirmó la idea de que las aberraciones meióticas en genotipos apospóricos podrían afectar la viabilidad del polen. Sin embargo, esta idea no fue comprobada en los híbridos apomícticos, los cuales, a pesar de tener una cifra mayor de anormalidades meióticas que su contraparte sexual, poseían una viabilidad de polen similar. Incluso, no se observó una correlación significativa entre las anormalidades meióticas y la viabilidad del polen en los híbridos. Mendes-Bonato y col. (2009) obtuvieron resultados similares al observar una falta de correlación al analizar las anormalidades meióticas y la viabilidad del polen en *B. brizantha*. Estos resultados podrían indicar que, además del comportamiento meiótico, son otros los factores involucrados en la producción de polen viable en estos híbridos.

De acuerdo con trabajos previos sobre las características y la herencia de la aposporía en *P. notatum* (Martínez y col., 2001, Martínez y col., 2003, Stein y col., 2004), nuestros datos aportan evidencias sobre la existencia de un rearrreglo cromosomal que podría estar asociado al/los determinantes de la aposporía en la especie. Este rearrreglo podría afectar el apareamiento cromosómico durante la meiosis y, así, ser responsable de las configuraciones anormales en la anafase I y telofase I, y de la baja viabilidad del polen, detectada en los individuos apospóricos analizados. Una estructura cromosómica de este tipo podría también explicar la segregación distorsionada y la ausencia de recombinación alrededor del locus responsable de la aposporía reportada en la especie (Martínez y col., 2001, Stein y col., 2004). Por otro lado, estudios de citogenética y de mapeo comparativo sugieren que el locus responsable de la apomixis está localizado en un cromosoma híbrido formado por segmentos de los cromosomas 2 y 12 de arroz (Pupilli y col., 2004, Stein y col 2004; Stein y col 2007). Esta estructura, podrían causar anormalidades meióticas y consecuentemente, ga-

metas no viables. Trabajos recientes, muestran que varios marcadores moleculares están completamente ligados a la aposporía en diversas especies originarias de diferentes regiones geográficas, indicando que esta región genómica está altamente conservada en biotipos naturales (Rebozzio y col., 2012).

En consecuencia, la transmisión de la aposporía a través del polen en *P. notatum* sólo se podría producir a través de meiocitos que recibieron el cromosoma portador del carácter, luego de haber recombinado en sectores por fuera del sector que controla la aposporía (ACL) y por lo tanto, luego de recibir este segmento específico del cromosoma intacto. Las gametas resultantes de la recombinación dentro del bloque serían no viables, ya que los eventos de recombinación que involucran este tipo de rearrreglo (inversión o incluso algún tipo particular de traslocación) generarían gametas no viables (Brown 1972). No existe evidencia que apoye esta hipótesis aún, pero experimentos de hibridación *in situ* (FISH) llevados a cabo con los clones BAC que contienen las secuencias asociadas con la aposporía en *P. simplex* mostraron que el locus que controla la aposporía se encuentra adyacente a un quiasma en las cromátidas no apareadas de un bivalente (Calderini y col., 2006).

Experimentos tendientes a proporcionar información sobre la localización cromosómica del ACL en *P. notatum* y determinar si el segmento cromosómico que lleva la aposporía está realmente involucrado en los reordenamientos genéticos que afectan a la meiosis de los individuos apospóricos fueron llevados a cabo en el presente Capítulo posibilitando la localización de la región responsable de la aposporía en un genotipo tetraploide apomíctico de *P. notatum* (Q4117) sobre los cromosomas en meiosis. Experimentos similares sobre el genotipo sexual no arrojaron señales significativas. Se ha demostrado que el locus apo se encuentra en hemიცигosis en especies de *Pennisetum* y *Cenchrus*, (Goel y col., 2003, Akiyama y col., 2004, Akiyama y col., 2005, Akiyama y col., 2011) y en *P. simplex* (Calderini y col., 2006). Akiyama y col., en 2011 distinguen una fuerte hibridación a través de un clon de BAC asociado a la aposporía en tan solo un cromosoma de la mayoría de las especies de *Pennisetum*. Asimismo, asegura que únicamente detecta esta hibridación en genotipos apomícticos, siendo completamente ausente en los genotipos sexuales. Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis, soportan la teoría de la hemიცигosis de este locus, postulada para la mayoría de las especies apospóricas, ya que los análisis de FISH utilizando una sonda de *P. simplex* revelan que el locus responsable de la aposporía en *P. notatum* se localiza en un único cromosoma.

Asimismo, si bien, no podemos distinguir en forma inequívoca la posición exacta del mismo en el cromosoma debido a la ausencia de marcadores de posiciones centroméricas y

teloméricas, sí fue posible distinguir que la localización del locus responsable de la aposporía se encuentra cercana a regiones de heterocromatina, las cuales se caracterizan por ser zonas de baja recombinación génica.

Estos resultados concuerdan con lo informado en otras especies hasta el momento. Los mismos aportan evidencias para explicar la presencia de un único cromosoma conteniendo la región responsable de la aposporía (hemicigosis) y la ausencia de recombinación en la zona debido a regiones de heterocromatina cercanas al mismo. Por otro lado, explicaría que la transferencia del cromosoma conteniendo el ACL sería suficiente para la transferencia del carácter a especies sexuales (Akiyama y col., 2004, Akiyama y col., 2005, Akiyama y col., 2011).

Una hecho particular que no ha sido indicado hasta el momento en otras especies, es la observación de la migración del cromosoma que lleva el locus responsable de la aposporía íntegro, solamente, hacia uno de los polos durante la anafase I de la microesporogénesis. Este hecho explicaría, en parte, la constitución genética de la apomixis postulada como un locus simplexo (Aaaa) y la segregación distorsionada de la aposporía, ya que se postula que una de las causas podría ser que solo aquellos granos de polen que contienen el cromosoma que lleva el locus responsable de la aposporía intacto (es decir, sin recombinación) pueden transmitir el carácter. Sin embargo, estudios más exhaustivos durante todo el desarrollo de la microesporogénesis deben realizarse para poder dilucidar esta incógnita.

Parte de los resultados presentados en este Capítulo fueron publicados en el artículo: Evaluation of meiotic abnormalities and pollen viability in aposporous and sexual tetraploid Paspalum notatum (Poaceae). Podio M, Siena L, Hojsgaard D, Stein J, Quarín CL, Ortiz JPA. Plant Syst Evol (2012) 298:1625-1633 (DOI 10.1007/s00606-012-0664-y).

Referencias

Akiyama Yukio, Wayne W. Hanna y Peggy Ozias-Akins (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. *Theor Appl Genet*: 111: 1042-1051.

Akiyama, Yukio, Conner, Joann A, Goel, Shailendra, Morishige, Daryl T, Mullet, John E, Hanna, Wayne W, Ozias-Akins, Peggy (2004). High-resolution physical mapping in *Pennisetum squamulatum* reveals extensive chromosomal heteromorphism of the genomic region associated with apomixis *Plant Physiology*: 134: 1733-1741.

Akiyama, Yukio, Goel, Shailendra, Conner, Joann A, Hanna, Wayne W, Yamada-Akiyama, Hitomi, Ozias-Akins, Peggy. (2011) Evolution of the apomixis transmitting chromosome in *Pennisetum*. *BMC Evolutionary Biology*, 11: 289-305.

Alexander MP (1980) Differential staining of aborted and non-aborted pollen. *Stain Technol.* 44:117-122

Bender J (2004) Chromatin-based silencing mechanisms. *Curr. Opin. Plant Biol* 7: 521-526.

Brown WV (1972) Inversions. In: Brown WV (ed) *Textbook of Cytogenetics*. Mosby Company, Saint Louis, pp 196-206

Calderini, Ornella, Chang, Song B, de Jong, Hans, Busti, Alessandra, Paolucci, Francesco, Arcioni, Sergio, De Vries, Sacco C, Abma-Henkens, Marleen H, Lankhorst, Renè M, Donnison, Iain S, Pupilli, Fulvio (2006). Molecular cytogenetics and DNA sequence analysis of an apomixis-linked BAC in *Paspalum simplex* reveal a nonpericentromere location and partial microcolinearity with rice. *Theor Appl Genet* 112: 1179 -1191

Dahmer N, Schifino-Wittmann MT, Dall'Agnol M, de Castro B (2008) Cytogenetic data for *Paspalum notatum* Flügge accessions. *Sci Agric* 65: 381-388

Delaney D, Nasuda S, Endo TR, Gill BS, Hulbert SH (1995) Cytologically based physical map of the group-3 chromosomes of wheat. *Theor Appl Genet* 91: 568-573.

Espinoza F, Daurelio LD, Pessino SC, Valle EM, Quarín CL (2006) Genetic characterization of *Paspalum notatum* accessions by AFLP markers. *Plant Syst Evol* 258: 147-159

Felismino MF, Pagliarini MS, do Valle CB (2010) Meiotic behavior of interspecific hybrids between artificially tetraploidized sexual *Brachiaria ruziziensis* and tetraploid apomictic *B. brizantha* (Poaceae). *Sci Agric* 67: 191-197

Goel S, Chen Z, Conner JA, Akiyama Y, Hanna WW, Peggy Ozias-Akins P (2003) Delineation by fluorescence in situ hybridization of a single hemizygous chromosomal region associated with aposporus embryo sac formation in *Pennisetum squamulatum* and *Cenchrus ciliaris*. *Genetics* 163: 1069-1082

Grossniklaus U (2001) From sexuality to apomixis: molecular and genetic approaches. In: Savidan Y, Carman JG, Dresselhaus T (eds) *The flowering of apomixis: from mechanisms to genetic engineering*. CIMMYT, IRS, Montpellier, European Community DG VI, Mexico City. pp. 168-211

Künzel G, Korzun L, Meister A (2000) Cytologically integrated physical restriction fragment length polymorphism maps for the barley genome based on translocation breakpoints. *Genetics*. 154: 397-412

Madlung A, Tyagi AP, Watson B, Jiang H, Kagochi T, Doerge RW, Martienssen R, Comai L (2005) Genomic changes in synthetic *Arabidopsis* polyploids. *Plant J* 41: 221-230

Martínez E, Acuña C, Hojsgaard DH, Tcach M, Quarín CL (2007) Segregation for sexual seed production in *Paspalum* as directed by male gametes of apomictic triploid plants. *Ann Bot* 100: 1239-1247

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

Martínez EJ, Urbani MH, Quarín CL, Ortiz JPA (2001) Inheritance of apospory in bahiagrass, *Paspalum notatum*. *Hereditas* 135: 9-25

Mendes-Bonato AB, Ferrari Felismino M, Souza Kaneshima AM, Pessim C, Calisto V, Pagliarini MS, Borges do Valle C. (2009) Abnormal meiosis in tetraploid genotypes of *Brachiaria brizantha* (Poaceae) induced by colchicine: its implications for breeding. *J Appl Genet* 50: 83-87

Mendes-Bonato AB, Junqueira-Filho RG, Pagliarini MS, Valle CB, Penteadó MIO (2002a) Unusual cytological patterns of microsporogenesis in *Brachiaria decumbens*: abnormalities in spindle and defective cytokinesis causing precocious cellularization. *Cell Biol Int* 26: 641-646

Mendes-Bonato AB, Pagliarini MS, Forli F, Valle CB, Penteadó, MIO (2002b) Chromosome number and microsporogenesis in *Brachiaria brizantha* (Gramineae). *Euphytica* 125: 419-425

Moscone EA, Klein F, Lambrou M, Fuchs J, and Schweizer D. (1999). Quantitative karyotyping and dual-color FISH mapping of 5S and 18S-25S rDNA probes in the cultivated *Phaseolus* species (Leguminosae). *Genome* 42: 1224-1233.

Moscone EA, Matzke MA, and Matzke AJM (1996). The use of combined FISH/GISH in conjunction with DAPI counterstaining to identify chromosomes containing transgene inserts in amphidiploid tobacco. *Chromosoma* 105: 231-236.

Nogler GA (1984) Genetics of apospory in apomictic *Ranunculus auricomus*. V. Conclusion. *Botanica Helvetica* 94: 411-422

Ortiz JPA, Pessino SC, Leblanc O, Hayward MD y CL Quarin (1997) Genetic fingerprinting for determining the mode of reproduction in *Paspalum notatum*, a subtropical apomictic forage grass. *Theor Appl Genet* 95: 850-856.

Ozias-Akins Peggy, D Roche and W Hanna (1998). Tight clustering and hemizyosity 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. *Proc. Natl . Acad. Sci . USA*. 95: 5127-5132.

Pessino SC, Ortiz JPA, Leblanc O, Do Valle CB, Evans C, Hayward MD (1997). Identification of a maize linkage group related to apomixis in *Brachiaria*. *Theor Appl Genet*. 94 : 439-444

Pupilli F, Martínez EJ, Busti A, Calderini O, Quarin CL, Arcioni S (2004) Comparative mapping reveals partial conservation of synteny at the apomixis locus in *Paspalum* spp. *Mol Genet Genomics* 270: 539-48

Pupilli F, Labombarda P, Caceres ME, Quarín CL, Arcioni S (2001) The chromosome segment related to apomixis in *Paspalum simplex* is homoeologous to the telomeric region of the long arm of rice chromosome 12. *Molecular Breeding* 8: 53-61.

Quarin CL, Burson BL, Burton GW (1984) Cytology of intra and interspecific hybrids between two cytotypes of *P. notatum* and *P. cromyorrhizon*. *Bot Gaz* 145: 420-426

Quarin CL, Espinoza F, Martinez EJ, Pessino SC, Bovo OA (2001) A rise of ploidy level induces the expression of apomixis in *Paspalum notatum*. *Sex Plant Reprod* 13: 243-249

Quarin CL, Urbani MH, Blount AR, Martínez EJ, Hack CM, Burton GW, Quesenberry KH (2003) Registration of Q4188 and Q4205, sexual tetraploid germplasm lines of Bahiagrass. *Crop Sci.* 43: 745-746

Quillet MC, Madjidian N, Griveau Y, Serieys H, Tersac M, Lorieux M, Bervilld A (1995) Mapping genetic factors controlling pollen viability in an interspecific cross in *Helianthus* sect. *Helianthus*. *Theor Appl Genet* 91: 1195-1202

Rebozzio RN, Rodriguez MP, Stein J, Ortiz JPA, Quarin CL, Espinoza F (2012) Validation of molecular markers linked to apospory in tetraploid races of bahiagrass, *Paspalum notatum* Flüggé. *Mol Breeding* 29: 189-198

Sherman JD, Stack SM (1995) Two dimensional spreads of synaptonemal complexes from solanaceous plants VI. High resolution recombination nodule map of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Genetics* 141: 683-708.

Stein J, Pessino SC, Martinez EJ, Rodriguez MP, Siena LA, Quarin CL, Ortiz JPA (2007) A genetic map of tetraploid *Paspalum notatum* Flüggé. (bahiagrass) based on single-dose molecular markers. *Mol Breeding* 20: 153-166

Stein J, Quarin CL, Martínez EJ, Pessino SC, Ortiz JPA (2004) Tetraploid races of *Paspalum notatum* show polysomic inheritance and preferential chromosome pairing around the apospory-controlling locus. *Theor Appl Genet* 109: 186-191

Young BA, Sherwood RT, Bashaw EC (1979) Cleared-pistil and thick-sectioning techniques for detecting aposporous apomixis in grasses. *Can J Bot* 57: 1668-1672

CAPÍTULO II:

AISLAMIENTO Y ESTUDIOS DE EXPRESIÓN DE SECUENCIAS HOMÓLOGAS A GENES ASOCIADOS A LA AOSPORÍA DE *PASPALUM NOTATUM*

Resumen

El objetivo de este trabajo fue aislar y estudiar la expresión relativa de los genes *SERK* y *EXS* de *P. notatum* para determinar su relación con la apomixis en la especie. En el caso de los genes *SERK*, se diseñaron cebadores a partir de regiones conservadas de los genes *SERK* de *Poa pratensis* (*PpSERK*), arroz (*OsSERK*) y maíz (*ZmSERK*). Inicialmente, se amplificó un fragmento de 200 pb a partir de los genotipos tetraploides Q4188 (sexual) y Q4117 (apomítico) de *P. notatum*. Posteriormente, mediante la utilización de una estrategia de caminata cromosomal se extendió la secuencia inicial hacia ambos extremos obteniéndose un fragmento de 711 pb. El mismo resultó similar a los exones 9 y 10 del gen *PpSERK*. Experimentos de Southern-blot con este fragmento indicaron la presencia de por lo menos tres copias de *PnSERK* en ambos genotipos analizados. Sucesivas caminatas cromosomales permitieron el aislamiento de dos secuencias genómicas: *PnSERK1* (1750 pb) y *PnSERK2* (2050pb) que cubren aproximadamente el 80% de las secuencias conocidas de arroz y maíz. Estas secuencias mostraron una alta similitud de secuencia con *PpSERK1* y *ZmSERK2*, respectivamente y corresponderían a diferentes miembros de la familia de genes *SERK*. Los estudios de filogenia indicaron que *PnSERK2* agrupa con genes *SERK* previamente relacionados con la embriogénesis somática: *AtSERK1/2*, *ZmSERK*, *DcSERK*, entre otros, mientras que *PnSERK1* agrupa con *SbSERK1*, *OsBAIK* y *PpSERK1/2*. Análisis de expresión por PCR en tiempo real (qRT-PCR) a partir de ARNm extraído de inflorescencias de Q4117 y Q4188 a diferentes estadios del desarrollo mostraron que el *PnSERK2* presenta niveles de expresión superiores a *PnSERK1* en ambos genotipos. En Q4188, *PnSERK2* presentó dos picos de expresión en los estadios de meiosis y antesis. En Q4117, los niveles de expresión de *PnSERK2* se mantuvieron constantes en premeiosis, meiosis y postmeiosis, y disminuyeron en antesis. Se detectaron diferencias significativas en los niveles de expresión relativa de *PnSERK2* entre Q4117 y Q4188 en los estadios de premeiosis, postmeiosis y antesis. Para el *PnSERK1* solo se observaron diferencias significativas en el estadio de antesis. Mediante la realización de experimentos de hibridación *in situ* de tejidos se determinó que el gen *PnSERK2* se expresa en las células madre de la megáspora en el genotipo

sexual y, en células de la nucela en el genotipo apomítico. No pudo detectarse expresión de *PnSERK1* con esta técnica en ninguno de los estadios analizados. A partir de las secuencias de *PnSERK1* y *PnSERK2* se realizaron experimentos de SCAR y CAPS (con 12 enzimas de restricción) sobre el ADN genómico de Q4188 y Q4117 a fin de detectar polimorfismos que posibiliten su localización en el mapa genético de la especie. En ninguno de los experimentos realizados pudo detectarse variantes alélicas entre los genotipos. Los resultados obtenidos en este trabajo indican que las razas tetraploides de *P. notatum* contienen al menos 2 genes de la familia *SERK*, uno de los cuales (*PnSERK2*) presenta una expresión significativamente diferente entre el genotipo sexual Q4188 y el genotipo apomítico Q4117, en los estadios de premeiosis, postmeiosis y antesis y una localización de su expresión contrastante entre los genotipos con diferentes modo de reproducción. Siguiendo una estrategia similar a la descrita anteriormente para los genes *SERK*, se aisló un fragmento de 2298 pb con alta homología al gen *EXS* de arroz y maíz ,del genotipo sexual Q4188 y del genotipo apomítico Q4117. Análisis de homología determinaron que ambos fragmentos resultaron prácticamente idénticos (ID 99%), por lo cual se trabajó con una secuencia consenso. Estudios de filogenia molecular mostraron que *PnEXS* presenta alta similitud con varios genes *EXS* y que agrupa junto a aquellos pertenecientes al género de las gramíneas. El mismo contendría los exones 4 al 10, interrumpidos por los correspondientes intrones. El análisis por Southern blot utilizando esta secuencia como sonda reveló la presencia de entre 2 y 4 copias del mismo en el genoma de *P. notatum*. Los estudios de expresión por qRT-PCR, no mostraron diferencias significativas entre los genotipos sexuales y apomíticos en los distintos estadios del desarrollo reproductivo. Sin embargo, estudios de hibridación *in situ* de tejido mostraron una posición espacial diferencial entre los genotipos con distinto modo de reproducción: la expresión de *EXS* fue observada en todo tejido ovárico del genotipo sexual mientras que solo fue detectada en unas pocas células que rodean los sacos embrionarios del genotipo apomítico. Estos resultados indicarían una regulación diferente en estos genotipos. El análisis de mapeo *in silico*, indicó que la secuencia aislada es ortóloga a genes *EXS* de arroz y maíz, presentes en una posición distal del brazo largo del cromosoma 12 de arroz y en una región pericentromérica en los cromosomas 1 y 3 de maíz, lo cual es coincidente con regiones que ya han sido reportadas como asociadas a la aposporía en otras especies. Estudios de mapeo genético en *P. notatum*, lograron localizar una de las copias del gen *PnEXS* en el grupo de ligamiento LgM6a del genotipo apomítico Q4117 y otra sobre el grupo de ligamiento LgM17a, a aproximadamente 23 cM del locus responsable de la aposporía, lo cual indicaría que serían copias no relacionadas a la aposporía.

Introducción

La percepción y la transducción de estímulos externos son esenciales para el crecimiento y desarrollo de organismos multicelulares. Uno de los grupos más importantes de receptores de superficie celular son aquellos del tipo quinasas (RLKs). Sus características estructurales propias los hacen particularmente adecuados para la señalización de célula a célula. Un RLK típico contiene un dominio extracelular capaz de percibir una señal específica, un dominio transmembrana para anclar la proteína dentro de la membrana, y un dominio citoplasmático quinasa para transferir la señal a través de la autofosforilación, seguida por la fosforilación adicional de substratos específicos (Gou y col., 2010). Originalmente, en plantas, se llamo a los RLKs (*receptor like kinases*): “receptores similares a proteínas quinasa”, ya que los ligandos de estos receptores eran en gran parte desconocidos (Walker y Zhang, 1990). Desde entonces, un pequeño número de RLKs han sido caracterizados funcionalmente en plantas y unos pocos ligandos específicos han sido identificados. Se ha demostrado que estos tipos de receptores juegan un papel esencial en el crecimiento, el desarrollo, la resistencia a patógenos y la muerte celular en plantas (Gou y col., 2010).

Los RLKs de plantas fueron clasificados inicialmente como serina/treonina quinasas (Horn y Walker, 1994), pero estudios más recientes indicaron que algunos RLKs pueden tener conjuntamente actividad serina/treonina y tirosina quinasa (Oh y col., 2009). El genoma de *Arabidopsis* codifica al menos 610 RLKs y receptores del tipo quinasas citoplasmáticos (RLCKs), que carecen de dominios extracelulares. Los RLKs y RLCKs pertenecen a una gran superfamilia monofilética, que representa casi el 2,5% de las proteínas codificadas en el genoma de *Arabidopsis* (La Iniciativa Genoma de *Arabidopsis*, 2000; Shiu y Bleecker, 2001). Sobre la base de su secuencia y similitudes estructurales, los RLKs fueron clasificados en más de 10 subfamilias, entre las cuales podemos mencionar: los RLKs ricos en repeticiones de leucina (LRR-RLKs), que pertenecen a la subfamilia más grande con al menos 223 miembros (Gou y col., 2010; Li 2010). Alrededor de dos tercios de los genes en esta superfamilia codifican proteínas con un péptido señal típico N-terminal y un dominio transmembrana hidrofóbico, que son características estructurales típicas de RLKs transmembrana.

A pesar de la identificación de un gran número de LRR-RLKs en *Arabidopsis thaliana*, las funciones biológicas han sido definidas sólo para 30 proteínas (Gou y col., 2010), que se desempeñan en una variedad de procesos fisiológicos. Por ejemplo, *ERECTA* (ER), regula la forma de órganos y la arquitectura de la inflorescencia (Torii y col., 1996); *CLAVATA 1* (CLV1) determina el balance entre las células meristemáticas indiferenciadas y diferencia-

das de los brotes y flores (Clark y col., 1997); BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 1 (BRI1) y BRI1-ASSOCIATED RECEPTOR KINASE 1 (BAK1) están involucrados en señalización por brasinoesteroides (BR) (Li y Chory, 1997; Li y col., 2002; Nam y Li, 2002); HAESA controla la abscisión de órganos florales (Jinn y col., 2000), FLAGELLIN-SENSITIVE 2 (FLS2) contribuye al reconocimiento de defensa de la planta por interacción planta/patógeno (Gómez-Gómez y Boller, 2000); VASCULAR HIGHWAY 1 (VH1) influye en los patrones de las células de la hoja (Clay y Nelson, 2002) y EXCESS MICROSPICYTES 1 (EMS1), SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1 (SERK1) y SERK2 juegan un papel importante en la microsporogénesis y la androesterilidad en *Arabidopsis thaliana* (Zhao y col., 2002; Albrecht y col., 2005; Colcombet y col., 2005). Otros LRR-RLKs de función conocida incluyen RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE 1 (RPK1), que participan en la señalización temprana por ácido abscísico (Hong y col., 1997; Osakabe y col., 2005); TOAD2 y su homólogo RPK1, son redundantes ya que ambos se requieren para la formación de patrones embrionarios en *Arabidopsis thaliana* (Nodine y col., 2007); PXY, es responsable del mantenimiento de la polaridad de tejido vascular (Fisher y Turner, 2007), y GASSHO1 (GSO1) y GASSHO2 (GSO2) son esenciales para el desarrollo normal de la epidermis de embriones en *Arabidopsis thaliana* (Tsuwamoto y col., 2008). Además, dos LRR-RLKs: BIR1 y SOBIR1, regularían la muerte celular y la inmunidad innata en *Arabidopsis thaliana* (Gao y col., 2009).

Curiosamente, se encontró que varios RLKs poseen funciones duales o múltiples durante el crecimiento de las plantas y el desarrollo. Por ejemplo, ERECTA está involucrado tanto en el desarrollo de las plantas como en las respuestas de defensa de patógenos (Godiard y col., 2003). BAK1 y BAK-LIKE 1 (BKK1) regulan el crecimiento de las células dependiente de brasinoesteroides, y desempeñan un papel importante en el control de la muerte celular bajo diversos estreses bióticos y abióticos. Cuando las plantas son atacadas por patógenos bacterianos, BAK1 también puede ser reclutado para el complejo FLS2 y regular así, la respuesta inmunitaria innata (Chinchilla y col., 2007; He y col., 2007; Heese y col., 2007; Kemmerling y col., 2007).

El gen *SERK* (*somatic embryogenesis receptor like kinase*) fue aislado por primera vez en zanahoria (*Daucus carota*) como un gen marcador de la transición de células somáticas a células embrionarias en cultivos celulares (Schmidt y col., 1997). En *Arabidopsis thaliana*, hay cinco homólogos de *DcSERK*, llamados *SERK1* al *SERK5* (Hecht y col., 2001). *SERK3* y *SERK4* fueron nombrados también como *BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 1 (BRI1) ASSOCIATED RECEPTOR KINASE 1 (BAK1)* y *BAK1-like1 (BKK1)*, debido a sus funciones en la vía de señalización de los BR (Li y col., 2002; Nam y Li, 2002; He y col., 2007). La familia de genes *SERK* tiene al menos tres miembros en el maíz (Baudino y col., 2001), trigo (Singla y

col., 2008) y *vid* (Maillot y cols. De 2009) y once miembros en arroz (Singla y col., 2009). Curiosamente, los miembros de la familia *SERK* mostraron tanto funciones superpuestas como divergentes (Albrecht y col., 2008). La identificación de los múltiples roles plantea cuestiones interesantes acerca de la especificidad funcional y el entrecruzamiento de las diferentes vías de señalización mediada por estos receptores (Li, 2010).

En los últimos años, la actividad *SERK* se asoció con los procesos apomícticos (Albertini y col., 2005). Un componente clave de la apomixis gametofítica es la formación de sacos embrionarios luego de una falla o sorteo de la meiosis de la célula arqueosporial (diplosporía) o directamente por mitosis a partir de célula somática del óvulo (aposporía). En ambos casos, se originan sacos embrionarios cuyos núcleos son no reducidos ($2n$), donde el embrión se desarrolla por partenogénesis independientemente de la fertilización de la célula huevo. Debido a que la expresión del o los genes *SERK* marca la transición entre células somáticas a células embriogénicas (Schmidt y col., 1997) se especula que la actividad de estos genes podría jugar un papel importante en varias especies apomícticas.

Tucker y col. (2003) estudiaron el homólogo a *AtSERK1* en *Hieracium* (una especie apomíctica apospórica) y encontraron el mismo patrón de expresión entre plantas sexuales y apomícticas. Los autores informaron de la presencia de transcriptos de ARNm de *HpSERK1-LIKE* desde el desarrollo temprano del óvulo hasta el desarrollo de las semillas (Tucker y col., 2003). Por otra parte, la transformación con una construcción *AtSERK1:GUS* en combinación con experimentos de hibridación *in situ* utilizando el gen *DcSERK1* como sonda antisentido, revelaron similares patrones espaciales y temporales de expresión, tanto en plantas sexuales como apomícticas (Tucker y col., 2003). Por el contrario, en *Poa pratensis* (apomíctica apospórica) se observó una actividad diferencial de genes *SERK* entre plantas apomícticas y sexuales (Albertini y col., 2004, Albertini y col., 2005). Albertini y col., (2004) caracterizaron 2.248 transcriptos expresados diferencialmente entre genotipos sexuales y apomícticos, de los cuales aproximadamente el 60% eran específicos de los órganos florales y/o participan en la megasporogénesis, el desarrollo del embrión, y de la semilla. El EST-6, de 181 nucleótidos de longitud, que se expresaba diferencialmente entre genotipos apomícticos y sexuales mostró una similitud altamente significativa con la secuencia de aminoácidos del gen *SERK1* de arroz (Albertini y col., 2004). Posteriormente, las secuencias genómicas completas y del DNAC de dos miembros del gen *SERK* (*PpSERK1* y *PpSERK2*) fueron aisladas y caracterizadas (Albertini y col., 2005). El patrón de expresión de los dos alelos fue casi idéntico en los genotipos apomícticos, pero difirieron marcadamente en los genotipos sexuales (Albertini y col., 2005). Sobre la base de estos estudios, los autores pos-

tularon que el patrón de expresión de *PpSERK* es compatible con un posible rol en la especificación de las células iniciales de la aposporía.

Una estrategia diferente para determinar los genes relacionados con la reproducción apomíctica es a través del estudio de genes localizados en la región cromosómica responsable del carácter. En varias especies de gramíneas apomícticas, se ha demostrado que la aposporía se hereda como un locus simple que presenta supresión de la recombinación. Desde un punto de vista evolutivo, se especula que los determinantes de la apomixis se presentan ligados en grandes regiones no recombinantes donde los genes implicados en su expresión (genes que controlan la apomeiosis, la partenogénesis y el desarrollo del endosperma) pueden mantenerse juntos y permitir la transferencia del carácter. Además, la organización estructural del bloque del cromosoma que lleva los genes de la apomixis (por ejemplo, la acumulación de elementos transponibles, elementos repetitivos y pseudogenes) hace que sea un locus complejo. (Pupilli y Barcaccia 2012). La comprensión de la estructura genética de estos bloques cromosómicos complejos no recombinantes podría proporcionar información clave sobre los genes que regulan al menos un componente de la apomixis gametofítica como la aposporía. En *P. squamulatum* (Akiyama y col., 2004), *C. ciliaris* (Conner y col., 2008) y *P. simplex* (Calderini y col., 2006, 2011) esta tarea se ha intentado por secuenciación de clones de BAC que contienen marcadores moleculares completamente ligados a la aposporía. En estas tres especies, se han hallado regiones que codifican proteínas, así como también un gran número de secuencias altamente repetitivas (Akiyama y col., 2004; Calderini y col., 2006, 2011). En particular en *P. simplex* (Calderini y col., 2006) se clonó un clon de BAC denominado 346H10 que contiene secuencias 100% ligadas a la aposporía. Un análisis detallado de este clon de BAC confirmó la presencia de elementos móviles repetitivos, entre los cuales podemos mencionar transposones del tipo ping/pong /SNOOPY, En/Spm y la subclase marineros, y retrotransposones relacionados a las subclases Ty3-gypsy y Ty1-copia. Además se detectaron dos genes que mostraron alta homología con un dominio proteico de la familia *EXS* y un dominio protein-quinasa (PKD). Un análisis comparativo con las bases de datos de arroz mostraron que estos genes eran similares a genes de *Oryza sativa* y que se localizaban sobre el genoma de arroz en la región distal del brazo largo del cromosoma 12 del mismo, junto a secuencias de marcadores de RFLP (C1069, C454, R2241) que ya han sido informados como 100% ligados a la aposporía en diferentes especies de *Paspalum* (Pupilli y col., 2004, Hosjgaard y col., 2011). Una de ellas, el R2241, presenta similitud de secuencia con el *EXS*. Una particularidad encontrada al secuenciar estos genes, fue la presencia de elementos transponibles interrumpiendo las secuencias codificantes (Calderini y col., 2006). Al realizar una comparación detallada de la estructura de los genes del *PsEXS* con la de *OsEXS*, se observó la supresión de algunos

exones de arroz y la pérdida de capacidad de codificación. Esto llevó a pensar que podrían tratarse de pseudogenes, sin capacidad de traducirse a proteínas (Calderini y col., 2006).

Hasta el presente no ha sido posible asignar un rol funcional del dominio *PKD* en la reproducción apomítica. Sin embargo, el gen *EXS* merece un estudio más detallado. La familia *EXS* es nombrada después de unificar los dominios: **ERD1/XPR1/SYG1**. La proteína *SYG1*, que contiene un dominio *EXS* C-terminal, fue descrita como una proteína de traducción de la señal asociada a proteínas G, en *Saccaromices cerevisiae* (Spain y col., 1995), la secuencia *XPR1*, se piensa que podrían tener un rol en los receptores del virus de leucemia murina (Battini y col., 1999), y las proteínas *ERD1* en *S. Cervisiae* están involucradas en la localización de proteínas en el retículo endoplasmático (Hardwick y col., 1990). En contraste con las proteínas *SYG1* y *XPR1*, que tienen tanto un dominio *SPX* como el dominio *EXS*, la mayoría de las proteínas en levadura que tiene uno de estos dominios no contiene el otro. En arábido, sólo los miembros de la familia *PHO1* poseen tanto un dominio *SPX* como un dominio *EXS*. La función del dominio *EXS* es aún desconocida, aunque podría estar implicado en el transporte o el censado de fosfato o en la clasificación de proteínas de endomembranas (Wang y col., 2004). En las proteínas *SYG1* se cree que el N-terminal participa en la transducción de la señal, mientras que la función del C-terminal también es desconocida aún. Esta región contiene varias hélices transmembrana. Las proteínas *SYG1* están involucradas en la traducción de la señal mediada por feromonas en levaduras, y se detectaron mutantes en las cuales la represión de esta proteína se asociaba al arresto del ciclo celular y la diferenciación (Spain y col., 1995). Los mismos autores proponen que una de estas mutantes deletéreas tienen la capacidad de promover la división celular en aquellas células que deberían estar arrestadas (células diferenciadas). En *P. simplex*, al comparar la estructura del gen *PsEXS* con el de arroz, se detectó la deleción de algunos de los exones y la pérdida de capacidad codificante (Calderini y col., 2006). Esto sugiere que el gen *PsEXS* en el genotipo apomítico presenta una forma truncada, dando lugar posiblemente a un mecanismo en el cual la existencia de copias de genes con rearrreglos involucrados en el desarrollo sexual podrían inducir la reprogramación de células diferenciadas en el proceso del desarrollo apomítico (Calderini y col., 2006).

Hipótesis

- Secuencias homólogas a genes *SERK* y *EXS* se encuentran asociadas a la apomixis en *Paspalum notatum*.

Objetivos

- El objetivo de este trabajo fue aislar y caracterizar secuencias de miembros de la familia génica *SERK* y *EXS* de *Paspalum notatum* y determinar su patrón de expresión durante el desarrollo reproductivo de plantas sexuales y apomícticas.

Materiales y métodos

Material vegetal

El material vegetal empleado correspondió a los genotipos tetraploides ($2n=4x=40$) de *Paspalum notatum* Q4188 y Q4117 y una población F_1 , derivada del cruzamiento entre ambos, segregante por el modo de reproducción (plantas apospóricas y no apospóricas). Q4117 es un genotipo natural tetraploide apomíctico obligado ($2n = 4x = 40$) proveniente del sur de Brasil (Ortiz y col., 1997). Q4188 es un genotipo tetraploide sexual ($2n = 4x = 40$) de origen experimental (Quarin y col., 2003). La población de mapeo fue desarrollada por el Ing. Camilo L Quarin y colaboradores en el Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE) - Facultad de Ciencias Agrarias, UNNE, Corrientes y utilizada para la construcción de un mapa de ligamiento genético de la especie al nivel tetraploide (Stein y col 2004; Stein y col., 2007). Todo el material vegetal se mantuvo en condiciones naturales en las parcelas experimentales del IBONE (Instituto de Botánica del Nordeste, Corrientes, Argentina).

Aislamiento de ADN genómico

La extracción del ADN genómico de las plantas experimentales se realizó según la técnica descrita por Shagai-Marooft y col., (1984) con las siguientes modificaciones: se congelaron en N_2 líquido aproximadamente 6 grs de tejido fresco de hoja, disgregándolos luego mecánicamente en mortero hasta obtener un polvo fino. Cada muestra fue transferida a un tubo de polipropileno de 50 ml conteniendo 20 ml de buffer de extracción (Tris-HCl 100 mM pH 7,5; NaCl 700 mM; EDTA 50 mM pH 8,0; CTAB 2% p/v y β - mercaptoetanol 140 mM) e incubada a 65 °C durante una hora con agitación. Se agregaron 10 ml de cloroformo, se mezcló durante 10 min, se centrifugó a 5000 g por 10 min y se recuperó la fase acuosa. Luego de una segunda purificación con cloroformo, se agregó un volumen de isopropanol frío a la fase acuosa obtenida (para precipitar el ADN) y se incubó a -20 °C por 16 h. El ovillo de ADN precipitado en solución fue recogido con una varilla de vidrio, lavado 20 min en una

solución de etanol 76 %, acetato de sodio 0,2 M, secado al aire y resuspendido en 700 µl de buffer TE (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1mM; pH 8,0). Cada muestra fue incubada con 5 µl AR-Nasa (10 mg/ml) a 37 °C durante 1 hora y posteriormente re-precipitada con 5% v/v de NaCl 5M y un volumen de isopropanol. Finalmente, se centrifuga a 10.000 g por 20 min, se lavó el precipitado con etanol 70%, secó a temperatura ambiente y disolvió en 500 µl de agua destilada estéril.

