



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

**Implementación de un sistema modelo
diploide/tetraploide para el estudio genético y
molecular de la apomixis en *Paspalum rufum***

MARIANO SOLIMAN

Ingeniero Agrónomo

Tesis para optar al título de Dr. en Ciencias Agrarias

DIRECTOR: Dra. LUCIANA DELGADO

CO-DIRECTOR: Dr. JUAN PABLO A. ORTIZ

“Implementación de un sistema modelo diploide/tetraploide para el estudio genético y molecular de la apomixis en *Paspalum rufum*”

Soliman Mariano
Ingeniero Agrónomo - UNRC

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 de Rosario y en la Unidad de Investigación de Genética Agraria y Biotecnología Genética dependiente de la Universidad de Estudios de Perugia durante el período comprendido entre el 1 de Abril de 2015 y 30 de Octubre de 2019, bajo la dirección de la Dra. Luciana Delgado y la co-dirección del Dr. Juan Pablo A. Ortiz.

Ing Agr. Mariano Soliman
Doctorando

Dra. Luciana Delgado
Directora

Dr. Juan Pablo A. Ortiz
Co-Director

Defendida:..... de 2020.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi directora, la Dra. Luciana Delgado por darme la oportunidad de poder realizar este trabajo de Tesis, por su predisposición para enseñar y su apoyo permanente. También quiero agradecer a mi Co-director, el Dr. Juan Pablo Ortiz por la disponibilidad para discutir los resultados y su manera positiva de ver 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 Ing. Agr. Florencia Galdeano, al Dr. Francisco Espinoza, a la Dra. Patricia Novo y todos los integrantes de este grupo de trabajo por su colaboración y por el apoyo recibido durante mis estadías en Corrientes.

Al Dr. Gianpiero Marconi por su ayuda con los análisis bioinformáticos. Al Dr. Emidio Albertini por brindarme un espacio en su laboratorio, por su colaboración y por el tiempo dedicado a discutir los experimentos. También me gustaría agradecer a todo el grupo de trabajo de la Unidad de Investigación de Genética Agraria y Biotecnología Genética dependiente de la Universidad de estudios de Perugia por recibirme como a uno más y especialmente a la Dra. Marika Bocchini por su buena predisposición, su colaboración y por su amistad.

A la Dra. Maricel Podio por su apoyo y colaboración en los análisis bioinformáticos. A la Dra. Juliana Stein por su colaboración en la realización de los mapas de ligamiento. A la Dra. Silvina Pessino por estar siempre dispuesta a discutir los resultados obtenidos y a todos mis compañeros del Laboratorio de Biología Molecular quienes fueron incondicionales durante todos estos años: Carolina, Celeste, Nicolás, Álvaro, Albertina, Luisina, Valeria Palmieri, Valeria Perotti, Andrea, Lorena, Lucas y Daniel por su apoyo y amistad.

A mis amigos de siempre, Andres, Martin y Juampi por alentarme a empezar este posgrado.

Y por último a mi familia y a Sofía, con los que siempre puedo contar.

A todos, MUCHAS GRACIAS.

Parte de los resultados descritos en esta Tesis han sido publicados en los siguientes artículos y comunicaciones científicas:

Artículos en revistas

Delgado, L., Sartor, M. E., Espinoza, F., Soliman, M., Galdeano, F., & Ortiz, J. P. (2016). Hybridity and autopolyploidy increase the expressivity of apospory in diploid *Paspalum rufum*. *Plant systematics and evolution*, 302(10), 1471-1481.

Soliman, M., Espinoza, F., Ortiz, J. P. A., & Delgado, L. (2018). Heterochronic reproductive developmental processes between diploid and tetraploid cytotypes of *Paspalum rufum*. *Annals of botany*, 123(5), 901-915.

Presentaciones a congresos

Expresividad de la aposporía en híbridos diploides y en autotetraploides sintéticos de *Paspalum rufum*. (2016) – L. Delgado, M. S. Sartor, M. Soliman y J.P. Ortiz. XVI Congreso Latinoamericano de Genética. Montevideo, Uruguay. *Journal of Basic & Applied Genetics*. ISSN/ISBN: 1852-6233.

Implementación de un modelo diploide/tetraploide para el estudio de la apomixis en *Paspalum rufum* (2016) - M. Soliman, F. Espinoza, L. Delgado y J.P. Ortiz. I Reunion Transdisciplinaria en Ciencias Agropecuarias. Casilda, Santa Fe. ISSN/ISBN: 978-987-4055-04-0.

Diferencias heterocrónicas en el desarrollo reproductivo femenino entre el citotipo diploide sexual y el tetraploide apomítico de *Paspalum rufum*. (2017) M. Soliman, F. Espinoza, J.P.A. Ortiz, L. Delgado. XLVI Congreso argentino de genética. *Journal of Basic and Applied Genetics* Vol. XXVIII Suppl. 1. ISSN:1852-6233.

Quantitative analysis of apospory and parthenogenesis, in diploid hybrids and autopolyploid genotypes of *Paspalum rufum*. (2018) M. Soliman, L. Demarchi, J. Zuliani, F. Espinoza, J. P. A. Ortiz and L. Delgado. XXII International Congress of Genetics (ICG). Bourbon Cataratas Convention & Spa Resort, Foz do Iguacu - PR – Brazil. ISBN: 978-85-89109-06-2.

Construction of a genetic linkage map of diploid *Paspalum rufum* and identification of genomic regions associated with apospory expressivity. (2019) M. Soliman, M. Bocchini, J. Stein, LD. Demarchi, E. Albertini, J.P.A Ortiz, y L. Delgado. XVII Congreso Latinoamericano de Genética. Mendoza, Argentina. E-ISSN: 1852-6322.

INDICE

| | |
|--|------|
| ABREVIATURAS, SIMBOLOS Y ANGLICISMOS | i |
| RESUMEN..... | v |
| ABSTRACT | viii |
| I- INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| I.1- Desarrollo reproductivo sexual y apomítico | 2 |
| I.1.1- Desarrollo sexual | 2 |
| I.1.2- Desarrollo apomítico | 4 |
| I.1.2.1- Tipos de apomixis | 5 |
| I.1.2.2- Características principales | 8 |
| I.1.2.2.1- Coexistencia de apomixis y sexualidad..... | 9 |
| I.1.2.2.2- Composición genómica del endosperma..... | 10 |
| I.1.2.2.3- Apomixis y microsporogénesis masculina..... | 12 |
| I.1.2.2.4- Apomixis y ploidía..... | 12 |
| I.1.2.2.5- Apomixis y heterocronía | 13 |
| I.1.2.2.6- Aplicaciones | 16 |
| I.1.2.3- Herencia de la apomixis | 17 |
| I.1.2.3.1- Herencia de la apomixis en <i>Paspalum</i> | 19 |
| I.1.2.4- Introducción a los mapas de ligamiento. | 20 |
| I.1.2.4.1 - Mapeo genético en especies apomíticas | 21 |
| I.2- Epigenética | 25 |
| I.2.1- Mecanismos epigenéticos..... | 26 |
| I.2.1.2- Modificación de histonas | 26 |
| I.2.1.3- ARN Pequeños no codificantes..... | 27 |
| I.2.1.4- Metilación del ADN | 28 |
| I.2.2- Relación entre apomixis y epigenética | 30 |
| I.2.3- Técnicas utilizadas para estudiar variaciones en los patrones de metilación | 31 |
| I.3- Características del género <i>Paspalum</i> | 33 |
| I.3.1- <i>Paspalum rufum</i> | 34 |
| II-OBJETIVOS E HIPÓTESIS | 37 |
| II.1- Objetivo General:..... | 37 |

| | |
|---|----|
| II.2- Objetivos Específicos:..... | 37 |
| II.3- Hipótesis:..... | 38 |
| III- MATERIALES Y MÉTODOS..... | 39 |
| III.1- Material vegetal y tipos de cruzamientos..... | 39 |
| III.2- Duplicación genómica | 40 |
| III.3- Extracción y cuantificación de ADN | 41 |
| III.4- Marcadores moleculares | 42 |
| III.5- Confirmación de híbridos..... | 44 |
| III.6- Análisis citoembriológicos..... | 44 |
| III.7- Análisis estadísticos para comparar expresividad de aposporía..... | 45 |
| III.8- Determinación del comportamiento reproductivo mediante el análisis FCSS..... | 46 |
| III.9- Construcción de un mapa de ligamiento genético del citotipo diploide de <i>P. rufum</i> | 47 |
| III.10- Detección de QTL | 48 |
| III.11- Detalle da la construcción del calendario | 49 |
| III.12- Construcción de bibliotecas y secuenciación para implementar la técnica MCSeEd..... | 51 |
| III.13- Flujo de trabajo informático sin genoma de referencia | 55 |
| III.14- Conteo de <i>Loci</i> | 56 |
| III. 15- Análisis estadístico de las bibliotecas genómicas | 57 |
| IV- RESULTADOS | 58 |
| IV.1 - SECCIÓN 1: HERENCIA DE LOS COMPONENTES DE LA APOMIXIS EN EL CITOTIPO DIPLOIDE DE <i>PASPALUM RUFUM</i> | 58 |
| IV.1.1- Caracterización de la aposporía en individuos F ₁ | 58 |
| IV.1.1.2- Postulación de modelos de herencia de la aposporía | 64 |
| IV.1.1.3- Expresividad de la aposporía en la población F ₁ | 64 |
| IV.1.2- Influencia del ambiente sobre la expresividad de la aposporía..... | 69 |
| IV.1.3- Caracterización de la aposporía en individuos F ₂ | 71 |
| IV.1.4- Evaluación de la capacidad de completar la partenogénesis | 75 |
| IV.1- DISCUSIÓN..... | 77 |
| IV.1- CONCLUSIONES | 83 |