La concentración de ADN se determinó por espectrofotometría a 260 nm y se estimó la pureza de la extracción empleando el índice de la relación de absorbancias a 260/280 nm. La integridad de las muestras se determinó por electroforesis en geles de agarosa al 0,8 % p/v teñidos con bromuro de etidio 10 mg/l (Sambrook y col., 1989).

Aislamiento de genes homólogos a partir de Q4117 y Q4188

Para aislar las secuencias homólogas a los genes *SERK* y *EXS* de *P. notatum* se diseñaron cebadores heterólogos a partir de secuencias disponibles en las bases de datos públicas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). En el caso de los genes *SERK* se utilizaron las secuencias disponibles de *Oryza sativa*, *Zea Mays* y *Poa pratensis*, mientras que para los genes *EXS* las secuencias empleadas fueron *Oryza sativa*, *Zea Mays* y *Sorghum bicolor*. Las secuencias de los cebadores generados se enumeran en la Tabla II.1 y Tabla II.2. Posteriormente se realizaron reacciones de PCR sobre el ADN de los genotipos Q4117 y Q4188, utilizando dichos cebadores en reacciones de un volumen final de 25 µl conteniendo 60 ng de ADN, 0,2 uM de cebador, buffer de PCR 1X (Promega), MgCl₂ 1,5 mM, dNTPs 200 µM y Taq polimerasa 1,5U (Promega). Las condiciones de reacción consistieron en una etapa inicial de desnaturalización de 5 min a 94 °C seguida de 35 ciclos de 30 seg a 94° C, 1 min a 55 °C, 2 min a 72 °C y 10 min finales de elongación a 72 °C.

Las reacciones de amplificación se resolvieron por electroforesis en geles de agarosa (40 mA por 2 h) y se tiñeron con 10 mg/l de bromuro de etidio. Las bandas de interés fueron cortadas del gel con un bisturí, purificadas con fenol/cloroformo y clonadas en el sistema pGEM-T-easy (Promega). Los clones fueron secuenciados por el servicio de MacroGen Inc. (Corea).

Tabla II.1. Cebadores utilizados para la amplificación de regiones conservadas de los genes *PnSERKs* y *PnEXSs*

Cebador	Secuencia
SERKF1	GCGGCTTTGGTGTGTTTAT
SERKR1	CCTTTCTTTTCGAGGTCATGC
EXSF	GTTGTGGGGAGTAAATCTATGGGTCTTT
EXSR	CACTGATCAGGATATACATGGTACTTG

Los productos de amplificación fueron resueltos por electroforesis en geles de agarosa (40 mA por 2 hs) y teñidos con 10 mg/l de bromuro de etidio. Las bandas de interés fueron cortadas del gel con un bisturí, purificadas con fenol/cloroformo y se clonadas con el sistema pGEM-T-easy (Promega). Los clones fueron secuenciados por el servicio de Macrogen Inc. (Corea).

Extensión de secuencias por caminata cromosomal

Se diseñó una estrategia de caminata cromosomal basada en el protocolo de Genome Walker de Clontech. Brevemente, se generaron 6 bibliotecas genómicas no clonadas a partir del genotipo Q4117 (Felitti y col., 2011). Las mismas se realizaron mediante la digestión de ADN genómico del genotipo Q4117 (durante una hora o durante toda la noche) con tres enzimas de restricción: *EcoRV*, *DraI* y *PvuII*. Los productos de la digestión fueron luego ligados a adaptadores (Genome Walker Universal Kit) (Clontech) siguiendo las recomendaciones del fabricante. De esta manera se generaron 6 bibliotecas no clonadas del genotipo Q4177. Los productos de ligación fueron utilizados como molde en dos rondas sucesivas de amplificación por PCR empleando oligonucleótidos específicos para el gen de interés en estudio y cebadores anclados sobre los adaptadores (Genome Walker Universal Kit). En la primera reacción, se utilizó el cebador AP1 (Clontech) como cebador externo y un cebador interno específico de la secuencia a amplificar. Los productos de esta primer PCR se utilizaron como molde para una segunda reacción de PCR utilizando el cebador AP2 (Clontech) como cebador anidado de la biblioteca y cebadores específicos del gen. Los productos de amplificación se sometieron a electroforesis en geles de agarosa 2,0%. Se aislaron aquellas bandas discretas, se las clonó y secuenció tal como se describe en la sección anterior.

El programa VecScreen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>) fue utilizado para identificar y eliminar los segmentos de los vectores. Las secuencias obtenidas

fueron alineadas con la secuencia original generándose los contiguos correspondientes. Para ello se empleo la versión libre del programa Sequencher 4.10.1 (Gene Codes Corporation). Una vez que un contiguo fue identificado, se diseñaron los cebadores en los extremos en dirección 5' y 3' del mismo con el fin de amplificar las secuencias flanqueantes. Los fragmentos amplificados fueron clonados en el sistema pGEM-T-easy y secuenciados para confirmar el ensamblado por Macrogen (Corea).

Análisis de similitud de secuencias

Se realizaron búsquedas de similitudes de secuencias para todos los fragmentos amplificados sobre la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (Altschul y col., 1990, 1997.). Las herramientas de BLASTN y BLASTX fueron utilizadas para comparar las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos, respectivamente. Las secuencias que mostraron un mayor porcentaje de similitud con las secuencias de nucleótidos y aminoácidos se utilizaron en los alineamientos múltiples con ClustalW2 (Chenna y col., 2003). La matriz obtenida a partir de los alineamientos múltiples de proteínas de los distintos genes SERK se utilizaron para llevar a cabo un análisis filogenético utilizando la versión 3.68 Phylip (Felsenstein 2005). Diez mil repeticiones *bootstrap* se llevaron a cabo para obtener un árbol de consenso sin raíces. Con el programa Pfam (Finn y col., 2008) disponible en la pagina web: <http://pfam.sanger.ac.uk/search> y el programa de la base de datos NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>, se realizó la búsqueda de dominios conservados en las secuencias de proteínas de los genes a analizar.

Análisis de hibridación Southern

Para estimar el número de copias de los genes analizados se realizaron experimentos de Southern blot sobre los genotipos Q4117, Q4188 y dos plantas F₁ (una apomíctica y una sexual).

Treinta µg de ADN genómico de cada muestra fueron digeridos con 1,25 U/µg de ADN de las enzimas *EcoRI*, *PstI*, *HindIII* y *HaeIII* (Promega) a 37 °C durante 16 hs. Las muestras fueron sembradas en geles de agarosa al 0,8 v% y resueltas a 60 mA por 6 h. Luego de la electroforesis, los geles se incubaron 30 min en una solución conteniendo NaOH 0,4 N y NaCl 0,6 M a fin de desnaturalizar el ADN, seguido de 30 min en solución de neutralización

(Tris-HCl 0,5 M pH 7,5; NaCl 1,5 M). La transferencia a filtros de nylon (Hybond N, Amersham) se realizó por capilaridad empleando una solución de SSC 10X (citrate de sodio 0,15 M, cloruro de sodio 1,5 M, etc.) (Sambrook y col., 1989) y el ADN fue fijado a los mismos por exposición a luz UV por 3 minutos e incubación a 80 °C por 2h.

El marcado de las sondas y la detección de la señal se realizó empleando un método no radiactivo que se basa en el uso combinado de una marca de digoxigenina, su detección por un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina y un revelado final con el sustrato quimioluminiscente CSPD (Boehringer-Mannheim, Dig. Luminiscent Detection Kit). Brevemente, el protocolo estándar incluye tres etapas: i) marcación de las sondas con dig-dUTP al 5%. La digoxigenina (esteroide natural derivado de plantas del género *Digitalis*) está unida por un enlace éter alcalino a dUTP, ii) hibridación de la sonda marcada al ADN fijado en una membrana y iii) detección del ADN hibridado con un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado a una fosfatasa alcalina. La actividad fosfatasa del conjugado desfosforila el sustrato CSPD el cual emite luminiscencia, presentando un máximo a 477 nm de longitud de onda. La señal imprime una placa radiográfica que se coloca sobre la membrana.

La marcación de las sondas se realizó por PCR en un volumen final de 100 µl conteniendo dig-dUTP 2,5 µM (5%), [dATP, dGTP, dCTP] 50 µM, dTTP 47,5 µM, los cebadores directo y reverso del M13, 0,2 µM de cada uno, Taq polimerasa 1U (Promega), MgCl₂ 2 mM, buffer de PCR 1X (Promega), glicerol 15% y 10 ng de ADN plasmídico. La incorporación del nucleótido marcado se verificó por electroforesis en geles de agarosa al 1,5%p/v de una alícuota de los productos de amplificación. Los ADN marcados muestran un retraso en la movilidad electroforética con respecto a los mismos fragmentos amplificados sin marcar. La concentración de las sondas se estimó por comparación de la intensidad de las bandas con un marcador de concentración conocida incluido en el gel de acuerdo a lo descrito en Sambrook y col. (1989).

La hibridación se realizó en una solución de SSC 5X, SDS 0,02%, S-lauril sarcosina 0,1%, reactivo de bloqueo 0,5% (Boehringer-Mannheim) pH 7,5 conteniendo una concentración de 50 ng/ml de sonda. Los filtros se pre-hibridaron 2 horas y las hibridaciones se realizaron a 63 °C durante 16 h. Luego se lavaron dos veces durante 5 min en SSC 2X; SDS 0,1% a temperatura ambiente y dos veces 15 min en SSC 0,25X; SDS 0,1% a 60 - 65 °C con fuerte agitación. Junto con los filtros experimentales se hibridaron controles en forma de puntos o gotas (dot-blots) conteniendo 1, 5, 50 y 100 pg del fragmento de ADN correspon-

diente a la sonda previamente desnaturalizada para determinar la sensibilidad del experimento (control de hibridación).

Para la detección de los fragmentos hibridados los filtros fueron lavados por 5 min en solución de ácido maleico 0,1 M, NaCl 0,15 M, Tween 20, pH 7,5 y posteriormente incubados 30 min en solución de bloqueo (ácido maleico 0,1 M, NaCl 0,15 M, reactivo de bloqueo 1% p/v, pH 7,5) y 30 min en solución de anticuerpo anti-Dig conjugado (anticuerpo diluido 1:10.000 en solución de bloqueo). Se hicieron dos lavados de 15 min cada uno en solución de lavado (ácido maleico 0,1 M, NaCl 0,15 M, Tween 20, pH 7,5) y 10 min en solución de detección (Tris-HCl 0,1 M pH 9,5, NaCl 0,1 M, MgCl₂ 0,05 M). La incubación de los filtros con el sustrato quimioluminiscente (CSPD) se realizó por 5 min, en oscuridad y con agitación suave. Las membranas se envolvieron con nylon transparente y previo a exponerlas a la placas radiográficas se las incubó 10 min a 37 °C para activar a la fosfatasa alcalina.

Los filtros se expusieron a placas radiográficas X-Omat (Kodak) por 2-24 h y fueron revelados en un cuarto oscuro con soluciones comerciales de revelador y fijador hasta la aparición de bandas. La observación y el análisis del resultado de la hibridación se realizó mediante la exposición de las placas a un transiluminador de luz blanca.

Extracción de ARN y síntesis de ADNc

Se realizó la extracción de ARN total utilizando el sistema SV Total RNA Isolation kit (Promega), a partir de inflorescencias de los genotipos Q4188 y Q4117 en distintos estadios del desarrollo reproductivo. La clasificación de las inflorescencias en los distintos estadios se realizó en base al calendario reproductivo descrito en Laspina y col., (2008), observando las células madres del polen en el microscopio teñidas con carmín acético al 45%. La transcripción reversa se obtuvo a partir de 1 µg de ARN total, utilizando la enzima Superscript II reverse transcriptase (Gibco-Life Technologies) de acuerdo a lo indicado en el protocolo estándar del fabricante.

Análisis de expresión por PCR cuantitativo en tiempo real (qRT-PCR)

Para determinar la expresión relativa de los genes *SERK* y *EXS* por experimentos de PCR cuantitativo en tiempo real (qRT-PCR) en los tejidos de la inflorescencia, se diseñaron

cebadores específicos para las secuencias expresadas de los genes: *PnSERKs* y *PnEXS* utilizando el programa Primer3 disponible en <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/input.html> (Tabla II.2). Los oligonucleótidos fueron sintetizados por Eurofins MWG Operon (<http://www.operon.com/default.aspx>).

Tabla II.2. Cebadores utilizados en los estudios de expresión por qRT-PCR de los *PnSERK1* y *PnSERK2*

Cebador	Secuencia
PnSERK1F	GCGGCTTTGGTGTGTTTAT
PnSERK1R	CCTTTCTTTTCGAGGTCATGC
PnSERK2F	CTGGAGCTTATTACTGGACAGAGGGC
PnSERK2R	CTCCTACCCTCTTCTCCTTCAGCAGTC
PRTEXSF	GTGTTCTCAGATCTGGAGCGTTCGG
PRTEXSR	CGCCACAAGTAGGGGAACACAAGAAG
TubulinaF	GTGGAGTGGATCCCCAACAA
TubulinaR	AAAGCCTTCCTCTGAACATGG
Glucosa-6-fosfato DHF	CATCAGAGATGAGAAAGTCAAGGTT
Glucosa-6-fosfato DHR	AGCTTTAAGAATGAAAGGAACACCT

Como genes normalizadores (*housekeeping*) se amplificaron fragmentos internos de la beta-tubulina y la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa debido a que ambos muestran una expresión estable en las inflorescencias de especies relacionadas como *Poa pratensis* y *Brachiaria brizantha* (Albertini y col., 2005; Duarte-Silveira y col., 2009)

Las reacciones de amplificación se realizaron en volumen final de 15 µl conteniendo 20 ng de DNAc, 0,2 uM de cada cebador, 1X Mezcla Real qPCR (Biodynamics). Las condiciones de reacción consistieron en una etapa inicial de desnaturalización de 2 min. a 94 °C seguida de 40 ciclos de 15 seg. a 94° C, 30 seg. a 55 °C, 40 seg. a 72 °C. La eficiencia de amplificación de cada reacción fue considerada tanto para las secuencias blanco como para los genes de referencia. En todos los casos se realizaron tres replicaciones técnicas de cada determinación y tres repeticiones biológicas, para cada estadio.

Se construyó una curva de calibración para cada uno de los genes blanco graficando los valores de Ct versus el logaritmo del número de copias (5, 50, 500, 5000, 50000, 5 10⁶, 5 10⁷ y 5 10⁸ copias) de los fragmentos clonados de cada gen. Seis amplificaciones fueron utilizadas para definir cada punto en la curva. Para controlar la carga del ADNc en cada

muestra experimental se realizaron curvas de calibración para los genes de referencia graficando los valores de Ct versus el logaritmo de la concentración de ARN (diluciones: 1/2, 1/5, 1/10 y 1/20) para cada muestra y cada estadio del desarrollo. La expresión relativa de los genes blanco en cada muestra y en cada estadio fueron analizados mediante la relación n° de copia/ng de ARN (método de la curva estándar, Livak 1997) y/o mediante el programa Rest2009 que utiliza un método de cuantificación relativa basado en Pfaffl, MW y col. (2002).

Experimentos de hibridación *in situ* de tejidos

La hibridación *in situ* de tejidos se realizó siguiendo el protocolo descrito por Laspina y col., (2008), con modificaciones menores. Brevemente, las inflorescencias fueron cosechadas entre las 8 y las 10 hs de la mañana, donde es posible encontrar flores en diferentes estadios del desarrollo. Las inflorescencias fueron fijadas en buffer de fijación que contiene: 4% de glutaraldehído, 0,25% paraformaldehído, buffer fosfato 0,01 M pH 7,2. Las mismas fueron clasificadas, seccionadas y separadas. Solo, en el estadio de anthesis, se pudieron separar los ovarios individuales debido al pequeño tamaño de los mismos en los estadios más jóvenes. Posteriormente, se deshidrataron en una serie de etanol (70, 80, 95, 100) y xilol (25, 50, 75 y 100) y posteriormente, fueron embebidas en parafina.

Las muestras se cortaron en secciones 10 micras y se colocaron en portaobjetos previamente tratados con Tween 20 al 4%, HCl 0,1 N, lavados, autoclavados y tratados con poli-L-lisina 100 mg/ml. Los cortes fueron desparafinados a través de una serie de xilol-etanol.

Para la marcación de las sondas, se partió de clones conteniendo fragmentos amplificados específicos para cada gen. Fragmentos lineales de los mismos fueron generados utilizando dos técnicas diferentes: una de ellas consistió en linealizar los plásmidos empleando las enzimas de restricción *NcoI* o *SaI* (Promega). La otra técnica, se basó en una amplificación directa por PCR, que permite linealizar el fragmento clonado y aumentar la masa de la sonda) siguiendo las condiciones descritas más arriba. Ambos productos linealizados, fueron purificados utilizando el sistema de limpieza de Promega (Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System), y llevados a una concentración final de 1 ug/ul. Las sondas fueron marcadas utilizando el sistema de marcación de Roche DIG RNA (DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7) Cat. No. 1175025, Roche Applied Science, Mannheim, Germany), siguiendo las instrucciones del fabricante. La discriminación de las hebras sentido y antisentido se basó

en la homología con secuencias conocidas y la marcación con la RNA polimerasa correspondiente (promotor SP6 o T7). Las sondas se hidrolizaron hasta obtener fragmentos de aproximadamente 150-200 pb, con buffer NaHCO₃/Na₂CO₃.

La prehibridación se llevó a cabo en un buffer Tris-HCl 0,05 M pH 7,5, que contiene 1 ug/ml de proteinasa K en una cámara húmeda a 37 °C durante 10 min.

La hibridación se realizó durante toda la noche en una cámara húmeda a 37 °C, en un buffer que contenía Tris-HCl 10 mM pH 7,5, NaCl 300 mM, formamida al 50% (desionizada), EDTA 1 mM , pH 8, Denhart 1X , dextransulfato 10%, ARN total 600 ng/ml y 60 ng de la sonda correspondiente. La detección se realizó siguiendo las instrucciones del kit de detección Roche Dig (DIG Nucleic Acid Detection Kit Cat. No. 11175041910, Roche Applied Science, Mannheim, Germany) utilizando un anticuerpo anti-DIG asociado a una fosfatasa alcalina y NBT/BCIP como sustratos. Las observaciones se realizaron en un microscopio Leica DM2500.

Mapeo *in silico* de secuencias correspondientes a genes *SERK* y *EXS*

Para localizar las secuencias ortólogas a los genes aislados en este trabajo se realizaron estudios de mapeo *in silico*, utilizando la base de datos GRAMENE (<http://www.gramene.org>) conjuntamente con la base de datos MaizeSequence (<http://www.maizesequence.org>). La localización de los genes de *P. notatum* en arroz y maíz se efectuó empleando la opción BLAST contenida en ambas bases de datos a partir de la cual es posible interrogar a la base y determinar si existe/n secuencia/s homóloga/s al gen de interés, localizarlo en el genoma y establecer posibles ubicaciones en otras gramíneas utilizando la opción de mapeo comparativo de la misma página. Los parámetros seleccionados fueron los siguientes: Base de datos: DNA database: genome sequence, Herramienta de búsqueda: BLASTN, Máximo valor de e-value: 10⁻⁴, Máximo número de hits: 10, Filtro para secuencias repetidas: activado. Se observó la posición de las secuencias en los respectivos cromosomas y los genes que flanquean la zona establecida.

Mapeo genético de *PnSERKs* y *PnEXS* en *P. notatum*

Experimentos de CAPS (Polimorfismo asociado a secuencias amplificadas y cortadas)

Con el objeto de localizar las secuencias de *PnSERK1* y *PnSERK2* en el mapa de *P. notatum*, los amplicones a partir de los genotipos parentales (Q4188 y Q4117) generados al utilizar los cebadores descritos en la Tabla II.5 fueron digeridos con 12 enzimas de restricción diferentes (*EcoRI*, *EcoRV*, *PstI*, *HindIII*, *HaeIII*, *MspI*, *HpaII*, *TaqI*, *PvuII*, *DraI*, *KpnI*, *BamHI*) y resueltos en geles de agarosa al 2% p/v.

En el caso de los genes *EXS*, para detectar polimorfismos entre los progenitores Q4188 y Q4117, los amplicones generados al utilizar los cebadores descritos en la Tabla II.2, fueron digeridos con las enzimas de restricción *EcoRI* o *HaeIII* y resueltos en geles de agarosa al 2% p/v. Las bandas polimórficas detectadas fueron utilizadas como marcadores moleculares del tipo CAPS y fueron mapeadas en 65 individuos de la población de mapeo. El análisis de ligamiento se realizó utilizando el programa de mapeo Mapmaker 3.0 (Lander y col., 1987) codificando los datos genéticos de los marcadores como derivados de una "F2- retrocruza" (opción F2 backcross Mapmaker 3.0), donde la presencia o ausencia de un determinado marcador indica heterocigosis u homocigosis respectivamente. Las unidades de mapeo en cM derivaron de la función de Kosambi (1944). Los parámetros utilizados fueron LOD= 3.0 y $\theta = 0,30$. (Stein y col., 2007).

Experimentos de SSCP (Polimorfismo asociado a la conformación de la simple hebra)

Con el objetivo de hallar polimorfismos entre los progenitores Q4188 y Q4117 para el gen *EXS* se amplificaron secuencias correspondientes una fracción del gene *EXS* de aproximadamente 500 pb. Para ello se utilizaron los cebadores descritos en la Tabla II.3. Los amplicones fueron suplementados con 5 μ l de buffer de siembra (formamida 95% p/v, NaOH 10 mM y azul de bromofenol 2mg/ml), desnaturalizados a 96 °C por 5 min y fueron resueltos en geles de MDE al 0,5% p/v, gelificado utilizando APS (0,06% v/v) y TEMED (0,07% v/v). La electroforesis se realizó empleando un equipo de secuenciación Gibco-BRL modelo S2, USA a 10 -15 W por 6 h usando como soluciones reguladoras TBE 0,5X pH 8,0 en los reservorios superior e inferior. Los geles se revelaron con nitrato de plata siguiendo el protocolo descrito por el "DNASilver Staining System" (Promega). Brevemente, el gel se incubó 20 min en solución fijadora (ácido acético glacial 10% v/v), seguido de 3 lavados en H₂O de 2 min cada uno e incubación en solución de tinción (AgNO₃ 1 g/l, formaldehído 0,1% v/v) por

30 min. Luego se lavó por 10 s en H₂O y se reveló con solución desarrolladora (carbonato de sodio 30 g/l, formaldehído 0,1% v/v, tiosulfato de sodio 2 mg/l) preenfriada, deteniéndose la reacción con agregado de la solución fijadora. Los geles se lavaron exhaustivamente con agua y se tomaron los datos directamente sobre el vidrio luego del secado a temperatura ambiente durante toda la noche.

Tabla II.3. Cebadores utilizados para la generación de marcadores moleculares del tipo SSCP para el gen *PnEXS*.

Cebador	Secuencia
PEXSF	GTGTTCTCAGATCTGGAGCGTTCGG
PEXSR	CACTGATCAGGATATACATGGTACTTG

Las bandas polimórficas detectadas fueron utilizadas como marcadores moleculares del tipo SSCP y fueron mapeadas en 65 individuos de la población de mapeo. El análisis de ligamiento se realizó utilizando el programa de mapeo Mapmaker 3.0 (Lander y col., 1987) codificando los datos genéticos de los marcadores como derivados de una “F2- retrocruza” (opción F2 backcross Mapmaker 3.0), donde la presencia o ausencia de un determinado marcador indica heterocigosis u homocigosis respectivamente. Las unidades de mapeo en cM derivaron de la función de Kosambi (1944). Los parámetros utilizados fueron LOD= 3.0 y $\theta = 0,30$. (Stein y col., 2007).

Experimentos de RFLP (Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción)

Los experimentos de RFLP fueron realizados sobre ADN genómico de los genotipos Q4117, Q4188 y 6 grupos segregantes para el modo de reproducción: un grupo de 10 individuos F₁ apomícticos (BA) y 5 grupos de 11 F₁ sexuales (BS), de manera de analizar un total de 65 individuos de la población segregante. Las muestras fueron digeridas con la enzima de restricción *EcoRI*, transferidas a una membrana de nitrocelulosa e hibridadas como se describe mas arriba en la sección de hibridación por Southern blot.

Resultados

CLONADO Y ESTUDIOS DE EXPRESIÓN DE GENES HOMOLOGOS A *SERK*

Clonado de secuencias parciales de *PnSERK* genómicas

Trece secuencias conocidas de genes *SERK* de *Poa pratensis*, arroz, maíz, *Arabidopsis thaliana*, y otras especies fueron alineadas (AAEE35238.1: *AtSERK1*, AEE31686.1: *AtSERK2*, AAB61708.1: *DcSERK1*, EES07030.1: *SbSERK2*, CAC37642.1: *ZmSERK3*, CAC37639.1: *ZmSERK2*, LOC_Os04g38480.1: *OsBAK1*, AAU88198.1: *OsSERK1*, XP_464966.1: *OsSERK2*, EES06565.1: *SbSERK1*, CAH56437.1: *PpSERK1*, CAH56436.1: *PpSERK2*, LOC_Os02g14120.1: *OsBAK1*) con el objetivo de identificar regiones conservadas. En base a este análisis se diseñaron cebadores sobre la región correspondiente al dominio quinasa, que se encuentra sobre el exón 9 y 10 del gen *SERK* de *Poa pratensis* (*PpSERK*)(Tabla II.1). Las secuencias en el resto de los exones resultaron menos conservadas y no todos los miembros de la familia pudieron alinearse correctamente.

A partir de la amplificación del ADN genómico con los cebadores anclados en el exón 9 se obtuvo un fragmento de 200 pb, el cual fue clonado y secuenciado. Este pequeño fragmento mostró una similitud de secuencia del 93 % con el gen *SERK2* AJ841697.1 de *P. pratensis* (e-value: $4 e^{-70}$), 92% con el gen *SERK1* AJ841698.1 de *P. pratensis* (e-value: $7 e^{-67}$) y 92% de similitud de secuencia con *Zea mays* *BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 1 (BR1)* ASSOCIATED RECEPTOR KINASE 1 (*BAK1*) (LOC100285968) ARNm gb | EU974959.1 | GENE ID: 100285968 LOC100285968 (e-value: $6 e^{-68}$). A este fragmento se lo denominó *PnSERKOF*(gen *SERK* de *Paspalum notatum* Fragmento Original).

El fragmento *PnSERKOF* fue utilizado como molde para diseñar nuevos cebadores con los cuales se llevó a cabo la extensión del gen *SERK* hacia ambos extremos (5'y 3') mediante caminata cromosomal (Figura II.1). Se emplearon seis diferentes bibliotecas genómicas producidas a partir del genotipo Q4117 (apomíctico). Luego de cuatro rondas de extensión, se obtuvieron dos *contigs* (contiguos) diferentes. A estos contiguos se los denominó: *PnSERK1* y *PnSERK2*, de 1760 y 2050 nucleótidos, respectivamente. El correcto ensamblaje de los dos contiguos fue validado por la amplificación a partir del ADN genómico de los mismos, utilizando cebadores específicos diseñados en los extremos de los contiguos (Tabla II.4) , el clonado de los amplicones y su secuenciación (Figura II.2).

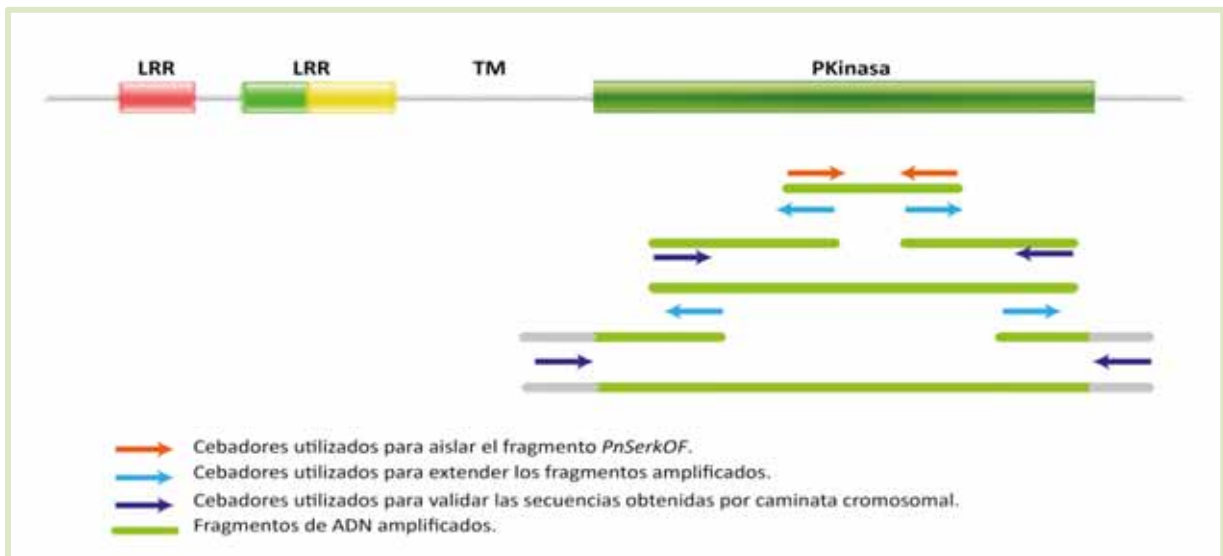


Figura II.1. Estrategia de caminata cromosomal para el aislamiento de los genes *PnSERKs*. PKinasa: Dominio quinasa. TM: dominio transmembrana. LRR: Repeticiones ricas en leucina.

Tabla II.4. Cebadores utilizados para la validación de los contiguos.

Cebador	Secuencia
PnSERK1F	ACTGACAAGGTGATATGTTTCAGTGAC
PnSERK1R	AAGGTAGAGGAGGTAGGATGGGCAGTT
PnSERK2F	CTCCTTTTCACTCTTCACCCCTATAA
PnSERK2R	CTGAGGTTGTAGGTGGAGTCGACGAT

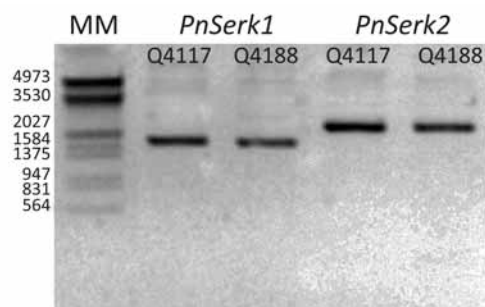


Figura II.2. Gel de agarosa al 1,5%. Bandas correspondientes a las amplificaciones de validación de los genes *PnSERK1* y *PnSERK2*.

Análisis de similitud de secuencias de *PnSERKs*:

La similitud de las secuencias obtenidas de *PnSERK1* y *PnSERK2* fueron analizadas en las bases de datos del NCBI (Tabla II.5). Entre ambos contiguos se observó una homología significativa en ciertas regiones. La región delimitada por las siguientes posiciones de nucleótidos: *PnSERK1* 1513-1738 / *PnSERK2* 1027-802 mostró un ID: 74%, e-value: $3e^{-34}$, y el segmento comprendido entre *PnSERK1* 1195-1516 / *PnSERK2* 953-1269 mostró un ID: 65%, e-value: $2e^{-18}$, sin embargo el resto de la secuencia reflejaron diferencias importantes.

El análisis de las secuencias completas obtenidas mostró que *PnSERK1* presentó alta similitud con el segmento original de 200 pb (*PnSERKOF*) entre los nucleótidos 1052-1231 (ID: 98%, e-value: $7e^{-88}$), mientras que el gen *PnSERK2* mostró una similitud menor con el fragmento original (*PnSERKOF*) (ID: 76% (e-value: $2e^{-13}$) en las siguientes regiones *PnSERK2* 1248-1333 / *PnSERKOF* 23-108.

Las búsquedas realizadas en la base de datos del NCBI revelaron que el primer contiguo (*PnSERK1*, 1760 nucleótidos) fue muy similar a la secuencia del gen *SERK2* de *Poa pratensis* en los exones 6 a 10 (AJ841697.1, ID: 82%, e-value: $3,00e^{-174}$) (Tabla II.5.a), no detectándose similitud entre los intrones. Esta secuencia también alineó con el gen *PpSERK1* (AJ841698.1, ID: 81%, e-value: $2,00e^{-170}$), y con el *Zea mays* *BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 1 (BRI1) ASSOCIATED RECEPTOR KINASE 1 (BAK1)* (LOC100285968) ARNm gb | EU974959.1 | GENE ID: 100285968, ID: 95 %; e-value: $2e^{-133}$).

Estos resultados indicaron que *PnSERK1* se originó a partir de la extensión directa del fragmento original *PnSERKOF* de 200 pb.

Tabla II.5.a. Análisis de similitud de secuencias (BLAST) para el *PnSERK1*.

Accesión	Descripción	% Cob.	e- Value	Max Iden.
AJ841697.1	<i>Poa pratensis</i> serk2 gene somatic embryogenesis receptor-like kinase 2	67%	$3,0e^{-174}$	82%
AJ841698.1	<i>Poa pratensis</i> serk1 gene somatic embryogenesis receptor-like kinase 1	65%	$2,0e^{-170}$	81%
AP003991.3	<i>Oryza sativa</i> Japonica Group genomic DNA, chromosome 2	65%	$9,0e^{-162}$	82%
XM_002453544.1	<i>Sorghum bicolor</i> hypothetical protein, mRNA	47%	$1,0e^{-141}$	93%
BT053842.1	<i>Zea mays</i> fullLength cDNA ZM_BFb0274I16 mRNA, complete cds	47%	$2,0e^{-133}$	95%
NM_001158857.1	<i>Zea mays</i> BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1-assoc. Rep. kinase 1	47%	$2,0e^{-133}$	95%
AK120541.1	<i>Oryza sativa</i> Japonica Group cDNA:J013129G20, full insert sequence	46%	$1,0e^{-110}$	86%
NM_123946.3	<i>Arabidopsis thaliana</i> leucine-rich repeat transmembrane protein kinase	25%	$1,0e^{-52}$	75%
FJ708789.1	<i>Arabidopsis thaliana</i> leucine-rich repeat receptor-like protein kinase	25%	$1,0e^{-52}$	75%

El segundo contiguo aislado (*PnSERK2*, 2050 pb) mostró un mayor porcentaje de similitud con el gen *SERK2* de *Zea mays* exones 6 a 11 (GenBank: AJ400869.1; ID GENE: 542016 *SERK2*, ID: 87%, e-value: 0,0), separados por los intrones correspondientes (Tabla II.5.b). Este contiguo también mostró similitud con *ZmSERK1* (GENE ID: 542015 *SERK1*, ID: 84%, e-value: 0,0), pero ninguna similitud significativa con los genes *SERK* de *Poa pratensis* *PpSERK1* y *PpSERK2*. Estos datos indicaron que este contiguo fue amplificado a partir de un fragmento similar al fragmento original (*PnSERKOF*), y correspondería a otro miembro de la familia *SERK* de *P. notatum*.

Para poner esta hipótesis a prueba, se realizó un análisis filogenético de ambos genes (*PnSERK1* y *PnSERK2*) con otras secuencias de genes *SERK* halladas en la base de datos del NCBI y un mapeo *in silico* sobre los genomas de arroz y maíz (véase mas adelante).

Tabla II.5.b. Análisis de similitud de secuencias (BLAST) para el *PnSERK2*.

Accesión	Descripción	% Cob.	e-value	Max. Iden.
AJ400869.1	Zea mays serk2 gene for somatic embryogenesis receptor-like kinase 2	99%	0.0	87%
AJ629310.1	Avena strigosa partial s5.6 gene for receptor-like-kinase	58%	0.0	78%
AY162177.1	Medicago truncatula somatic embryogenesis receptor kinase 1	64%	0.0	74%
AJ400868.1	Zea mays serk1 gene for somatic embryogenesis receptor-like kinase 1	70%	2,0e ⁻¹⁸⁰	84%
NM_001111663.1	Zea mays somatic embryogenesis receptor-like kinase2 (serk2), mRNA	63%	3,0e ⁻¹⁷⁰	96%
XM_002454009.1	Sorghum bicolor hypothetical protein, mRNA	63%	1,0e ⁻¹⁶⁸	94%
AJ400870.1	Zea mays partial mRNA somatic embryogenesis receptor-like kinase 3	56%	2,0e ⁻¹⁵⁹	96%
XM_002454009.1	Sorghum bicolor hypothetical protein, mRNA	63%	1,0e ⁻¹⁶⁸	94%
AJ400870.1	Zea mays partial mRNA somatic embryogenesis receptor-like kinase 3	56%	2,0e ⁻¹⁵⁹	96%

Análisis de dominios proteicos estructurales conservados

El análisis de los genes *PnSERK1* y *PnSERK2* a través del programa Pfam y la base de datos del NCBI confirmaron la presencia de dominios característicos de proteínas quinasas transmembrana. Este estudio demostró que, si bien, las secuencias de ambos genes no fueron aisladas en su totalidad, ambas presentan el dominio quinasa y la región transmembrana correspondiente a receptores del tipo quinasa (Figura II.3).

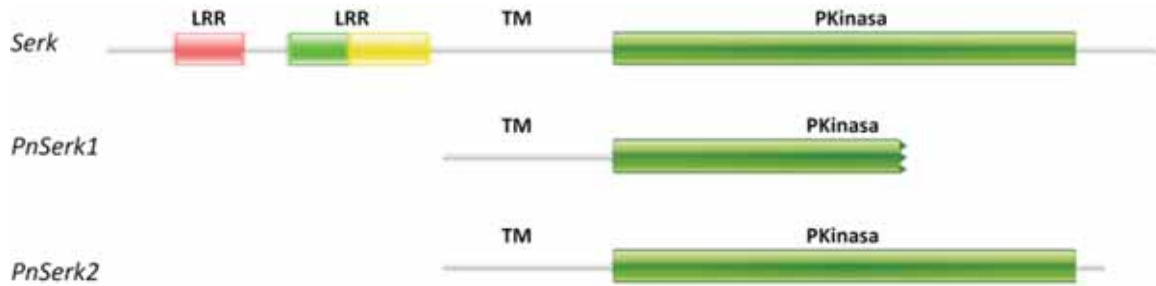


Figura II.3. Esquema comparativo de los dominios estructurales presentes en fragmentos proteicos de los genes *PnSERK1* y *PnSERK2*. PKinasa: Dominio quinasa. TM: dominio transmembrana. LRR: Repeticiones ricas en leucina.

Estudios de filogenia de *PnSERKs*

Con el fin de investigar la identidad de los genes *PnSERK1* y *PnSERK2* se llevaron a cabo estudios de filogenia molecular. Para dicho análisis se utilizaron las secuencias aminoácidas de las proteínas *SERK* disponibles en las base de datos del NCBI.

En primer lugar se compararon las secuencias traducidas de los genes *PnSERK1* y *PnSERK2* con las 13 secuencias de proteínas *SERK* de mayor homología en las bases de datos, con el fin de analizar los niveles de conservación en los diferentes dominios (Figura II.4). La secuencia consenso consistió de 645 aminoácidos. Debido a que ambas secuencias *PnSERK* son parciales, representan sólo un fragmento del gen completo. El alineamiento indicó que la secuencia del gen *PnSERK1* (307 aa) comenzó en el aminoácido número 186 y terminó en el aminoácido 505 de la secuencia consenso, mientras que el gen *PnSERK2* (430 aa) inició en el aminoácido 204 y terminó en el aminoácidos 636 de la secuencia de aminoácidos consenso.

Se observaron diferentes niveles de conservación de secuencia a lo largo de la proteína. Un nivel muy bajo de conservación se detectó en la región que abarca los aminoácidos del 1 al 45. Por otro lado, la región desde 45 al 303 muestran una conservación de nivel medio y, en este sector, pueden claramente definirse dos grupos diferentes de secuencias. Mientras que el gen *PnSERK1* se incluyó en uno de los grupos, *PnSERK2* alinea mejor con el otro grupo. La región 303-520 resultó ser muy conservada entre todos los miembros (esta es, precisamente, la región correspondiente al dominio quinasa de las proteínas *SERK*). La región que contiene los aminoácidos entre 520 y 645 mostró un nivel medio de conservación, y nuevamente, se separan los mismos dos grupos de proteínas ya definidos por la región 45-303 (Figura II.4).

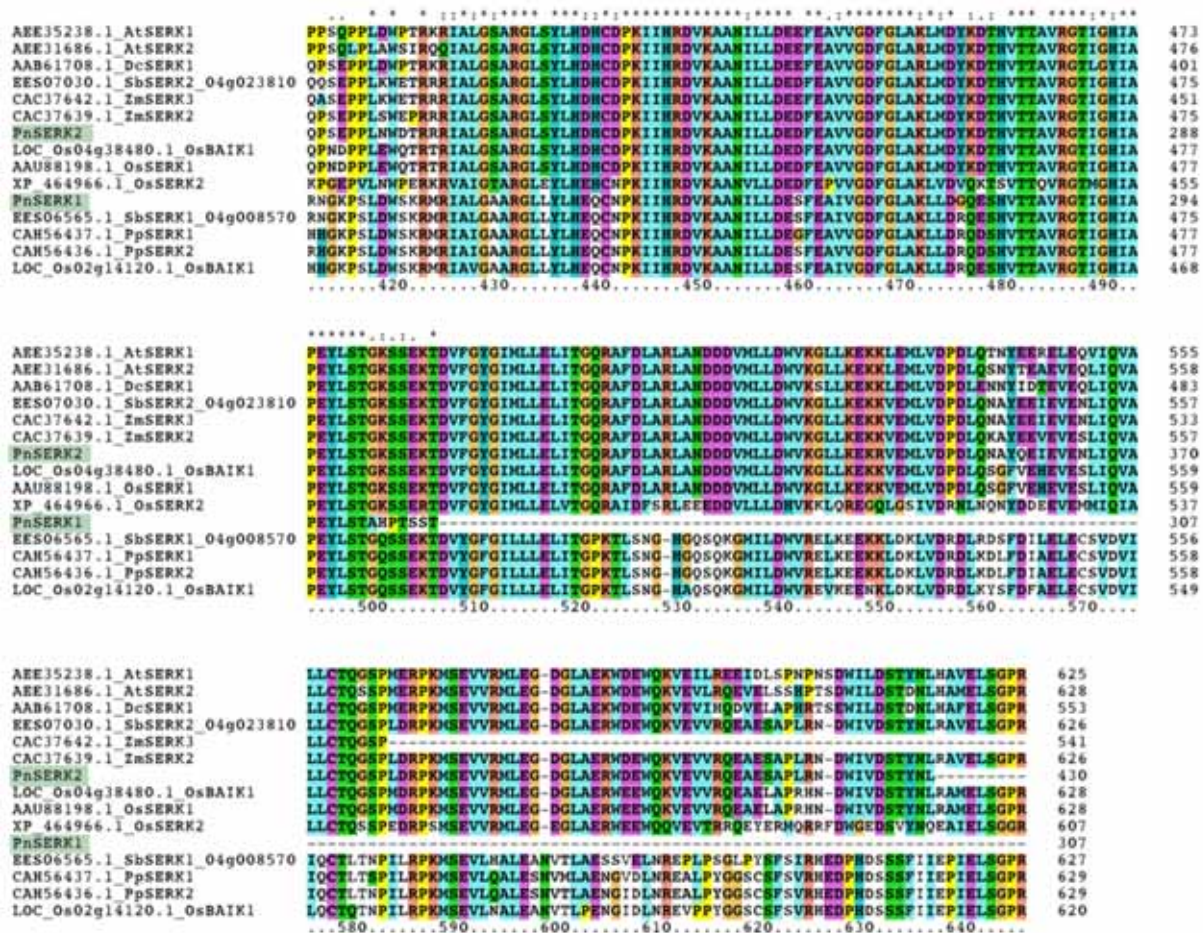


Figura II.4. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de diferentes proteínas SERK (Cont.).

A partir de este alineamiento se construyó un árbol filogenético (Figura II.5) que confirmó que las secuencias aisladas de los dos genes *SERK* de *P. notatum* pertenecen a miembros distintos de esta familia génica. El análisis realizado muestra tres grupos definidos. Uno de estos grupos presenta tan solo dos miembros: la proteína SERK3 de trigo (*TaSERK3*) y la proteína SERK2 de arroz (*OsSERK2*). En los otros dos grupos se destaca la separación del PnSERK1 del PnSERK2. El PnSERK1 se ubica en el mismo grupo que contiene a las proteínas PpSERK1 y PpSERK2, SbSERK1, y OsBAIKL1 mientras que el PnSERK2 se asocia con el resto de las proteínas analizadas: ZmSERK1/2/3, TaSERK1/2, OsSERK1, OsBAIK1.2, SbSERK2, AaSERK, CISERK, VVSERK1/Serlk, TcSERK, DISERK, DcSERK, CcSERK, CuSERK, SISRK, LsSERK, CsSERK, AtSERK1/2/3/4/5. Este último grupo, el cual contiene a PnSERK2, presenta varios miembros que han sido descritos como proteínas directamente asociadas a la embriogénesis somáticas, entre las cuales podemos destacar a: AtSERK1/2, DcSERK, ZmSERK.

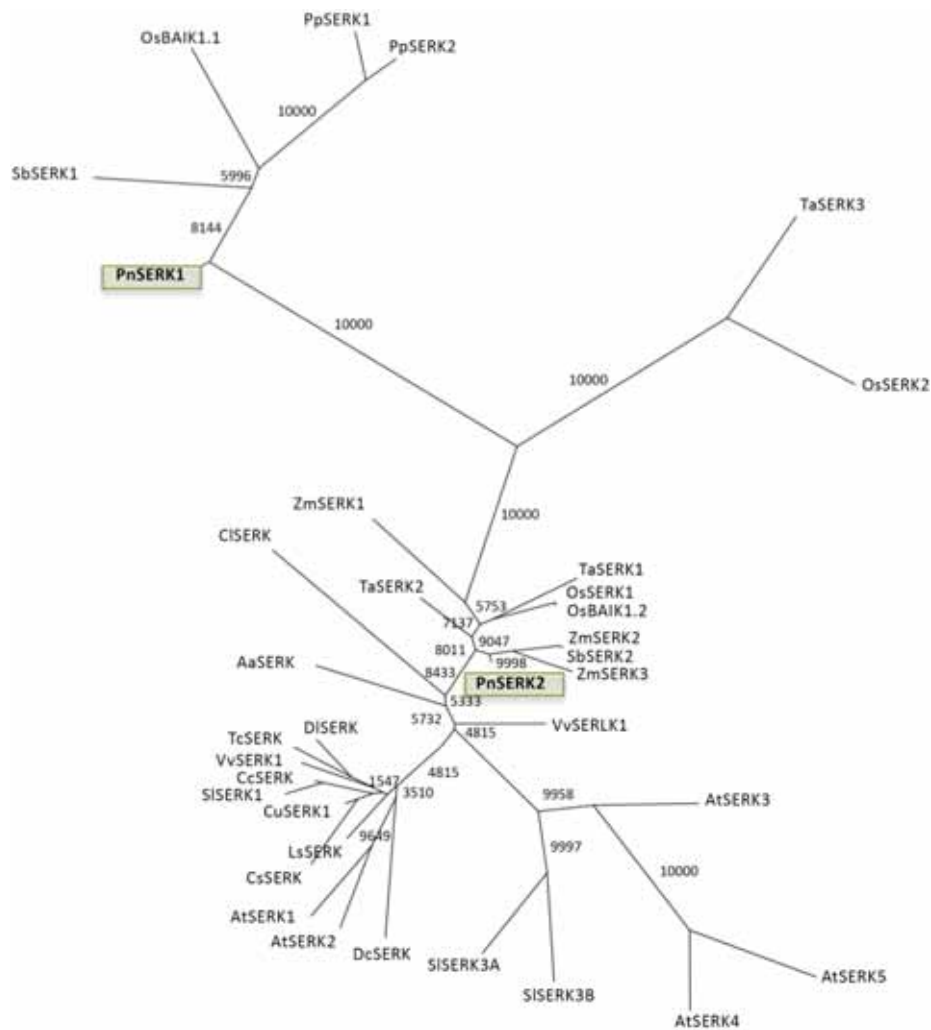


Figura II.5: Árbol filogenético con diferentes secuencias conocidas de proteínas SERK.

Entre los miembros mas estudiados de las proteínas SERK se encuentran los pertenecientes a *Arabidopsis thaliana*. La familia de proteínas SERK en arabisopsis esta compuesta por 5 miembros, dos de los cuales (*AtSERK1/2*) fueron asociados directamente con la embriogénesis somática. Por lo tanto, realizamos un nuevo análisis filogenético únicamente con dichos miembros para poder confirmar la asociación de nuestros genes con la embriogénesis somática (Figura II.6).

El análisis reveló que *PnSERK1* se encuentra distante de las demás proteínas utilizadas en este análisis. Mientras que *PnSERK2* agrupó junto a las proteínas *AtSERK1* y *AtSERK2*, y cercano a los demás miembros de la familia *SERK* de arabisopsis.

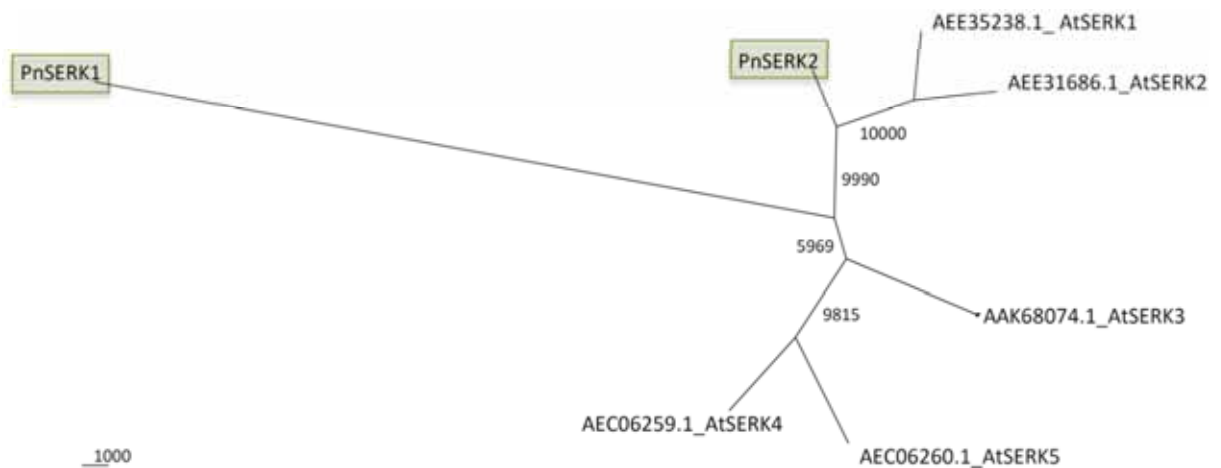


Figura II.6: Árbol filogenético con proteínas SERK de *Arabidopsis thaliana*.

Análisis del número de copias de genes *PnSERK*

Con el fin de estimar el número de copias aproximado de la familia *SERK* en *P. notatum* se realizó una hibridación de Southern Blot, utilizando un fragmento de 711 pb homólogo a ambos clones *PnSERKs* como sonda.

El fragmento de 711pb está contenido en ambos *PnSERK* aislados: corresponde a las posiciones 1052-1760 del clon *PnSERK1* y a las posiciones 802-1027 y 1195-1333 del clon *PnSERK2*. El fragmento mostró una similitud del 99% (e-value: 0,0) y el 74% (e-value: 1×10^{-34}) con los genes *PnSERK1* y *PnSERK2*, respectivamente. La temperatura a la cual se realizó la hibridación (63°C) permite la hibridación de ambos miembros de la familia *SERK* (*PnSERK1* y *PnSERK2*).

Los experimentos se realizaron sobre los genotipos parentales: Q4117 (apomícticos) y Q4188 (sexual), así como dos progenies F_1 (Figura II.7). El ADN genómico se digirió con tres enzimas de restricción (*Pst*I, *Eco*RI y *Hae*III). Tanto *Pst*I y *Eco*RI no digieren la secuencia de 711 pb internamente. *Hae*III posee un sitio de restricción interno (en la posición 121).

Los experimentos de hibridación detectaron entre 2 y 3 bandas con las enzimas de restricción que no digieren internamente la sonda (Figura II.7). Por lo tanto, al menos 3 copias correspondientes a miembros de genes diferentes y/o alelos están presentes en el genoma de *P. notatum*.

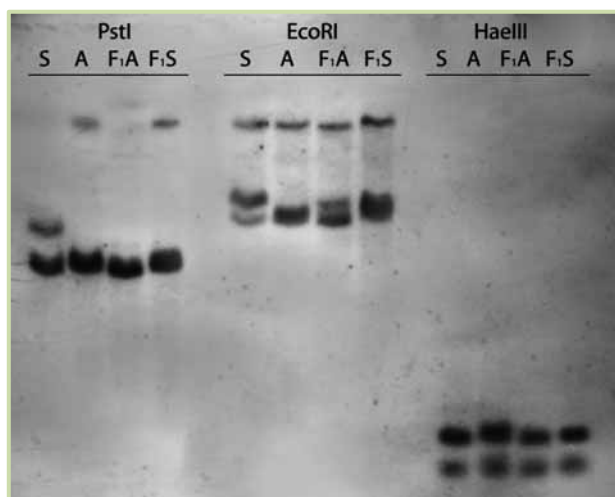


Figura II.7: Hibridación de Southern Blot

Análisis cuantitativos de expresión de genes *SERK* en tejido floral

A fin de estudiar los patrones de expresión de los genes *PnSERK1* y *PnSERK2* se llevaron a cabo experimentos de qRT-PCR sobre ADNc derivado de ARNm de espiguillas de los genotipos Q4117 y Q4188 en diferentes estadios del desarrollo reproductivo (premeiosis, meiosis, postmeiosis y antesis). Las reacciones de amplificación fueron realizadas empleando cebadores que permiten la amplificación específica de cada gen (Tabla II. 2). Los genes de referencia utilizados para la normalización de la expresión fueron la β -tubulina y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

Los estudios de expresión realizados mostraron que *PnSERK2* presenta niveles superiores de expresión a los observados para *PnSERK1* (entre seis y quince veces), tanto en Q4117 como en Q4188, en todos los estadios del desarrollo reproductivo. El análisis comparativo de las variaciones de expresión de *PnSERK2* entre ambos genotipos detectaron diferencias significativas en los estadios de premeiosis, postmeiosis y antesis ($p < 0,02$). Siendo mayor la expresión en el genotipo apomíctico en el estadio de premeiosis y postmeiosis y menor en el estadio de antesis (Figura II.8 A).

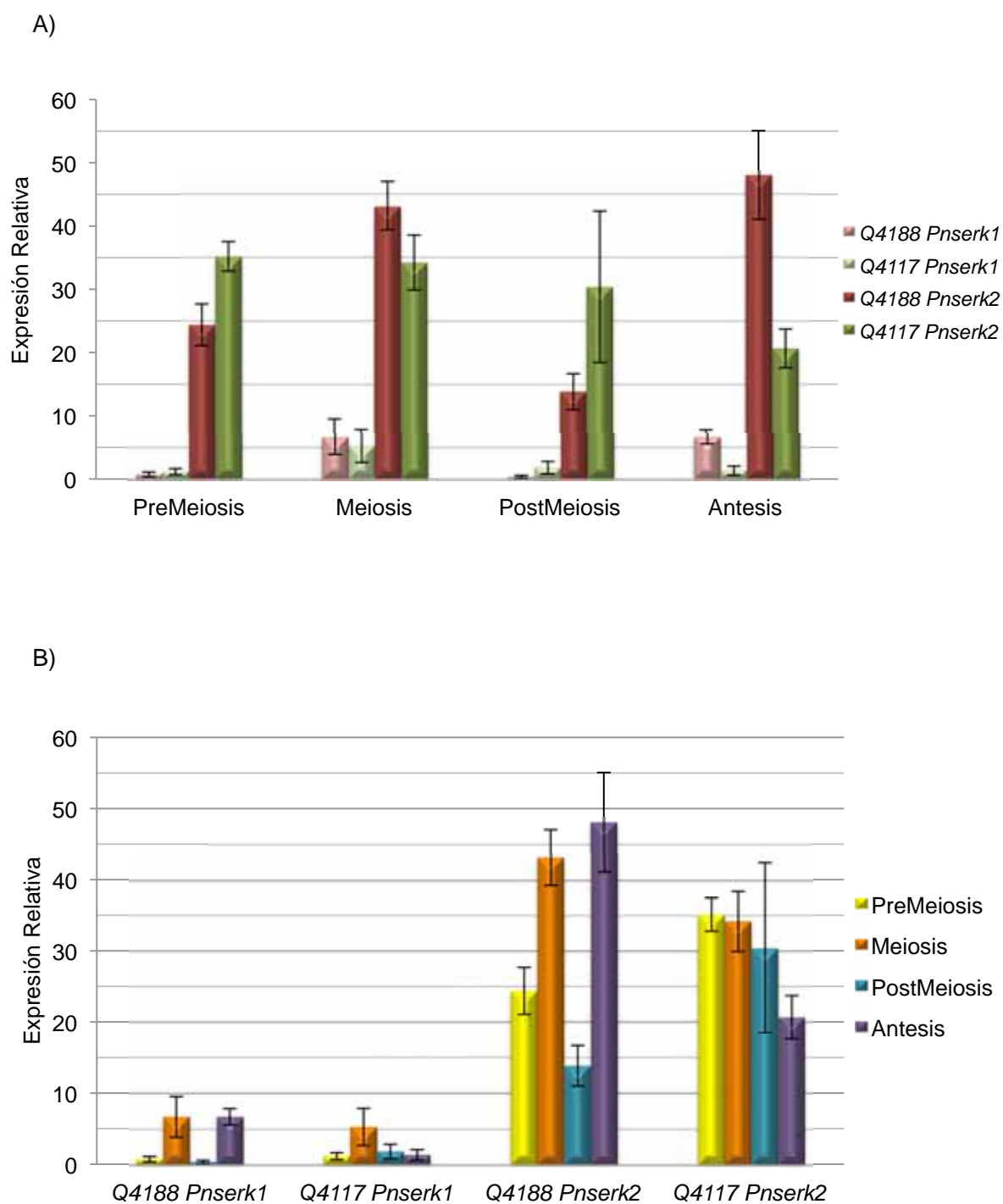


Figura II.8: Gráfica de los niveles de expresión relativa durante los diferentes estadios del desarrollo reproductivo de los genes *PnSERKs*. A) Análisis comparativo de cada gen en los diferentes estadios del desarrollo reproductivo. B) Análisis comparativo de cada gen en los genotipos apomítico y sexual.

Los estudios comparativos para el *PnSERK1* mostraron diferencias significativas únicamente en el estadio de antesis ($p < 0,002$), siendo mayor la expresión en el genotipo sexual.

El análisis de la expresión relativa sobre cada genotipo en los diferentes estadios del desarrollo reproductivo reveló que en el genotipo sexual, la variación de la expresión observada entre los diferentes estadios de los genes *PnSERK1* y *PnSERK2* fue similar (Figura II.8 panel B), observándose valores máximos en los estadios de meiosis y antesis. Sin embargo, el patrón de expresión en el genotipo apomíctico resultó diferente (Figura II.8, panel B). En éste se observa que la expresión disminuye gradualmente a medida que avanza el desarrollo reproductivo. Esto podría indicar que posiblemente haya una regulación diferencial en la expresión de estos genes en el genotipo apomíctico a la que estaría presente en el genotipo sexual.

Estudios de hibridación *in situ* de tejidos de genes *PnSERK*

Con el objetivo de determinar la localización precisa de la expresión de los genes *SERK* aislados de *P. notatum*, se realizaron experimentos de hibridación *in situ* de tejido en dos estadios diferentes del desarrollo reproductivo: meiosis y antesis. Los mismos fueron seleccionados debido a que son claves en el desarrollo de las células iniciales de la aposporía y del saco embrionario, respectivamente y fueron los estadios en los cuales se detectaron diferencias significativas durante el análisis de expresión por qRT-PCR (ver sección anterior).

Los experimentos fueron realizados utilizando sondas específicas para cada uno de los genes. Para el *PnSERK1* se utilizó un fragmento de 550 pb (correspondientes a las posiciones 750 - 1300) el cual no presenta homología con el *PnSERK2*. Para el *PnSERK2* se utilizó un fragmento de 600 pb (comprendido entre las bases 1330 - 1930), sin homología de secuencia con el *PnSERK1*.

En el caso del *PnSERK1*, al hibridar con las sondas sentido y antisentido correspondientes no se observó hibridación en ninguno de los estadios analizados, en ambos genotipos (Figura II.9). Probablemente, esto se deba a la baja expresión general del gen, como pudo evidenciarse en los análisis de PCR en tiempo real. Por el contrario, la hibridación con el gen *PnSERK2* mostró señales de expresión en ambos genotipos bajo estudio (Q4117 y Q4188). La hibridación con la sonda antisentido reveló una disposición espacial diferente entre los genotipos sexuales y apomícticos. En el genotipo Q4117 (apomíctico), se observó

una fuerte hibridación con la sonda antisentido en células de la nucela que rodean a la célula madre de la megáspora y parte de los tegumentos, en el óvulo en el estadio de meiosis. Es de destacar que no se observó hibridación en las células en división meiótica ni en las células de los labios (Figura II.10.a-b). En el estadio de antesis, la localización de los transcritos de *PnSERK2*, se localizaron sobre los tegumentos y en el aparato del huevo.

La hibridación con la sonda antisentido en el genotipo Q4188 (sexual), manifestó hibridación sobre los haces vasculares del ovario en el estadio de premeiosis (Figura II.10.e). En el estadio de meiosis, pudo detectarse la expresión de transcritos sobre la zona donde se encuentra la célula madre de la megáspora (CMM), aunque no se puede apreciar la misma (Figura II.10.f). En el estadio de antesis, solo se observó hibridación en los tegumentos del ovario y sobre las antípodas.(Figura II.10.g). Asimismo se observó expresión en anteras pero no en los granos de polen.

La hibridación con la sonda sentido de *PnSERK2* no produjo señales significativas sobre el óvulo del genotipo Q4117. Sin embargo, en el genotipo Q4188 la sonda sentido mostró señales de hibridación sobre células de la nucela en un estadio previo a la meiosis. En el estadio de antesis, no se observó señal en ninguno de los dos genotipos analizados (Figura II.10.I).

Los resultados obtenidos muestran que la expresión del gen *PnSERK2* se distribuye mayoritariamente en el tejido esporofítico del óvulo tanto en los genotipos apomícticos como sexuales. De manera similar a lo informado en *Poa pratensis* (Albertini y col., 2005) se observó expresión del gen *PnSERK2* específicamente sobre la célula madre de la megáspora (CMM) en el genotipo sexual, mientras que en el genotipo apomíctico se observó expresión sobre las células de la nucela que rodean a la célula arquesporrial en división. Estos resultados soportan la hipótesis de que los genes *SERK* participarían de la/s vía/s de señalización de los procesos de diferenciación celular que ocurren en el óvulo e indicaría que la regulación de su expresión y/o su acción sobre las moléculas blanco serían diferentes en plantas con diferente modo de reproducción.

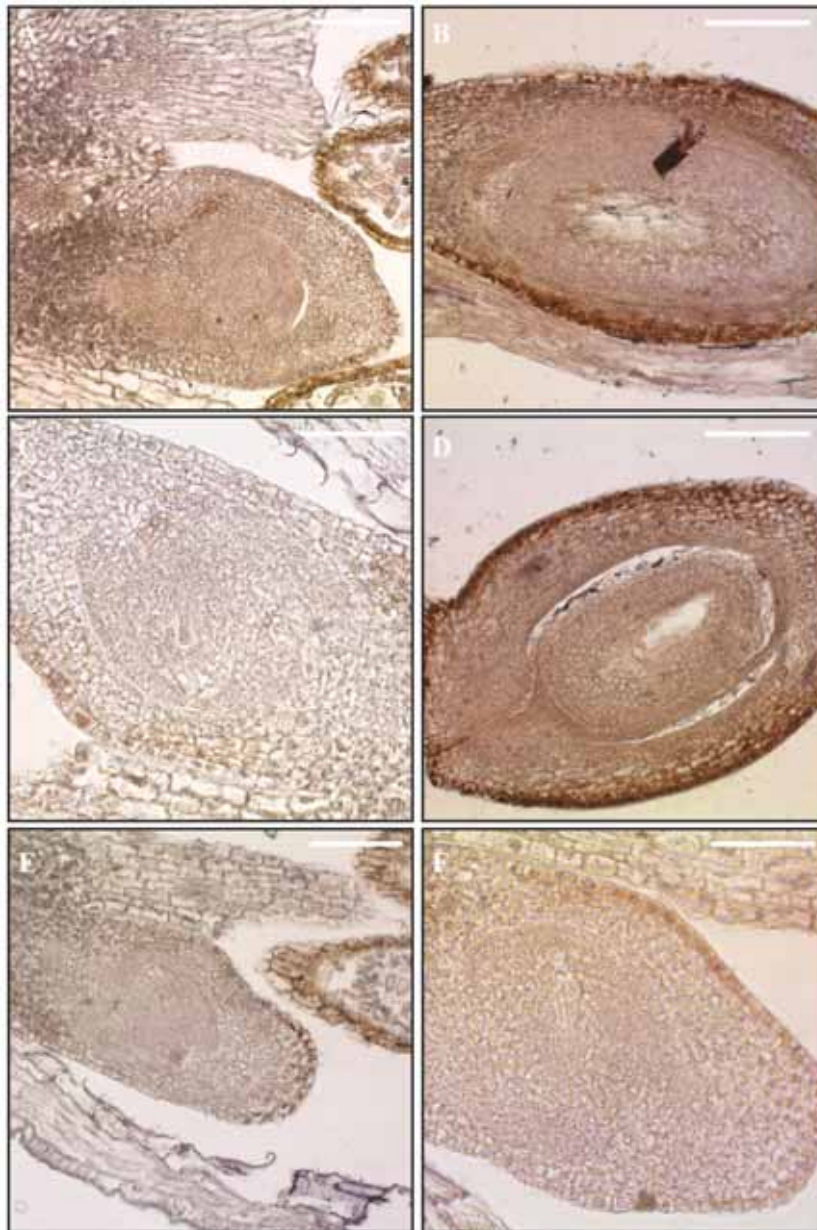


Figura II.9. Hibridación *in situ* sobre tejido reproductivo del gen *PnSERK1*. No se observó hibridación en ninguno de los estadios analizados. A-D: Hibridación con la sonda antisentido del gen *PnSERK1*. E-F: Hibridación con la sonda sentido del gen *PnSERK1*. A: Q4117 (apomíctico) óvulo en estadio de meiosis. B: Q4117 (apomíctico) óvulo hibridado en el estadio de. C: Q4188 (sexual) óvulo en el estadio de meiosis. D: Q4188 (sexual) óvulo en el estadio de antesis. E: Q4117 (apomíctico) óvulo en el estadio de meiosis. F: Q4188 (sexual) óvulo en el estadio de meiosis.

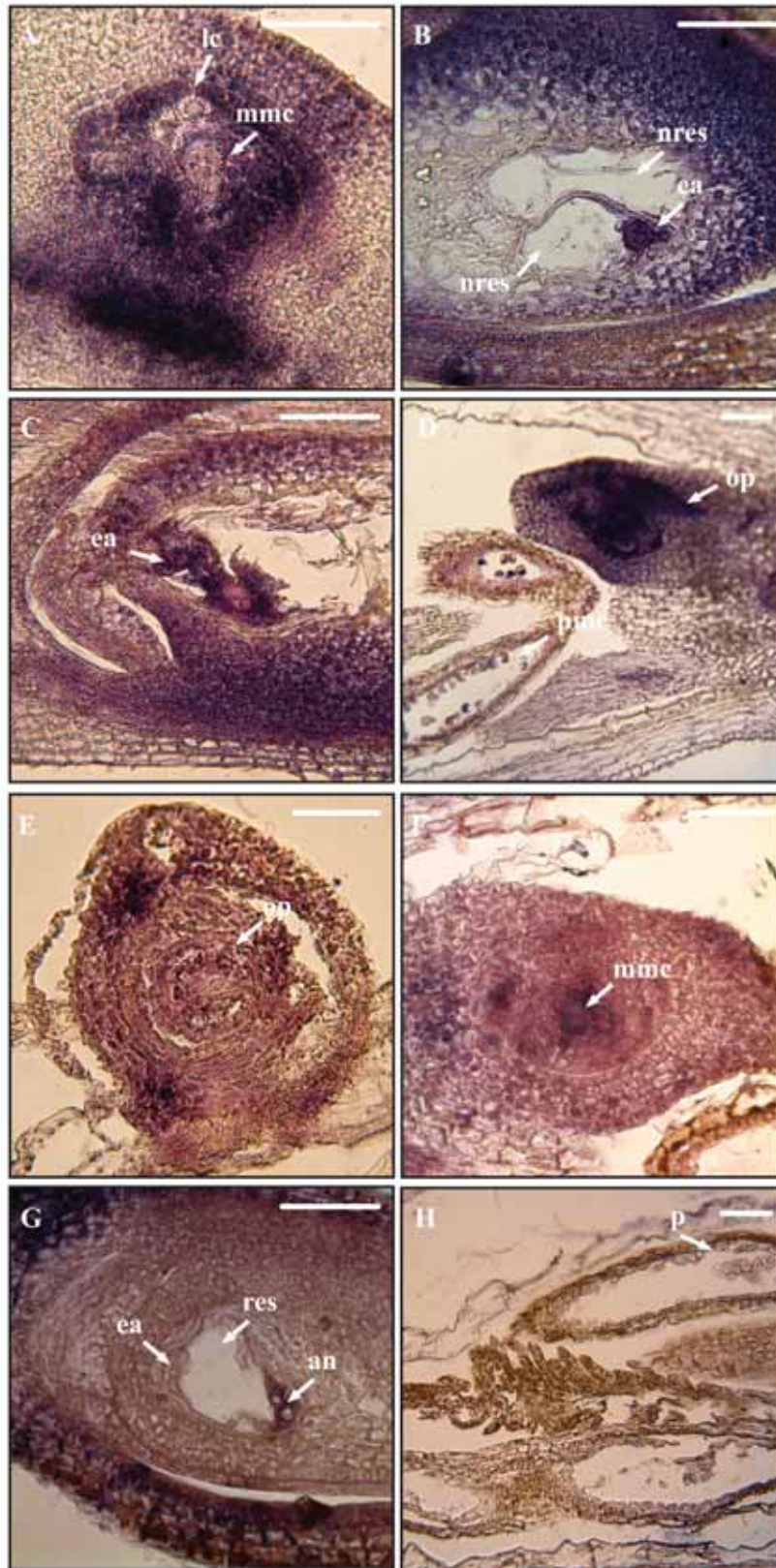


Figura II.10. Hibridación *in situ* sobre tejido reproductivo del gen *PnSERK2* (ver leyenda abajo)

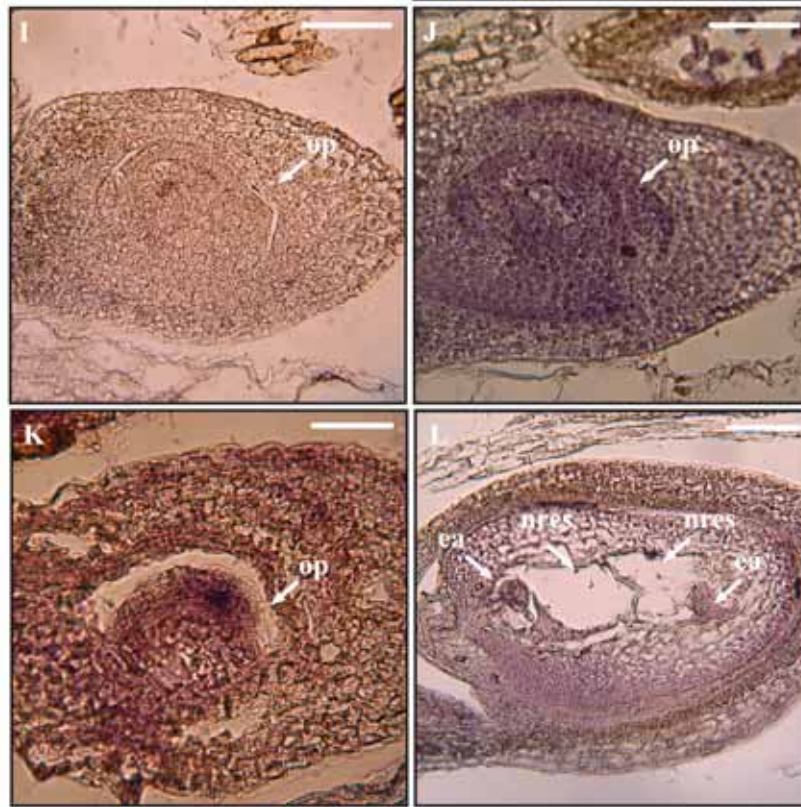


Figura II.10 (cont.). Hibridación *in situ* sobre tejido reproductivo del gen *PnSERK2*. A: Q4117 (apomictico) óvulo en estadio de meiosis hibridado con la sonda antisentido del gen *PnSERK2*. Se observó una fuerte hibridación en células de la nucela, que rodea a la célula madre de la megáspora, y también en parte de los tegumentos. No se observó hibridación en la célula madre megáspora ni en las células de los labios (rodeado por una línea punteada). B: Q4117 (apomictico) óvulo hibridado en el estadio de antesis con la sonda antisentido del gen *PnSERK2*. Se observa una fuerte hibridación tanto en los tegumentos y como en el aparato del huevo. C: Vista más cercana de otro óvulo en antesis del genotipo Q4117 hibridado con la sonda antisentido *PnSERK2*. Se observa hibridación en los tegumentos y el aparato de huevo. D: Q4117 (apomictico) óvulo en el estadio de premeiosis. Se observa hibridación en las células madre del polen sobre los primordios de anteras. E: Q4188 (sexual) óvulo en el estadio de premeiosis, hibridado con la sonda antisentido de *PnSERK2*. La hibridación se detecta en todo el sistema vascular. F: Q4188 (sexual) óvulo en el estadio de meiosis hibridado con la sonda antisentido *PnSERK2*. Se detecta una hibridación en la zona de la célula madre de la megáspora (cmm). G: Una visión más distante de un óvulo del genotipo Q4188 (sexual) en el estadio de antesis hibridado con la sonda antisentido *PnSERK2*. Se detecta hibridación sobre las paredes del ovario y en las antípodas. H: Q4188 (sexual) anteras, hibridadas con la sonda antisentido *SERK*. No se observó señal en las células del polen. I: Q4117 (apomictico) óvulos en estadio de meiosis hibridados con una solución de control sin sonda. Ninguna señal fue observada. J: Q4117 (apomictico) óvulos en meiosis hibridados con una sonda sentido *PnSERK2*. No se detectó señal. K: Q4188 (sexual) en el estadio premeiótico del óvulo hibridado con una sonda sentido *PnSERK2*. Una señal fuerte se observó en una porción de la nucela, en una capa de células cerca de la MMC, hacia el polo chalazal. L: Q4117 (apomictico) óvulo en el estadio de antesis hibridado con una sonda sentido *PnSERK2*. No se observa señal. cmm: célula madre de la megáspora. lc: las células de los labios. nres: saco embrionario no reducido. res: saco embrionario reducido ea: aparato del huevo. op: primordio de óvulo. pmc: células madre del polen. p. polen, an: antípodas. Las barras corresponden a 100 micras.