IV.2- SECCIÓN 2: CARACTERIZACIÓN DEL COMPORTAMIENTO REPRODUCTIVO DE INDIVIDUOS TETRAPLOIDES OBTENIDOS POR DUPLICACIÓN CROMOSÓMICA

84

| | |
|--|----|
| IV.2.1- Obtención de individuos tetraploides por duplicación cromosómica mediante tratamientos con colchicina..... | 84 |
| IV.2.2- Evaluación del comportamiento reproductivo de los individuos tetraploides | 86 |
| IV.2.2.1- Capacidad de producir sacos embrionarios apospóricos..... | 86 |
| IV.2.2.2- Influencia del ambiente sobre la expresividad de la aposporía | 88 |
| IV.2.2.3- Producción de semillas y capacidad de completar la apomixis en los individuos tetraploides..... | 90 |
| IV.2- DISCUSIÓN..... | 94 |
| IV.2- CONCLUSIONES..... | 99 |

IV.3- SECCIÓN 3: MAPEO GENÉTICO Y DETECCIÓN DE MARCADORES ASOCIADOS A LA AOSPORÍA EN UNA POBLACIÓN F₁ SEGREGANTE

100

| | |
|--|-----|
| IV.3.1- Mapeo de ligamiento genético en una población F ₁ de <i>Paspalum rufum</i> diploide . | 100 |
| IV.3.2- Identificación de regiones genómicas asociadas a la expresividad de la aposporía | 108 |
| IV.3- DISCUSIÓN..... | 113 |
| IV.3- CONCLUSIONES..... | 117 |

IV.4- SECCIÓN 4: DESARROLLO REPRODUCTIVO SEXUAL Y APOMÍCTICO EN GENOTIPOS DIPLOIDES Y TETRAPLOIDES

118

| | |
|--|-----|
| IV.4.1- Desarrollo reproductivo sexual en los citotipos diploide y tetraploide..... | 119 |
| IV.4.2- Caracterización cuantitativa del crecimiento y desarrollo del óvulo en los citotipos diploide y tetraploide..... | 125 |
| IV.4.3- Aparición de las células iniciales de la aposporía en los citotipos diploide y tetraploide | 129 |
| IV.4- DISCUSIÓN..... | 134 |
| IV.4- CONCLUSIONES..... | 139 |

IV.5- SECCIÓN 5: DETERMINACIÓN DE PATRONES DE METILACIÓN EN GENOTIPOS DIPLOIDES CON DIFERENTE EXPRESIVIDAD DE AOSPORÍA.....

140

| | |
|--|-----|
| IV.5.1- Aplicación de la técnica MCS _{Ed} en muestras con diferente expresividad de aposporía. | 140 |
|--|-----|

| | |
|---|-----|
| IV.5.1.1- Identificación de posiciones diferencialmente metiladas | 141 |
| IV.5.1.2- Validación de las bases de datos obtenidas | 146 |
| IV.5- DISCUSIÓN..... | 150 |
| IV.5- CONCLUSIONES | 155 |
| V- CONCLUSIONES GENERALES..... | 156 |
| VI- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 159 |
| VII- ANEXO | 176 |

ABREVIATURAS, SÍMBOLOS Y ANGLICISMOS

μg: microgramos ($1 \cdot 10^{-6}$ g)

μl: microlitro ($1 \cdot 10^{-6}$ l)

μm: micrometros ($1 \cdot 10^{-6}$ m)

2n: número cromosómico diploide de una especie

ac: células antípodas del saco embrionario

ADN: ácido desoxirribonucleico

AFLP: polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados

A-m: medida en micrómetros de la apertura de la micrópila

Ar: medida en grados de ángulo de rotación del óvulo

ARNasa: ribonucleasa

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)

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

CMM: célula madre de la megáspora

CMMi: célula madre de la micróspora

CTAB: bromuro de cetiltrimetil amonio

DIC: contraste de interferencia diferencial

DMSO: dimetilsulfóxido

dNTPs: desoxinucléotidos trifosfato

e: medida en micrómetros del ancho de la epidermis del óvulo

ec: oosfera o célula huevo

EDTA: ácido etilendiamino-tetracético

F1: primera generación en un cruzamiento

F2: segunda generación en un cruzamiento

FDR: tasa de falso descubrimiento (*False Discovery Ratio*)

FG2: estadio de desarrollo reproductivo caracterizado por la presencia de un saco embrionario meiótico después de la primera mitosis

FG4: estadio de desarrollo reproductivo caracterizado por la presencia de un saco embrionario meiótico después de la segunda mitosis

FG5: estadio de desarrollo reproductivo caracterizado por la presencia de un saco embrionario meiótico después de la tercera mitosis

FG6: estadio de desarrollo reproductivo caracterizado por la presencia de un saco embrionario sexual en formación luego de la celularización

gl: grados de libertad

HCl: ácido clorhídrico

IA: Células iniciales de la aposporía

I-l: medida en micrómetros del largo del integumento interno

IT: parámetros independientes del tamaño del ovario

l-I: medida en micrómetros del largo del integumento

Loc-an: medida en micrómetros del ancho del lóculo

Loc-ar: medida en micrómetros del área del lóculo

Loc-l: medida en micrómetros de la longitud del lóculo

Loc-p: medida en micrómetros del perímetro del lóculo

LSC: células de gran tamaño que se encuentran en el extremo chalazal de la línea germinal

M: concentración molar. Moles de soluto en un litro de solución

mf: megáspora funcional.

mg/ml: miligramos por mililitro

ml: mililitro

mM : milimolar ($1 \cdot 10^{-3}$ M)

n: número cromosómico haploide de una especie

NaCl: cloruro de sodio

ng: nanogramos

nm: nanómetro ($1 \cdot 10^{-6}$ m)

°C: grados centígrados

Ov-an: medida en micrómetros del ancho del ovario

Ov-ar: medida en micrómetros del área del ovario

Ov-l: medida en micrómetros del largo del ovario

Ov-p: medida en micrómetros del perímetro del ovario

p/v: porcentaje calculado en unidades de peso sobre unidades de volumen

pb: pares de bases

PCR: reacción en cadena de la ADN polimerasa

pn: célula central binucleada

RAPD: polimorfismos por amplificación al azar del ADN

RFLP: polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción

sd: desvío estándar

SEA: saco embrionario apospórico

%SEA: proporción de SEA o expresividad de la aposporia

SEM: saco embrionario meiótico

syn: sinérgidas

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

TE: Tris-EDTA

tet: tétradas de megásporas después de la meiosis

tri: tríada de megásporas después de la meiosis

Tris: N-Tris-(hidoximetil)-aminoetano

U: unidad de actividad enzimática

UBC: Universidad de la Columbia Británica

UPGMA: método de agrupamiento de pares no ponderados con media aritmética para la realización de un dendograma

UV: ultravioleta

v/v: porcentaje calculado en unidades de volumen sobre unidades volumen

V: voltios

x: número cromosómico básico de una especie

χ^2 : prueba de bondad de ajuste

RESUMEN

La apomixis es un modo de reproducción asexual por semillas que genera progenies genéticamente idénticas a la planta madre. Esta característica es común en especies del género *Paspalum*, donde las poblaciones naturales se organizan en complejos agámicos multiploides. En estos sistemas, el citotipo diploide se reproduce por sexualidad, mientras que los poliploides, generalmente triploides y tetraploides, se reproducen por apomixis gametofítica de tipo apospórica pseudógama. A pesar de esto, en varias especies del género, en especial en *P. rufum*, se detectaron individuos diploides que producen sacos embrionarios apospóricos (SEA) e incluso algunos son capaces de completar la apomixis.

El objetivo de este trabajo fue establecer un sistema de estudio de la apomixis a nivel diploide y tetraploide en *P. rufum*. Para esto se trabajó en la generación y caracterización del material vegetal, se estableció un sistema comparativo y se desarrollaron herramientas moleculares para futuros estudios sobre los genes asociados al control de los componentes del carácter.

En primer lugar, se realizó una caracterización de la transmisión de los componentes de la apomixis, aposporía (SEA) y partenogénesis al nivel diploide. Se trabajó con una población segregante F_1 proveniente del cruzamiento entre dos genotipos diploides naturales, ambos capaces de producir SEA en proporciones similares (5,77 %SEA y 13 %SEA) y con capacidad diferencial de completar la partenogénesis (0% y 15%). Los análisis de segregación del carácter “aposporía”, realizados mediante observaciones citoembriológicas, ajustaron a un modelo dominante controlado por dos *loci* independientes. La determinación del %SEA en la progenie F_1 (entre 0% y 35,8 %SEA) reveló que la hibridación puede aumentar significativamente la expresividad del carácter. Por otro lado, se confirmó que el grado de expresividad de la aposporía se transmite desde los parentales a las progenies (F_2) y es un carácter estable para un mismo genotipo a lo largo del tiempo, sin embargo varía en diferentes ambientes. La capacidad de formar semillas por apomixis fue evaluada en varios individuos mediante citometría de flujo y se demostró que si bien algunos producen semillas apomícticas, la mayor expresividad de la aposporía no se correlaciona con esta capacidad. Además, se analizó la influencia del aumento de ploidía, en genotipos tetraploides artificiales, sobre la expresividad de la aposporía y la apomixis. Estos análisis mostraron que la duplicación

genómica permite incrementar el %SEA y la apomixis aunque esta no prevalece sobre la sexualidad.