Localización en *in silico* de las secuencias de *PnSERK1* y *PnSERK2* sobre el genoma de arroz y maíz

Con el objetivo de localizar secuencias ortólogas a los genes *SERK* aislados de *P. notatum* en especies modelo, se realizó un estudio de mapeo *in silico* de ambos genes sobre *Oryza sativa* y *Zea mays* utilizando las bases de datos públicas GRAMENE (<http://www.gramene.org>) y Maizesequence (<http://www.maizesequence.org>).

Localización de *PnSERK1* en el genoma de *Oryza sativa*

Los análisis de alineamiento realizados con el gen *PnSERK1* sobre el genoma de *Oryza sativa* revelaron la presencia de una copia del mismo ubicada sobre el cromosoma 2 de arroz (Figura II.11). En la tabla II.6 se muestran la localización física en pares de bases de la secuencia de *PnSERK1*, el cromosoma de arroz en el cual se localiza, la posición en pares de base sobre el cromosoma de arroz, el e-value, el porcentaje de identidad de secuencia y la longitud de la misma.

Esta secuencia se encontró en el cromosoma 2 de arroz en la posición 7711946 - 7713149 pb (e-value $2,2 \times 10^{-167}$), separado por regiones que no presentan homología alguna de secuencia. Estas secuencias no homólogas internas consistirían en los intrones correspondientes a este gen. El fragmento del *PnSERK1* con similitud de secuencia con esta región del cromosoma 2 de arroz comprende 1137 nucleótidos que abarcan desde el nucleótido 584 al 1721 del gen.

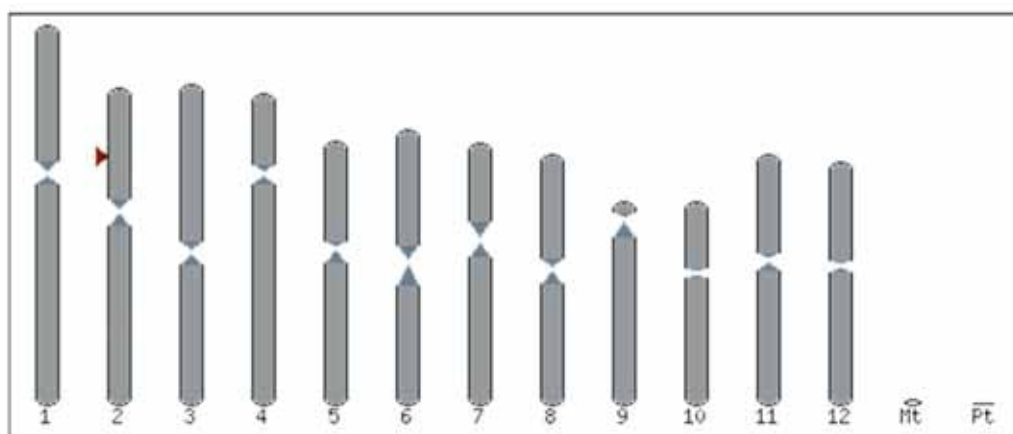


Figura II.11: Gráfico del genoma de *Oryza sativa*. Las puntas de flechas rojas sobre los cromosomas de arroz indican la posición física en la cual se encuentran las regiones ortólogas al gen *PnSERK1*.

Tabla II.6: Datos del alineamiento de secuencias entre *PnSERK1* y el genoma de *Oryza sativa*.

<i>PnSERK1</i>	Crom. Arroz	Posición	e-value	% Identidad	Longitud
584 - 647	Crom. 2	7713086 - 7713149	2.2e-167	82.81	64
755 - 781	Crom. 2	7712960 - 7712986	2.2e-167	92.59	27
827 - 876	Crom. 2	7712865 - 7712914	2.2e-167	94.00	50
929 - 1287	Crom. 2	7712439- 7712797	2.2e-167	86.94	360
1478 - 1721	Crom. 2	7711946 - 7712189	2.2e-167	88.93	244

Localización de *PnSERK1* en el genoma de *Zea mays*

La localización física *in silico* del gen *PnSERK1* sobre el genoma de *Zea mays* mostró que las secuencias ortólogas del gen se encuentra sobre los cromosomas 5 y 6 de maíz (Figura II.12). La Tabla II.7 resume los datos de los alineamientos de secuencia entre el gen *SERK* de *P. notatum* y el genoma de maíz.

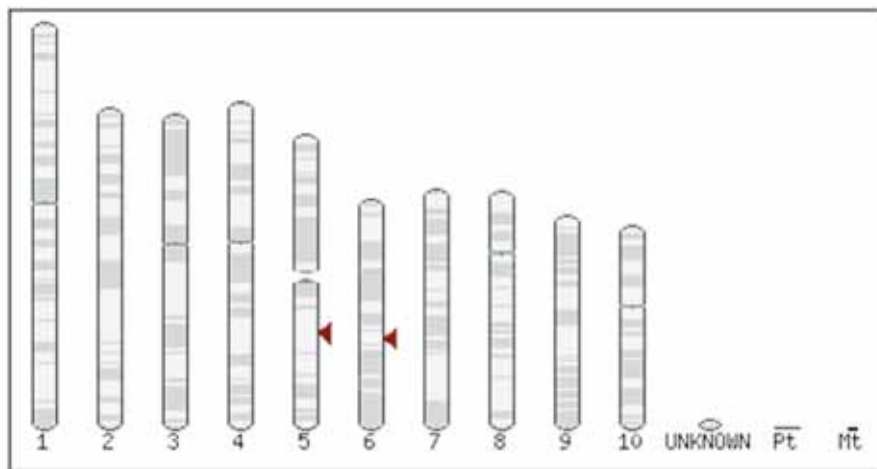


Figura II.12: Gráfico del genoma de *Zea mays*. Las puntas de flechas rojas sobre los cromosomas de maíz indican la posición física en la cual se encuentran las regiones ortólogas al gen *PnSERK1*.

Como podemos observar en este caso, se ve una alta similitud de secuencia (e-value: 0.0 y $1,4e^{-257}$) en los cromosomas 5 y 6 de maíz. En el cromosoma 5, se encuentra la mayor porción del gen *PnSERK1*. La similitud de la secuencia abarca 1223 nucleótidos de los 1760 que comprende el gen. El fragmento homólogo contiene a los nucleótidos del 515 al 1738

del *PnSERK1* y comprende la región, entre 146839257 pb y 146840472 pb del cromosoma 5 de maíz, con ciertas regiones con ausencia de ortología, posiblemente por pertenecer a secuencias intrónicas.

El cromosoma 6 de maíz presenta una secuencia ortóloga de la porción comprendida entre los nucleótidos 943 y 1738 de este gen. Esta región comprende el dominio quinasa de la secuencia del gen *SERK*, y es la región mas conservada del mismo.

Tabla II.7: Datos del alineamiento de secuencias entre *PnSERK1* y el genoma de *Zea mays*.

<i>PnSERK1</i>	Crom. <i>Zea mays</i>	Posición	e-value	% Identidad	Longitud
515 - 879	Crom. 5	146839257 - 146839619	0.	86.76	370
943 - 1307	Crom. 5	146839680 - 146840044	0.	91.51	64
1465 - 1738	Crom. 5	146840199 - 146840472	0.	92.00	275
943 - 1314	Crom. 6	102396444 - 102396815	1.4e-257	92.23	373
1469 - 1738	Crom. 6	102396970 - 102397239	1.4e-257	89.30	271

Localización de *PnSERK2* en el genoma de *Oryza sativa*

El análisis *in silico* de la secuencia del gen *PnSERK2* muestra dos regiones ortólogas en el genoma de arroz, localizados sobre los cromosomas 4 y 8 (Figura II.13). Una de ellas se encuentra localizada sobre el brazo largo del cromosoma cuatro de arroz en la posición 22.682.669 - 22.684.503 (Tabla II.8), conteniendo 1669 nucleótidos del gen desde el nucleótido 74 al 1723. La segunda se sitúa sobre la región distal del brazo corto del cromosoma 8 de arroz, en la posición 4.347.085 - 4.348.253, comprendiendo los nucleótidos desde el 673 al 1942 (1269 pb) del gen.

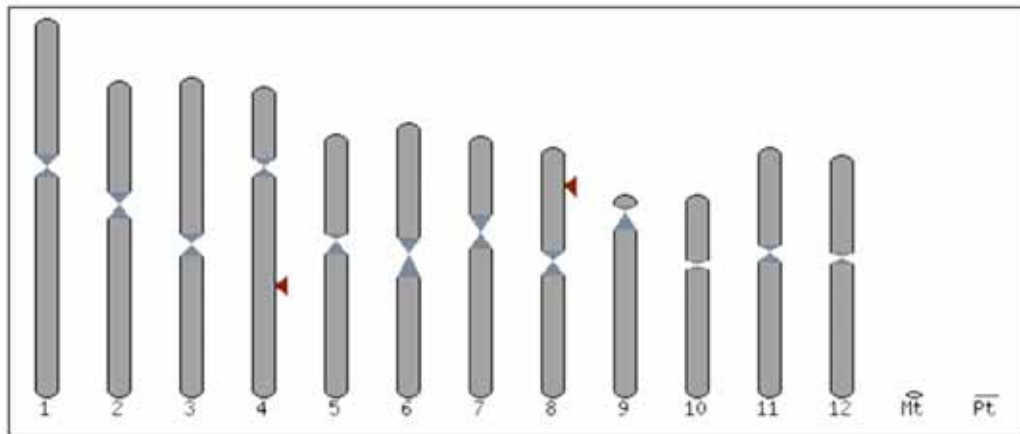


Figura II.13: Gráfico del genoma de *Oryza sativa*. Las puntas de flechas rojas sobre los cromosomas de arroz indican la posición física en la cual se encuentran las regiones ortólogas al gen *PnSERK2*.

Tabla II.8: Datos del alineamiento de secuencias entre *PnSERK2* y el genoma de *Oryza sativa*.

<i>PnSERK2</i>	Crom. Arroz	Posición	e-value	% Identidad	Longitud
74 - 192	Crom. 4	22682669 - 22682787	3.1e-213	89.17	120
673 - 1036	Crom. 4	22683236 - 22683599	3.1e-213	85.79	366
1179 - 1529	Crom. 4	22683962 - 22684310	3.1e-213	84.75	354
1604 - 1723	Crom. 4	22684384 - 22684503	3.1e-213	85.25	122
673 - 793	Crom. 8	4348253 - 4348373	4.5e-58	85.25	122
1290 - 1527	Crom. 8	4347548 - 4347785	8.9e-71	83.40	241
1846 - 1942	Crom. 8	4347085 - 4347181	8.9e-71	85.00	100

Localización de *PnSERK2* en el genoma de *Zea mays*

La localización física del gen *PnSERK2* sobre el genoma de maíz indica que el mismo se encuentra representado por dos copias posicionadas sobre los cromosomas 4 y 5 de maíz (Tabla II.9, Figura II.14)

Tabla II.9: Datos del alineamiento de secuencias entre *PnSERK2* y el genoma de *Zea mays*

<i>PnSERK2</i>	Crom. <i>Zea mays</i>	Posición	e-value	% Identidad	Longitud
5 - 329	Crom. 5	176215947 - 176216271	0.	90.46	325
356 - 505	Crom. 5	176216298 - 176216449	0.	83.97	156
657 - 1137	Crom. 5	176216601 - 176217081	0.	92.15	484
1170 - 1788	Crom. 5	176217103 - 176217715	0.	92.89	619
1805 - 1973	Crom. 5	176217737 - 176217905	0.	88.76	169
5 - 329	Crom. 4	124636274 - 124636598	0.	89.54	325
657 - 1123	Crom. 4	124636927 - 124637393	0.	90.41	469
1174 - 1745	Crom. 4	124637440 - 124638004	0.	92.48	572

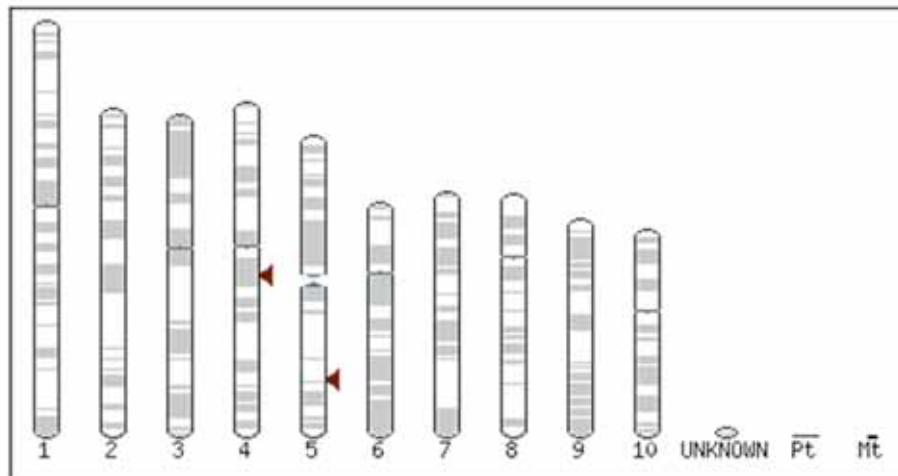


Figura II.14: Gráfico del genoma de *Zea mays*. Las puntas de flechas rojas sobre los cromosomas de arroz indican la posición física en la cual se encuentran las regiones ortólogas al gen *PnSERK2*

En la posición 124636274 - 124638004 del cromosoma 4 de maíz vemos el fragmento de mayor longitud: abarcando los nucleótidos del 5 al 1745 (1740 pb) del gen *PnSERK2*. Otra región de alta homología que comprende una fracción apenas mayor (desde el nucleótido 5 al 1973) del gen *PnSERK2*, se localiza sobre el cromosoma 5 de maíz, en las posicio-

nes 176215947 - 176217905. En ambas secuencias ortólogas se observa nuevamente la falta de ortología interna por presencia de intrones.

Localización de los genes *PnSERK* sobre el mapa genético de *Paspalum notatum*

Con el objetivo de determinar la localización de las secuencias de los genes *PnSERK 1* y *2* en el mapa genético de *P. notatum* se realizaron experimentos tendientes a detectar polimorfismos genéticos de sus respectivas secuencias, entre los genotipos Q4188 y Q4117 (progenitores de la población de mapeo utilizados para la construcción de un mapa de ligamiento genético por Stein y col., 2007) que resultaran adecuados para los análisis de ligamiento. A pesar de numerosos intentos que incluyeron distintas técnicas como la generación de marcadores del tipo SCAR y CAPS, no fue posible detectar polimorfismos segregantes entre ambos progenitores. Este resultado indica que existe una alta homología entre las secuencias *PnSERK* en ambos genotipos (Figura II.15).

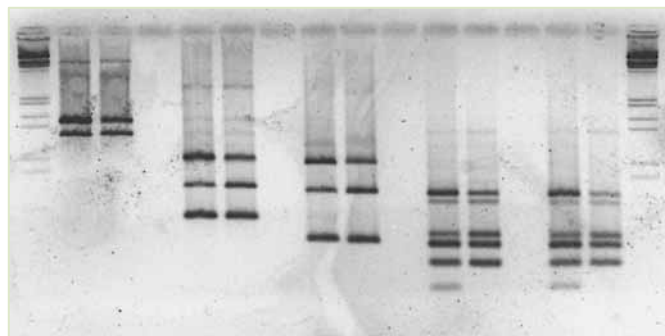


Figura II.15. Gel de agarosa al 2%. Ensayo de CAPS a partir del gen *PnSERK2* sobre los genotipos parentales, utilizando cinco enzimas de restricción diferentes.

CLONADO Y ESTUDIOS DE EXPRESIÓN DEL GEN *EXS*

Clonado de una secuencia parcial del *PnEXS* genómico.

Tres secuencias conocidas de los dominios *EXS* de arroz, maíz y sorgo fueron alineadas (EES17313.1 de *Shorgum bicolor*, ACG42380.1 de *Zea mays*, BAG89435 de *Oryza sativa*) con el objetivo de determinar las zonas conservadas del dominio. En base a este alineamiento fueron diseñados cebadores heterólogos (Tabla II.1). La amplificación con estos

cebadores generaron un fragmento de 2298 pb, presente en el genotipo Q4117 y Q4188, el cual fue clonado y secuenciado. Las secuencias aisladas a partir de ambos individuos (sexual y apomíctico) resultaron ser muy similares entre sí (ID: 99%, e-value 0.0), observándose solo ciertas diferencias localizadas, en su mayoría, en regiones no codificantes.

Análisis de similitud de secuencias de *PnEXS*

La similitud de la secuencia del gen *PnEXS* fue realizada en la base de datos del NCBI. Al efectuar un análisis del tipo BLASTN, este fragmento presentó una alta similitud de secuencia con varios genes *EXS* (Tabla II.10), conservando el 99% de similitud de secuencia con el gen *EXS* XM_002443430.1 de Sorgo bicolor (e-value: 2×10^{-54}), un 90% de similitud, con el gen *EXS* AL928754.2 de *Oryza sativa* (e-value: 2×10^{-54}) y un 97% con el gen *EXS* NM_003579155.1 de *Zea mays* (e-value: 3×10^{-46}).

Tabla II.10. Análisis de similitud de secuencias (BLAST) para el *PnEXS*.

Accesión	Descripción	% Cob.	e-Value	Max Iden.
XM_002443430.1	Sorghum bicolor hypothetical protein, mRNA	28%	$2,00 \times 10^{-55}$	99%
XM_002443428.1	Sorghum bicolor hypothetical protein, mRNA	11%	$2,00 \times 10^{-55}$	95%
NM_001157853.1	Zea mays EXS, C-terminal (LOC100284958), mRNA	28%	$3,00 \times 10^{-47}$	97%
AL928754.2	Oryza sativa chromosome 12, BAC OSJNBa0056D07, sequence	50%	$2,00 \times 10^{-55}$	90%
AL713904.3	Oryza sativa chromosome 12, . BAC OJ1306_H03, sequence	50%	$2,00 \times 10^{-55}$	90%
XM_003563711.1	Brachypodium distachyon SPX and EXS domain, mRNA	28%	$1,00 \times 10^{-39}$	98%
AK248801.1	Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone: FLbaf5102, mRNA	9%	$5,00 \times 10^{-37}$	91%

El análisis de las secuencias de *OsEXS*, *ZmEXS* y *SbEXS*, indican que los mismos poseen entre 12 y 13 exones según la especie. Por ejemplo, el gen *EXS* en *Oryza sativa* presenta 13 exones, mientras que en *Zea mays* y *Sorghum bicolor* contiene 12 exones, aparentemente el *OsEXS* presenta un exón más en el extremo 5' de la secuencia. Al realizar un alineamiento de estas secuencias con la secuencia del *PnEXS* utilizando una versión libre del programa Sequencher 4.0, reveló que la misma comprendía la secuencia del gen *EXS* desde los exones 4 al 10 según el alineamiento con las secuencias de *SbEXS* y *ZmEXS*, o de los exones 5 al 11 según la secuencia del gen *OsEXS*, interrumpida por los correspondientes intrones (Figura II.16).

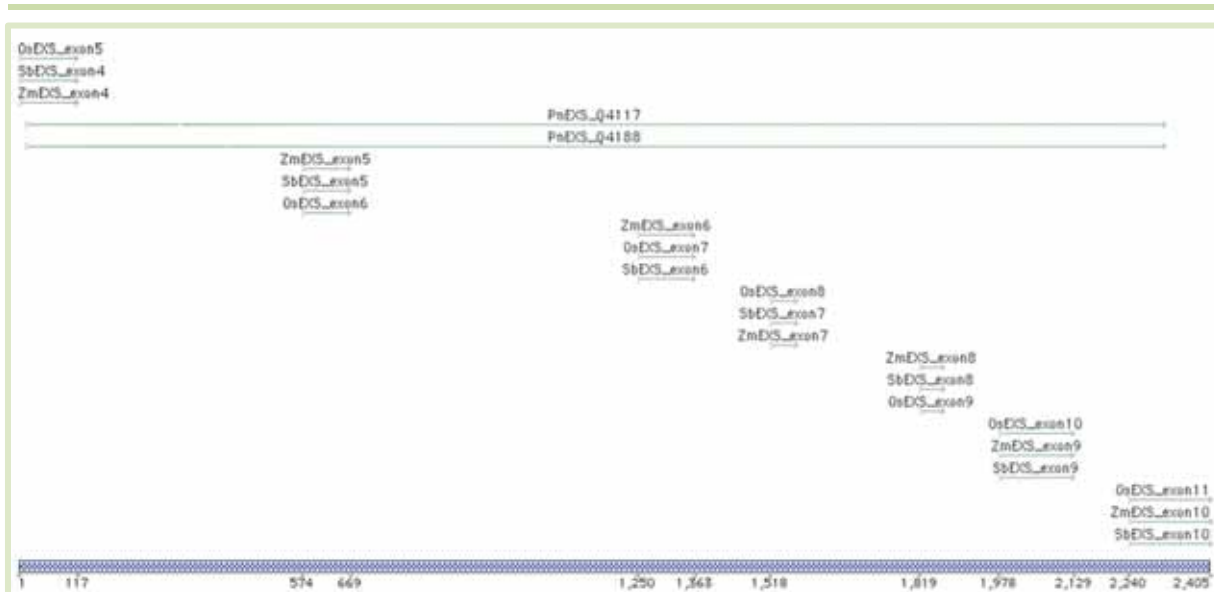


Figura II.16. Análisis de alineamiento de secuencias entre los genes *PnEXS* y los exones correspondientes a los genes *SbEXS*, *ZmEXS* y *OsEXS*.

Estos resultados indicaron que *PnEXS* es similar a los genes *ZmEXS* y *SbEXS*. Para corroborar este resultado, se realizó un análisis de similitud de secuencias utilizando la herramienta BLASTN del programa presente en la base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) seguido de un análisis filogenético con las secuencias halladas en dicha base de datos.

Estudios de filogenia de secuencias del gen *EXS* de *P. notatum*

Con el fin de investigar la relación existente entre el gen *PnEXS* con otros genes *EXS* conocidos, se realizaron estudios filogenéticos utilizando el programa Phylip (Felsenstein 2005). Para dicho análisis se utilizaron tanto las secuencias aminoacídicas como nucleotídicas de estos genes registradas en la base de datos del NCBI. Siete secuencias nucleotídicas codificantes de genes *EXS*: EES17313.1 de *Sorgo bicolor*, ACG42380.1 de *Zea mays*, BAG89435 de *Oryza sativa*, JF747408.1 de *Lolium perenne* y XM_003533575 de *Glycine max*, junto a las dos secuencias pertenecientes a *P. notatum* fueron analizadas. Como se puede observar en la figura II.17, las secuencias nucleotídicas de *P. notatum* presentan una alta similitud de secuencia con los genes *EXS* de *Sorgo bicolor*, *Zea mays*, *Oryza sativa*, *Lolium perenne* y *Glycine max*.

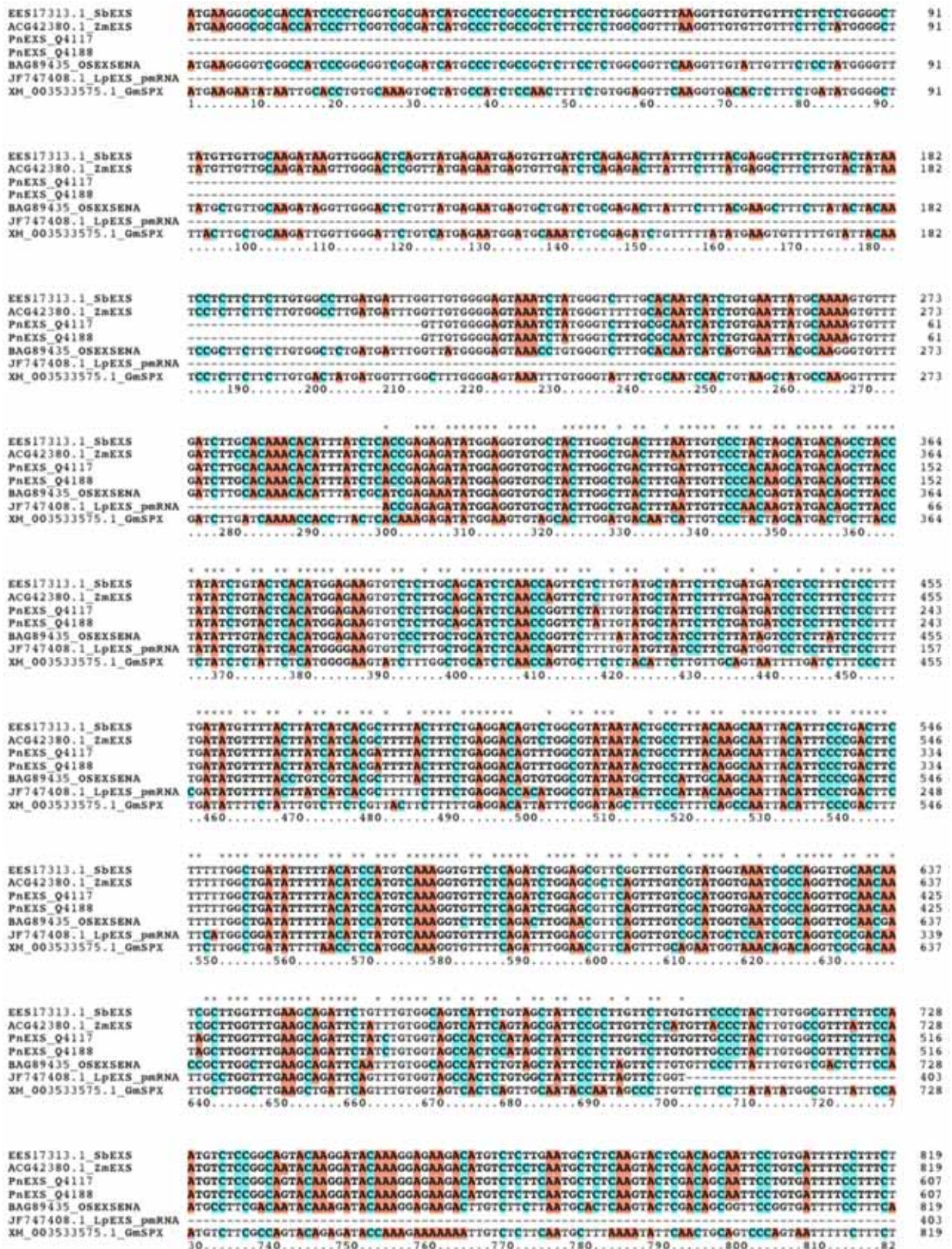


Figura II.17. Análisis de alineamientos de secuencias nucleotídicas codificantes de varios genes EXS.

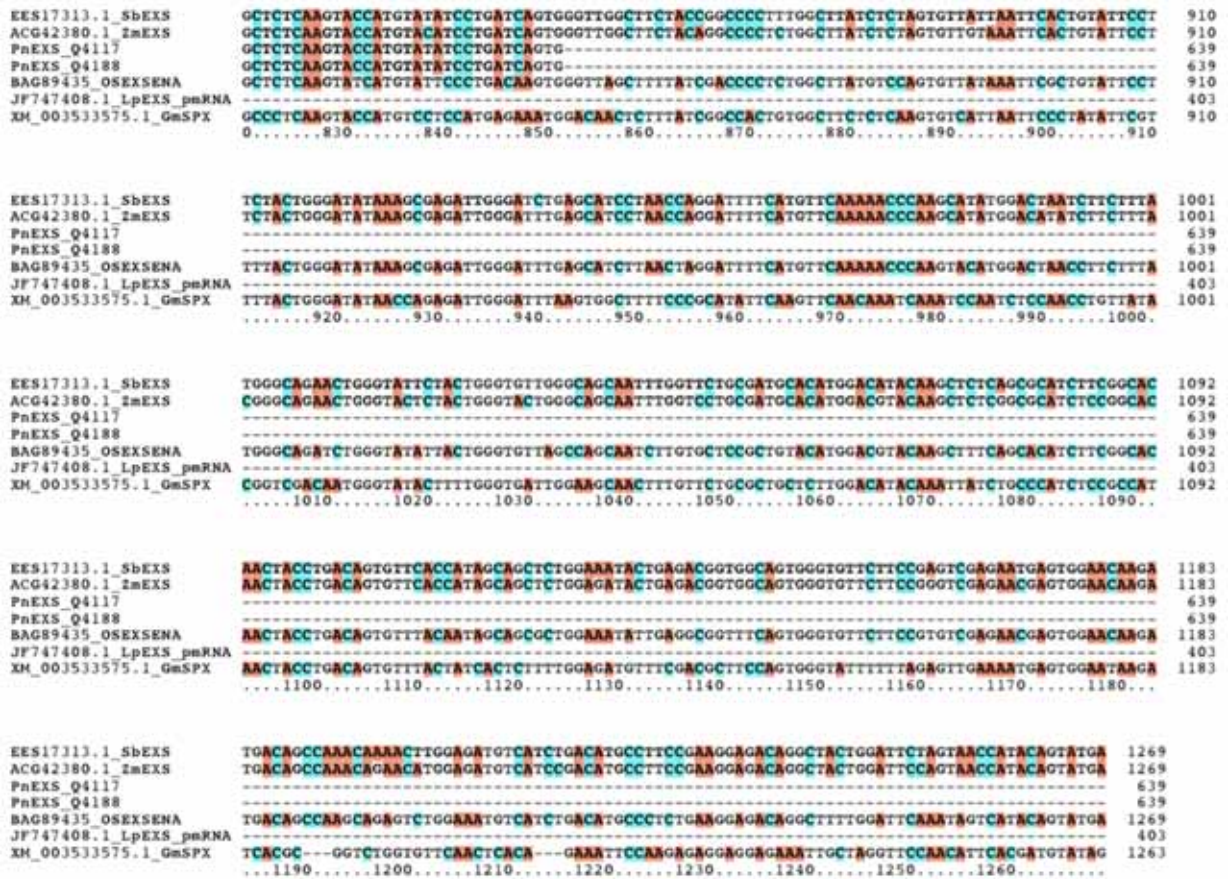


Figura II.17. (cont.) Análisis de alineamientos de secuencias nucleotídicas codificantes de varios genes EXS.

La secuencia codificante del gen *PnEXS* comprende desde el nucleótido 213 al 851 de la secuencia consenso, tan solo 639 pb de los 2298 pb que contiene la secuencia genómica aislada. El análisis del alineamiento muestra que la secuencia codificante del genotipo Q4117 difiere en solo dos nucleótidos de la secuencia codificante de Q4188. En la posición 525 de la secuencia consenso, se observa un cambio de una adenina (A), presente en el genotipo Q4117, por una guanina (G), en el genotipo Q4188, y en la posición 696 una citosina (C), en el genotipo Q4117, fue reemplazada por una timina (T) en el individuo Q4188.

Posteriormente realizamos un análisis utilizando las secuencias proteicas de los genes *EXS* (Figura II.18). Al efectuar este estudio de alineamiento con las secuencias aminoacídicas, notamos que las transversiones (mutaciones en las que se produce el cambio de una piridina por una purina o viceversa), encontradas entre el genotipo sexual y el genotipo apomítico, resultaron ser mutaciones silenciosas, es decir, que a pesar de exhibir una base

diferente, el aminoácido para el cual codifica el codón al cual pertenece esta base no se modifica.

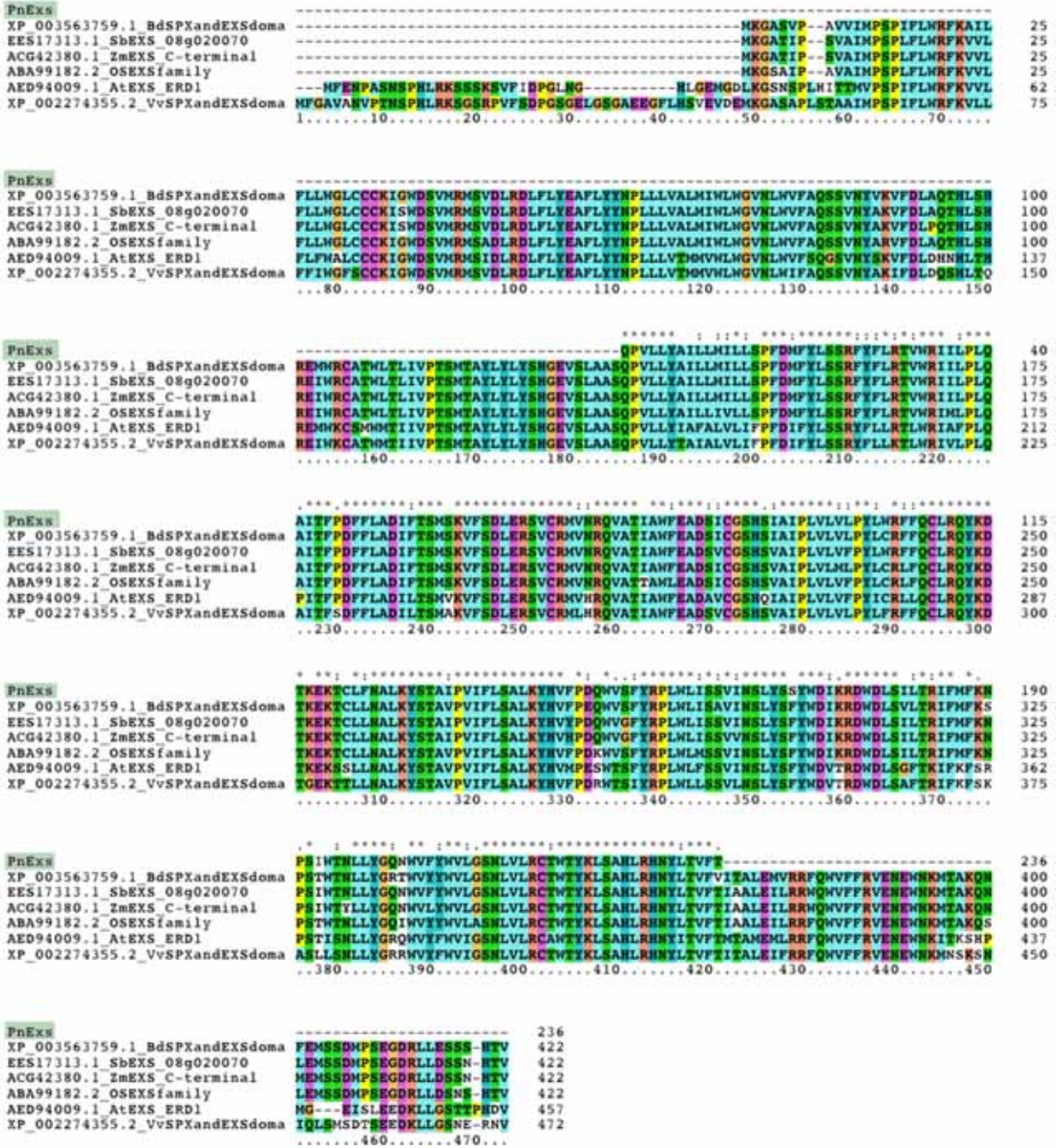


Figura II.18 Análisis de alineamiento de secuencias aminoácidas de varios genes EXS hallados en las bases de datos de NCBI.

El análisis de la secuencia aminoacídica muestra una secuencia consenso de 472 aminoácidos siendo la secuencia con mayor número de residuos aminoacídicos utilizada la correspondiente al gen de *Vitis vinífera* (XP_002274355.2) (Figura II.18). Se puede advertir que las secuencias proteicas, como era de esperarse luego de observar el alineamiento nucleotídico, es altamente similar en las distintas especies analizadas. La secuencia proteica del gen *PnEXS* es parcial comenzando en el aminoácido 186 hasta a la posición 421 (incluyendo 236 aminoácidos totales).

Al confeccionar el árbol filogenético podemos ver que el gen *PnEXS* se encuentra asociado a los genes *EXS* de sorgo bicolor y maíz (Figura II.19). Esto se ajusta a lo esperado, debido a que los tres pertenecen a la familia de las *Poaceas*, subfamilia *Panicoideas*.

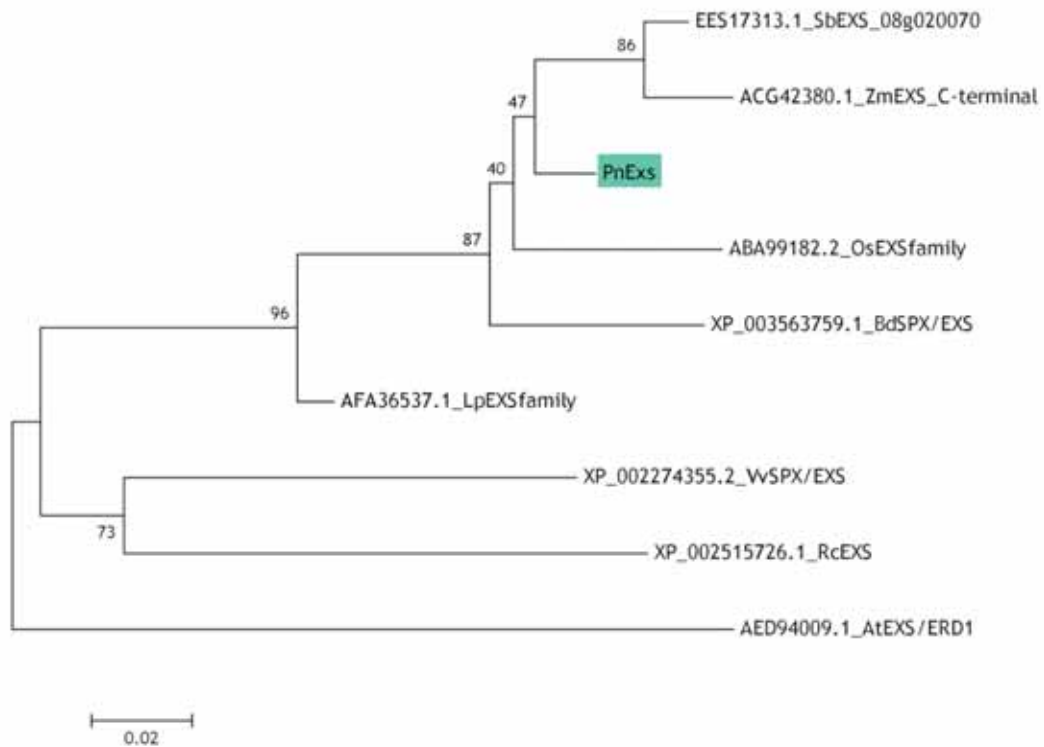


Figura II.19. Árbol filogenético de varios genes *EXS* hallados en la base de datos del NCBI.

Análisis de número de copias de *PnEXS*

Con el fin de estimar el número de copias aproximado de la familia *EXS* en *P. notatum* se realizó una hibridación de Southern blot, utilizando el fragmento de 2298 pb correspon-

diente a los genes *PnEXS*. Se hibridaron los dos genotipos parentales: Q4117 (apomíticos) y Q4188 (sexual) (Figura II.20). El ADN genómico se digirió con tres enzimas de restricción (*EcoRI*, *HindIII* y *HaeIII*). Tanto *EcoRI* como *HaeIII* poseen sitios de restricción interno en la sonda. *EcoRI* contiene dos sitios de restricción en la misma, generando 3 fragmentos de diferentes tamaños: uno de 960 pb, otro de 810 pb y un tercero de 560 pb aproximadamente. *HaeIII*, posee un único sitio de restricción que genera dos fragmentos: uno de 990 pb y otro de 1340 pb. *HindIII* no digieren la secuencia de 2298 pb internamente.

Como resultado de la hibridación se detectaron entre 4-5 bandas de hibridación del *PnEXS* con la enzima de restricción *HindIII*, 6 fragmentos con *EcoRI* y 4 fragmentos con *HaeIII*, por lo cual se deduce que existen entre 2 y 4 copias correspondientes diferentes genes y/o alelos de *EXS* en el genoma de *P. notatum* (Figura II.20).

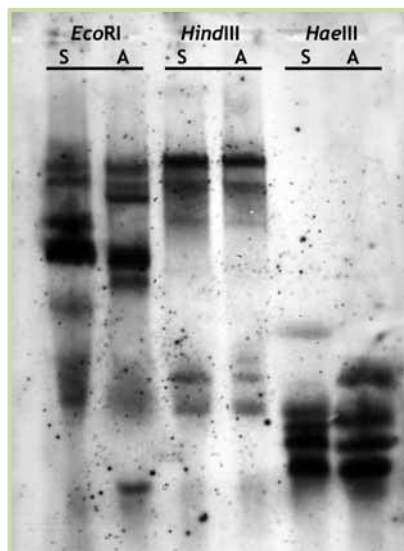


Figura II.20. Hibridación de Southern Blot del gen *PnEXS* sobre ADN de *P. notatum*.

Análisis cuantitativo de la expresión de *PnEXS* en tejido floral

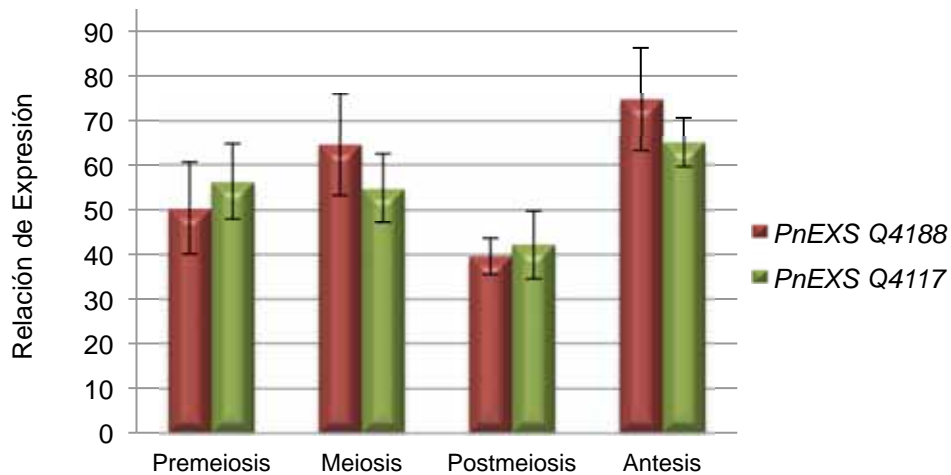
Con el propósito de estudiar los patrones de expresión del *PnEXS* durante el desarrollo reproductivo de *P. notatum*, se realizaron experimentos de qRT-PCR sobre ADNc obtenido a partir de ARN total extraído de espiguillas durante diferentes estadios del desarrollo reproductivo (premeiosis, meiosis, postmeiosis y anthesis) de los genotipos Q4188 y Q4117. Las reacciones de amplificación fueron realizadas utilizando cebadores específicos del gen (Tabla II.11). El amplicón obtenido fue de 170 pb.

Tabla II.11. Cebadores utilizados para amplificar el gen *PnEXS* a partir de cDNA.

Cebador	Secuencia
PRTEXSF	GTGTTCTCAGATCTGGAGCGTTCCGG
PRTEXSR	CGCCACAAGTAGGGGAACACAAGAAG

Los análisis de expresión relativa en los diferentes estadios del desarrollo mostraron que la expresión de gen *PnEXS* es similar en ambos genotipos (Figura II.21). Un análisis estadístico del mismo utilizando el programa Rest2009 reveló que las diferencias de expresión encontradas fueron no significativas ($p > 0,05$).

A)



B)

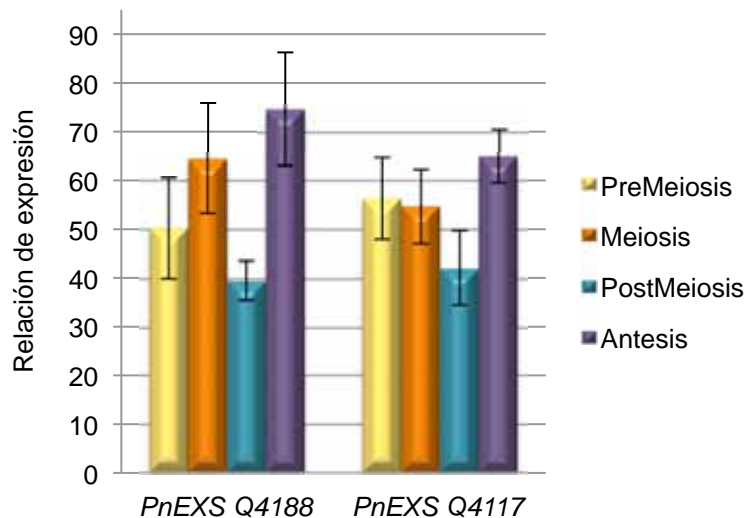


Figura II.21: Gráfica de expresión relativa vs. estadios del desarrollo reproductivo. A) Comparación entre los genotipos apomícticos y sexual. B) Comparación entre los distintos estadios del desarrollo reproductivo.

Estudios de hibridación *in situ* de tejido

La hibridación *in situ* de tejido se realizó con el fin de observar la localización de la expresión de los transcritos del gen *PnEXS* en inflorescencias de los genotipos Q4188 y Q4117. Dos estadios diferentes del desarrollo reproductivo: el estadio de meiosis y el de antesis, fueron analizados, utilizando una sonda específica para el gen *PnEXS* de 600 pb, que contenía a los exones 9 y 10.

En la Figura II.22, se muestran los resultados obtenidos para la hibridación *in situ* de tejido del gen *PnEXS*. Al hibridar con la sonda antisentido del gen *PnEXS*, la cual detecta al transcripto sentido del mismo, no se pudo detectar hibridación en ninguno de los óvulos en el estadio de meiosis analizados de ambos genotipos: Q4117 (apomítico) (Figura II.22.a) y Q4188 (sexual) (Figura II.22.d). Sin embargo, en el estadio de antesis, se pudo localizar la expresión del transcripto sentido tanto en el genotipo sexual como en el apomítico. La disposición de la señal fue muy contrastante entre los genotipos con diferente modo de reproducción. La expresión del transcripto sentido del *PnEXS* se localiza en todo el tegumento del ovario, del individuo sexual, incluyendo el aparato del huevo (Figura II.22.e y f), en cambio, en el genotipo apomítico, solo pudo advertirse una pequeña señal de hibridación sobre algunas células del tegumento que rodean los sacos embrionarios (Figura II.22 b y d).

Al realizar el estudio utilizando la sonda sentido, el genotipo sexual no presentó un nivel detectable de expresión en ninguno de los dos estadios ensayados (Figura II.22 j-l). Sin embargo, curiosamente, en el genotipo apomítico podemos observar una región en la cual algunas células de la nucela, localizadas en el extremo opuesto a la célula madre de la megáspora, presentan una hibridación apreciable durante el estadio de meiosis (Figura II.22 h-i). La expresión del gen anti*PnEXS* sobre estas células de la nucela no nos permite discernir si este gen presenta o no una función en la generación de células iniciales de la aposporía en genotipos apospóricos, indicando que estudios mas exhaustivos sobre el mismo deben ser realizados poder esclarecer su posible función en dichas células. En el estadio de antesis no se detectó hibridación en ninguno de los dos genotipos estudiados (no mostrado).

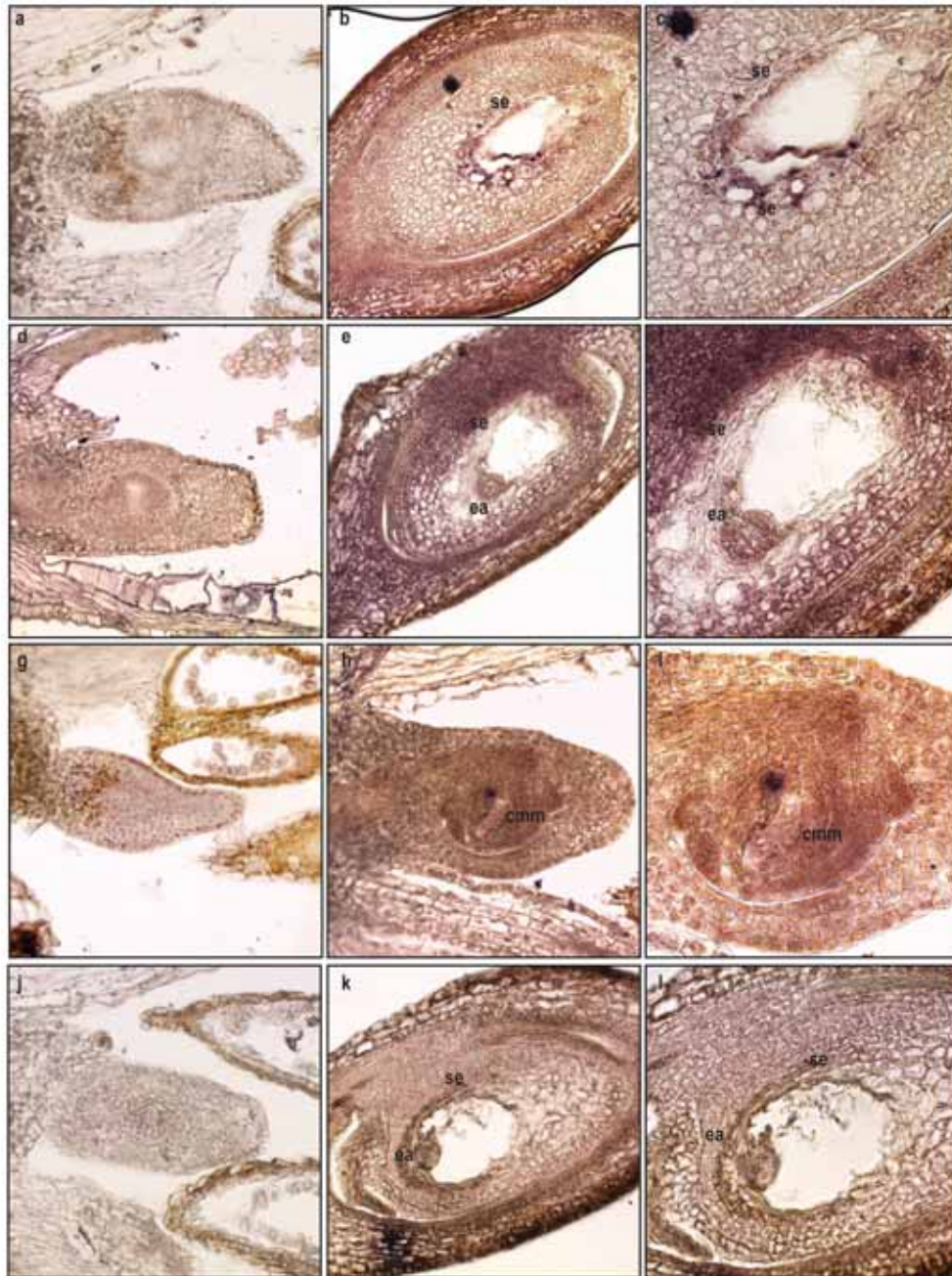


Figura 11.22. Hibridación *in situ* de tejido del gen *PnEXS* en ovarios. a-f) Hibridación con la sonda antisentido (detecto transcritos sense). g - l) Hibridación con la sonda sentido. a - c y g - i) Hibridación sobre óvulos del genotipo apomíctico (Q4117) en los estadios de meiosis (a, g, h e i) y antesis (b y c). d - f y j - l) Hibridación sobre óvulos del genotipo sexual (Q4188) en los estadios de meiosis (d y j) y antesis (e, f, k y l).

Localización *in silico* de la secuencia de *PnEXS* sobre el genoma de arroz y maíz

Con el objetivo de localizar las secuencias ortólogas al gen *EXS* aislado de *P. notatum* en especies modelo, se realizó un estudio de mapeo *in silico* sobre *Oryza sativa* y *Zea mays* utilizando las bases de datos públicas Gramene (www.gramene.org) y Maizesequence (www.maizesequence.org).

Localización de *PnEXS* en el genoma de *Oryza sativa*

Los análisis de alineamiento realizados con el gen *PnEXS* sobre el genoma de *Oryza sativa* revelaron la presencia de tan solo una copia del gen ubicada sobre el cromosoma 12 de arroz (Figura II.23). En la tabla II.12 se muestran la localización física en pares de bases de la secuencia de *PnEXS*, el cromosoma de arroz en el cual se localiza, la posición en pares de bases sobre el cromosoma de arroz, el e-value, el porcentaje de identidad de secuencia y la longitud de la misma.

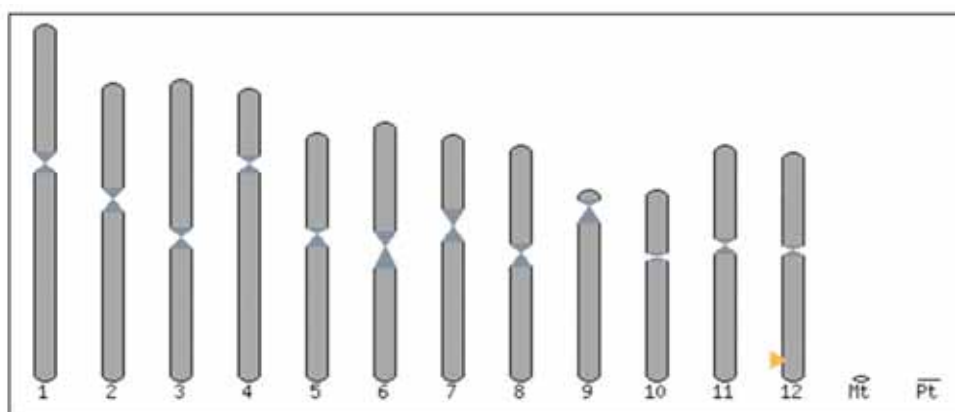


Figura II.23: Gráfico del genoma de *Oryza sativa*. Las puntas de flechas amarillas sobre los cromosomas de arroz indican la posición física en la cual se encuentran las regiones ortólogas al gen *PnEXS*.

La posición exacta sobre el cromosoma 12 de arroz corresponde a: 24943149-24945591 pb (e-value: $1,7 \times 10^{-163}$), separado por regiones que no presentan homología alguna de secuencia. Estas secuencias no homólogas internas consistirían en los intrones del gen.

El fragmento del *PnEXS* con similitud de secuencia en esta región del cromosoma 12 de arroz comprende 2275 nucleótidos que abarcan desde el nucleótido 5 al 2280 del gen.

Tabla II.12: Datos del alineamiento de secuencias entre *PnEXS* y el genoma de *Oryza sativa*.

<i>PnEXS</i>	Crom. Arroz	Posición	e-value	% Identidad	Longitud
5 - 121	Crom. 12	24945475 - 24945591	1.7e-163	89.74	117
544 - 672	Crom. 12	24945006 - 24945134	1.7e-163	91.47	129
1229 - 1366	Crom. 12	24944206 - 24944343	1.7e-163	86.43	140
1495 - 1558	Crom. 12	24943994 - 24944057	1.7e-163	98.44	64
1792 - 1860	Crom. 12	24943659 - 24943726	1.7e-163	89.86	69
1957 - 2117	Crom. 12	24943321 - 24943481	1.7e-163	83.44	163
2218 - 2280	Crom. 12	24943149 - 24943211	1.7e-163	90.48	63

Localización de *PnEXS* en el genoma de *Zea mays*

El mapeo *in silico* del gen *PnEXS* sobre el genoma de *Zea mays*, nos muestra que el mismo presenta secuencias ortólogas sobre los cromosomas 1 y 3 de maíz (Figura II.24).

En la tabla II.13 podemos ver que la copia sobre el cromosoma 3 de *Zea mays* comprende casi la totalidad de la secuencia (2290 pb de 2298pb) con una alta homología (e-value: $1.2e^{-316}$). Su localización relativa abarca los nucleótidos comprendidos entre los pares de base 114875597 - 114880843.

En el cromosoma 1, la secuencia ortóloga al gen *PnEXS* se extiende desde las bases 166714142 a las bases 166716373, conteniendo 2131 nucleótidos del mismo.

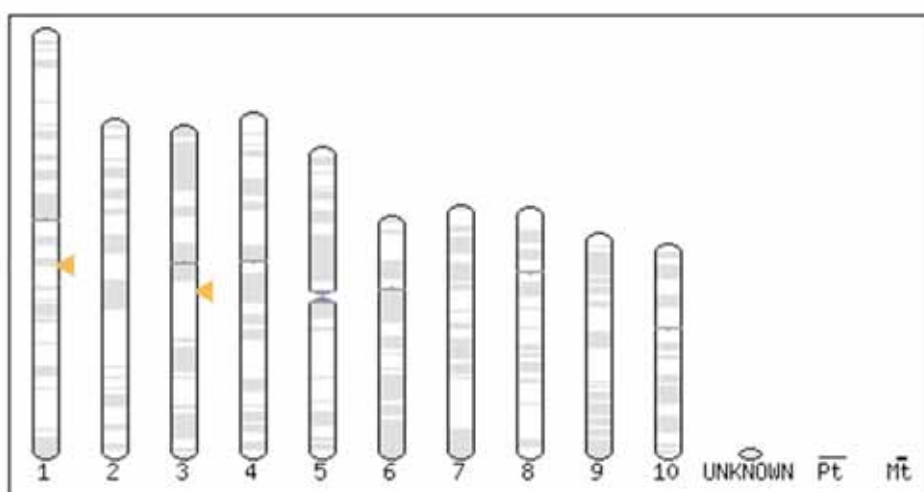


Figura II.24: Gráfico del genoma de *Zea mays*. Las puntas de flechas amarillas sobre los cromosomas de arroz indican la posición física en la cual se encuentran las regiones ortólogas al gen *PnEXS*.

Tabla II.13: Datos del alineamiento de secuencias entre *PnEXS* y el genoma de *Zea mays*.

<i>PnEXS</i>	Crom. <i>Zea Mays</i>	Posición	e-value	% Identidad	Longitud
1 - 109	Crom. 3	114880735 - 114880843	1.2e-316	97.25	109
463 - 670	Crom. 3	114877441 - 114877647	1.2e-316	89.62	212
1164 - 1375	Crom. 3	114876544 - 114876755	1.2e-316	89.35	216
1917 - 2131	Crom. 3	114875727 - 114875941	1.2e-316	88.02	217
2179 - 2290	Crom. 3	114875597 - 114875710	1.2e-316	92.11	114
1 - 109	Crom. 1	166716265 - 166716373	1.1e-301	98.17	109
534 - 670	Crom. 1	166715640 - 166715777	1.1e-301	91.30	138
1182 - 1365	Crom. 1	166714958 - 166715143	1.1e-301	93.05	187
1400 - 1568	Crom. 1	166714756 - 166714922	1.1e-301	86.71	173
1917 - 2131	Crom. 1	166714142 - 166714357	1.1e-301	89.86	217

La posición en la cual se ubica en gen *PnEXS*, tanto en arroz como en maíz, resulta interesante, ya que fue informado que en estas regiones cromosómicas se encuentran varios de los marcadores moleculares 100% ligados a la aposporia tanto en *P. notatum* como en *P. simplex* (Martínez y col., 2003, Stein y col., 2004, Pupilli y col., 2004, Podio y col., 2012b).

Esta franja cromosómica sinténica entre *P. notatum*, *P. simplex*, arroz y maíz podrían revelar el agrupamiento de ciertos genes con funciones comunes o relacionadas, como por ejemplo, aquellos que direccionan el modo de reproducción: aposporía o sexualidad.

Localización de la secuencia *EXS* en el mapa genético de *Paspalum notatum*

Con el objetivo de localizar al gen *EXS* sobre el mapa genético de *P. notatum* se realizaron experimentos con diferentes tipos marcadores moleculares: CAPS, SSCP y RFLP sobre los genotipos parentales (Q4188 y Q4117) de la población de mapeo y 65 progenies F₁.

Experimentos de CAPS

Al realizar el mapeo por CAPS, encontramos que los amplicones de *PnEXS* digeridos con *EcoRI* generaron un polimorfismo segregante en la población (Figura II.25). Este marcador permitió mapear uno de los genes y/o alelos del gen *PnEXS* en el mapa genético de *P. notatum*, localizándose sobre el grupo de ligamiento Lg6a perteneciente al genotipo Q4117 (Figura II.26). La posición relativa sobre este grupo de ligamiento parece ser centro-mérica, ya que se ubica simétricamente, a aproximadamente 42 cM de los marcadores que se encuentran en los extremos del grupo de ligamiento.

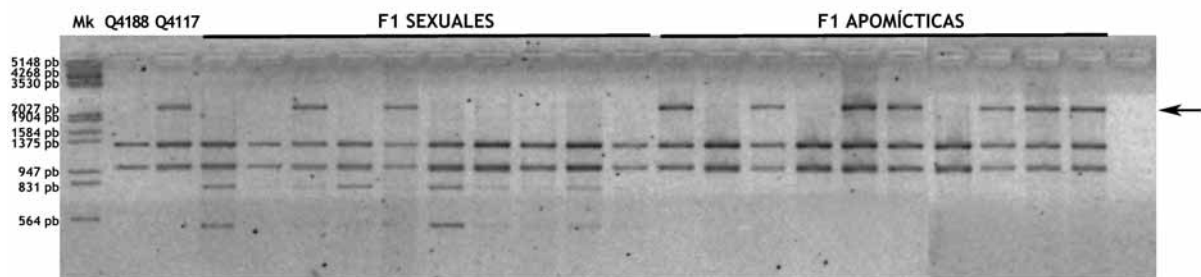


Figura II.25. Gel de agarosa al 2%. Ensayo de CAPS a partir del gen *PnEXS* sobre los genotipos parentales y una fracción de la población segregante por el modo de reproducción (10 F₁ sexuales y 10 F₁ apomícticas).

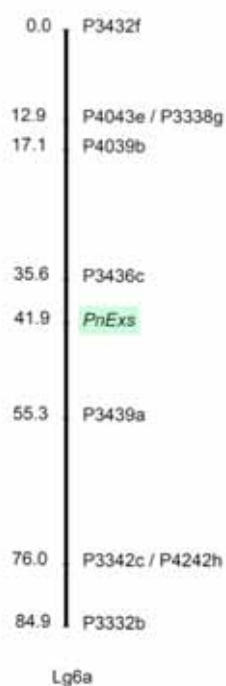


Figura II.26. Grupo de ligamiento LgM6a del genotipo Q4117 conteniendo una copia del gen *PnEXS*.

Este resultado indica que el fragmento amplificado de esta copia del gen *PnEXS* no está genéticamente ligado a la aposporía en *P. notatum*.

Experimentos de SSCP

Conociendo que entre las secuencias genómicas de los genotipos Q4117 y Q4188 presentan diferencias a nivel de bases que podrían generar polimorfismo en la conformación de la simple hebra de ADN, fueron realizados experimentos de SSCP, con el objetivo de localizar otra de las copias del *PnEXS* en *P. notatum*. En este caso, los fragmentos amplificados de 500 pb entre los genotipos parentales y los 65 individuos F_1 fueron resueltos en un gel de MDE al 0,5% (Figura II.27). En este análisis, fue observada una banda polimórfica entre los genotipos parentales, la cual resultó segregante en la población de mapeo. Con estos datos fue posible localizar esta nueva copia en el grupo de ligamiento Lg17a del genotipo Q4117 utilizando el programa Mapmaker 3.0.

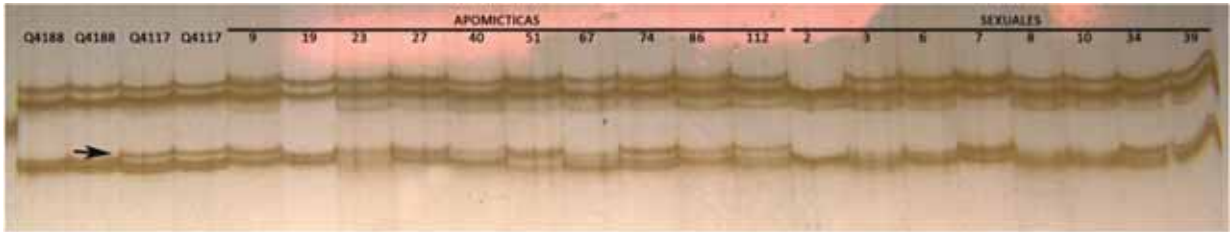


Figura II.27. Gel MDE al 0,5%, con los genotipos parentales y parte de la población de mapeo. La flecha indica la banda presente en el genotipo apomíctico y ausente en el genotipo sexual, que segrega en la población.

Los resultados arrojados por el programa de mapeo indicaron que una de las copias del gen *PnEXS* se localiza en el grupo de ligamiento Lg17a. Esto resultó ser interesante ya que este grupo contiene al locus responsable de la aposporía, y se posicionó a aproximadamente unos 20 cM de esta región (Figura II.28).

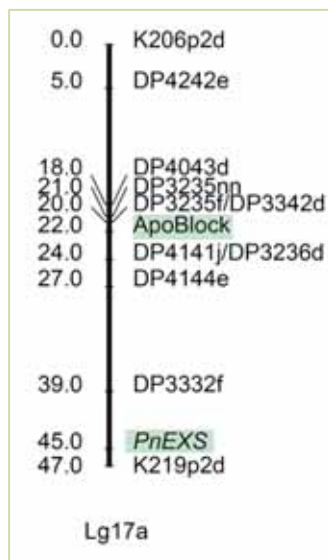


Figura II.28. Grupo de ligamiento LgM17a del genotipo Q4117 conteniendo una copia del gen *PnEXS*.

Experimentos de RFLP

Como había sido informado con anterioridad que el gen *PnEXS* se encontraba 100% ligado a la aposporía en *P. notatum* (Hosjgaard y col., 2011), realizamos un experimento de RFLP, para lograr distinguir la copia de *PnEXS* ligada al carácter.

A través de este experimento, utilizando los genotipos parentales y grupos segregantes para el modo de reproducción, fue posible observar una banda presente en el genotipo parental apomítico, la cual se encontraba ausente en el grupo apomítico (BA) y presente en todos los grupos sexuales (BS) (Figura II.29). Si bien, no se ha podido mapear aun este marcador debido a que no fue posible analizar los patrones de hibridación sobre todos los individuos de la población por carecer de ADN genómico, este resultado estaría indicando que al menos una copia del gen se halla ligada en repulsión con el locus responsable de la aposporía. Análisis más exhaustivos serán necesarios para confirmar esta hipótesis.

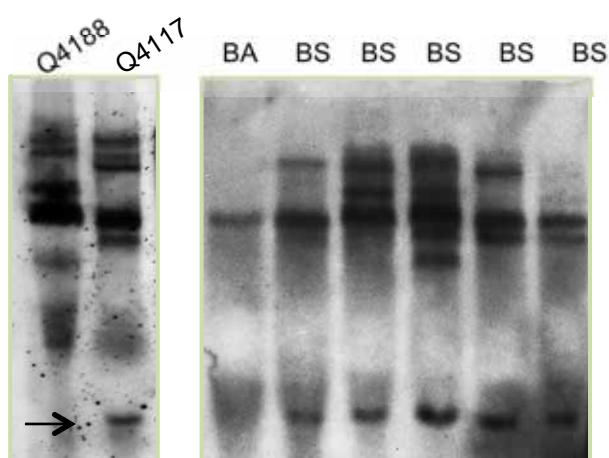


Figura II.29. Análisis de RFLP sobre los genotipos parentales y grupos segregantes por el modo de reproducción. La flecha indica la banda presente en el genotipo parental apomítico y en los grupos sexuales.

Es posible que los tipos de marcadores empleados, o las enzimas utilizadas en esta oportunidad estén localizando algunas de las 4 - 5 copias del gen no ligadas genéticamente a la aposporía. Sin embargo, es posible que exista una copia del gen *PnEXS* que si esté relacionada con el modo de reproducción, tal como fue informado por Calderini y col., (2006) y Hosjgaard y col., (2011) en *P. simplex* y *P. notatum*.

Discusión

CLOADO Y ESTUDIOS DE EXPRESIÓN DE GENES HOMOLOGOS A *SERK*

La familia de genes *SERK* (somatic embryogenesis receptor like kinase) ha sido parcialmente caracterizada a nivel funcional en varias especies de plantas. En *Arabidopsis thaliana*, la familia consta de cinco miembros, que están involucrados en al menos cinco vías de señalización diferentes. *AtSERK1* y *AtSERK2* son esenciales para la microsporogénesis; *AtSERK3* cumple funciones en vías controladas por brasinoesteroides y es parcialmente redundante con *AtSERK1*. *AtSERK3* controla también la inmunidad innata (Kemmerling y col., 2007) y está implicada en la percepción de la flagelina (Chinchilla y col., 2007, Heese y col., 2007). Junto con *SERK4/BKK1*, *SERK3* controla la muerte celular de la planta (He y col., 2007, Kemmerling y col., 2007). La función de *SERK5* aún permanece desconocida.

La familia de genes *SERK* parece ser un ejemplo clásico de redundancia de genes, debido a que no se registraron fenotipos para los mutantes con pérdida de función simples, a excepción de *serk3/bak1* (Albrecht y col., 2008). Un enfoque genético sistemático fue utilizado para analizar mutantes dobles, triples y cuádruples de *Arabidopsis* con el fin de ver si sus fenotipos están relacionadas con la señalización por BR y con la respuesta a patógenos (Albrecht y col., 2008). Los resultados sugieren que sólo *AtSERK1* y *AtSERK3* participan en la señalización mediada por *BRI1*. Solamente los triples y cuádruples mutantes *serk* mostraron fenotipos aditivos, lo que sugiere que los diferentes *SERK* tienen redundancia (Albrecht y col., 2008). Además, *SERK4* resultó ser parcialmente redundante con *SERK3* en la mediación de la respuesta inducida por patógenos (Albrecht y col., 2008). Se propuso que los diferentes miembros *SERK* son sólo redundante en pares, y que los miembros *SERK* que son redundantes dentro de una vía, no son redundantes en otra (Albrecht y col., 2008).

Hasta ahora, no se ha identificado el ligando para los receptores *SERK*. Ellos son considerados como correceptores de no unión a ligando, que son funcionales a través de la formación de heterodímeros u homodímeros (Nolan y col., 2009). *AtSERK1* es capaz de formar homodímeros (Shah y col., 2001). Se demostró que *SERK1* heterodimeriza con *BRI1* y *SERK3* para detectar las señales de BR (Li y col., 2002, Nam y Li 2002, Karlova y col., 2006). Asimismo, se propuso que *SERK1*, junto con *SERK2* heterodimerizan con *EMS1/EXS* (Canales y col., 2002, Zhao y col., 2002) para el control del desarrollo del polen (Albrecht y col., 2005, Colcombet y col., 2005). *SERK3* heterodimeriza con al menos dos receptores diferentes: *BRI1*, para la detección de señales de BR, y *FLS2*, durante el control de la inmunidad innata (Li y col 2002, Nam y Li 2002, Russinova y col 2004, Chinchilla y col 2007). Basándose en la estimación del tamaño que se informó sobre el complejo

BRI1/SERK1/SERK3 de 350-450 kDa (Karlova y col., 2006) y en el hecho de que los receptores de BR1 pueden homodimerizarse (Rusinova y col., 2004), Albrecht y col., (2008) propuso que una posible configuración de este complejo de receptores incluye dos receptores que unen al ligando y dos correceptores. La combinación de diferentes receptores y correceptores en la estructura del heterodímero contribuiría a generar una red compleja que controla la activación de múltiples vías independientes (Albrecht y col., 2008).

En este Capítulo del trabajo de Tesis fueron identificados dos diferentes miembros de la familia SERK de *P. notatum*, denominados *PnSERK1* y *PnSERK2*. Sin embargo, posiblemente existan otros miembros de la familia *SERK* aún no identificados ya que los experimentos de Southern blot realizados con una sonda altamente conservada demuestran que tanto en el genotipo sexual como en el apomítico hay presentes al menos tres copias de estos genes.

El análisis de los dominios de las dos secuencias aisladas confirmó la presencia del dominio quinasa y el dominio transmembrana característicos de este tipo de proteínas. Estos resultados confirmaron que estas secuencias están funcionalmente relacionadas con los receptores del tipo quinasa. Los análisis filogenéticos realizados incluyendo secuencias *SERK* de varias especies indicaron que los genes aislados de *P. notatum* pertenecen a grupos evolutivos diferentes y que *PnSERK2* es el que mayor similitud presenta con los genes *SERK* (*AtSERK1/2*) de *Arabidopsis* relacionados con la embriogénesis somática.

Los estudios de expresión de los genes *PnSERK* en diferentes estadios del desarrollo permitieron asociar estos genes al modo de reproducción. Se caracterizó la expresión de los mismos en tejidos reproductivos de genotipos apomíticos y sexuales. Especialmente, *PnSERK2* mostró niveles altos de expresión en óvulos y diferencias significativas de expresión relativa entre el genotipo sexual y el apospórico durante los estadios de meiosis, post-meiosis y antesis. Los estudios realizados con *PnSERK1* mostraron muy bajos niveles de expresión en ambos genotipos.

Sumado a esto los experimentos de hibridación *in situ* de tejidos con fragmentos del gen *PnSERK2* revelaron un patrón de expresión espacial contrastante entre plantas sexuales y apospóricas en los estadios de premeiosis y meiosis. En los individuos sexuales, la hebra sentido se expresa sólo en la MMC y las células del labio adyacentes. En los individuos apospóricos, se observó una expresión fuerte en gran parte de la nucela y parte de los tegumentos, precisamente donde las células iniciales de la aposporia se diferencian, pero no se detectó ARNm ni en el MMC ni en las células del labio. Esto sugiere que *PnSERK2* po-

dría participar de la cascada de señales que posibilitan la generación de sacos embrionarios del tipo apospórico a partir de células nucelares en el genotipo apomíctico. Curiosamente, la expresión de la hebra antisentido detectó la presencia de transcritos en un grupo de células nucelares en el genotipo sexual en premeiosis, sugiriendo que algún tipo de mecanismo de silenciamiento podría estar funcionando en las células.

En los individuos con reproducción sexual una célula de la nucela (el precursor de la célula madre de la megáspora) es capaz de detectar señales que conducen a la reprogramación celular, con el fin de: 1) adquirir un destino gametofítico, y 2) dividirse por meiosis. Las células nucelares, en cambio, ignoran estas señales, y continúan con su destino preprogramado de esporofito. En contraste, en los individuos apospóricos, varias células somáticas nucelares se vuelven sensibles a señales aún desconocidas que inducen la adquisición de un destino gametofítico, pero sin determinar la entrada a la meiosis. Por lo tanto, se vuelven capaces de dividirse y formar un megagametofito funcional mitóticamente, integrado por células no reducidas. Desde hace tiempo se intenta dilucidar cómo las células nucelares de individuos apospóricos son capaces de detectar señales que regulan la reprogramación celular hacia un destino gametofítico. Se ha especulado sobre la existencia de vías de transducción de señales que operan sobre la MMC y, que se encontraría reprimida en las células nucelares circundantes durante la reproducción sexual normal. Este control sería desreprimido en células nucelares de individuos apospóricos. Curiosamente, un análisis transcriptómico comparativo de los órganos reproductivos de individuos sexuales y apospóricos reveló la existencia de un gran número de genes expresados diferencialmente que pertenecen a las cascadas de señalización de tipo ERK (Albertini y col., 2004, Laspina y col., 2008, Polegri y col., 2010). Asimismo, evidencia de la existencia de vías moleculares reprimidas en la nucela de plantas sexuales fue provista por Olmedo-Monfil y col., (2009), quienes informaron que la pérdida de función en mutantes argonauta9 (*ago9*) de *Arabidopsis thaliana*, mostraba una elongación de varias células en la nucela, que adoptaban un destino gametofítico. Curiosamente, AGO9 está implicada en la generación de siRNAs, y participa como un actor importante en la vía de silenciamiento génico transcripcional y postranscripcional. Por lo tanto, AGO9 podría ser el control de un mecanismo represivo, actuando en la nucela con el fin de inhibir la re-programación para un destino gamético. El principal objetivo de la proteína AGO9 parecen ser retrotransposones. Olmedo-Monfil y col. (2010) propusieron que AGO9 funcionaría produciendo tasiRNAs, que podrían moverse como moléculas señal más allá de su lugar celular de iniciación provocando la metilación del ADN, dirigida por ARN y, por lo tanto, el silenciamiento génico.