Para avanzar con el desarrollo de herramientas moleculares se utilizó la población F₁ para generar un mapa de ligamiento genético a nivel diploide. Se construyeron dos mapas de ligamiento mediante la inclusión de 627 marcadores de AFLP. Cada mapa quedó formado por 10 grupos de ligamiento (GL) cubriendo una longitud total de 1071,8 cM y 914 cM con una distancia promedio entre marcadores de 4,78 cM y 4,53 cM y una distancia máxima entre dos marcadores de 28,74 y 34,8 cM para el parental femenino y masculino, respectivamente. La variación observada para la expresividad de la aposporía en la población nos llevó a realizar una búsqueda de regiones asociadas a la misma mediante análisis de regresión simple. Se comprobó la existencia de más de una región genómica asociada al carácter, localizadas principalmente en dos GL.

Si bien se desconocen las vías moleculares que controlan la apomixis se ha postulado que su expresión es posible gracias a la desregulación de los mismos genes que participan en el desarrollo sexual y provocan una heterocronía en los procesos de desarrollo reproductivo. Con el objetivo de probar esta hipótesis se comparó el desarrollo reproductivo sexual y apomítico entre los citotipos diploide y tetraploide, ambos con sexualidad y apomixis en diferentes proporciones. Se evaluó la evolución de la esporogénesis y la gametogénesis femenina y masculina, el crecimiento del ovario y la diferenciación de las células iniciales de la aposporía (IA). Estos análisis mostraron diferente coordinación entre los procesos de desarrollo sexual y apomítico en el citotipo diploide respecto del tetraploide, observándose principalmente un retraso de la meiosis femenina en los tetraploides. Se postula que esta característica podría estar favoreciendo al desarrollo apomítico al nivel poliploide.

Considerando la relación que existe entre las modificaciones epigenéticas y la expresión de la apomixis se realizó un análisis comparativo de los perfiles de metilación entre genotipos diploides, de la población F₁, con diferentes %SEA, utilizando espiguillas en premeiosis y postmeiosis. Se aplicó una técnica desarrollada recientemente denominada MCS_{Ed}. Este análisis reveló la presencia de cambios en la metilación asociados a los diferentes comportamientos reproductivos. Se verificó además que varias de las secuencias diferencialmente metiladas poseen homología con genes relacionados con procesos de crecimiento y desarrollo reproductivo.

Los resultados obtenidos en la presente tesis permitieron caracterizar exhaustivamente el desarrollo de la apomixis a nivel diploide y tetraploide en la especie *P. rufum*. Se desarrolló el material vegetal diploide y tetraploide para continuar con los estudios moleculares de la apomixis y comprender su control, así como la influencia que ejercen los aumentos en los niveles de ploidía. Se construyó un mapa de ligamiento que será el punto de partida para localizar los componentes de la apomixis en el genoma diploide. Por último, se implementó el sistema diploide para un primer estudio comparativo a nivel molecular identificándose variaciones epigenéticas relacionadas con el cambio del comportamiento reproductivo. Además, se generó una base de datos de secuencias que serán de gran utilidad en estudios posteriores para la identificación de los genes que intervienen en la regulación de la apomixis a nivel diploide.

ABSTRACT

Apomixis is an asexual mode of reproduction by seeds that generates maternal clonal progeny. Although the character is mainly expressed at polyploid level, components of apomixis have been detected at the diploid level in several species of *Paspalum*, including *P. rufum*.

The objective of this work was to establish a comparative system for studying apomixis at diploid and tetraploid levels in *P. rufum*. The activities performed include the generation and characterization of the plant material, as well as, the development of molecular tools for further analyses of genes controlling apomixis components.

The trans-generational transmission of apomixis components, apospory (AES) and parthenogenesis, was analyzed in a segregating F₁ population obtained by crossing diploid genotypes producing similar proportions of AES (5.77% and 13%), but having different capacity to complete parthenogenesis (0% and 15%). Cytoembryological observations revealed that apospory segregates as a dominant character controlled by two independent *loci*. Quantification of %AES showed that hybridity can increase it up to 35.8% and is transmitted to successive F₂ generations. Tetraploid genotypes artificially obtained revealed higher %AES than its diploid counterparts. The evaluation of apomixis capacity by flow cytometry in diploid hybrids showed that it is transmitted to the progeny, however a high %AES is not enough to guarantee apomixis expression. Artificial tetraploid genotypes also increase apomixis capacity in comparison to its original diploids but it varied depending on original diploid genotypes.

A genetic linkage map at diploid level was built in order to characterize the *P. rufum* genome and search regions associated with expressivity of apospory. Two linkage maps with ten linkage-groups (LG) were constructed for each parental genotypes covering a recombination distance of 1071.8 cM (maternal) and 914 cM (paternal), respectively. A single regression analysis allowed to find more than one genomic region modifying the character.

Reproductive development was characterized by cytoembryological observations of ovaries and anthers during reproductive development. This assay showed a delay of female reproductive development in tetraploid cytotype with respect to diploid cytotype, mainly at meiosis. This behavior could favor apomixis development at the tetraploid level.

An epigenetic comparative analysis between diploid plants with low and high %AES was performed by applying the new MCSeEd technique. Results revealed that different methylation patterns are related with reproductive development. Sequences differentially methylated showed homology with genes related to growth and reproductive development.

Results obtained in this work contribute to generate the vegetal material for characterizing apomixis and establishing a comparative system at both diploid and tetraploid levels. The diploid system and the genetic linkage maps developed, as well as, the methylation analysis performed will help for disclosing apomixis components operating in *P. rufum*.

I- INTRODUCCIÓN

A lo largo de la Introducción se hace un recorrido que desarrolla las temáticas abordadas en los objetivos de la presente Tesis. Es importante resaltar que la motivación primordial de este trabajo es comprender la regulación de la apomixis en todos sus aspectos, genético, molecular y de desarrollo. De esta manera se inicia la introducción con una base general del desarrollo reproductivo vegetal para luego explicar en profundidad las características principales de la apomixis. Se aborda su distribución en el reino vegetal, su relación con el desarrollo sexual femenino y masculino, así como la necesidad o no de polinización.

Luego se analizan algunos aspectos importantes que influyen en el éxito que presenta la apomixis respecto de la sexualidad. Por un lado, la estrecha relación que se conoce entre los citotipos poliploides y la expresión de la apomixis, así como entre la sexualidad y el citotipo diploide. A colación de esta relación se trata otro fenómeno denominado “heterocronía”, que podría ser causado por los aumentos de ploidía, provocando una alteración en la coordinación entre los procesos de desarrollo y favoreciendo la expresión de la apomixis. Antes de ahondar en los temas genéticos y moleculares se describen las posibles aplicaciones de introducción/uso de la apomixis resaltándose de esta manera la importancia de comprender su regulación.

Posteriormente se hace un recorrido por los estudios de herencia del carácter, así como las diferentes técnicas que se utilizan para su caracterización y se profundiza en los trabajos previos que analizan la herencia en el género *Paspalum*, que es el estudiado en el presente trabajo. Se introduce luego la temática de los mapas de ligamiento, su aplicación en la localización genómica del *locus/loci* que la controlan, ya sea en especies apomícticas como en el género *Paspalum*.

Luego, dado que el último tema tratado en esta tesis se relaciona con las modificaciones epigenéticas se describen las bases moleculares de estos procesos, así como su relación con la expresión de la apomixis y las diferentes técnicas que se utilizan para su estudio.

Por último y para dar paso a los trabajos experimentales desarrollados, se describen las características generales del género *Paspalum* y luego de la especie en estudio *Paspalum rufum*, así como se detallan los trabajos previos realizados en relación al comportamiento reproductivo de esta especie y el material vegetal desarrollado a partir de los cuales se inicia este trabajo de Tesis.

I.1- Desarrollo reproductivo sexual y apomítico

I.1.1- Desarrollo sexual

El proceso de desarrollo sexual en las angiospermas implica una alternancia cíclica entre un estado esporofítico o diploide multicelular ($2n$) representado por las células somáticas de la planta y otro estado gametofítico o haploide (n) representado por el grano de polen y el saco embrionario. Durante el proceso de floración se da inicio al estado gametofítico, en el cual ocurre la meiosis que posibilita la recombinación, la reducción del contenido genético y conduce a la formación de las gametas masculinas en las anteras y de las gametas femeninas en los ovarios de las flores (Asker y Jerling, 1992; Crang *et al.*, 2018).

El mecanismo de formación de las gametas femeninas consta de dos etapas, la primera es la megasporogénesis, que involucra la formación y maduración de los productos de la meiosis (megásporas), y la segunda es la megagametogénesis que comprende la formación y maduración del Saco Embrionario Meiótico (SEM) (megagametofito) mediante tres ciclos de mitosis. Durante la megasporogénesis, generalmente en las gramíneas de reproducción sexual, una célula especializada de la nucela, denominada célula arqueosporial dará lugar a la célula madre de las megásporas (CMM) que se divide meióticamente para formar cuatro megásporas reducidas (n) dispuestas en forma lineal (Johri y Rao, 1984). Las tres megásporas más cercanas a la micrópila degeneran y queda solo la megáspora funcional del extremo chalazal. Este proceso de formación de esporas es el más común en angiospermas y se denomina megasporogénesis monosporica. Sin embargo, existen otras especies en donde no se forma la pared celular luego de la primera y/o segunda meiosis dando lugar a la formación de megásporas con dos o cuatro núcleos, respectivamente (megasporogénesis bispórica o tetrasporica) (Yadegari y Drews, 2004).