Interesantemente, el candidato *PnSERK2* parece estar activo en la MMC de plantas sexuales, pero reprimido en la nucela. Este mismo candidato se expresa fuertemente en la nucela de plantas apospóricas. Además, *PnSERK2* resultó ser el ortólogo putativo de *AtSERK1*, que ha demostrado ser esencial para la especificación del tapetum y el desarrollo del polen durante la esporogénesis masculina (Albrecht y col 2005;. Colcombet y col 2005.). En *Medicago truncatula*, la expresión de *MtSERK1* (el ortólogo de *AtSERK1*) se asoció con cambios en el desarrollo, posiblemente reflejando una reprogramación celular (Nolan y col., 2009). La clonación del promotor *MtSERK1* en un vector conteniendo el gen GUS ha permitido el análisis de expresión de *MtSERK1* en los cultivos embriogénicos y en la planta (Nolan y col., 2009). La expresión se vio asociada con los meristemas, con zonas de transición entre un tipo de tejido y otro o la transición entre un órgano y otro, además de estar asociado a células del tejido vasculares del procambio. Los autores proponen un papel para *MtSERK1* en la adquisición de la pluripotencialidad y la reprogramación celular hacia nuevas direcciones de desarrollo (Nolan y col., 2009). Estas conclusiones están de acuerdo con la observación de la expresión de *PnSERK2* en células nucelares de los individuos apospóricos, ya que están siendo re-programadas para adquirir el destino de gametofito femenino.

Una pregunta para responder en el futuro es la naturaleza del receptor implicado en la heterodimerización junto al correceptor *PnSERK2* en el óvulo de *P. notatum*, así como el ligando del mismo y las otras posibles moléculas que podrían participar en este complejo receptor. En las anteras de arabidopsis, fue propuesto que la vía de control de la microsporangénesis sería activada por la acción de una hormona peptídica pequeña denominada TPD1 (Yang y col., 2003), los LRR receptores EMS1/EXS (Canales y col., 2002, Zhao y col., 2002) y los correceptores SERK1/SERK2 (Albrecht y col., 2005, Colcombet y col., 2005), los cuales forman heterodímeros. La vía BR implica un ligando brasinoesteroide, el receptor BRI1, así como los correceptores SERK1 y SERK3 (Li y col., 2002, Nam y Li 2002, Karlova y col., 2006). La vía de la inmunidad innata implica el ligando flg22, el receptor FLS2 y el correceptor SERK3 (Chinchilla y col.,2007). La vía de control de la muerte celular consiste en un receptor no identificado y el ligando, junto con el correceptor SERK3/SERK4. Además, de dicho péptido y ligandos de brasinoesteroides, otras moléculas pueden estar actuando como señales posibles en otros tejidos.

Las auxinas son un grupo de fitohormonas que funcionan como reguladoras del crecimiento vegetal y juegan un rol fundamental en todos los aspectos del desarrollo de la planta, influyendo, elongación y diferenciación celular. Resultados recientes han demostrado que un gradiente de auxina ovular dirige la identidad de las células en el gametofito femenino diferenciado de *Arabidopsis thaliana* (Pagnussat y col., 2009). Aunque los mecanismos que con-

trolan la producción y el establecimiento de este gradiente de auxina aún no se han dilucidado, la adquisición de la identidad de la célula depende de la distancia que separa los núcleos haploides no-celularizados desde el extremo micropilar de los óvulos. En *Medicago truncatula*, se informó que la auxina regula la expresión de MtSERK1 (un ortólogo a AtSERK1) en cultivos embriogénicos (Nolan y col., 2003). Los genes *SERK* de *Triticum aestivum* también son inducibles por auxina (Singla y col., 2008). Además, existe evidencia de que la señalización de BR a través de proteínas de transducción de señales dependientes de auxina (Nakamura y col., 2006, Vert y col., 2008) proporciona un punto de cruce entre la auxina y las vías de señalización de hormonas BR (Nolan y col., 2009). El mecanismo de respuesta a auxina se ha sugerido que tiene un papel en el desarrollo del óvulo en la especie apomíctica *Hieracium* (Koltunow y col., 2001). Yamada-Akiyama y col., (2009) también encontraron una proteína sensible a la auxina que se expresa en pistilos de *Panicum maximum* apomíctico. Polegri y col., (2010), hallaron un homólogo de *A. thaliana* ARF1 (Auxin response factor 1) expresado en las etapas iniciales de la formación del óvulo apomíctico, lo cual sugiere que la respuesta a auxinas puede afectar a la diferenciación de la célula inicial de la aposporia de células de la nucela, tal vez mediante la represión de cierta clase de genes de respuesta a auxina que intervienen para mantener el estado indiferenciado de las células nucelares una vez que la célula madre de la megáspora se forma. Por lo tanto, aunque el gen *SERK* no se encuentre involucrado directamente en el inicio de la formación de un saco embrionario apospórico, posiblemente pertenezca a una de las cascadas de señalización en la cual podrían también estar involucrados la auxina y ciertos ARF.

Por otro lado, a pesar de que aun no se ha logrado localizar físicamente estos genes en el genoma de *P. notatum* el mapeo *in silico* en los genomas de arroz y maíz muestra que ambos se localizan en regiones distintas a las descritas como estrictamente relacionadas a la aposporia. Se conoce que regiones del cromosoma 2 y 12 de arroz junto a regiones de los cromosomas 1, 3, 4 y 5 de maíz presentan sintenia con el locus responsable de la aposporia en especies de *Paspalum* (Pupilli y col., 2001, Martinez y col., 2003, Pupilli y col., 2004, Stein y col., 2007, Hojsgaard y col., 2011, Podio y col., 2012) y *Brachiaria brizantha* (Pessino y col., 1998). La localización del *PnSERK2* sobre los cromosomas 4 y 5 de maíz y la localización del *PnSERK1* en el cromosoma 2 de arroz, es similar a la encontrada para otros genes expresados diferencialmente entre plantas sexuales y apomícticas de *P. notatum* (Laspina y col., 2008) y *Brachiaria Brizantha* (Rodrigues y col., 2003) lo cual aporta evidencia de que los genes de esta región podrían formar parte de una cascada de señalización involucrada en la determinación del modo de reproducción en la especie.

Es relevante destacar que *PnSERK1* es muy similar a *PpSERK1*, informado por Albertini y col., (2005) el cual se expresó diferencialmente en óvulos sexuales y apomícticos de *Poa pratensis*. Sin embargo, en *P. notatum* no se detectó una señal significativa para *PnSERK1* en los tejidos reproductivos en los estudios de hibridación *in situ* de tejido. Por otra parte, en los experimentos de PCR en tiempo real, *PnSERK1* mostró una menor expresión comparada con la correspondiente a *PnSERK2*. Curiosamente, *PnSERK2* muestra un patrón de expresión espacial muy similar a la informada para *PpSERK1*: expresión de la hebra sentido en la MMC de genotipos sexuales y en células nucelares en los genotipos apomícticos. Esto indicaría que *PnSERK2* cumpliría una función análoga a *PpSERK1*. Sin embargo, dado que en *Poa pratensis* no se observa expresión de la hebra antisentido, no es posible plantear el mismo tipo de regulación para ambas especies.

CLONADO Y ESTUDIOS DE EXPRESIÓN DEL GEN *PNEXS*

En los últimos años se ha tratado de dilucidar cual/es sería/n el/los mecanismo/s por el cual se produce el cambio de destino de las células de la nucela a células iniciales de la aposporía (Grimanelli y col., 2001; Koltunow y Grossniklaus 2003; Albertini y col., 2004; Albertini y col., 2005; Curtis y Grossniklaus 2007; Curtis y Grossniklaus 2008; D'Erfurth y col., 2009; Grimanelli 2012). En 2006, Calderini y col., encontraron una secuencia con alta homología al dominio *EXS* presente en un clon de BAC conteniendo secuencias 100% ligadas a la aposporía. Si bien todavía no se conoce la función de este dominio C-terminal, fue uno de los primeros genes que pudo ser localizado en la región que controla el carácter.

En este trabajo se ha logrado aislar un fragmento del gen *EXS* de *P. notatum* de 2298 pb, con el cual se realizaron estudios de filogenia, expresión, mapeo comparativo y localización en el mapa genético de la especie. La secuencia parcial, aislada hasta el momento, de *PnEXS* contiene seis exones, con sus correspondientes intrones, de los 12 o 13 exones que podría comprender este gen según estudios de alineamientos de secuencias realizados con especies relacionadas. Los estudios de filogenia muestran que tanto las secuencias aminoacídicas como las secuencias nucleotídicas se alinean casi en su totalidad, lo cual nos indica que este gen está altamente conservado en distintas especies de angiospermas, por lo cual, su función podría ser de vital importancia para este tipo de plantas.

El análisis de número de copias utilizando la técnica de Southern blot, reveló que existirían entre dos y cuatro copias de este gen en *P. notatum*. No se ha determinado aún si estas copias representan a genes duplicados o a miembros de esta familia génica particular. Pero

si se han podido localizar dos de ellas en el genotipo apomíctico de la especie. El mapeo genético de una de las copias del gen *PnEXS* sobre el genoma de *P. notatum* mostró una localización en la región central (centromérica) del grupo de ligamiento Lg6a del genotipo apomíctico. Otra de ellas, se ubicó en un extremo del grupo de ligamiento Lg17a aproximadamente a unos 23 cM de la región asociada al carácter. Por último un análisis de RFLP, indicaría que otra de las copias está ligada en repulsión al grupo de ligamiento Lg17a, que contiene al locus responsable de la aposporía. Sin embargo no es posible descartar que exista una copia del mismo que se encuentre ligada al carácter que aún no fue posible detectar ya que Hosjgaard y col., (2011) revelan que una de las copias del gen *PsEXS* se encontraría 100% ligada a la aposporía en *P. notatum*.

Asimismo, la localización *in silico* de *PnEXS* sobre los genomas de arroz y maíz indicó que EXS se ubica sobre el cromosoma 12 de arroz, y sobre los cromosomas 1 y 3 de maíz. Estas regiones ya fueron relacionadas a la aposporía en *P. notatum*, *P. simplex* y *P. procurrems* (Martínez y col., 2003, Stein y col., 2004, Pupilli y col., 2004, Podio y col., 2012b, Hosjgaard y col., 2011). Estos resultados indican que esta zona contiene genes que podrían estar relacionados físicamente con este modo de reproducción. Conjuntamente, la región del cromosoma 1 y 3 de maíz en la cual encuentra sintenia, contiene otros genes que han sido relacionados a la apomixis en otras especies como *Tripsacum* y *Brachiaria* (Grimanelli y col., 1998, Blakey y col., 2001, Pessino y col., 1998,1999).

Los estudios de expresión realizados sobre los genotipos sexuales y apomícticos revelan que el transcripto del gen *PnEXS* se expresa en todos los estadios del desarrollo reproductivo del genotipo apomíctico y sexual, observándose un mínimo de expresión en el estadio de postmeiosis en el genotipo sexual. En el genotipo apomíctico no se observaron diferencias significativas durante los diferentes estadios del desarrollo. No obstante, tampoco fueron observadas diferencias significativas entre los genotipos apomíctico y sexual en ninguno de los estadios. Sin embargo, al realizar la hibridación *in situ* de tejido para poder localizar la expresión del mismo sobre óvulos, se observaron diferencias muy contrastantes entre el genotipo apomíctico y sexual. A pesar de no poder detectar expresión en el estadio de meiosis en ninguno de los dos genotipos, en el estadio de anthesis, el genotipo sexual presentó una fuerte hibridación en todo el tegumento que rodea el saco embrionario, incluyendo el aparato del huevo, mientras que en el genotipo apomíctico se observó una gran restricción de la expresión en todo el ovario, localizándose solamente en unas pocas células del tegumento que se encuentran adyacentes a uno de los sacos embrionarios. Estos resultados indicarían una represión de la expresión del gen *PnEXS* en los óvulos apomícticos. Curiosamente, la sonda sentido, la cual no mostró hibridación en el genotipo sexual en ningun-

nos de los dos estadios examinados, reveló una hibridación en algunas células de la nucela del genotipo apomíctico. Estos análisis revelan una posible relación funcional del *PnEXS* con el modo de reproducción, dando lugar a una posible especulación donde el *PnEXS* estaría regulado por la expresión de su secuencia antisentido a través de un posible mecanismo de miRNA/siRNA en el genotipo apomíctico. Si bien esto es una hipótesis, se conoce que la regulación de la expresión durante el desarrollo del ovario y la reproducción sexual está llevada a cabo por numerosos mecanismos de miRNA y siRNA (Vaucheret y col., 2004), por lo tanto se podría postular que un mecanismo de regulación de la expresión en la cual podría estar involucrada la secuencia antisentido de este transcrito en células de la nucela del genotipo apomíctico podría estar relacionada con la aparición de células iniciales de la aposporia dando origen a la expresión de la aposporia.

Referencias

Akiyama, Yukio, Conner, Joann A, Goel, Shailendra, Morishige, Daryl T, Mullet, John E, Hanna, Wayne W, Ozias-Akins, Peggy (2004). High-resolution physical mapping in *Pennisetum squamulatum* reveals extensive chromosomal heteromorphism of the genomic region associated with apomixis *Plant Physiology*: 134: 1733-1741.

Albertini E, Marconi G, Barcaccia G, Raggi L, Falcinelli M (2004) Isolation of candidate genes in *Poa pratensis* L. *Plant Mol Biol* 56: 879-894

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

Albrecht C, Russinova E, Hecht V, Baaijens E, de Vries S (2005) The *Arabidopsis thaliana* SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASES 1 and 2 control male sporogenesis. *Plant Cell* 17: 3337-3349.

Albrecht C, Russinova E, Kemmerling B, Kwaaitaal M, de Vries SC (2008) Arabidopsis SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE proteins serve brassinosteroid-dependent and- independent signaling pathways. *Plant Physiol* 148:611-619.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215: 403-410.

Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang JH, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389-3402.

Arabidopsis Genome Initiative: Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 2000, 408: 796-815.

Battini JL, Rasko JE, and Miller AD (1999). A human cell-surface receptor for xenotropic and polytropic murine leukemia viruses: Possible role in G protein-coupled signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 1385-1390.

Baudino S, Hansen S, Brettschneider R, Hecht VRG, Dresselhaus. T, Lorz H, Dumas C, Rogowsky PM (2001) Molecular characterization of two novel maize LRR receptor-like kinases, which belong to the *SERK* gene family. *Planta* 213: 1-10.

Blakey C, Goldman S, Dewald, C (2001). Apomixis in *Tripsacum*: comparative mapping of a multigene phenomenon. *Genome* 44: 222-230.

Calderini O, Chang SB, de Jong H, Busti A, Paolocci F, Arcioni S, de Vries S, Abma-Henkens MHC, Klein Lankhorst RM, Donnison IS, Pupilli F (2006). Molecular cytogenetics and DNA sequence analysis of an apomixis-linked BAC in *P. simplex* reveal a nonpericentromere location and partial microcolinearity with rice. *Theor Appl Genet* 112: 1179 -1191

Calderini O, Donnison I, Polegri L, Panara F, Thomas A, Arcioni S, Pupilli F (2011) Partial isolation of the genomic region linked with apomixis in *Paspalum simplex*. *Mol Breed* 28 (2): 265-276

Canales C, Bhatt AM, Scott R, Dickinson H (2002) *EXS*, a putative LRR receptor kinase, regulates male germline cell number and tapetal identity and promotes seed development in *Arabidopsis*. *Curr Biol* 12: 1718-1727.

Chenna R, Sugawara H, Koike T, Lopez R, Gibson TJ, Higgins DG, Thompson JD. (2003) Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res* 31: 3497-500.

Chinchilla D, Zipfel C, Robatzek S, Kemmerling B, Nurnberger T, Jones JD, Felix G, Boller T (2007) A flagellin-induced complex of the receptor *FLS2* and *BAK1* initiates plant defence. *Nature* 448: 497-500.

Clark SE, Williams RW, Meyerowitz EM (1997) The *CLAVATA1* gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in *Arabidopsis*. *Cell* 89: 575-585.

Clay NK and Nelson T (2002) *VH1*, a provascular cell-specific receptor kinase that influences leaf cell patterns in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14: 2707-2722.

Colcombet J, Boisson-Dernier A, Ros-Palau R, Vera CE, Schroeder JI (2005) *Arabidopsis* *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASES 1* and *2* are essential for tapetum development and microspore maturation. *Plant Cell* 2005, 17: 3350-3361.

Conner JA, Goel S, Gunawan G, Cordonnier-Pratt MM, Johnson VE, Liang C, Wang H, Pratt LH, Mullet JE, Debarry J et al. (2008): Sequence analysis of bacterial artificial chromosome clones from the apospory-specific genomic region of *Pennisetum* and *Cenchrus*. *Plant Physiol* 147:1396-1411.

Curtis MD, Grossniklaus U: Amphimixis and apomixis: two sides of the same coin. - In: Hörandl, E., Grossniklaus, U., Van Dijk, P.J., Sharbel, T. (ed.) (2007): *Apomixis: Evolution, Mechanisms and Perspectives*. 37-62. ARG-Gantner Ruggell, Liechtenstein

Curtis MD, Grossniklaus U. (2008). Molecular control of autonomous embryo and endosperm development. *Sex Plant Reprod* 21: 79-88.

D'Erfurth I, Jolivet S, Froger N, Catrice O, Novatchkova M, Mercier R (2009). Turning meiosis into mitosis. *PLoS Biol* 7:e1000124

Duarte Silveira E, Alves-Ferreira M, Arrais Guimaraes L, Rodrigues da Silva F, Tavares de Campos Carneiro V (2009) Selection of reference genes for quantitative real-time PCR expression studies in the apomictic and sexual grass *Brachiaria brizantha*. *BMC Plant Biol* 9:84. doi:10.1186/1471-2229-9-84.

Felitti SA, Seijo JG, González AM, Podio M, Laspina NV, Siena LA, Ortiz JPA, Pessino SC (2011). "Expression of *lorelei*-like genes in aposporous and sexual *Paspalum notatum* plants". *Plant Mol Biol* 77 (4-5): 337-354.

Felsenstein J (2005) PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.89. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle.

Finn RD, Tate J, Mistry J, Coghill PC, Sammut SJ, Hotz H, Ceric G, Forslund G, Eddy SR, Sonnhammer ELL and Bateman A. (2008) Nucl. Acids Res. 36 (suppl 1): D281-D288. doi: 10.1093/nar/gkm960

Fisher K, Turner S (2007) PXY, a receptor-like kinase essential for maintaining polarity during plant vascular-tissue development. Curr Biol 17:1061-1066.

Gao M, Wang X, Wang D, Xu F, Ding X, Zhang Z, Bi D, Cheng YT, Chen S, Li X y col., (2009) Regulation of cell death and innate immunity by two receptor-like kinases in *Arabidopsis*. Cell Host Microbe 6:34-44.

Godiard L, Sauviac L, Torii KU, Grenon O, Mangin B, Grimsley NH, Marco Y (2003) *ERECTA*, an LRR receptor-like kinase protein controlling development pleiotropically affects resistance to bacterial wilt. Plant J 36:353-365.

Gomez-Gomez L, Boller T (2000) *FLS2*: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. Mol Cell 5: 1003-1011.

Gou X, He K, Yang H, Yuan T, Lin H, Clouse SD, Li J (2010) Genome-wide cloning and sequence analysis of leucine-rich repeat receptor-like protein kinase genes in *Arabidopsis thaliana*. BMC Genomics 11:19.

Grimanelli D (2012) Epigenetic regulation of reproductive development and the emergence of apomixis in angiosperms. Current Opinion in Plant Biology 15:57-62.

Grimanelli D, Leblanc O, Espinosa E, Perotti E, de Leon DG, 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.

Hardwick KG, Lewis MJ, Semenza J, Dean N, and Pelham HR (1990). ERD1, a yeast gene required for the receptor-mediated retrieval of luminal ER proteins from the secretory pathway. EMBO J. 9: 623-630.

He K, Gou X, Yuan T, Lin H, Asami T, Yoshida S, Russell SD, Li J (2007) *BAK1* and *BKK1* regulate brassinosteroid-dependent growth and brassinosteroid-independent cell-death pathways. Curr Biol 17: 1109-1115.

Hecht V, Vielle-Calzada JP, Hartog MV, Schmidt ED, Boutilier K, Grossniklaus U, de Vries SC (2001) The Arabidopsis *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1* gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. *Plant Physiol* 127: 803-816.

Heese A, Hann DR, Gimenez-Ibanez S, Jones AM, He K, Li J, Schroeder JI, Peck SC, Rathjen JP (2007) The receptor-like kinase *SERK3/BAK1* is a central regulator of innate immunity in plants. *P Natl Acad Sci USA* 104: 12217-12222.

Hojsgaard HD, Martínez EJ, Acuña CA, Quarin CL, Pupilli F (2011) A molecular map of The apomixis-control locus in *Paspalum procurrents* and its comparative analysis with other species of *Paspalum*. *Theor Appl Genet* (2011) 123: 959-971.

Hong SW, Jon JH, Kwak JM, Nam HG (1997) Identification of a receptor-like protein kinase gene rapidly induced by abscisic acid, dehydration, high salt, and cold treatments in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 113: 1203-1212.

Horn MA and Walker JC (1994) Biochemical properties of the autophosphorylation of *RLK5*, a receptor-like protein kinase from *Arabidopsis thaliana*. *Biochim Biophys Acta* 1208: 65-74.

Jinn TL, Stone JM, Walker JC (2000) *HAESA*, an *Arabidopsis* leucine- rich repeat receptor kinase, controls floral organ abscission. *Genes Dev* 14:108-117.

Karlova R, de Vries SC, (2006). *Advances in Understanding Brassinosteroid Signaling*. *Sci. STKE* 2006, pe36

Kemmerling B, Schwedt A, Rodriguez P, Mazzotta S, Frank M, Qamar SA, Mengiste T, Betsuyaku S, Parker JE, Mussig C y col., (2007) The BRI1-associated kinase1, *BAK1*, has a brassinolide- independent role in plant cell-death control. *Curr Biol* 17: 1116-1122.

Koltunow AM, Grossniklaus U (2003) Apomixis: a developmental perspective. *Annu Rev Plant Biol* 54:547-574.

Koltunow AM, Johnson SD, Lynch M, Yoshihara T, Costantino P. (2001). Expression of *rolB* in apomictic *Hieracium piloselloides* Vill. causes ectopic meristems in planta and changes in ovule formation, where apomixis initiates at higher frequency. *Planta* 214 (2): 196-205.

Koltunow AN, Johnson SD, Rodrigues JCM, Okada T, Hu Y, Tsuchiya T, Wilson S,

Fletcher P, Ito K, Suzuki G et al. (2011). Sexual reproduction is the default mode in apomictic *Hieracium* subgenus *Pilosella*, in which two dominant loci function to enable apomixis. *The Plant Journal* 66: 890-902.

Kosambi DD (1944) The estimation of map distance from recombination values. *Ann Eugen* 12: 172-175.

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

Laspina NV, Vega T, Seijo JG, Gonzalez AM, Martelotto LG, Stein J, Podio M, Ortiz JPA, Echenique VC, Quarin CL, Pessino SC (2008) Gene expression analysis at the onset of aposporous apomixis in *Paspalum notatum*. *Plant Mol Biol* 67: 615-628.

Li J and Chory J (1997) A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. *Cell* 90: 929-938.

Li J, Wen J, Lease KA, Doke JT, Tax FE, Walker JC (2002) *BAK1*, an *Arabidopsis* LRR receptor-like protein kinase, interacts with *BRI1* and modulates brassinosteroid signaling. *Cell* 110: 213-222.

Li, J (2010) Multi-tasking of somatic embryogenesis receptor-like protein kinases. *Current Opinion in Plant Biology*, 13: 1-6.

Livak, K. (1997). ABI Prism 7700 Sequence Detection System, User Bulletin 2. PE Applied Biosystems, Foster City, CA.

Maillot P, Lebel S, Schellenbaum P, Jacques A and Walter B (2009) Differential regulation of *SERK*, *LEC1-Like* and Pathogenesis-Related genes during indirect secondary somatic embryogenesis in grapevine. *Plant Physiology and Biochemistry* 47: 743-752.

Martínez EJ, Hopp E, Stein J, Ortiz JPA, Quarin CL (2003) Genetic characterization of apospory in tetraploid *Paspalum notatum* based on the identification of linked molecular markers. *Mol Breeding* 12: 319-327

Nakamura A, Umemura L, Gomi K, Hasegawa Y, Kitano H, Sazuka T and Matsuoka M Production and characterization of auxin-insensitive rice by overexpression of a mutagenized rice IAA protein (2006) *The Plant Journal* 46: 297-306.

Nam KH, Li J (2002) *BRI1/BAK1*, a receptor kinase pair mediating brassinosteroid signaling. *Cell* 110: 203-212.

Nodine MD, Yadegari R, Tax FE (2007) *RPK1* and *TOAD2* are two receptor-like kinases redundantly required for *Arabidopsis* embryonic pattern formation. *Dev Cell* 12: 943-956.

Nolan KE, Irwanto RR, Rose RJ (2003). Auxin up-regulates *MtSERK1* expression in both *Medicago truncatula* root-forming and embryogenic cultures. *Plant Physiol.* 133: 218-230.

Nolan KE, Kurdyukov S, Rose RJ (2009). Expression of the Somatic Embryogenesis Receptorlike Kinase1 (*Serk1*) gene is associated with developmental change in the life cycle of the model legume *Medicago truncatula*. *J. Exp. Bot.* 60: 1759-1771.

Oh MH, Wang X, Kota U, Goshe MB, Clouse SD, Huber SC (2009) Tyrosine phosphorylation of the *BRI1* receptor kinase emerges as a component of brassinosteroid signaling in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009, 106:658-663.

Olmedo-Monfil V, Durán-Figueroa N, Arteaga-Vázquez M, Demesa-Arévalo E, Autran D, Grimanelli D, Slotkin RK, Martienssen RA, Vielle-Calzada J-P. (2010). Control of female gamete formation by small RNO pathway in *Arabidopsis*. *Nature* 464: 628-632.

Ortiz JPA, Pessino SC, Leblanc O, Hayward MD y CL Quarin (1997) Genetic fingerprinting for determining the mode of reproduction in *Paspalum notatum*, a subtropical apomictic forage grass. *Theor Appl Genet* 95: 850-856.

Osakabe Y, Maruyama K, Seki M, Satou M, Shinozaki K, Yamaguchi- Shinozaki K (2005) Leucine-rich repeat receptor-like kinase1 is a key membrane-bound regulator of abscisic acid early signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17: 1105-1119.

Pagnussat GC, Alandete-Saez M, Bowman JL, Sundaresan V. (2009). Auxin-dependent patterning and gamete specification in the *Arabidopsis* female gametophyte. *Science* 324, 1684-1689 expression and is activated by Opaque-2 in transgenic rice plants. *The Plant Journal* 14: 673-683.

Pessino SC; Evans C; Ortiz JPA; Armstead I; do Valle CB; Hayward MD. (1998) A genetic map of the apospory-region in *Brachiaria* hybrids: identification of two markers closely associated with the trait. *Hereditas* 128: 153-158.

Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L: Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 2002, 30(9): e36.

Podio M, Rodriguez, M, Felitti, S, Stein, J, Martinez, E, Siena, L, Quarin, C, Pessino, S, Ortiz, JPA (2012) Sequence characterization, *in silico* mapping and cytosine methylation analysis of markers linked to apospory in *Paspalum notatum*. *Genetics and Molecular Biology*. <http://www.scielo.br/pdf/gmb/2012nahead/2012-055.pdf>.

Podio M, Siena LA, Hosjgaard D, Stein J, Quarin CL, Ortiz JPA. (2012b) "Evaluation of meiotic abnormalities and pollen viability in aposporous and sexual tetraploid *Paspalum notatum* (Poaceae)". *Plant Systematics and Evolution*. DOI 10.1007/s00606-012-0664-y.

Polegri L, Calderini O, Arcioni S, Pupilli F (2010) Specific expression of apomixis-linked alleles revealed by comparative transcriptomic analysis of sexual and apomictic *Paspalum simplex* Morong flowers. *JExp Bot* 61: 1869-1883

Pupilli F, Barcaccia G. (2012). Cloning plants by seeds: inheritance models and candidate genes to increase fundamental knowledge for engineering apomixis in sexual crops. *Journal of Biotechnology* 159: 291-311.

Pupilli F, Busti A, Quarin CL y Arcioni S (2001) The chromosome segment related to apomixis in *Paspalum simplex* is homeologous to the telomeric region of the long arm of rice chromosome 12. *Molecular Breeding* 8: 53-61

Pupilli F, Martínez EJ, Busti A, Calderini O, Quarin CL, Arcioni S (2004) Comparative mapping reveals partial conservation of synteny at the apomixis locus in *Paspalum* spp. *Mol Genet Genomics* 270: 539-48

Quarin CL, Urbani MH, Blount AR, Martínez EJ, Hack CM, Burton GW, Quesenberry KH (2003) Registration of Q4188 and Q4205, sexual tetraploid germplasm lines of Bahiagrass. *Crop Sci*. 43:745-746

Rodrigues JC, Cabral GB, Dusi DM, de Mello LV, Rigden DJ, Carneiro VT (2003). Identification of differentially expressed cDNA sequences in ovaries of sexual and apomictic plants of *Brachiaria brizantha*. *Plant Molecular Biology*, 53, 745-757.

Rusinova E, Borsta J, Kwaaitaala M, Caño-Delgado A, Yinc Y, Choryc J and de Vriesa C (2004) Heterodimerization and Endocytosis of *Arabidopsis* Brassinosteroid Receptors BRI1 and AtSERK3 (BAK1). *The Plant Cell* 16 (12): 3216-3229.

Saghai-Marouf MA, KM Soliman, RA Jorgensen y RW Allard (1984) Proc Natl Acad Sci 81: 8014-8018.

Sambrook J, Fritsch EF y Maniatis T (1989) Molecular cloning. A laboratory manual. 2º de. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Schmidt ED, Guzzo F, Toonen MA, de Vries SC (1997) A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. Development 124:2049-2062.

Shah K, Gadella TW Jr, van Erp H, Hecht V, de Vries SC (2001) Subcellular localization and oligomerization of the *Arabidopsis thaliana* somatic embryogenesis receptor kinase 1 protein. J Mol Biol 309(3): 641-655

Shiu SH, Bleecker AB (2001) Receptor-like kinases from Arabidopsis form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. Proc Natl Acad Sci USA 98: 10763-10768.

Singla B, Khurana JP and Khurana P (2008) Characterization of three somatic embryogenesis receptor kinase genes from wheat, *Triticum aestivum*. Plant Cell Rep 27: 833-843.

Singla B, Khurana JP and Khurana P (2009) Structural Characterization and Expression Analysis of the *SERK/SERL* Gene Family in Rice (*Oryza sativa*). International Journal of Plant Genomics, doi:10.1155/2009/539402.

Spain BH, Koo D, Ramakrishnan M, Dzudzor B and Colicelli J. (1995). Truncated forms of a novel yeast protein suppress the lethality of a G protein alpha subunit deficiency by interacting with the beta subunit. J. Biol. Chem. 270: 25435-25444.

Stein J, Pessino SC, Martinez EJ, Rodriguez MP, Siena LA, Quarín CL, Ortiz JPA (2007) A genetic map of tetraploid *Paspalum notatum* Flüggé. (bahiagrass) based on single-dose molecular markers. Mol Breeding 20:153-166

Stein J, Quarín CL, Martínez EJ, Pessino SC, Ortiz JPA (2004) Tetraploid races of *Paspalum notatum* show polysomic inheritance with preferential chromosome pairing and suppression of recombination around the apospory-controlling locus. Theoret. Appl. Genet. 109: 186-191.

Torii KU, Mitsukawa N, Oosumi T, Matsuura Y, Yokoyama R, Whittier RF, Komeda Y (1996) The Arabidopsis *ERECTA* gene encodes a putative receptor protein kinase with extracellular leucine- rich repeats. *Plant Cell* 8: 735-746.

Tsuwamoto R, Fukuoka H, Takahata Y (2008) *GASSHO1* and *GASSHO2* encoding a putative leucine-rich repeat transmembrane-type receptor kinase are essential for the normal development of the epidermal surface in Arabidopsis embryos. *Plant J* 54: 30-42.

Tucker MR, Araujo AC, Paech NA, Hecht V, Schmidt ED, Rossell JB, De Vries SC, Koltunow AM. (2003). Sexual and apomictic reproduction in *Hieracium* subgenus *Pilosella* are closely interrelated developmental pathways. *The Plant Cell* 15: 1524-1537.

Vaucheret H, Vazquez F, Créte P and Bartel DP (2004) The action of ARGONAUTE1 in the miRNA pathway and its regulation by the miRNA pathway are crucial for plant development. *Genes Dev* 18: 1187-1197.

Vert G, Walcher CL, Chory J, Nemhauser JL. (2008). Integration of auxin and brassinosteroid pathways by Auxin Response Factor 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 105: 9829-9834

Walker JC and Zhang R (1990) Relationship of a putative receptor protein kinase from maize to the S-locus glycoproteins of *Brassica*. *Nature* 345: 743-746.

Wang Y, Ribot C, Rezzonico E and Poirier Y (2004) Structure and Expression Profile of the Arabidopsis PHO1 Gene Family Indicates a Broad Role in Inorganic Phosphate Homeostasis. *Plant Physiol.* 135(1): 400-411.

Yamada-Akiyama H, Akiyama Y, Ebina M, Xu QiuSheng, Tsuruta S, Yazaki J, Kishimoto N, Kikuchi S, Takahara M, Takamizo T, Sugita, S, Nakagawa H, (2009). *Journal of plant physiology* 166(7): 750-761

Yang SL, Xie LF, Mao HZ, Puah CS, Yang WC, Jiang L, Sundaresan V, Ye D (2003) Tapetum determinant1 is required for cell specialization in the Arabidopsis anther. *Plant Cell* 15: 2792- 2804

Zhao DZ, Wang GF, Speal B, Ma H (2002) The *EXCESS MICROSPOROCYTES1* gene encodes a putative leucine-rich repeat receptor protein kinase that controls somatic and reproductive cell fates in the Arabidopsis anther. *Genes Dev* 16: 2021-2031.

CAPÍTULO III:

MAPEO COMPARATIVO Y LOCALIZACIÓN DE SECUENCIAS RELACIONADAS A LA AOSPORÍA EN *PASPALUM NOTATUM*

III.1 ANALISIS DE MAPEO *IN SILICO* DE SECUENCIAS ESPECÍFICAS DE LA AOSPORÍA EN *PASPALUM NOTATUM*.

Resumen

La genética comparativa es una herramienta útil para estudiar genes relacionados en diferentes especies. Las gramíneas son una familia muy importante desde el punto de vista agronómico ya que entre ellas podemos mencionar al arroz, maíz, trigo y cebada. El análisis comparativo en estas especies permitió identificar regiones *sinténicas* que conservan la presencia y orden génico entre las mismas. Los análisis comparativos a nivel de mapas genéticos han revelado también la existencia de rearrreglos cromosomales. En el caso de la apomixis, el mapeo comparativo permitió la identificación de marcadores moleculares ligados al carácter en diferentes especies de gramíneas como *Pennisetum squamulatum*, híbridos maíz-tripsacum, híbridos de *Brachiaria*, *Panicum maximum* y varias especies de *Paspalum*. Particularmente, en *Paspalum notatum* se observó que el locus responsable de la aposporía es *sinténico* a regiones del cromosoma 2 y 12 de arroz. Una estrategia alternativa es el mapeo *in silico* de secuencias asociadas al locus de la apomixis en especies modelo. Esta estrategia resulta interesante para identificar posibles ortólogos de genes candidatos. El objetivo de este trabajo fue identificar por medio de experimentos de mapeo *in silico* en arroz y maíz la localización de secuencias física y/o funcionalmente relacionadas a la apomixis en *P. notatum* y establecer por estudios de mapeo comparativo las regiones sinténicas de estas especies que pueden contener genes candidatos a controladores de este modo de reproducción. Para ello se analizaron marcadores previamente identificados como 100% ligados a la aposporía en *P. notatum* utilizando las herramientas de BLAST de las bases de datos del NCBI, GRAMENE y MaizeSequence. Varios de los marcadores analizados resultaron ser similares a transposones y retrotransposones, mientras que otros reflejaron similitud de secuencia con proteínas hipotéticas. Llamativamente uno de ellos presentó similitud de secuencia con una metiltransferasa de la familia MT-A70 (*N6-adenosine-methyltransferase*

MT-A70-like protein). Asimismo, se localizaron los marcadores ligados a la aposporia en *P. notatum* en los cromosomas 2 y 12 de arroz y 1, 3, 4 y 5 de maíz, en regiones que abarcan aproximadamente entre 8 y 30 Mpb, respectivamente. Estos resultados indican que la comparación de secuencias *in silico* es una herramienta útil para identificar genes homólogos de candidatos a controladores de la aposporia en las especies modelo.