En las especies del género *Paspalum* la megáspora funcional está compuesta por un núcleo (megasporogénesis monospórica) y durante la megagametogénesis resulta en la formación de sacos embrionarios de tipo *Polygonum*. Después de la degeneración de las megásporas del extremo micropilar, la megáspora funcional en la posición más cercana a la chalaza agranda su tamaño antes de la primera división mitótica a través de la formación de una vacuola en el extremo chalazal. Luego de esta primera división, los núcleos migran hacia los polos opuestos empujados por una vacuola central y se generan dos nuevas divisiones mitóticas en cada núcleo (Cass *et al.*, 1985). Luego de este proceso que incluye tres divisiones mitóticas, migración nuclear y citocinesis se genera el saco embrionario sexual formado por 8 núcleos haploides (n) contenidos en 7 células: la ovocélula, dos sinérgidas, una célula central binucleada y tres antípodas. En las gramíneas en particular, el aparato oosférico, formado por la ovocélula rodeada por dos sinérgidas, está situado en el extremo micropilar del óvulo, sitio por donde ingresa el tubo polínico en el momento de la fecundación. En el extremo opuesto denominado chalazal, se encuentra un gran número de antípodas que puede variar de 6 o 7 hasta varias decenas (Reiser y Fischer, 1993).

En las anteras, el proceso de formación de gametas masculinas también se divide en dos etapas. Durante la microsporogénesis, las células madres de los microsporas (CMMi) formadas a partir de un tejido especializado de la antera llamado tapetum se dividen por meiosis dando origen a cuatro micrósporas. Posteriormente, en la microgametogénesis, cada micróspora desarrolla un grano de polen con una célula vegetativa y otra generativa, producto de la división mitótica del núcleo haploide. La célula generativa se divide una vez más para originar dos células espermáticas (Nakamura *et al.*, 2010). En algunos casos, esto último ocurre generalmente después de la germinación del polen (Borg *et al.*, 2016).

La formación de la semilla requiere un proceso de doble fecundación. El polen germina sobre el estigma de la flor desarrollando un tubo polínico que crece por el estilo y entra al óvulo a través de la apertura micropilar. Los núcleos espermáticos ingresan al saco embrionario después de la penetración del tubo polínico a través de una sinérgida. Uno de los núcleos espermáticos (n) se fusiona con la ovocélula (n) para dar origen al cigoto ($2n$), a partir del cual desarrollará el embrión. El otro gameto masculino se fusiona con los núcleos polares para originar el endosperma ($2n + n$). De esta manera se reestablece el número cromosómico diploide de la especie (Brink y Cooper, 1940; Russell, 1992).

I.1.2- Desarrollo apomítico

En la naturaleza pueden formarse semillas a través de un proceso asexual denominado apomixis el cual hace prescindible la fecundación y evita la recombinación del material genético. Los descubrimientos iniciales de la apomixis en plantas mayores fueron atribuidos a la observación de una planta femenina de *Alchornea ilicifolia* (syn. *Caelebogyne ilicifolia*) (diclino dioica) proveniente de Australia que continuó formando semillas luego de ser plantada sola en los jardines botánicos reales en Kew, Inglaterra (Smith, 1841). Algunos de los primeros experimentos realizados con plantas apomíticas fueron realizados de forma involuntaria por Gregor Mendel, quien utilizó plantas de *Hieracium* para confirmar sus famosos experimentos realizados en arvejas. En los mismos, el investigador atribuyó la falta de segregación observada a una “frecuente autopolinización” (Asker y Jerling, 1992). El término “apomixis” deriva del griego “apo” que significa falta o ausencia, y “mixis” que significa unión o mezcla y se utilizó inicialmente para describir todos aquellos mecanismos de reproducción en donde exista sustitución de la reproducción sexual por algún tipo de proceso de multiplicación asexual, sin fusión de núcleos y células, sin embargo, esta interpretación ya no es más aceptada (Asker y Jerling, 1992). La apomixis en plantas con flor es hoy definida como la formación de semillas de forma asexual a partir de tejidos maternos del óvulo, evitando los procesos de meiosis y fertilización (Nogler, 1984).

La apomixis es un carácter que está documentado en más de 320 géneros de Angiospermas (Hörandl y Hojsgaard, 2012). Sin embargo, salvo algunas excepciones en algunos pastos forrajeros y árboles frutales, no es una característica común entre las especies de cultivos. En relación a los procesos evolutivos, Darlington (1939) proponía que la apomixis podría ser un callejón sin salida en la evolución de una especie. Esta idea estaba basada en la suposición de que la apomixis causa pérdida de heterogeneidad genética en poblaciones y esto conlleva una pérdida de potencial de adaptación a cambios climáticos. De esta manera, las especies que se reproducían de forma agámica estaban destinadas a la extinción. Este punto de vista, de un sistema estático y cerrado, ha sido recientemente revisado mediante trabajos basados en observaciones empíricas donde se manifiesta que los complejos agámicos almacenan considerable variación genética y representan sistemas dinámicos y flexibles (Hörandl y Hojsgaard, 2012; Ortiz *et al.*, 2013).

I.1.2.1- Tipos de apomixis

El carácter presenta formas diferentes lo que condujo a suponer que ha surgido varias veces en forma independiente durante la evolución (Grimanelli *et al.*, 2001). Nogler (1984) dividió a la apomixis en dos amplios grupos y las denominó: apomixis esporofítica y apomixis gametofítica.

En la **apomixis esporofítica**, también llamada embrionía adventicia (Koltunow *et al.*, 1995), se generan embriones directamente a partir de algunas células somáticas de la nucela o de los integumentos sin que se forme un gametofito. Estas células iniciales forman embriones de forma globular que solo pueden desarrollarse hasta la madurez si se fertiliza el saco embrionario sexual, ya que los embriones sexuales y asexuales comparten el mismo endosperma para nutrirse (**Figura 1. B**). En este tipo de apomixis pueden producirse semillas con embriones múltiples y algunas veces el embrión formado en el saco embrionario sexual puede llegar a madurez y germinar (Hand y Koltunow, 2014). La embrionía adventicia es el tipo de apomixis que se encuentra con mayor frecuencia en la naturaleza (148 géneros) (Hojsgaard *et al.*, 2014). Se conoce que es un carácter genéticamente complejo, sin embargo, no ha sido ampliamente estudiado a nivel molecular (García *et al.* 1999). Entre las especies de importancia agronómica que poseen el carácter se pueden mencionar al mango (*Mangifera indica*), varias especies de cítricos y orquídeas (Hand y Koltunow, 2014).

En la **apomixis gametofítica** se forma un embrión a partir de una célula huevo de un saco embrionario no reducido en ausencia de fecundación. Otra forma de llamar a la formación del saco embrionario mitótico es apomeiosis (**Figura 1. C-D**). De acuerdo con el origen de la célula precursora no reducida que da origen al saco embrionario no reducido, la apomixis gametofítica se subdivide en dos grupos: diplospórica y apospórica (Hand y Koltunow, 2014).

En la **diplosporía**, el precursor del megagametofito o saco embrionario es la célula madre de la megáspora (o una célula con un programa de desarrollo alterado que se diferencia en la posición que tiene la célula madre de la megáspora) (**Figura 1. C**). Esta célula puede directamente entrar en la mitosis (tipo *Antennaria*), sin previa reducción del contenido genómico o iniciar la meiosis pero abortar el proceso antes de finalizarlo (Tipo *Taraxacum*). Generalmente, los sacos embrionarios diplospóricos conservan la estructura típica de los sacos

de origen meiótico de tipo *Polygonum*, con siete células y ocho núcleos (Savidan 2000). En la **diplosporía meiótica** de tipo *Taraxacum*, la célula madre de las megáspora inicia la profase meiótica, pero a consecuencia de una asinapsis parcial o total, la mayoría o la totalidad de los cromosomas permanecen sin aparearse en forma de univalentes. Estos univalentes no migran hacia los polos. Por el contrario, restituyen el núcleo y luego, uniéndose a las fibras del huso se separan en sus cromátidas dando origen a dos núcleos no reducidos. La posterior citocinesis origina una díada de megásporas, citológicamente no reducidas. Generalmente, en la célula del extremo chalazal de la díada, se producen tres mitosis consecutivas para formar un saco embrionario octo-nucleado. La formación del núcleo de restitución ocurre únicamente en la meiosis femenina (Nogler, 1984). Este tipo de apomixis es común en especies pertenecientes a la familia Compuestas (*Taraxacum*, *Erigeron*, *Chondrilla*) y a otras especies como las pertenecientes al género *Boechea* (Corral *et al.*, 2013). Existen descritos otros dos tipos de diplosporía meiótica, tipo *Ixeris* y tipo *Allium*, pero son mucho menos frecuentes que el tipo *Taraxacum* (Nogler, 1984; Savidan, 2000).

En la **diplosporía mitótica**, también conocida como de tipo *Antennaria*, los sacos embrionarios se generan a partir de la célula madre de la megáspora. Esta célula no inicia la meiosis, sino que después de una larga interfase, se produce un crecimiento celular generado por una gran vacuolización y luego de tres mitosis sucesivas se origina a un saco embrionario maduro compuesto por ocho núcleos no reducidos (Nogler, 1984). Este tipo de apomixis está más ampliamente difundido (Savidan, 2000). Entre los géneros más importantes con este tipo de apomixis se encuentran: *Antennaria*, *Poa*, *Tripsacum*, entre otros (Nogler, 1984). Por otra parte, en el género *Eragrostis* se produce una diplosporía mitótica diferente al caso de *Antennaria*. En este caso, se producen solo dos mitosis sucesivas que llevan a la formación de un saco embrionario que cuenta con cuatro núcleos: dos pertenecen a las sinérgidas, uno a la célula huevo y otro a la célula central (Meier *et al.*, 2011).

En las plantas diplospóricas el proceso sexual se ve completamente comprometido ya que es la misma célula madre de la megáspora la que sufre la modificación. Sin embargo, existen individuos diplospóricos facultativos en los cuales algunos óvulos siguen la ruta sexual y otros la diplospórica.

En la **aposporía**, el saco embrionario no reducido no se inicia a partir de la célula madre de la megáspora, sino que lo hace a partir de una célula somática no reducida posicionada adyacente a la megáspora funcional o a la célula madre de la megáspora. A esta célula se la denomina célula IA (Hand y Koltunow, 2014) (**Figura 1. D**). De acuerdo a su formación y estructura los sacos embrionarios apospóricos pueden presentar distintas variantes: tipo "*Hieracium*" o bipolar, tipo "*Panicum*" o monopolar, además de algunas variantes típicas del género *Paspalum* (Nogler, 1984). Las células nucelares IA poseen un núcleo grande y un citoplasma denso al igual que las células que se diferencian como células arquesporales. A diferencia de la diplosporía, en los óvulos de las plantas que presentan aposporía pueden coexistir el proceso sexual y el apomítico al mismo tiempo.

En la **aposporía bipolar** o de tipo *Hieracium* la formación del saco se produce después de tres divisiones mitóticas, originándose ocho núcleos que se distribuyen hacia ambos polos, conformando una estructura similar a los sacos embrionarios de tipo *Polygonum* de las especies sexuales. La diferencia con este último reside en que cada núcleo es no reducido. Es un tipo de apomixis ampliamente distribuida en diferentes géneros como son *Hieracium*, *Hypericum*, *Poa* (Nogler, 1984), y también está presente en la especie *Paspalum simplex* (Caceres *et al.*, 1999).

En la **aposporía monopolar** o de tipo *Panicum* los sacos embrionarios se forman a partir de células de la nucela del óvulo mediante dos mitosis consecutivas, dando origen a cuatro núcleos, los cuales se distribuyen hacia un solo polo. Los sacos desarrollados están constituidos de un aparato oosférico, compuesto por dos sinérgidas y la ovocélula y una célula central con un solo núcleo polar, careciendo de antípodas. La apomixis apospórica de tipo *Panicum* está ampliamente distribuida en gramíneas (*Cenchrus*, *Chloris*, *Digitaria*, *Eriochloa*, *Panicum*, *Sorghum*, *Pennisetum*, etc) (Nogler, 1984; Carman, 1997). En el género *Paspalum* se genera una variante de este tipo de aposporía y el saco embrionario queda formado por una célula huevo, una o dos sinérgidas y una célula central con dos núcleos polares (saco embrionario apospórico tipo *Paspalum*) (Quarín y Burson, 1991; Ortiz *et al.*, 2013).

La apomixis apospórica está ampliamente distribuida entre las gramíneas y en el caso de las tropicales y subtropicales la mayoría poseen un desarrollo de saco embrionario del tipo *Panicum*; mientras que otras tantas de clima templado poseen sacos embrionarios del tipo *Hieracium* (Savidan, 2000).

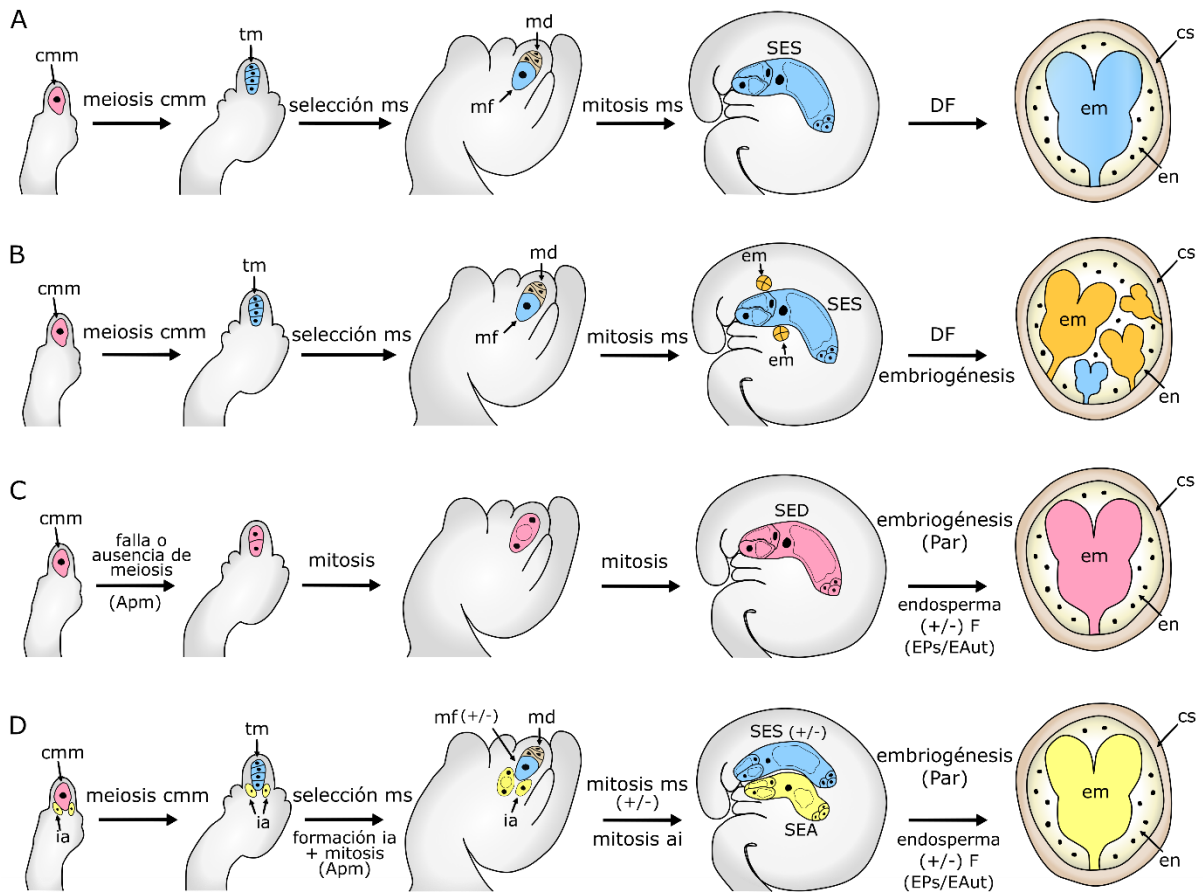


Figura 1. Desarrollo reproductivo en especies sexuales y apomíticas. **A**, eventos de formación de semilla sexual. **B**, eventos de apomixis esporofítica. **C**, eventos de la apomixis diplospórica, **D**, apomixis apospórica, del tipo *Hieracium*, donde la formación del endosperma puede o no requerir de la fecundación. En el caso de la aposporia, los gametofitos reducidos pueden coexistir con los gametofitos apospóricos o puede ocurrir la degeneración del gametofito reducido. **Apm**, apomeiosis; **cmm**, célula madre de la megáspora; **cs**, cubierta seminal; **em**, embrión; **en**, endosperma; **EAut**, formación autónoma del endosperma; **EPS**, formación del endosperma por pseudogamia, el cual requiere fecundación; **F**, fecundación; **DF**, doble fecundación; **ia**, Células iniciales de la aposporia; **ie**, célula inicial del embrión; **md**, megásporas degeneradas; **mf**, megáspora funcional; **ms**, megáspora; **SEA**, saco embrionario apospórico, no reducido; **SED**, saco embrionario diplospórico, no reducido; **SES**, saco embrionario sexual, reducido; **Par**, partenogénesis; **tm**, tétrada de megásporas; (+/-), presencia o ausencia. (Modificado de Koltunow *et al.*, 2013).

I.1.2.2- Características principales

La apomixis puede ocurrir mediante varios mecanismos pero todos comparten tres componentes principales: (i) apomeiosis: generación de una célula capaz de producir un embrión sin haber realizado una reducción en el contenido genético o una recombinación a través de la meiosis, (ii) partenogénesis: el desarrollo del embrión en ausencia de fertilización

(proceso conocido como partenogénesis), y (iii) formación autónoma del endosperma en ausencia de fertilización o por pseudogamia, mediante la fertilización de los núcleos polares (Hand y Koltunow, 2014).

Los sacos embrionarios, tanto diplospóricos como apospóricos, contienen la ovocélula no reducida ($2n$), a partir de la cual se desarrolla el embrión partenogenéticamente. Sin embargo, no necesariamente se anula la fecundación de los núcleos polares. Aunque en algunos casos el endosperma puede desarrollarse en forma autónoma (*Erigeron* o *Taraxacum*), en muchas especies (la mayoría de las gramíneas tropicales como *Panicum*, *Pennisetum*, *Tripsacum* o *Paspalum*) es necesario que una gameta masculina se fusione con el/los núcleos polares de la célula central para formar el endosperma. Este proceso es conocido como pseudogamia. La falla en el desarrollo del endosperma es una de las causas de la ausencia de formación de semillas apomícticas en muchas ocasiones (Quarin 1999).

I.1.2.2.1- Coexistencia de apomixis y sexualidad

Los procesos reproductivos que determinan la apomixis y la sexualidad no son mutuamente excluyentes. A las plantas que son capaces de producir estos dos procesos reproductivos se las conoce como “apomícticas facultativas” y pueden contener simultáneamente sacos reducidos (meióticos) y no reducidos (provenientes de apomixis) en una misma planta, en una misma inflorescencia y aún en un mismo óvulo (Harlan *et al.*, 1964). En todos los estudios de los mecanismos de apomixis conocidos, y en la mayoría de los genotipos estudiados se ha reportado algún grado de sexualidad remanente en plantas apomícticas, que por lo tanto son apomícticas facultativas (Espinoza *et al.*, 2006; Rebozzio *et al.*, 2011); las plantas apomícticas obligadas son muy poco frecuentes en la naturaleza (Asker y Jerling, 1992; Bicknell y Koltunow, 2004). Sabiendo esto, las progenies de los genotipos apomícticos generan clases maternas ($2n + 0$) y no-maternas o aberrantes. Hay tres tipos diferentes de individuos aberrantes que pueden encontrarse en la pro genie de una planta apomíctica: 1) híbridos BII ($n + n$) que resultan de la fecundación de una ovocélula reducida con polen reducido 2) híbridos BIII ($2n + n$) que resultan de la fecundación de una ovocélula no reducida con polen reducido, y 3) haploides ($n + 0$) generados por partenogénesis a partir de una ovocélula reducida, también conocidos como polihaploides (Savidan, 2000; Koltunow y Grossniklaus, 2003).