Introducción

La genética comparativa abarca la comparación estructural y funcional entre genomas con el fin de estimar similitudes y diferencias entre las organizaciones biológicas (Devos y Gale 2000). La evolución de los organismos a menudo permite realizar análisis biológicos comparativos para asociar genes, proteínas, genomas y características a través de las especies y los géneros. Estos patrones conectados pueden conducir a un nuevo conocimiento, hipótesis y predicciones sobre especies relacionadas. La variedad de investigaciones a nivel de ADN han contribuido considerablemente al conocimiento de la estructura y función de los genomas debido a la complementación de investigaciones realizadas entre diferentes disciplinas.

Los análisis de genética comparativa han mostrado la existencia de conservación en el contenido y orden génico (colinearidad) en los genomas de diferentes especies de plantas y animales. En el caso de la familia de las gramíneas la colinearidad se ha mantenido durante la evolución por un período mayor a 60 millones de años (Devos y Gale 1997). Asimismo, Paterson y col. (1996) predijeron que entre el 43% y 58% de la extensión cromosomal permaneció colineal a lo largo del período evolutivo que separa las monocotiledóneas de las dicotiledóneas. La genética comparativa es una herramienta muy útil en el campo de la biología molecular. Los programas de mejoramiento de cultivos pueden usarla para transferir información desde las especies modelos (estudiadas en mayor detalle) a la especie de interés agronómico (estudiadas en menor detalle) para identificar genes que controlan características deseables y para detectar alelos superiores con el fin de introducirlos en los programas de mejoramiento (Sorrells y col., 2003).

La familia botánica de las gramíneas (*Poaceae*) comprende más de 10.000 especies. Las cinco especies de cultivos de cereales más importantes desde el punto de vista social y económico son miembros de las gramíneas (*Poaceae*) que pertenecen a tres grandes subfamilias, *Panicoideae* (sorgo, maíz), *Ehrhartoideae* (arroz) y *Pooideae* (trigo, cebada), que se estima divergieron de un antepasado común hace 60 millones de años atrás (Devos y

Gale 1997). Estudios comparativos de la genómica en las gramíneas han ayudado a comprender los cambios evolutivos que originaron las especies actuales a partir de un ancestro común así como también apoyó el desarrollo de herramientas genómicas tales como marcadores del tipo COS (secuencias ortólogas conservadas) (Salse y Feuillet 2007).

Los análisis comparativos de los genomas de gramíneas fueron inicialmente realizados utilizando sondas de RFLP y tomando al genoma del arroz como referencia (Devos y Gale, 1997). Mediante la localización de un mismo grupo de marcadores en las distintas especies fue posible comparar el orden y distribución de determinadas secuencias en los genomas de trigo (Sorrells y col., 2003, Singh y col., 2004), sorgo (Klein y col., 2003, Paterson y col., 2004), cebada (Stein y col., 2007, Stein 2007) y maíz (Salse y col., 2004). Estos estudios llevaron a definir los términos *colinearidad* y *sintenia* para hacer referencia a la conservación del orden de genes/locus en un segmento cromosómico y a las regiones conservadas que derivan de un antecesor común, respectivamente. El término "*sintenia*" está siendo últimamente reemplazado por "ortología" para referirnos a segmentos cromosómicos o loci génicos conservados en distintas especies provenientes de un mismo ancestro común (Devos y Gale, 1997). Análisis posteriores determinaron que la colinearidad presente en grandes segmentos cromosomales no necesariamente se mantiene al nivel de secuencias (microcolinearidad) (Li y Gill 2002).

El mapeo comparativo basado en el uso de marcadores moleculares de RFLP reveló que a pesar de las grandes diferencias en el nivel de ploidía, el número de cromosomas y el contenido de ADN (valor C), el orden lineal de los marcadores se mantuvo conservado entre las especies de gramíneas. Los alineamientos entre los cromosomas de estas especies se pueden visualizar como círculos concéntricos que representan las relaciones entre segmentos cromosómicos ortólogos (*sinténicos*) de arroz, maíz, sorgo, trigo y cebada (Moore y col 1995, Devos y Gale 2000). Un trabajo reciente de integración de las duplicaciones dentro de estos cuatro genomas de cereales (trigo, arroz, maíz, sorgo) condujeron a la identificación de siete duplicaciones compartidas en las cuatro especies y a la definición de los cinco grupos cromosómicos ancestrales (Salse y col., 2008) (Figura III.1.1). Los análisis comparativos a nivel de mapas genéticos han revelado también la existencia de rearrreglos (inversiones, translocaciones e inserciones) en la organización de los cromosomas de las distintas especies que en algunos casos son indicativos de los mecanismos evolutivos involucrados en la especiación en gramíneas (Keller y Feuillet, 2000).

Ehrartoideae	Pooideaea	Panicoideae	
Cromosomas de arroz	Cromosomas de Trigo/Cebada	Cromosomas de Sorgo	Cromosomas de Maíz
r5	1	s9	m6 m8
r1	3	s3	m8 m3
r3	4	s9 s1	m1 m5 m9
r7	2	s2	m7 m2
r10	1	s1	m1 m5 m9
r11	4	s5	m4 m2
r12	5	s8	m10 m3 m1
r8	7	s7	m4 m1 m6 m10
r9	5	s2	m7 m2
r2	6	s4	m4 m5
r4	2	s6	m4 m5
r6	7	s10	m9 m6 m5

Figura III.1.1. Colinearidad entre arroz, trigo, cebada, sorgo y maíz (tomado de Bolot y col., 2009). Los cromosomas ortólogos de arroz, trigo, cebada, sorgo y maíz se muestran en 12 cajas usando como referencia los 12 cromosomas de arroz. Los bloques del mismo color (rosa, rojo, azul, amarillo, verde) muestran los cinco cromosomas ancestrales de gramíneas identificados por el análisis de sintenia y la presencia de duplicaciones halladas entre las cinco especies.

Recientemente, la secuenciación de los genomas de arroz y sorgo (International Rice Genome Sequencing Project 2005, Paterson y col., 2009) así como el desarrollo de un mapa

físico del maíz (Wei y col., 2007) proporcionaron herramientas muy valiosas para comparar estos tres genomas de gramíneas. Al mismo tiempo, el desarrollo de colecciones de EST de las *Triticeae* (trigo y cebada) y la mejora de los métodos de análisis (herramientas de alineación de secuencias, análisis estadísticos) permitieron un análisis *in silico* de la macrocolinealidad entre estos genomas (Devos y Gale 2000). Los modelos evolutivos que pueden deducirse de comparaciones *in silico* del genoma se basan en la capacidad de evaluar con confianza si dos o más genes que se encuentran en el mismo orden en dos segmentos cromosómicos son verdaderamente ortólogos.

En el caso de la apomixis, el mapeo comparativo permitió la identificación de marcadores moleculares ligados al carácter en diferentes especies de gramíneas como *Pennisetum squamulatum*, híbridos maíz-*tripsacum*, híbridos de *Brachiaria*, *Panicum maximum* y varias especies de *Paspalum* (revisado en Ozias-Akins y van Dijk 2007, Pupilli y Barcaccia 2012).

Mediante el uso de un conjunto de sondas heterólogas, en un trabajo pionero en este campo se observó que la apomixis en *P. simplex* cosegrega estrictamente con un conjunto de marcadores situados en la región telomérica del brazo largo del cromosoma 12 del arroz, cubriendo una distancia de aproximadamente 15 cM (Pupilli y col., 2001). Posteriormente, en *P. notatum*, se encontró que la región que contiene el locus responsable de la aposporia es *sinténico* a segmentos del cromosomas 12 y 2 de arroz (Pupilli y col., 2004, Stein y col 2007). Recientemente, en el caso particular del género *Paspalum* se han identificado marcadores moleculares ligados a la apomixis en cuatro especies *P. notatum*, *P. simplex*, *P. malacophyllum* y *P. procurrens* (Pupilli y col 2004, Hosjgaard y col., 2011, Pupilli y Barcaccia 2012). El mapeo comparativo del ACL en estas especies, realizado con un conjunto común de sondas heterólogas de arroz, mostró que aunque todos los marcadores ligados a la apomixis en *P. simplex* y *P. malacophyllum* fueron sinténicos a la misma porción del cromosoma 12 del arroz, el ACL de *P. notatum* fue localizado en un cromosoma híbrido que lleva los marcadores asignados a los cromosomas 2 y 12 de arroz y correspondería a un segmento cromosómico más extenso.

Se ha determinado que en *P. simplex* y *P. notatum* el carácter de la aposporia está controlado por un único alelo dominante con segregación distorsionada (Pupilli y col., 2001, Martínez y col., 2001). Asimismo, la detección de varios marcadores completamente ligados al carácter evidenció una fuerte supresión de la recombinación alrededor del locus de la aposporia en estas especies (Pupilli y col. 2001, Martínez y col., 2003, Stein y col., 2004, Stein y col., 2007). La falta de recombinación en el locus responsable de la apomixis se ha observado además en otras especies de reproducción apomictica (Ozias-Akins y van Dijk,

2007, Pupilli y Barcaccia 2012). Una explicación para la supresión de la recombinación presente en este locus en *Paspalum* podría estar relacionada con reordenamientos cromosómicos que tuvieron lugar después de la poliploidización. Según Urbani y col., (2002), algunas especies de *Paspalum* fueron sometidas a la poliploidización a partir de un ancestro diploide sexual común. Pupilli y col. (2004) compararon la sintenia de marcadores anclados en cromosomas sexuales y apomíticos de *P. notatum*, observando una estricta colinearidad de los cromosomas sexuales con los cromosomas 2 y 12 de arroz, en cambio el segmento cromosómico que contiene el locus responsable de la aposporía cosegrega con marcadores presente en los cromosomas 2 y 12 de arroz, lo cual indicaría que existiría una posible translocación de un segmento cromosomal que podría haberse producido como consecuencia de la poliploidización. Este cromosoma híbrido presentaría divergencias de secuencia que producirían una pérdida en la capacidad de emparejamiento y de recombinación en el locus de la apomixis en esta especie. Un reordenamiento similar ha sido planteado que pudo haberse producido en el locus de la apomixis en *Pennisetum squamulatum* (Ozias-Akins y col., 1998) y *Cenchrus ciliaris* (Goel y col., 2003), donde el mapeo comparativo mostró bajos niveles de recombinación en este locus.

La supresión de la recombinación es una característica común a varias especies apomíticas (Ozias-Akins y van Dijk, 2007, Pupilli y Barcaccia 2012) y se considera un obstáculo para la clonación posicional de los genes claves controladores del carácter. Una estrategia alternativa, es el mapeo *in silico* de las secuencias asociadas al locus de la apomixis en especies modelo. Esta estrategia resulta interesante para determinar las posibles regiones sinténicas en estas especies e identificar en ellas genes candidatos. Por otro lado el mapeo de los mismos marcadores en varias especies apomíticas del mismo género y la identificación de secuencias comunes a todas ellas, contribuiría a reducir la región del ACL y ayudaría al reconocimiento de genes candidatos.

Hipótesis

- La localización de secuencias asociadas a la aposporía en especies modelo como arroz y maíz contribuirá a detectar genes candidatos asociados con el modo de reproducción.

Objetivo

• El objetivo de esta sección fue determinar por medio de experimentos de mapeo *in silico* en arroz y maíz la localización de secuencias física y/o funcionalmente relacionadas a la apomixis en *Paspalum notatum* e identificar por estudios de mapeo comparativo las regiones sinténicas de estas especies que pueden contener genes candidatos a controladores de este tipo de reproducción.

Materiales y métodos

Marcadores moleculares ligados a aposporía

Se analizaron diferentes tipos de marcadores completamente ligados a la aposporía en *P. notatum*: dos marcadores de RAPD (BCU243-377 y 1157-BCU259) (Martínez y col., 2003), 14 marcadores AFLP (E32M33e, E33M32c, E33M33a, E33M33b, E33M33f, E33M42e, E33M42g, E35M33p, E35M33n, E36M37c, E36M37d, E36M38a, E35M43n y E35M43p) (Stein y col., 2004, 2007), cinco clones de RFLP originados a partir de DNAC de arroz (C560, C932, C454, C996A y C1069), (Martínez y col., 2003; Pupilli y col., 2004) y cinco SCAR (PnGSA1, PnGSA2, PnGSA3, PnGSA4, PnMA764) (Podio y col., 2012) (Tabla III.1.1). Asimismo, se analizaron la localización de las secuencias codificantes de los genes *PnSERK* y *PnEXS* (ver capítulo II de la presente Tesis).

Tabla III.1.1: Marcadores moleculares ligados a la aposporía

Tipo de marcador	Marcador Ligado a la aposporía	Nombre de la secuencia	Longitud (pb)
RAPD	BCU243-377 ^a	PnMA243	351
AFLP	E32M33e ^b	PnMAC5	96
	E33M32c ^b	PnMAI3	279
	E33M42e ^b	PnMAJ5	207
	E33M42g ^b	PnMAJ7	115
	E36M37c ^b	PnMAM3	87
	E36M38a ^b	PnMAN1	42
	E35M43p ^b	PnMAU16	176

RFLP	C560 ^c	D15383	421
	C932 ^c	D22694	329
	C454 ^c	C98049	725
	C996A ^c	C98189	271
	C1069 ^{a,b,c}	D15675	400
SCAR	PnMAI3 ^d	PnGSA1	350
		PnGSA2	384
		PnGSA3	689
		PnGSA4	1077
	PnGSA1 ^d	PnMA764	764

^aMartínez y col., (2003); ^bStein y col., (2004), Stein y col., (2007); ^cPupilli y col., (2004).

^dPodio y col., (2012)

Mapeo *in silico* de marcadores ligados a la aposporía en *P. notatum*

Las secuencias de los marcadores moleculares de AFLP y RAPD ligados a la aposporía en *P. notatum* fueron obtenidas a partir del banco de datos genéticos de *P. notatum* disponible en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agrarias de la UNR. Dichas secuencias fueron identificadas durante el trabajo de Tesis Doctoral de la Dra. Rodríguez (María Pía Rodríguez Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Agrarias, UNR 2010). Las secuencias de los clones de RFLP, fueron obtenidas de la base de datos RGP (<http://rgp.dna.affrc.go.jp/>). Todas las secuencias disponibles se localizaron en los genomas de arroz y maíz mediante la herramienta BLAST (Altschul y col., 1990) que proveen las bases de datos GRAMENE (www.gramene.org) y MaizeSequence (www.maizesequence.org), respectivamente. Las secuencias ortólogas a las secuencias estudiadas se determinaron siguiendo el procedimiento descrito por Salse y col. (2004), utilizando los criterios para definir ortología: poseer al menos 65% de identidad sobre al menos 60% de la longitud de las secuencias y con un e-value <0,005. Los clones de RFLP de arroz que generaron marcadores previamente asociados con la aposporía también se incluyeron en el análisis como puntos de referencia.

Análisis de similitud de secuencias

Se realizaron búsquedas de similitudes para todos marcadores ligados a la aposporía en la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI; www.ncbi.nlm.nih.gov) (Altschul y col., 1990, 1997.). Las herramientas de BLASTn y BLASTx fueron utilizados para comparar las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos, respectivamente.

Resultados

Análisis de similitud de secuencias

Con el objetivo de caracterizar las secuencias de los marcadores ligados a la aposporía en *P. notatum*, se realizaron consultas en las bases de datos del NCBI utilizando la herramienta BLAST. Los resultados obtenidos se sintetizan en la tabla III.1.2.

Tabla III.1.2: Alineamiento de secuencias según BLASTN/BLASTX

Nombre de la secuencia	e-value	Mejor alineamiento según BLASTN/BLASTX ¹
PnMA243	5.0e-50	gb FL982880.1 <i>Panicum virgatum</i> cDNA clone. Similar to hypothetical protein, DNA binding protein
PnMAC5	n.d	n.d
PnMAI3	n.d	n.d.
PnMAJ5	2.0e-07	gb AC243221.1 <i>Panicum virgatum</i> clone PV_ABa006-D05
PnMAJ7	n.d.	n.d.
PnMAM3	7.3e-06	Os07g22800.1 retrotransposon protein, putative, Ty1-copia subclass
PnMAN1	n.d.	n.d.
C560 ^c	2.7e-53	LOC_Os04g39700, 60S ribosomal protein L6, putative, expressed
C932 ^c	5.0e-152	LOC_Os02g52290.1, peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, FKBP-type
C454 ^c	2.7e-113	LOC_Os12g40560.1, KH domain containing protein
C996A ^c	1.2e-49	LOC_Os12g42180, 50S ribosomal protein L14
C1069 ^{a,b,c}	1.8e-228	LOC_Os12g40530.1, transposon protein, putative, Mutator sub-class
PnGSA1 ^d	3e-08	gbFE614154.1 CBYX11857.b1 CBYX <i>Panicum virgatum</i> callus cDNA
PnGSA2 ^d	2e-05	gbJG806067.1 CFNU4264.b1 CFNU <i>Panicum virgatum</i> shoot cDNA
PnGSA3 ^d	2e-59	gbCD438587.1 Endosperm_5 Zea mays cDNA LOC100281493 N6-adenosine-methyltransferase MT-A70-like protein
	5.1e-42	LOC_Os02g45110.1 Transcript. MT-A70 domain containing protein

PnGSA4 ^d	8e-54 1.9e-25	gb CD433356.1 EL01N0307F02.b Endosperm_3 Zea mays cDNA. LOC_Os03g45030.1 Retrotransposon protein, putative, Ty3-gypsy subclass.
PnMA764 ^d	0.068 1.1e-06	gb FK945593.1 Zea mays cDNA RMZM5G800837_T01 transposable element

^aMartínez y col. (2003); ^bStein y col. (2004), Stein y col. (2007); ^cPupilli y col. (2004) ^dPodio y col. 2012
¹ Mejor alineamiento según BLASTn/BLASTx (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). n.d. no determinado.

Varios de los marcadores (PnMAM3, C1069, PnGSA4 y PnMA764) resultaron ser similares a transposones y retrotransposones, lo cual concuerda con lo informado en otras especies en el sentido de que la región responsable de la apomixis se encuentra invadida por elementos repetitivos (Ozias-Askin y Van Dijk 2007, Pupilli y Barcaccia 2012). Otras secuencias, reflejaron similitud de secuencia con proteínas hipotéticas (PnMA243, PnMAJ5, PnGSA1 y PnGSA2).

El análisis de las secuencias correspondientes a los marcadores de RFLP C996A y C560, reveló que las mismas serían proteínas ribosomales, mientras que el C454 presentó similitud de secuencia con un dominio KH y el C932 con una peptidil-prolil cis-trans isomerasa. El marcador PnGSA3 resultó ser uno de los más interesantes ya que presentó similitud de secuencia con una metiltransferasa de tipo MT-A70 (*N6-adenosine-methyltransferase MT-A70-like protein*).

Mapeo *in silico* de marcadores ligados a la aposporía

El análisis de mapeo *in silico* sobre los genomas de arroz y maíz permitió la identificación de secuencias ortólogas en estas especies. Los resultados del análisis de los distintos marcadores en los genomas de arroz y maíz se resumen en la tabla III.1.3.

Los marcadores PnMAC5, PnMAI3, PnMAN1, PnMAU16, PnGSA1 y PnGSA2 no presentaron alineamientos significativos con secuencias ortólogas en ninguno de los dos genomas analizados (no mostrado).

Tabla III.1.3: Mapeo *in silico* de secuencias ligadas a la aposporía en *P. notatum* sobre los cromosomas de arroz y maíz.

Marcador	Cromosoma de Arroz (Os): bp	e-value	%ID	Cromosoma de maíz (Zm): bp	e-value	%ID
PnMA243	Os2: 22235716 - 22235909	0.003	65.19	Zm 4: 94738078 - 94738380	1.2e-11	65.93
PnMAJ5	n.s.	n.s	n.s	Zm4:181677342-181677525	5.6e-07	70.31
				Zm 6: 14579479 - 14579638	6.6 e-09	71.10
PnMAJ7	Os2: 28607664 - 28607748	0.37	68.82	n.s.	n.s.	n.s.
	Os6: 14637709 - 14637797	0.19	68.48			
PnMAM3	Os : múltiples	7.6e-05	86.57	Zm: múltiples	7.2e-05	84.42
C560	Os2: 22876845 - 22.878075	2.3e-147	100	Zm4: 128263137 - 128264614	2.5e-79	86.87
	Os 4: 23476213 - 23477653	3.7e-213		Zm5: 179392786 - 179393814	2.9e-79	87.21
C932	Os 2: 32011864 - 32014026	5e-152	100	Zm5: 209262954 - 209264371	1.3e-53	87.04
C454	Os12: 25058216 - 25065293	0.0	100	Zm1: 167869383 - 167870468	4.2e-98	75.12
C996A	Os12: 26106507 - 26108035	4.4e-160	100	Zm3: 86923502 - 86928449	1.0e-32	78.10
C1069	Os12: 25047073 - 25047471	1.8e-228	100	Zm1: 167565640-167566038	1.0e-87	85.96
				Zm3: 115792597 - 115792988	1.4e-75	85.50
PnGSA3	Os2: 27358073 - 27358338	5.1e-42	69.83	Zm5: 194339512 - 194343577	4.2e-28	79.62
PnGSA4	Os: múltiples	1.9e-25	66.25	Zm: múltiples	8e-54	68.00
PnMA764	Os12: 18536262 - 18536706	4.8e-7	68.15	Zm: múltiples	4.0e-05	67.61
PnSERK1	Os 2: 7713086 - 7712189	2.2e-167	82.81	Zm5: 146839257 - 146840472	0.0	86.76
				Zm6: 102396444 - 102397239	1.4e-257	92.23
PnSERK2	Os4: 22682669 - 22684503	3.1e-213	89.17	Zm5: 176215947 - 176217905	0.0	90.46
	Os8: 4348253 - 4347181	4.5e-58	92.23	Zm4: 124636274 - 124638004	0.0	89.54
PnEXS	Os12: 24945475 - 24943211	1.7e-163	89.74	Zm1: 166716265 - 166714357	1.1e-301	98.17
				Zm3: 114880735 - 114875710	1.2e-316	97.25

Los marcadores PnMA243, PnMAM3 y PnGSA3 fueron localizados en el cromosoma 2 de arroz, cercanos a los marcadores relacionados con la aposporía C560 y C932. Estos marcadores también fueron ubicados en forma colineal en el cromosoma 5 de maíz. El marcador PnMA764 alineó con una secuencia genómica del cromosoma 12 de arroz y el cromosoma 5 de maíz, cerca de los clones de arroz relacionados con la aposporía C1069 y C932, respectivamente. Junto a estos marcadores se encuentra posicionado también el gen *PnEXS* muy cercano al marcador de RFLP ligado a la aposporía C1069. Esta región comprendida entre los marcadores C996A, C1069 y el gen *PnEXS* se presenta, además, de manera colineal en el cromosoma 3 de maíz. El resto de las secuencias analizadas mapea en los cromosomas de maíz 1 (C454), 4 (PnMA243, PnMAJ5 y C560) y 6 (PnMAJ5) (Tabla III.1.3). El análisis de secuencias de los genes *PnSERK* reveló su posición en los cromosomas 2 de arroz y 4 y 5 de maíz (ver Capítulo II). Sus localizaciones relativas resultaron alejadas a la mayoría de los marcadores ligados a la aposporía. Sin embargo, el *PnSERK2* mostró una alta asociación con el marcador de RFLP C560 tanto en el cromosoma 5 como en el 4 de maíz.

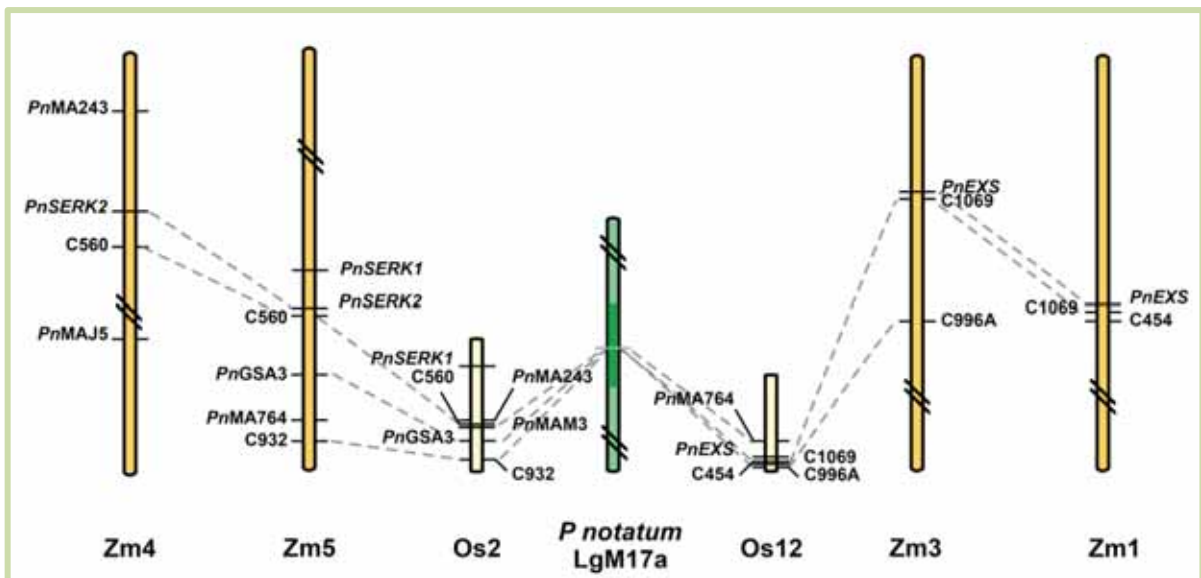


Figura III.1.2. Mapeo *in silico* de secuencias específicas de la aposporía en los genomas de arroz y maíz. Los marcadores de *Paspalum notatum* (Pn) y de arroz fueron localizados en los cromosomas de arroz (Os) y maíz (Zm) mediante la herramienta BLASTn disponible en las bases de datos GRAMENE y MaizSequence. La posición relativa de cada marcador se determina en base a la posición física de las secuencias ortólogas enumeradas

en la Tabla III.1.3. Los clones de RFLP de arroz que generaron marcadores completamente ligados a aposporía en la especie fueron incluidos como puntos de referencia.

Los resultados obtenidos en esta parte del trabajo de tesis indican que secuencias ortólogas a los marcadores ligados a la aposporía en *P. notatum* se distribuyeron entre los cromosomas 2 y 12 de arroz y 1, 3, 4 y 5 de maíz, en regiones que abarcan aproximadamente entre 8 y 30 Mpb, respectivamente, a excepción del cromosoma 4 de maíz en el cual los marcadores se encuentran más distanciados entre sí (aproximadamente 87 Mpb) (Figura III.1.2). Se conoce que regiones del cromosoma 2 de arroz son ortólogas a regiones de los cromosomas 4 y 5 de maíz y que regiones del cromosoma 12 presentan ortología con secuencias posicionadas en los cromosomas 1 y 3 de maíz (Bolot y col., 2009) por lo cual se considera que la asignación de ortología entre las secuencias de estas especies es correcta.

Discusión

Las gramíneas han sido la familia más estudiada en el reino vegetal. Los recientes avances en la secuenciación y tecnologías de genotipado han ayudado en el análisis comparativo de los genomas de especies relacionadas. La utilización de esta información aplicada a los programas de mejoramiento de cultivos ha aumentado por la disponibilidad de sofisticadas herramientas bioinformáticas. Sobre la base de la homología de secuencias, sumado a la disposición de marcadores moleculares, hemos podido realizar una comparación entre los genomas de arroz, maíz y *P. notatum*.

El segmento del cromosoma que codifica para la aposporía en *P. notatum* se asemeja a la región genómica específica de la aposporía (ACL) encontrado en otras gramíneas tales como *Pennisetum squamulatum* (Ozias-Akins y col., 1998; Roche y col., 2001), *Cenchrus ciliaris* (Ozias-Akins y col., 2003; Roche y col., 1999), *Paspalum simplex* (Labombarda y col., 2002; Pupilli y col., 2004) y *Panicum maximum* (Ebina y col., 2005). En todas estas especies el ACL se caracteriza por una restricción de la recombinación. En *Pennisetum*, *Cenchrus* y *Paspalum*, también existe una fuerte distorsión de la segregación (Ozias-Akins y col., 1998, 2003; Roche y col., 1999, 2001; Labombarda y col., 2002; Pupilli y col., 2004) que está ausente en *P. maximum* (Ebina y col., 2005). La comprensión de la estructura genética de estos bloques cromosómicos complejos no recombinantes puede proporcionar información clave sobre los genes que controlan y regulan la expresión de la aposporía. En *P. squamulatum* (Akiyama y col., 2004), *C. ciliaris* (Conner y col., 2008) y *P. simplex* (Calderini

y col., 2006, 2011) esta tarea se ha intentado por secuenciación directa de clones de BAC que contienen marcadores moleculares completamente ligados a la aposporía. En estas tres especies, se han hallado regiones que codifican proteínas, así como también un gran número de secuencias altamente repetitivas (Akiyama y col., 2004; Calderini y col., 2006, 2011).

En este trabajo, fue posible caracterizar las secuencias de marcadores moleculares completamente ligados a la aposporía en *P. notatum* y realizar un análisis de mapeo *in silico* de las mismas en los genomas de arroz y maíz. Los análisis de similitud de las secuencias derivadas de marcadores de RAPD y AFLP determinaron que la mayoría de ellas corresponden a secuencias no codificantes. Esto puede ser debido a la naturaleza de los marcadores moleculares de las cuales derivan, que normalmente se localizan en regiones repetitivas.

El mapeo *in silico* determinó que varias secuencias ortólogas fueron localizadas en los cromosomas 2 y 12 de arroz, en segmentos previamente asociados con la aposporía en esta especie (Pupilli y col., 2004), y en los cromosomas 1, 3, 4 y 5 de maíz. Un estudio reciente sobre la base de una estrategia de mapeo comparativo mostró que varios marcadores del cromosoma 12 de arroz (incluyendo los marcadores de RFLP C996 y C1069 analizados en este trabajo) se encuentran sobre la región cromosómica responsable de la aposporía en cuatro especies de *Paspalum* (Hojsgaard y col., 2011). Teniendo en cuenta que la apomixis puede haber surgido a partir de la desregulación de los genes implicados en la reproducción sexual, la identificación de las secuencias codificantes dentro de las regiones sinténicas al ACL y una comparación con la información derivada de los análisis de expresión puede ayudar a identificar los genes física y funcionalmente relacionados con este modo de reproducción. Por otro lado, varios transcriptos expresados diferencialmente en los tejidos reproductivos sexuales y apospóricos de *P. notatum* resultaron ser ortólogos a secuencias situadas en la misma región del cromosoma 2 de arroz (Laspina y col., 2008). Asimismo, el cromosoma 2 de arroz y el 5 de maíz fueron asociados a la aposporía en híbridos de *Brachiaria* (Pessino y col., 1997, 1998). Por consiguiente, es probable que estos segmentos cromosómicos contengan secuencias relacionadas con la aposporía. Varias de estas secuencias específicas de *P. notatum* parecerían estar relacionadas con elementos repetitivos tales como transposones de la subclase mutator y retrotransposones de las subclases Ty1-copia y Ty3-Gypsy. La presencia de estos elementos coincide con la observación de la presencia de secuencias repetitivas en el ACL de otras especies de gramíneas (Akiyama y col., 2004; Calderini y col., 2006; Conner y col., 2008). Además, mutantes nulas en la expresión de la proteína AGO9 implicada en el procesamiento de retrotransposones fueron capaces de producir gametos no reducidos en *Arabidopsis thaliana*, imitando así el primer paso del desarro-

llo de la aposporía (Olmedo Monfil y col., 2010). En un estudio reciente de *P. notatum*, se observó que retrotransposones que se expresan diferencialmente en inflorescencias de genotipos sexuales y apomícticos contienen segmentos de genes asociados a la apomixis transduplicados. Este hallazgo hizo pensar que este tipo de elementos puede cumplir una función reguladora en la expresión de genes asociados al carácter (Ochogavía y col., 2011).

En este trabajo se encontró que la secuencia derivada de uno de los marcadores 100% ligados a la aposporía (PnGSA3) (Podio y col., 2012), mostró similitud con una metiltransferasa del tipo MT-A70 (N6-adenosine-methyltransferase MT-A70-like protein). Las proteínas MT-A70 son metiltransferasas de ARN asociadas a la división de tejidos, particularmente a órganos reproductivos y meristemas del tallo y la raíz (Clancy y col., 2002, Zhong y col., 2008) La inactivación de un ortólogo a esta proteína en *Arabidopsis thaliana* resulta en una falla en el desarrollo del embrión pudiendo progresar solamente hasta el estadio globular (Zhong y col., 2008). Debido a que una de las hipótesis planteadas sobre el control de la expresión de la apomixis incluye mecanismos epigenéticos como reguladores o disparadores de la aposporía en gramíneas la metilación de genes podría estar relacionada al carácter (Grimanelli 2012). La presencia de una secuencia similar a MT-70 en el locus responsable de la aposporía en *P. notatum* justifica la realización de nuevos experimentos tendientes a identificar la secuencia completa y determinar si se trata de un gen funcional. En este caso, estudios de expresión en tejido de inflorescencias a distintos estadios del desarrollo podrían aportar evidencia sobre su participación o no en el proceso de apomixis.

Los resultados presentados en este Capítulo del trabajo de Tesis indican que es posible identificar genes homólogos de candidatos a controladores de la aposporía en las especies modelo, basados en la comparación *in silico* de secuencias. En particular, fue posible identificar genes ortólogos en arroz y maíz que podrían estar asociados a la expresión del carácter aposporía.

Parte de los resultados presentados en este Capítulo fueron publicados en el artículo: Podio, M, Rodríguez, MP, Felitti, SA, Stein, J, Martínez, EJ, Siena, LA, Quarin, CL, Pessino, SC, Ortiz, JPA (2012) "Sequence characterization, in silico mapping and cytosine methylation analysis of markers linked to apospory in Paspalum notatum". Genetics and Molecular Biology. <http://www.scielo.br/pdf/gmb/2012nahead/2012-055.pdf>

Referencias

Akiyama, Yukio, Conner, Joann A, Goel, Shailendra, Morishige, Daryl T, Mullet, John E, Hanna, Wayne W, Ozias-Akins, Peggy (2004). High-resolution physical mapping in *Pennisetum squamulatum* reveals extensive chromosomal heteromorphism of the genomic region associated with apomixis Plant Physiology 134: 1733-1741.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. J Mol Biol 215: 403-410.

Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang JH, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res 25: 3389-3402.

Bolot S, Abrouk M, Masood-Quraishi U, Stein N, Messing J, Feuillet C, Salse J (2009). The 'inner circle' of the cereal genomes. Current Opinion in Plant Biology 12: 119-125

Calderini O, Chang SB, de Jong H, Busti A, Paolocci F, Arcioni S, de Vries S, Abma-Henkens MHC, Klein Lankhorst RM, Donnison IS, Pupilli F (2006). Molecular cytogenetics and DNA sequence analysis of an apomixis-linked BAC in *Paspalum simplex* reveal a nonpericentromere location and partial microcolinearity with rice. Theor Appl Genet 112: 1179 -1191.

Calderini O, Donnison I, Polegri L, Panara F, Thomas A, Arcioni S, Pupilli F (2011) Partial isolation of the genomic region linked with apomixis in *Paspalum simplex*. Mol Breed. 28 (2): 265-276

Clancy MJ, Shambaugh ME, Timpte CS, Bokar JA (2002) Induction of sporulation in *Saccharomyces cerevisiae* leads to the formation of N6-methyladenosine in mRNA: A potential mechanism for the activity of the IME4 gene. Nucleic Acids Res 30: 4509-4518.

Conner JA, Goel S, Gunawan G, Cordonnier-Pratt MM, Johnson VE, Liang C, Wang H, Pratt LH, Mullet JE, Debarry J et al. (2008): Sequence analysis of bacterial artificial chromosome clones from the apospory-specific genomic region of *Pennisetum* and *Cenchrus*. Plant Physiol 147: 1396-1411.

Devos KM y Gale MD (1997) Comparative genetics in the grasses. Plant Mol Biol 35: 3-15.

Devos KM, Gale MD (2000) Genome relationships: the grass model in current research. *Plant Cell* 12: 637-646.

Ebina M, Nakagawa H, Yamamoto T, Araya H, Tsuruta S, Takahra M y Nakayima K (2005) *Grassland Science* 51: 71-78.

Goel S, Chen Z, Conner JA, Akiyama Y, Hanna WW, Peggy 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: 1069-1082

Grimanelli D (2012) Epigenetic regulation of reproductive development and the emergence of apomixis in angiosperms. *Current Opinion in Plant Biology* 15: 57-62.

Hojsgaard HD, Martínez EJ, Acuña CA, Quarín CL, Pupilli F (2011) A molecular map of the apomixis-control locus in *Paspalum procurrens* and its comparative analysis with other species of *Paspalum*. *Theor Appl Genet* 123: 959-971.

International Rice Genome Sequencing Project (2005) The map-based sequence of the rice genome. *Nature* 436: 793-800.

Klein PE, Klein RR, Vrebalov J, Mullet JE (2003) Sequence-based alignment of sorghum chromosome 3 and rice chromosome 1 reveals extensive conservation of gene order and one major chromosomal rearrangement. *Plant J* 34: 605-621.

Koltunow AM, Grossniklaus U (2003) Apomixis: a developmental perspective. *Annu Rev Plant Biol* 54: 547-574.

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

Laspina NV, Vega T, Seijo JG, Gonzalez AM, Martelotto LG, Stein J, Podio M, Ortiz JPA, Echenique VC, Quarín CL, Pessino SC (2008) Gene expression analysis at the onset of aposporous apomixis in *Paspalum notatum*. *Plant Mol Biol* 67: 615-628.