En la mayoría de las especies no se han descrito los mecanismos por los cuales la célula huevo de un saco embrionario no reducido evita con frecuencia ser fecundada. Sin embargo, se ha propuesto que en especies pertenecientes a *Tripsacum* y a *Poa* la fecundación de la célula huevo se evita debido a la formación de un proembrión que se genera previo a la antesis (Asker y Jerling, 1992). Por otra parte, en *Panicum máximum* se ha propuesto que la célula huevo no reducida puede sintetizar pared celular que actúa como una barrera física ante la fecundación (Savidan, 1989; Koltunow, 1993).

I.1.2.2.2- Composición genómica del endosperma

En las plantas apomícticas es raro encontrar especies con formación autónoma del endosperma, la mayoría de ellas requiere de la fertilización de la célula central para permitir la formación del mismo (Pseudogamia). En la embrionía adventicia el endosperma lo provee el saco embrionario sexual presente en el mismo óvulo. En las plantas diplospóricas normalmente la formación del endosperma se genera de forma autónoma, particularmente en la familia de las compuestas (Koltunow, 1993). Sin embargo, para unas pocas especies diplospóricas como *Elymus*, *Poa*, *Eragrostis*, y *Tripsacum* es necesaria la polinización de los núcleos polares (Bashaw y Hanna, 1990). En las plantas apospóricas sucede lo inverso, con excepción de las especies del género *Hieracium*, es muy raro encontrar plantas que produzcan su endosperma de forma autónoma, es decir que la formación del endosperma generalmente requiere de polinización (Nogler, 1984; Asker y Jerling, 1992). A pesar de estas diferencias, tanto en apomícticos autónomos como en pseudógamos, la constitución del endosperma difiere del de las plantas sexuales (Hand y Koltunow, 2014).

En los sacos embrionarios sexuales de tipo *Polygonum*, la célula central contiene dos núcleos polares que pueden fusionarse antes de la fecundación (*Arabidopsis*) o pueden fusionarse junto al núcleo espermático durante la fecundación (maíz). Por lo tanto, la célula central genera endosperma triploide que contiene dos genomas maternos y uno paterno (2m:1p). Esta relación de genomas materno:paterno (m:p) del endosperma es crucial para el desarrollo normal de la semilla y en muchas especies, la causa de aborto por cruzamientos interploides se debe una relación diferente entre genomas maternos y paterno (Haig y Westoby, 1991). Normalmente, se interpreta que los efectos de la relación genoma m:p en el desarrollo de

semillas se debe a la acción de genes que están regulados por la impronta genómica (Koltunow y Grossniklaus, 2003; Curtis y Grossniklaus, 2008).

En las plantas apomícticas pseudógamas, la fecundación de una célula central no reducida por una célula espermática reducida conduce a la formación de un endosperma con una relación 4m:1p, la cual en especies sexuales como maíz causa el aborto de semillas. Este balance de endosperma también está alterado en apomícticos autónomos debido a que no existe una contribución paterna a la formación del endosperma (4m:0p). Para superar este inconveniente, las plantas apomícticas usan varios mecanismos que pueden dividirse en dos grandes grupos. En el primer grupo, están las plantas que son insensibles a la relación de genomas 2m:1p y se pueden encontrar tanto plantas apomícticas autógamas como pseudógamas. Por ejemplo, *Tripsacum dactyloides* es capaz de soportar una amplia variedad de relaciones m:p del endosperma (Grimanelli *et al.*, 1997) y en *Paspalum notatum* los cruzamientos entre diploides sexuales como receptoras y tetraploides apomícticos como dadores de polen dan como resultado aborto de semillas, mientras que las plantas apomícticas toleran un amplio rango de relaciones m:p (Quarín, 1999). Esto demuestra que las plantas apomícticas toleran estos cambios en el balance de genomas materno y paterno del endosperma, mientras que las sexuales no lo hacen. En el segundo grupo, las plantas presentan modificaciones en el desarrollo del saco embrionario o en el proceso de doble fecundación con la finalidad de mantener esa relación 2m:1p. Un ejemplo es el de *Panicum maximum* el cual genera un saco embrionario tetranucleado del tipo *Panicum* que cuenta con un solo núcleo polar y de esta manera mantiene la relación 2m:1p cuando es fecundado. Por otro lado, *Arabis holboellii*, cuenta además con una alteración en la microsporogénesis que conduce a la formación de células espermáticas no reducidas que fertilizan a la célula central no reducida y produce una relación de endosperma 4m:2p. En otras especies, las dos células espermáticas reducidas son entregadas por el tubo polínico y liberadas en la célula central donde se fusionan con los núcleos polares (Koltunow y Grossniklaus, 2003).

Independientemente de cual sea el mecanismo por el cual las plantas apomícticas toleran o evitan los cambios en el balance m:p del endosperma, es un carácter de suma importancia que debe ser tenido en cuenta para la ingeniería de la apomixis en cereales, donde el desarrollo del endosperma es muy sensible a la desviación de la tasa 2m:1p. La formación de endosperma

desbalanceado puede ser la explicación de la alta frecuencia de semillas abortadas que se encuentran en los programas de introgresión (Hand y Koltunow, 2014).

I.1.2.2.3- Apomixis y Microsporogénesis masculina

Numerosos estudios realizados con el objetivo de analizar la meiosis en plantas apomícticas permitieron deducir que la apomixis es un fenómeno relacionado solo con las estructuras reproductivas femeninas. En las plantas apomícticas los procesos masculinos de esporogénesis y gemetogénesis parecen no ser afectados (Nogler, 1984). Esto hace que las plantas apomícticas puedan transmitir el carácter a través del polen y ser utilizadas en cruzamientos únicamente como progenitores masculinos. Sin embargo, a pesar de generarse una esporogénesis de tipo sexual en las anteras hay numerosos trabajos que manifiestan que existen fallas en la meiosis de plantas apomícticas (Nogler, 1984).

En el género *Paspalum* está ampliamente aceptada la asociación entre apomixis e irregularidades en la meiosis masculina en la cual se forman asociaciones cromosómicas multivalentes (principalmente cuadrivalentes), asinápsis o desinápsis, todo el genoma permanece desapareado o aparecen puentes cromosómicos y micronúcleos (Quarin, 1992). Estudios citogenéticos comparativos durante la microsporogénesis revelaron anormalidades en la meiosis durante el anafase I en *P. notatum* apomícticos, los cuales fueron atribuidos a rearrreglos cromosómicos, tales como una inversión o una translocación en un cromosoma. Por otra parte, en los citotipos sexuales se observan menos alteraciones en la meiosis y las gametas son balanceadas (Podio *et al.*, 2012b). La evidencia experimental sugiere que existe una correlación entre la ocurrencia de anormalidades en la meiosis y la apomixis en *Paspalum*. Estas anormalidades pueden estar relacionadas a rearrreglos naturales en el cromosoma portador del *locus* de la apomixis (Stein *et al.*, 2004).

I.1.2.2.4- Apomixis y ploidía

La poliploidía se puede definir como la existencia de más de dos complementos genómicos completos en el núcleo celular. El proceso de poliploidización es un mecanismo de evolución muy importante y es entendido como una fuerza diversificadora ampliamente difundida en el reino vegetal (Soltis *et al.*, 2009). La poliploidía se caracteriza por otorgar una

mayor diversidad alélica, heterocigosidad y frecuentemente por proveer efectos de heterosis (Birchler *et al.*, 2010). De esta forma se pueden generar alteraciones en la expresión génica que son importantes para el control de la plasticidad fenotípica y la rápida adaptación de las especies a nuevos ambientes (Nicotra *et al.*, 2010). Barker *et al.* (2016) estiman que el 24% de las especies vegetales son poliploides. Esta frecuencia se hace más notoria (58%) en las especies monocotiledóneas y particularmente en el género *Paspalum* donde la frecuencia de especies poliploides o de especies con citotipos poliploides se estima que es del 80% (Quarin, 1992).

La apomixis gametofítica es un carácter que muestra una profunda relación con el nivel de ploidía, debido a que se manifiesta principalmente en genotipos poliploides ($2n=4x$ o superior). Si bien a nivel diploide ($2n=2x$) es posible encontrar especies con apomixis de tipo embriogénesis adventicia, en géneros tales como *Citrus*, *Nothoscordum*, *Sarcococca* y *Euphorbia* (Bhat *et al.*, 2005), la apomixis gametofítica es muy poco frecuente (Asker y Jerling, 1992). A pesar de esto, existen algunos registros de apomixis a nivel diploide en poblaciones naturales de *Boechera* (diplospórica) (Schranz *et al.*, 2005; Sharbel *et al.*, 2010; Lovell *et al.*, 2013) y de *Ranunculus kuepferi* (apospórica) (Schinkel *et al.*, 2016). Además, dentro de las Panicoideas, se han registrado casos de plantas diploides que presentan sacos embrionarios apospóricos en especies de los géneros de *Brachiaria* (Naumova *et al.*, 1999) y *Paspalum*. En este último género se registraron SEA en el citotipos diploides de *P. cromyorrhizon* Trin. (Quarín *et al.*, 1982), *P. densum* Poir. (Quarin y Caponio, 1993), *P. equitans* Mez (Quarín y Norrmann, 1987), *P. malacophyllum* Trin. (Hojsgaard *et al.*, 2008), *P. notatum* Flüggé (Quarín *et al.*, 2001), *P. haumanii* Parodi, *P. intermedium*, *P. quadrifarium* Lam., *P. quarinii* Morrone & Zuloaga y *P. rufum* Nees (Norrmann *et al.*, 1989). Todos estos resultados avalan la hipótesis de la presencia de factores genéticos determinantes de la apomixis a nivel diploide, aunque proponen que su expresión estaría reprimida (Quarín *et al.*, 2001). Los últimos trabajos en el complejo taxonómico *B. holboelli*, detectaron que aquellos genes sobre-expresados en plantas apomícticas diploides comparados con las diploides sexuales, están codificados por *loci* que han sufrido duplicaciones en el genoma apomíctico (Sharbel *et al.*, 2009).

I.1.2.2.5- Apomixis y heterocronía

Los antecedentes publicados hasta el momento sugieren que la apomixis evolucionó en plantas a través de re-arreglos de los programas de desarrollo reproductivo sexual (Grimanelli

et al., 2001). La mayoría de las plantas apomícticas poliploides son facultativas, lo que implica que la sexualidad y la apomixis coexisten en la misma planta y hasta en el mismo ovario (Nogler, 1984; Asker y Jerling, 1992; Ozias-Akins y van Dijk, 2007). Además, existen evidencias previas en *Hieracium*, por ejemplo, donde observan que la apomixis y la sexualidad son procesos superpuestos e interrelacionados. En este caso se observó que la aparición de células IA parece ser estimulada por la sexualidad mientras que la apomixis recluta la maquinaria sexual en un momento específico para habilitar la expresión de la apomixis (Koltunow *et al.*, 2011; Hand y Koltunow, 2014). Por otra parte, diversos estudios de mutantes sexuales han identificado genes involucrados en el desarrollo reproductivo sexual que generan fenotipos reminiscentes al desarrollo apomíctico como la producción de gametas no reducidas, de múltiples células gaméticas o de múltiples sacos embrionarios (García-Aguilar *et al.*, 2010; Olmedo-Monfil *et al.*, 2010; Hernández-Lagana *et al.*, 2016). Toda esta información revela que una desregulación de los mecanismos preexistentes, que controlan el desarrollo reproductivo sexual es suficiente para alcanzar desarrollos similares a la apomixis. En concordancia con estas evidencias, Carman (1997) postuló una teoría que llamó “asincronía de los genes duplicados”. En este trabajo propone que la hibridación de dos genotipos que presentan diferencias en los procesos de desarrollo reproductivo sexual y su posterior poliploidización (aloploidización), conducen a una desregulación en la expresión de genes duplicados involucrados en el desarrollo reproductivo. Esta desregulación provoca una expresión ectópica o prematura de los programas de desarrollo que inducen la apomixis, la polisporía y la poliembrionía.

El término heterocronía se utiliza para denotar que distintos individuos presentan diferencia en el desarrollo de una célula o linaje celular respecto a otra célula o linaje celular que se toma como referencia (Bradley *et al.*, 2007). En general, para conocer y comparar la evolución en el tiempo de los procesos de desarrollo reproductivo se toman como referencia parámetros de crecimiento del óvulo. Nogler, (1984) revisó varios trabajos realizados en *Potentilla*, *Ranunculus* y *Malus* y concluyó que es normal observar en plantas apospóricas un desarrollo asincrónico de sacos embrionarios no reducidos en los óvulos individuales de un mismo primordio floral, mientras que en la mayoría de las plantas sexuales los tiempos de desarrollo son más controlados. Trabajos más recientes realizados en especies apospóricas del género *Paspalum*, *Poa*, *Ranunculus* y *Hieracium* mostraron que los diferentes eventos del desarrollo apomíctico presentan mayor variabilidad comparados con los procesos sexuales, los

cuales están estrictamente controlados (Koltunow *et al.*, 1998). En plantas apospóricas de *Hypericum* se ha informado que los últimos estadios de desarrollo del megagametofito están retrasados respecto a las accesiones sexuales (Galla *et al.*, 2011). También se observó en *Brachiaria decumbens*, que el desarrollo reproductivo sexual diploide muestra algunas diferencias de sincronización respecto al desarrollo de plantas tetraploides apomícticas. Se observó que en plantas apomícticas los productos de la meiosis permanecen hasta estadios de crecimiento del óvulo posteriores (Dusi y Willemse, 1999). En *Sorghum bicolor*, un paleotetraploide diploidizado que puede producir sacos embrionarios apospóricos, la caracterización del desarrollo reproductivo femenino de diferentes genotipos apomícticos permitió observar que el programa apospórico acelera el inicio de la meiosis y la formación del saco embrionario sexual (Carman *et al.*, 2011). Además, se detectó heterocronía en el desarrollo reproductivo entre diploides sexuales (Bradley *et al.*, 2007) y también entre genotipos sexuales y apomícticos de especies diplospóricas de *Tripsacum* (Leblanc *et al.*, 1995; Grimanelli *et al.*, 2003). Leblanc *et al.* (1995) ha demostrado que la primera mitosis de los megagametofitos diplospóricos ocurre casi al mismo tiempo que la meiosis en los megasporocitos sexuales, teniendo en cuenta el crecimiento del integumento. Por otro lado, Grimanelli *et al.* (2003) observó que los óvulos diplospóricos de *Tripsacum* con el mismo crecimiento presentaron megásporas en diferentes etapas de desarrollo reproductivo en contraste con la coordinación exacta entre el crecimiento del óvulo y el desarrollo reproductivo que se encuentra en los genotipos sexuales. En cuanto a *Paspalum notatum*, una especie relacionada con *P. rufum*, existe un trabajo en el cual se describe el calendario de desarrollo reproductivo de un genotipo tetraploide. Estos análisis muestran que el desarrollo reproductivo masculino está desacoplado del desarrollo femenino de tal manera que el polen inicia la meiosis y en el ovario aún se observa la célula madre de la megáspora (Laspina *et al.*, 2008).

Otra manifestación de heterocronía, bastante frecuente en las plantas apomícticas es la presencia de desarrollo embrionario precoz (antes de la antesis) en especies apomícticas diplospóricas y apospóricas como *Poa pratensis* (Yudakova y Shakina, 2007), *Paspalum* spp. (Laspina *et al.*, 2008), *Tripsacum* (Grimanelli *et al.*, 2003) y *Cenchrus ciliaris* (Sharma *et al.*, 2014).

I.1.2.2.6- Aplicaciones

La introducción de la apomixis desde parientes silvestres en especies de cultivos y la transformación de genotipos sexuales en genotipos de reproducción apomíctica son objetivos de larga data del fitomejoramiento. Los mejoradores creen que la introducción de la apomixis en cultivos de importancia agronómica tendrá efectos revolucionarios para la agricultura. El impacto de los cultivos apomícticos en la agricultura sería enorme tanto en los países desarrollados como en los países en desarrollo (Vielle Calzada *et al.*, 1996; Pupilli y Barcaccia, 2012). La fijación del vigor híbrido a través de la apomixis es un objetivo deseable para los mejoradores y agricultores por igual. Además de eso, entre los beneficios potenciales de aprovechar la apomixis se pueden mencionar los siguientes:

- Los programas de desarrollo y reproducción de híbridos serían más rápidos y económicos debido a la estabilización de los genotipos heterocigotos a través de la apomixis (Spillane *et al.*, 2004).
 - Se facilitaría el mejoramiento de caracteres poligénicos.
 - Se podría explorar la heterosis en cultivos en los cuales no se hace actualmente.
 - La propagación por semillas de plantas que se reproducen de forma vegetativa terminarían con el uso de técnicas como el cultivo de tejidos que demanda demasiada mano de obra en cultivos ornamentales.
- Se podrían eliminar problemas relacionados con la transmisión de virus en los cultivos que se propagan de manera vegetativa.
 - Mejoraría la logística de almacenaje y transporte de los propágulos en cultivos de reproducción agámica como la papa (Van Dijk y Van Damme, 2000; Spillane *et al.*, 2004; Barcaccia y Albertini, 2013).

A lo largo de los años se ha intentado alcanzar la reproducción apomíctica en especies cultivadas mediante diferentes estrategias, sin embargo, la complejidad del carácter ha presentado diversos obstáculos. Una de las técnicas con las cuales se intentó transferir la apomixis hacia especies cultivadas fue mediante la introgresión. Es decir, mediante la hibridación entre un cultivo sexual y una especie apomíctica relacionada, seguida por una serie de retrocruzas usando a la especie de propagación sexual como parental recurrente. Con el uso de esta técnica se ha intentado transferir el carácter desde *Tripsacum dactyloides* a *Zea mayz*

(maíz) (Leblanc *et al.*, 2009) o desde *Elymus rectisetus* a *Triticum aestivum* (trigo) (Liu *et al.*, 1994). También se han intentado generar mutantes sexuales que presenten fenotipos similares a la apomixis mediante la inactivación de genes de la sexualidad por etiquetado de transposones (“transposon tagging”) o por mutagénesis. Estos estudios de mutantes, así como los análisis de expresión diferencial, han identificado genes involucrados en diferentes componentes del desarrollo reproductivo (Hand y Koltunow, 2014; Fei *et al.*, 2019). Esta información se ha vuelto muy útil y ha permitido diseñar mutantes que presentan fenotipos similares a la apomixis (Crismani *et al.*, 2013). Con el propósito de generar este tipo de mutantes se pretende modificar la meiosis para convertirla en una mitosis produciendo así gametos clonales capaces de generar semillas sin el aporte genético de otro gameto. En este sentido se han logrado algunos avances al respecto, de hecho, se obtuvieron semillas clonales en *A. thaliana* combinando líneas MiMe (que permiten eludir la meiosis) con líneas GEM (que permiten eliminar el genoma paterno luego de la fecundación) (Marimuthu *et al.*, 2011). En *Oriza sativa*, utilizando la técnica CRISPR-Cas9, también fue posible obtener semillas clonales combinando las mutaciones involucradas en las líneas MiMe y en BABYBOOM (BBM) (que permite iniciar la embriogénesis) (Khanday *et al.*, 2019). Sin embargo, en todos estos casos, aún no se han podido lograr plantas apomícticas con penetrancia completa del carácter y tampoco plantas con formación autónoma del endosperma.