Li W, Gill BS (2002) The colinearity of the Sh2/A1 orthologous region in rice, sorghum and maize is interrupted and accompanied by genome expansion in the *Triticeae*. *Genetics* 160:1153–1162

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

Ochogavía AC, Seijo, JG, González AM, Podio M, Duarte Silveira, E, Machado Lacerda AL, Tavares de Campos Carneiro V, Ortiz JPA, Pessino SC (2011) Characterization of retrotransposon sequences expressed in inflorescences of apomictic and sexual *Paspalum notatum* plants. *Sexual Plant Reproduction* 24 (3): 231-246.

Olmedo-Monfil V, Durán-Figueroa N, Arteaga-Vázquez M, Demesa-Arévalo E, Autran D, Grimanelli D, Slotkin RK, Martienssen RA, Vielle-Calzada J-P. (2010). Control of female gamete formation by small RNO pathway in *Arabidopsis*. *Nature* 464: 628-632.

Ozias-Akins P, Akiyama Y y Hanna WW (2003) Molecular characterization of the genomic region linked with apomixis in *Pennisetum/Cenchrus*. *Funct Integr Genomics* 3: 94-104.

Ozias-Akins P, van Dijk PJ. (2007) Mendelian genetics of apomixis in plants. *Annu Rev Genet* 41: 509-537.

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

Paterson AH, Bowers JE, Bruggmann R, Dubchak I, Grimwood J, Gundlach H, Haberler G, Hellsten U, Mitros T, Poliakov A, Schmutz J y col. (2009) The *Sorghum bicolor* genome and the diversification of grasses. *Nature* 457: 551-556

Paterson AH, Bowers JE, Chapman BA (2004) Ancient polyploidization predating divergence of the cereals, and its consequences for comparative genomics. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101: 9903-9908.

Paterson AH, Lan TH, Reischmann KP, Chang C, Lin YR, Liu SC, Burow MD, Kowalski SP, Katsar CS, DelMonte TA, et al (1996) Toward a unified genetic map of higher plants, transcending the monocot-dicot divergence. *Nat Genet* 14: 380-382

Pessino SC, Ortiz JP, Leblanc O, do Valle CB y MD Hayward (1997) Identification of a maize linkage group related to apomixis in *Brachiaria*. *Theor Appl Genet* 94: 439-444.

Pessino SC; Evans C; Ortiz JPA; Armstead I; do Valle CB; Hayward MD. (1998) A genetic map of the apospory-region in *Brachiaria* hybrids: identification of two markers closely associated with the trait. *Hereditas* 128: 153-158.

Podio, M, Rodriguez, MP, Felitti, SA, Stein, J, Martinez, EJ, Siena, LA, Quarin, CL, Pessino, SC, Ortiz, JPA (2012) Sequence characterization, *in silico* mapping and cytosine methylation analysis of markers linked to apospory in *Paspalum notatum*. *Genetics and Molecular Biology* . <http://www.scielo.br/pdf/gmb/2012nahead/2012-055.pdf>.

Pupilli F, Barcaccia G (2012) Cloning plants by seeds: inheritance models and candidate genes to increase fundamental knowledge for engineering apomixis in sexual crops. *Journal of Biotechnology* 159: 291-311.

Pupilli F, Busti A, Quarin CL y Arcioni S (2001) The chromosome segment related to apomixis in *Paspalum simplex* is homeologous to the telomeric region of the long arm of rice chromosome 12. *Molecular Breeding* 8: 53-61

Pupilli F, Martínez EJ, Busti A, Calderini O, Quarin CL, Arcioni S (2004) Comparative mapping reveals partial conservation of synteny at the apomixis locus in *Paspalum* spp. *Mol Genet Genomics* 270: 539-48

Roche D, Cong P, Chen Z, et al.,(1999) An Apospory Specific Genome Region Is Conserved between Buffelgrass (*Cenchrus ciliaris* L.) and *Pennisetum squamulatum* Fresen, *Plant J.* 19: 203-208.

Roche D, Hanna WW, and Ozias-Akins P (2001), Is Supernumerary Chromatin Involved in Gametophytic Apomixis of Polyploidy Plants?. *Sex Plant Reprod* 13: 343-349.

Salse J, Bolot S, Throude M, Jouffe V, Piegu B, Masood U, Calcagno T, Cooke R, Delseny M, Feuillet C (2008) Identification and characterization of conserved duplications between rice and wheat provide new insight into grass genome evolution. *Plant Cell* 20:11-24.

Salse J, Feuillet C (2007) Comparative genomics of cereals. In Genomics-Assisted Crop Improvement. Edited by Varshney RK, Tuberosa R. Springer Verlag. 177-205. chapter 18.

Salse J, Piegú B, Cooke R, Delseny M (2004) New *in silico* insight into the synteny between rice (*Oryza sativa* L.) and maize (*Zea mays* L.) highlights reshuffling and identifies new duplications in the rice genome. *Plant J* 38: 396-409.

Singh NK, Raghuvanshi S, Srivastava SK, Gaur A, Pal AK, Dalal V, Singh A, Ghazi IA, Bhargava A, Yadav M, Dixit A y col. (2004) Sequence analysis of the long arm of rice chromosome 11 for rice-wheat synteny. *Funct Integr Genomics* 4: 102-117.

Sorrells ME, La Rota M, Bermudez-Kandianis CE, Greene RA, Kantety R, Munkvold JD, Miftahudin, Mahmoud A, Ma X, Gustafson PJ, Qi LL y col. (2003): Comparative DNA sequence analysis of wheat and rice genomes. *Genome Res* 13: 1818-1827.

Stein J, Pessino SC, Martínez EJ, Rodríguez MP, Siena LA, Quarín CL, Ortiz JPA (2007) A genetic map of tetraploid *Paspalum notatum* Flüggé. (bahiagrass) based on single-dose molecular markers. *Mol Breeding* 20: 153-166

Stein J, Quarín CL, Martínez EJ, Pessino SC, Ortiz JPA (2004) Tetraploid races of *Paspalum notatum* show polysomic inheritance and preferential chromosome pairing around the apospory-controlling locus. *Theor Appl Genet* 109: 186-191

Stein N (2007) *Triticeae* genomics: advances in sequence analysis of large genome cereal crops. *Chromosome Res* 15: 21-31.

Stein N, Prasad M, Scholz U, Thiel T, Zhang H, Wolf M, Kota R, Varshney RK, Perovic D, Grosse I, Graner A (2007) A 1,000-loci transcript map of the barley genome: new anchoring points for integrative grass genomics. *Theor Appl Genet* 114: 823-839.

Wei F, Coe E, Nelson W, Bharti AK, Engler F, Butler E, Kim H, Goicoechea JL, Chen M, Lee S, Fuks G y col. (2007) Physical and genetic structure of the maize genome reflects its complex evolutionary history. *PLoS Genet* 3:e123.

Zhong S, et al. (2008) MTA is an *Arabidopsis* messenger RNA adenosine methylase and interacts with a homolog of a sex-specific splicing factor. *Plant Cell* 20: 1278-1288

III.2 LOCALIZACIÓN DE SECUENCIAS EXPRESADAS DIFERENCIALMENTE ENTRE PLANTAS APOMÍCTICAS Y SEXUALES DE *PASPALUM NOTATUM*

Resumen

El estudio de transcritos diferencialmente expresados en órganos reproductivos entre los genotipos apomícticos y sexuales se ha utilizado desde la segunda mitad de la década de 1990 para la detección de genes candidatos relacionados a la apomixis. Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio identificaron 65 genes expresados diferencialmente según el modo de reproducción en *Paspalum notatum*. El objetivo de este trabajo fue determinar la localización de un grupo de ellos en el mapa genético de *P. notatum* y establecer si presentan un ligamiento genético con el locus responsable de la aposporía en la especie. Para ello se diseñaron cebadores específicos para cada transcritos y se generaron marcadores de tipo SCARs. Utilizando la población de mapeo segregante para el modo de reproducción se intentó posicionar cada clon en el mapa genético de *P. notatum*. La mayoría de los amplicones resultaron no segregantes en la población y solo uno de los clones (N54), el cual presenta similitud de secuencia con poliubiquitina, pudo ser situado en el grupo de ligamiento LgM17b del genotipo Q4117 (apomíctico). Este grupo es homólogo al grupo de ligamiento LgM17a, el cual contiene al locus responsable de la aposporía, por lo cual posiblemente una de las copias aun no mapeadas podría encontrarse en este grupo. Si bien, en este trabajo no se han podido localizar los demás transcritos analizados, todos pudieron ser amplificados a partir de ADN genómico de los genotipos Q4117 (apomíctico) y Q4188 (sexual), lo que indicaría que no existirían genes específicos del carácter aposporía, sino que existiría alguna forma de regulación de la expresión de los mismos que podría disparar el carácter.

Hipótesis

- Secuencias expresadas diferencialmente en inflorescencias de plantas apomícticas y sexuales se localizan en regiones genómicas asociadas a la aposporía.
- La asociación genética y funcional de determinadas secuencias es clave para identificar los genes disparadores del carácter.

Objetivo

- El objetivo de este trabajo fue determinar la localización de secuencias expresadas diferencialmente entre plantas apomícticas y sexuales en el mapa genético de *P. notatum* y determinar si presentan un ligamiento genético con el locus responsable de la aposporía en la especie.

Introducción

El estudio de los perfiles transcripcionales de los órganos reproductivos entre los genotipos apomícticos y sexuales se ha utilizado desde la segunda mitad de la década de 1990 para la detección de genes expresados diferencialmente de acuerdo al modo de reproducción. Inicialmente, Vielle-Calzada y col. (1996) realizaron estudios comparativos en *Pennisetum squamulatum* y posteriormente otros estudios análogos fueron llevados a cabo en graminéas como *Brachiaria* (Leblanc y col., 1997; Rodríguez y col., 2003), *Panicum* (Chen y col., 1999; Yamada-Akiyama y col., 2009), *Poa* (Albertini y col., 2004), *Eragrostis* (Cervigni y col., 2008), *Paspalum* (Laspina y col., 2008, Polegri y col., 2010), *Pennisetum ciliare* (Singh y col., 2007), y en *Hieracium* (Guerin y col., 2000) y *Boechera* (Sharbel y col., 2009).

Sin embargo, a pesar de que se han podido identificar varios genes candidatos a través de estos perfiles de expresión (Albertini y col., 2005; Chen y col., 2005, Polegri y col., 2010), hasta la fecha no existen datos certeros sobre la participación de genes apomícticos aislados de especies naturales que participan en las vías claves de alguno de los procesos que involucra la apomixis. Por lo tanto es necesario combinar la información obtenida por un análisis transcripcional con los datos genéticos disponibles, para mejorar la probabilidad de identificar los determinantes del carácter. La localización en el genoma puede aportar información importante a cerca de su función como miembro de una cascada de eventos que desencadenan la apomixis o como disparadores del mismo. En este último caso, la asociación física con el locus de la aposporía es una prueba crucial para su demostración.

Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio identificaron un grupo de secuencias expresadas diferencialmente entre genotipos sexuales y apomícticos de *P. notatum* (Pessino y col., 2001; Laspina y col., 2008). Sumado a esto, la existencia de un mapa genético de la especie (Stein y col., 2007) posibilita localizar estas secuencias diferencialmente expresadas y determinar si presentan una asociación física con el locus responsable de la aposporía.

Materiales y métodos

Mapeo de transcritos relacionados a la aposporía

Desarrollo de SCARs (Secuencias amplificadas, caracterizadas y secuenciadas)

Un grupo de clones hallados como diferencialmente expresados entre genotipos sexuales y apomíticos fueron analizados con el objetivo de encontrar polimorfismos asociados al modo de reproducción y posteriormente localizarlos en el mapa genético de *P. notatum* generado por Stein y col. (2007). Los clones analizados fueron: N5, N13, N19, N31, N54 y N108 (Tabla III.2.1). (tomado de Laspina y col., 2008)

Tabla III.2.1 Transcritos de ARNm expresados diferencialmente entre genotipos apomíticos y sexuales de *P. notatum*

Nombre del Clon	Origen	ID ^a	e-Value	Homología de Secuencia	Localización en Arroz ^b
N5	Sexual	AK068667	2.9 e ⁻¹⁵	Lunapark B protein	2, 4
N13	Apomítico	n.d	-	n.d	10
N19	Sexual	CAJ83813.1	3 e ⁻⁸	CHK1 checkpoint homolog	2
N31	Sexual	CAB40774.1	0.25	Extensin-like protein	2
N54	Sexual	NP_001054720.1	9 e ⁻³⁸	Polyubiquitin	1-10
N108	Sexual	AAX94831.1	1 e ⁻³⁶	Transposon protein	2

^aID correspondiente al mejor alineamiento en el análisis de BLAST. ^bAnálisis realizado con Gramene Sequence (Laspina y col., 2008) n.d.: no determinado

Para ello se realizaron amplificaciones de tipo SCAR utilizando cebadores específicos para cada secuencia (Tabla III.2.2). Las reacciones de amplificación se realizaron a partir de ADN genómico de los genotipos parentales (Q4117 y Q4188) en un volumen final de 25 µl conteniendo 60 ng de ADN, 0,2 µM de cebador, buffer de PCR 1X (Promega), MgCl₂ 2,5 mM, dNTPs 200 µM y Taq polimerasa 1,5U (Promega). Las condiciones de reacción consistieron en una etapa inicial de desnaturalización de 5 min a 94 °C seguida de 40 ciclos de 30 seg a 94° C, 1 min a temperaturas fijas que van desde los 55°C hasta los 69°C dependiendo del clon a analizar, 1 min 30 seg a 72 °C y 10 min finales de elongación a 72 °C. Luego de la reacción los productos de amplificación fueron suplementados con buffer de siembra y resueltos en geles de agarosa al 2,5 % p/v y/o poliacrilamida al 5%. La electroforesis en geles

de agarosa se realizó a 60 mA en buffer TAE 1X, durante 4 horas. Los productos de amplificación fueron teñidos con una solución de bromuro de etidio (10 µg/ml) y visualizados usando un transiluminador UV. En el caso de electroforesis en geles de poliácridamida, los productos de amplificación fueron suplementados con 5 µl de buffer de siembra (formamida 95% p/v, NaOH 10 mM y azul de bromofenol 2 mg/ml), desnaturalizados a 95 °C por 5 min y sembrados en geles desnaturalizantes de poliácridamida al 5% (acrilamida:bisacrilamida (19:1) 5%, TBE 0,5X, urea 7,5 M). La electroforesis se realizó empleando un equipo de secuenciación Gibco-BRL modelo S2, USA a 50 W por 2:30 h (1 h sin las muestras y 1:30 h con las muestras) usando como soluciones reguladoras TBE 0,5X y 1X pH 8,0 en los reservorios superior e inferior, respectivamente. Los geles se revelaron con nitrato de plata siguiendo el protocolo descrito por el “DNA Silver Staining System” (Promega). Brevemente, los geles se incubaron 20 min en solución fijadora (ácido acético glacial 10% v/v), seguido de 3 lavados en H₂O destilada de 2 min cada uno e incubación en solución de tinción (AgNO₃ 1 g/l, formaldehído 0,1% v/v) por 30 min. Luego se lavó por 10 s en H₂O y se reveló con solución desarrolladora (carbonato de sodio 30 g/l, formaldehído 0,1% v/v, tiosulfato de sodio 2 mg/l) preenfriada, deteniéndose la reacción con agregado de la solución fijadora. Los geles se lavaron exhaustivamente con agua y se tomaron los datos directamente sobre el vidrio luego del secado a temperatura ambiente por al menos 24 hs.

Tabla III.2.2 Cebadores utilizados para amplificar las secuencias asociadas a la aposporia y desarrollar marcadores de tipo SCAR

Nombre del Clon	Nombre Cebador	Secuencia
N5	5NJU	AAGTTGGGTGCCGATTCTGGAT
	5NJL	GAGTGCTGGGGCCTTCTTCATTA
N13	A-13-U1	GCCCTTAGCCATTTACTTATTTAG
	A-13-L2	TATCTTCACTCGACTTGTACCGTTTAGG
N19	19NJU	CCTGAGAAACGGCTACCACATC
	19NJL	CGAGCTTTTTAACTGCAACAACCTT
N31	31NJU	TCCTCCTCGTTCCGCACAAAT
	31NJL	GGGGGAATGAAGAAGGAGTC
N54	54NJU	GAAAGCAGCGCCTCCCAGTAGC
	54NJL	CAGGCGAAGGACGAGGTGAAGG
N108	108NJU	ATCTGGGCAGTGGTTTGTGAA
	108NJL	GACGGGGGTTAGTTTAGATAGAGA

Análisis de ligamiento

El análisis de ligamiento se realizó utilizando el programa de mapeo Mapmaker 3.0 (Lander y col., 1987) de acuerdo a lo descrito por Stein y col. (2007), codificando los datos genéticos de los marcadores como "F2-retrocruza" (opción F2 backcross), donde la presencia o ausencia de un determinado marcador indica heterocigosis u homocigosis respectivamente. Las unidades de mapeo en cM derivaron de la función de Kosambi (1944).

El mejor orden de los marcadores dentro de cada grupo se determinó usando las funciones del programa "compare", "order" y "ripple" (para verificar el orden establecido). Se empleó asimismo el comando "error detection on" para detectar los posibles errores.

Resultados

Mapeo de transcritos relacionados con la aposporia

Seis de los clones de ADNc derivados de transcritos específicos del desarrollo de flores obtenidos por expresión diferencial entre plantas sexuales y apomícticas de *P. notatum* (Laspina y col., 2008) fueron ensayados en la población de mapeo a fin de determinar su posición en el mapa genético de la especie (Tabla III.2.1).

En la tabla III.2.3, se resumen los resultados obtenidos para las amplificaciones realizadas para cada uno de los clones estudiados. El clon N19 resultó monomórfico entre los genotipos parentales, presentando solo una banda de amplificación. En el caso de los clones N5, N13, N31, N54 y N108 fue posible observar bandas polimórficas entre los genotipos parentales en las condiciones ensayadas.

Las mismas condiciones de amplificación fueron entonces ensayadas sobre los genotipos parentales y parte de la población de mapeo para observar la segregación de los mismos y determinar su localización en el mapa genético de *P. notatum*.

Sólo uno de los cinco clones de ADNc provenientes de transcritos expresados diferencialmente según el modo de reproducción en *P. notatum* pudo localizarse en uno de los grupos de ligamiento de la especie. El clon N54, mostró segregación entre los individuos F₁ de la población segregante por el modo de reproducción (Figura III.2.1), lo cual permitió su posterior localización en el mapa genético de *P. notatum*.

Tabla III.2.3 Análisis de segregación y mapeo de los transcritos expresados diferencialmente en *P. notatum*.

Nombre del Clon	Bandas detectados en Q4188	Bandas detectados en Q4117	Análisis entre los parentales	Análisis en la progenie	Localización en el mapa de <i>P. notatum</i>
N5	3	5	Polimórfico	No segregante	-
N13	3	2	Polimórfico	No segregante	-
N19	1	1	Monomórfico	-	-
N31	3	5	Polimórfico	No segregante	-
N54	9	10	Polimórfico	Polimórfico	LgM17b
N108	5	6	Polimórfico	No segregante	-

Los resultados de la localización en el mapa genético de *P. notatum* tetraploide lo ubicó en el grupo de ligamiento LgM17b, uno de los cromosomas homólogos al grupo LgM17a que contiene el locus responsable de la aposporía (Figura III.2.2), a 16 cM de marcadores que se encuentran 100% ligados en repulsión con el locus responsable de la aposporía.

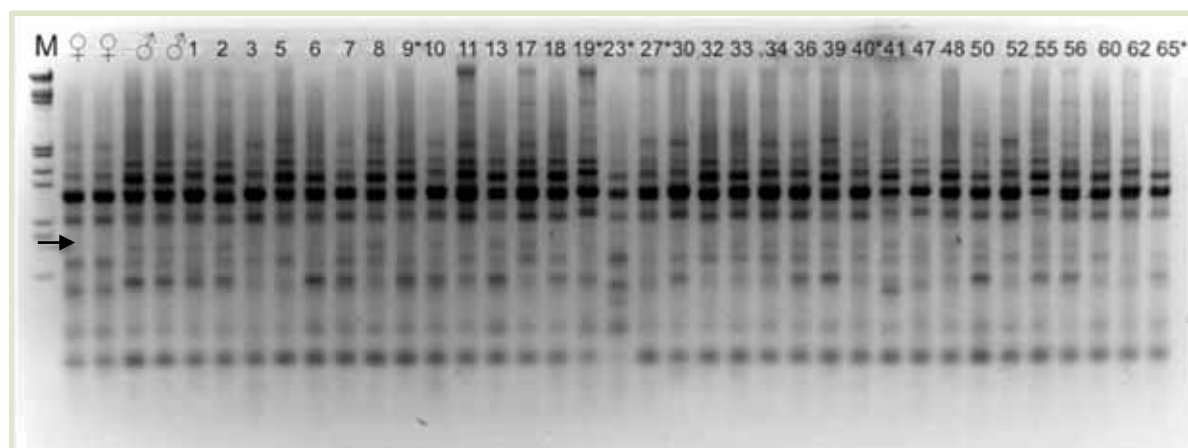


Figura III.2.1: Gel de agarosa al 2,5% corrido a 40mA por 5hs. Amplificación del clon N54 a partir de ADN genómico de los genotipos parentales y parte de la población F_1 segregante por su modo de reproducción de *P. notatum*. La flecha indica la banda polimórfica segregante por el modo de reproducción que pudo ser mapeada en el grupo de ligamiento LgM17b. El asterisco (*) indica aquellos individuos F_1 cuyo modo de reproducción es apomíctica.

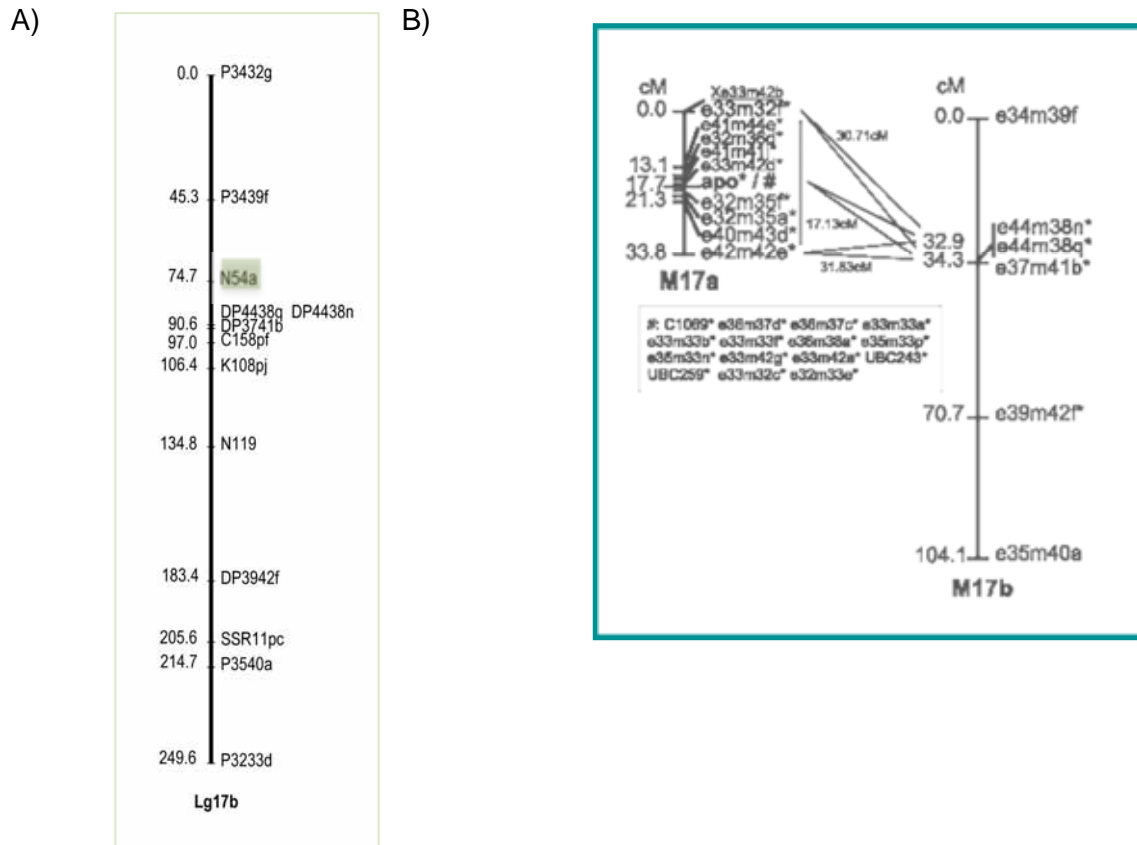


Figura III.2.2. Localización del transcrito diferencialmente expresado N54. A) Grupo de ligamiento LgM17b mostrando la localización del transcrito N54a. B) Grupos de ligamiento asociados a la aposporia reportados por Stein y col (2007). Las líneas horizontales indican marcadores ligados en fase de repulsión.

Discusión

El análisis de transcritos diferencialmente expresados entre genotipos apomícticos y sexuales es una de las herramientas utilizadas por varios grupos que estudian la apomixis en diferentes especies. Existen varios estudios recientes sobre la identificación y aislamiento de genes candidatos de la aposporia en diferentes especies de gramíneas (Vielle-Calzada y col., 1996b, Chen y col., 1999, Leblanc y col., 1997, Rodrigues y col., 2003, Pessino y col., 2001 y Albertini y col., 2004 y 2005, Laspina y col., 2008, Polegri y col., 2010). Sin embargo, resulta difícil poder determinar si estos genes se encuentran relacionados directamente con el desenlace del carácter o si solo están involucrados en cascadas de señalización posteriores al inicio de la apomixis. Hasta el momento solo unos pocos transcritos han sido reportados como funcional y físicamente asociados a algún componente de la apomixis (Polegri y col., 2010).

En el presente trabajo se intentó localizar transcritos previamente relacionados con la aposporía (ya que se hallaron expresados diferencialmente entre genotipos apomícticos y sexuales) (Laspina y col., 2008) en el mapa genético de *P. notatum*. Los experimentos realizados a partir del diseño de cebadores específicos para la amplificación por PCR de cada uno y transformarlos en marcadores tipo SCAR mostró que de los seis clones de ADNc ensayados solo 1 pudo localizarse en el mapa de ligamiento de *P. notatum*. Este clon (N54), el cual presenta homología de secuencia con una poliubiquitina, se localizó en el grupo de ligamiento LgM17b, uno de los grupos de ligamientos homólogos al grupo de ligamiento LgM17a, que contiene al locus responsable de la aposporía, encontrándose a 16 cM de marcadores detectados como 100% en repulsión al grupo apo. Esta localización puede indicar que alelos de este gen se encuentren en acoplamiento ligados a la aposporía aunque los mismos no pudieron ser identificados en este trabajo.

Por otro lado, dado que la mayoría de las secuencias asociadas a la aposporía amplificadas en este trabajo fueron no segregantes en la población, es de suponer que dichas secuencias se encuentran en múltiples dosis y por lo tanto no mostraron polimorfismos para su localización en el mapa genético de *P. notatum*. Asimismo, estos resultados indican que muchos de los genes expresados diferencialmente entre plantas apomícticas y sexuales no serían genes específicos para cada uno de los tipos de reproducción analizados sino que las diferencias estarían dadas por alteraciones en los patrones de expresión. Este trabajo sería un nuevo progreso en el anclado de transcritos relacionados al modo de reproducción que podrían llegar a dar un avance importante sobre los posibles mecanismos involucrados con la aposporía. Debido a que todavía no se han detectado transcritos diferencialmente expresados que se encuentren ligados al locus responsable de la aposporía en *P. notatum*, es posible que estas secuencias pertenezcan a la cascada de genes que se activan específicamente en este tipo de reproducción, pero ninguno de los transcritos analizados hasta el momento serían los disparadores del carácter. Sin embargo, como no fue posible detectar polimorfismos para su mapeo, su asociación física con el locus no puede ser aún descartada y serán necesarios nuevos análisis para revelar su localización física en el genoma de *P. notatum*.

Referencias

Albertini E, Marconi G, Barcaccia G, Raggi L, Falcinelli M (2004) Isolation of candidate genes in *Poa pratensis* L. *Plant Mol Biol* 56: 879-894

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

Cervigni GD, Paniego N, Diaz M, Selva JP, Zappacosta D, Zanazzi D, Landerreche I, Martelotto L, Felitti S, Pessino S, Spangenberg G, Echenique V (2008) Expressed sequence tag analysis and development of associated markers in a near-isogenic plant system of *Eragrostis curvula*. *Plant Mol Biol* 67: 7-10.

Chen L; Miyazaki C; Kojima A; Saito A; Adachi T (1999). Isolation and characterisation of a gene expressed during early embryo sac development in apomictic Guinea grass (*Panicum maximum*). *Journal of Plant Physiology* 154: 55-62.

Guerin, J. y col. (2000) A DEFICIENS homologue is down-regulated during apomictic initiation in ovules of *Hieracium*. *Planta*, 210: 914-920.

Koltunow AM, Grossniklaus U (2003) Apomixis: a developmental perspective. *Annu Rev Plant Biol* 54: 547-574.

Kosambi DD (1944) The estimation of map distance from recombination values. *Ann Eugen* 12: 172-175.

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

Laspina NV, Vega T, Seijo JG, Gonzalez AM, Martelotto LG, Stein J, Podio M, Ortiz JPA, Echenique VC, Quarín CL, Pessino SC (2008) Gene expression analysis at the onset of aposporous apomixis in *Paspalum notatum*. *Plant Mol Biol* 67: 615-628.

Leblanc, O; Armstead, I; Pessino, SC; Ortiz, JPA; Evans, C; doValle, CB; Hayward, MD (1997) Non-radioactive mRNA fingerprinting to visualise gene expression in mature ovaries of *Brachiaria* hybrids derived from *B. brizantha*, an apomictic tropical forage. *Plant Science* 126: 49-58.

Nogler, GA. (1984) Gametophytic apomixis. In: *Embryology of Angiosperms* [edited by Johri, B.M.]. Springer-Verlag, Berlin, Germany.

Pessino, SC; Espinoza, F; Martínez, EJ; Ortiz, JPA; Valle, E; Quarín, CL. (2001) Isolation of cDNA clones differentially expressed in flowers of apomictic and sexual *Paspalum notatum*. *Hereditas* 134: 35-42.

Pessino, SC; Evans, C; Ortiz, JPA; Armstead, I; do Valle, CB; Hayward, MD. (1998) A genetic map of the apospory-region in *Brachiaria* hybrids: identification of two markers closely associated with the trait. *Hereditas* 128: 153-158.

Polegri L, Calderini O, Arcioni S, Pupilli F (2010) Specific expression of apomixis-linked alleles revealed by comparative transcriptomic analysis of sexual and apomictic *Paspalum simplex* Morong flowers. *J Exp Bot* 61:1869-1883

Rodrigues JCM, Cabral GB, Dusi DMA, de Mello LV, Ridgen DJ y Carneiro VTC (2003) Identification of differentially expressed cDNA sequences in ovaries of sexual and apomictic plants of *Brachiaria brizantha*. *Plant Molecular Biology* 53: 745-757.

Sharbel TF, Voigt ML, Corral JM, Thiel T, Varshney A, Kuhmlehn J, y col. (2009). Molecular signatures of apomictic and sexual ovules in the *Boechera holboellii* complex. *Plant J* 58: 870-882.

Singh, M., Burson, B. L., & Finlayson, S. A. (2007). Isolation of candidate genes for apomictic development in buffelgrass (*Pennisetum ciliare*). *Plant Molecular Biology*, 64: 673-682.

Stein J, Pessino SC, Martinez EJ, Rodriguez MP, Siena LA, Quarín CL, Ortiz JPA (2007) A genetic map of tetraploid *Paspalum notatum* Flüggé. (bahiagrass) based on single-dose molecular markers. *Mol Breeding* 20: 153-166

Stein J, Quarín CL, Martínez EJ, Pessino SC, Ortiz JPA (2004) Tetraploid races of *Paspalum notatum* show polysomic inheritance and preferential chromosome pairing around the apospory-controlling locus. *Theor Appl Genet* 109:186-191

Vielle-Calzada JP, Nuccio ML, Budiman MA, Thomas TL, Burson BL, Hussey MA y Wing RA (1996) Comparative gene expression in sexual and apomictic ovaries of *Pennisetum ciliare* (L.) Link. *Plant Molecular Biology* 32: 1085-1092.

Yamada-Akiyama H, Akiyama Y, Ebina M, Xu QiuSheng, Tsuruta S, Yazaki J, Kishimoto N, Kikuchi S, Takahara M, Takamizo T, Sugita, S, Nakagawa H, (2009). *Journal of plant physiology* 166 (7): 750-761.

CONCLUSIONES GENERALES

Los estudios realizados en este trabajo de tesis estuvieron dirigidos a profundizar el conocimiento de las características citogenéticas y moleculares del locus responsable de la aposporía en *P. notatum*, caracterizar genes cuya expresión fue asociada a la apomixis en gramíneas y analizar secuencias genómicas específicas del locus de la aposporía.

A partir de los resultados obtenidos en la presente Tesis se puede arribar a las siguientes conclusiones:

CAPÍTULO I

1) Las razas tetraploides apomícticas naturales de *P. notatum* presentan cierto tipo de rearreglo cromosomal que afecta la meiosis en las células madre del polen y que se transmite a la descendencia asociado al modo de reproducción.

2) Las razas tetraploides apomícticas de *P. notatum* presentan una menor viabilidad del polen que los genotipos tetraploides completamente sexuales (obtenidos experimentalmente). La menor viabilidad del polen se correlaciona con las aberraciones meióticas descritas en el ítem 1.

3) Existirían otros factores, además de la presencia de aberraciones meióticas, capaces de afectar la producción de polen viable en los híbridos ya que no fue posible correlacionar las anomalías meióticas y la viabilidad del polen en las progenies F₁ derivadas del cruzamiento de plantas apomícticas y sexuales.

4) Este tipo de rearreglo cromosomal puede explicar la distorsión de la segregación y la supresión de la recombinación asociada a la transmisión de la apomixis en esta especie.

5) El locus responsable de la aposporía en *P. notatum* se encuentra localizado en un fragmento cromosómico hemicigota, rodeado de regiones de heterocromatina, el cual migra hacia uno de los polos en la meiosis I de la microesporogénesis. Esta estructura puede explicar el carácter simplexo del locus que controla la aposporía en una especie tetraploide.

CAPÍTULO II

1) Existen al menos dos genes de la familia *SERK* en *P. notatum* (*PnSERK1* y *PnSERK2*), los cuales resultaron altamente homólogos al gen *PpSERK1* y al gen *ZmSERK2* respectivamente.

2) Estudios moleculares y experimentos de Southern blot determinaron que existen al menos tres genes/alelos en *P. notatum*.

3) La expresión del gen *PnSERK2* se manifiesta fundamentalmente en tejido esporofítico. Este gen muestra diferencias en los patrones de expresión en los distintos estadios del desarrollo reproductivo y una notable diferencia en la localización de su expresión entre los genotipos apomícticos y sexuales.

4) La expresión del gen *PnSERK2* en el genotipo sexual se encuentra confinada a la célula madre de la megáspora, mientras que en el genotipo apomíctico, se localiza exclusivamente en células nucleares.

5) El gen *PnSERK2* sería uno de los genes implicados en la cascada de señalización del desarrollo de sacos apospóricos.

6) Una secuencia con alta homología a los genes *EXS* de Sorgo bicolor, maíz y arroz de *P. notatum* (*PnEXS*) fue aislada y caracterizada.

7) Estudios moleculares y experimentos de Southern blot determinaron que existen entre 2 y 4 genes/alelos en *P. notatum*.

8) La expresión del gen *PnEXS* entre los genotipos apomícticos y sexuales no mostró diferencias significativas en los estadios del desarrollo reproductivo analizados.

9) La localización de la expresión del gen *PnEXS* se detecta en todo el tejido del ovario sexual mientras que solo pudo detectarse expresión en algunas células del tegumento que rodean los sacos embrionarios en el genotipo apomíctico.

10) El gen *PnEXS* estaría diferencialmente regulado en los genotipos apomícticos y sexuales, posiblemente a través de un mecanismo de silenciamiento presente en el genotipo apomíctico.

11) La localización *in silico* de *PnEXS* determinó que la misma se localiza en regiones previamente asociadas a la aposporía (cromosoma 12 de arroz y 1 y 3 de maíz).

12) Una copia del gen *PnEXS* fue localizada en el grupo de ligamiento LgM6a en una región no asociada genéticamente con el locus responsable de la aposporía (ACL) en *P. notatum*. Otra fue situada en el grupo de ligamiento LgM17a, a 23 cM del ACL. Una tercera estaría ligada en fase de repulsión al mismo.

13) El gen *PnEXS* sería uno de los primeros genes relacionados física y funcionalmente a la aposporía en *P. notatum*.

CAPÍTULO III. 1

1) El análisis de las secuencias de marcadores ligados a la aposporía reveló que varias de las secuencias presentan similitud con transposones y retrotransposones, y regiones codificantes y no codificantes.

2) Particularmente, uno de los marcadores ligados a la aposporía resultó ser similar a una metiltransferasa del tipo MT-A70. Esta proteína podría estar relacionada con alguno tipo de regulación epigenética de genes claves del proceso de reproducción.

3) El análisis de las secuencias de marcadores previamente ligados a la aposporía indican que es posible identificar genes homólogos a candidatos controladores de la aposporía en las especies modelo, basados en la comparación *in silico* de secuencias.

CAPÍTULO III. 2

1) De los seis clones de ADNc ensayados solo uno pudo localizarse en el mapa de ligamiento de *P. notatum*.

2) El clon N54, que presenta homología de secuencia con poliubiquitina, fue localizado en el grupo de ligamiento LgM17b, en fase de repulsión al locus responsable de la aposporía.

3) Posiblemente estas secuencias pertenezcan a la cascada de genes que se activan específicamente en este tipo de reproducción, pero ninguno de los transcritos analizados hasta el momento serían los disparadores del carácter.