I.1.2.3- Herencia de la apomixis

La apomixis en angiospermas es un sistema de reproducción heredable, sin embargo, la complejidad de su base genética no ha permitido aún comprender su regulación a nivel molecular (Grimanelli, 2012; Brukhin y Baskar, 2019). Si bien la herencia de la apomixis ha sido estudiada en muchas especies, la mayoría de ellas son comúnmente poliploides, altamente heterocigotas y con poca caracterización genética, razón por la cual la disección del carácter es difícil y compleja (Nogler, 1984). Normalmente, los estudios de herencia se realizan sobre progenies obtenidas a partir de cruzamientos entre individuos poliploides, en los cuales se utilizan como madres los genotipos completamente sexuales (naturales o generados artificialmente) y como padres los genotipos apomícticos obligados. Posteriormente, los individuos de la población se clasifican según su modo de reproducción. Para ello, es interesante

ampliar la explicación sobre las diferentes técnicas que permiten determinar el comportamiento reproductivo y que información se genera a partir de cada análisis.

En el caso de las especies apomícticas apospóricas los análisis citoembriológicos permiten estudiar la capacidad de una planta de producir sacos embrionarios apospóricos dado que son fácilmente diferenciables respecto de los SEM por no presentar antípodas. Sin embargo, la presencia de sacos no reducidos no garantiza que la planta tenga la capacidad de completar los otros componentes de la apomixis. Otra técnica muy interesante, rápida y sencilla es el FCSS mediante citometría de flujo de semillas. Este método permite conocer la relación de ploidía (valor C) entre el embrión y el endosperma de una semilla y deducir la vía reproductiva que le dio origen. Por ejemplo, en una planta diploide se pueden observar relación embrión:endosperma 2C:3C si la semilla fue obtenida por reproducción sexual, 2C:5C si la semilla se obtuvo mediante apomixis pseudógama ó 3C:5C si se generó un embrión a partir de un SEA luego de la fecundación de la célula huevo con polen reducido (Híbridos BIII) (Delgado *et al.*, 2014).

Diversos trabajos han propuesto que los componentes de la apomixis mencionados anteriormente (apomeiosis, partenogénesis y formación autónoma del endosperma o pseudogamia) son controlados por pocos *loci* (1-2 *loci*). En las gramíneas apospóricas *Brachiaria* (Pessino *et al.*, 1998), *Paspalum* (Martínez *et al.*, 2002), *Pennisetum/Cenchrus* (Ozias-Akins *et al.*, 1998; Roche *et al.*, 1999) y en las diplospóricas *Tripsacum* (Grimanelli *et al.*, 1998) y *Eragrostis* (Zappacosta *et al.*, 2019) existe evidencia de que los componentes de la apomixis están controlados por un solo *locus* simple y dominante y en la mayoría de ellos ese *locus* está contenido en una región que muestra baja frecuencia de recombinación (Koltunow *et al.*, 2013). Por otra parte, diversos trabajos realizados en *Poa* (Albertini *et al.*, 2001; Matzk *et al.*, 2005), *Erigeron* (Noyes y Rieseberg, 2000), *Taraxacum* (Van Dijk y Bakx-Schotman, 2004), *Hieracium* (Catanach *et al.*, 2006), *Hypericum* (Schallau *et al.*, 2010) y *Potentilla* (Ozias-Akins y van Dijk, 2007) muestran que la apomeiosis y la partenogénesis son controladas por factores que segregan de forma independiente. Sin embargo, incluso en estos casos, uno de los dos *loci* puede estar en una región de recombinación reducida (por ejemplo, partenogénesis en *Taraxacum* (Van Dijk, 2009) y diplosporía en *Erigeron* ((Noyes y Rieseberg, 2000)). La baja recombinación alrededor de los *loci* de apomixis puede ser el resultado de reordenamientos cromosómicos locales que se fijan debido al modo de reproducción asexual (Koltunow *et al.*,

2013). Teniendo en cuenta esto, las proporciones observadas de herencia del carácter que ajustan a un único *locus* simple en muchas especies, posiblemente se deba a que aunque existan varios genes involucrados en determinar los componentes de la apomixis estos residen en una región del genoma con baja o nula recombinación (Koltunow *et al.*, 2013).

Tradicionalmente se ha considerado a la apomixis como un carácter cualitativo de tal manera que los individuos que no presentan SEA son clasificados como sexuales y aquellos capaces de formar este tipo de sacos son considerados apomícticos. Sin embargo, existen variaciones de la expresividad de la apomixis que generalmente se han considerado bajo la influencia de factores genéticos o epigenéticos (Acuña *et al.*, 2011; Armenta-Medina *et al.*, 2011; Podio *et al.*, 2014a; Zilli *et al.*, 2015). Investigaciones recientes plantean nuevas formas de estudio de la apomixis en los cuales se proponen análisis cuantitativos de la expresión del carácter. En *Poa pratensis* (altamente poliploide $2n= 18$ a 150) se postula un modelo en donde la aposporía y la partenogénesis segregan de manera independiente y tienen diferente expresión dependiendo de la combinación de 5 genes (Matzk *et al.*, 2005). En *Erigeron*, el cruzamiento entre un genotipo triploide diplospórico y un donante de polen diploide sexual generó 24 plantas descendientes tetraploides que portan el factor que determina la diplosporía pero presentan una variación continua en la proporción de sacos no reducidos (41% - 89%) que es atribuida a la segregación de modificadores parentales (Noyes, 2005). Por último, en *Eragrostis curvula*, se postula que la diplosporía está gobernada por un gen de efecto dominante localizado en una región con baja recombinación y que su expresividad (3 – 100%) está regulada por genes de efecto aditivo (5 QTLs) que se encuentran en regiones del genoma diferentes al gen determinante del carácter (Zappacosta *et al.*, 2019).

I.1.2.3.1- Herencia de la apomixis en *Paspalum*

La mayoría de los estudios de herencia de la apomixis utilizando especies del género *Paspalum* fueron llevados a cabo principalmente utilizando las especies *P. notatum* Flüggé y *P. simplex* Morong. La producción artificial de individuos tetraploides sexuales (Quarin *et al.*, 1984; Quarín *et al.*, 2001, 2003) permitió la generación de poblaciones segregantes para el modo de reproducción, las cuales fueron utilizadas para los estudios de herencia sin la necesidad de realizar cruces interespecíficos o interploides (Ortiz *et al.*, 2013). La mayoría de los estudios de la herencia de la aposporía se realizaron mediante estudios citoembriológicos que detectaban

la capacidad de los individuos de producir SEA. En *P. notatum*, Martínez *et al.*, (2001) realizó diversos tipos de cruzamientos interespecíficos entre genotipos completamente sexuales y progenitores naturales apomícticos con la finalidad de realizar un modelo de herencia de la aposporía. En este trabajo, los análisis de segregación de la aposporía permitieron proponer que el carácter se hereda de forma tetrasómica por un *locus* simple dominante (Aaaa) que presenta distorsión de la segregación a favor de la sexualidad. También se observó un exceso de progenie sexual, que se desvía de las proporciones esperadas 1:1 en poblaciones segregantes de *P. notatum* (Stein *et al.*, 2004; Acuña *et al.*, 2011), *P. simplex* (Pupilli *et al.*, 2001), *P. malacophyllum* (Pupilli *et al.*, 2004), *P. procurrens* (Hojsgaard *et al.*, 2011) y en *P. plicatulum* (Aguilera *et al.*, 2011). En estas instancias la baja tasa de transmisión de la apomixis en poblaciones segregantes fue atribuida a una posible presencia de un alelo letal ligado a la apomixis. Sin embargo, experimentos posteriores, confirmaron que la aposporía está relacionada con reordenamientos genómicos (inversiones o translocaciones) y anomalías meióticas en *Paspalum notatum* (Pupilli *et al.*, 2004; Stein *et al.*, 2004; Podio, *et al.*, 2012b) que podrían causar supervivencia diferencial de los productos de la meiosis, así como también supresión de la recombinación cerca del *locus* de la aposporía.

I.1.2.4- Introducción a los mapas de Ligamiento.

El mapeo genético permite estimar la posición relativa de un determinado número de *loci* a lo largo del cromosoma. El orden se establece en base a la frecuencia con la que ocurre intercambio de material genético o recombinación entre cromosomas homólogos durante la meiosis (profase I). Este proceso de intercambio genético es evidenciado mediante la presencia de quiasmas entre cromosomas homólogos. Para un par de *loci*, el intercambio de material genético hace que algunas gametas generadas en la meiosis sean de tipo recombinante y otras gametas de tipo parental. La comparación de las frecuencias de recombinación entre *loci* a través de la observación de los mismos en las progenies de un cruzamiento, permiten establecer las posiciones relativas de estos *loci* en grupos de ligamiento y así construir los mapas. Si dos genes/marcadores se encuentran muy cerca en el mismo cromosoma, la probabilidad de que se produzca la recombinación entre ellos es muy baja, por lo tanto, no se observará segregación independiente durante la meiosis. En este caso, se considera que estos marcadores están ligados presentando combinaciones genéticas de tipo parentales (Pierce, 2012). Con esta misma lógica,

pero analizando además el fenotipo de las progenies es posible establecer las posiciones relativas de los marcadores moleculares respecto al *locus* que determina el carácter en estudio.

La unidad de medida en un mapa de ligamiento genético es el “centimorgan” (cM) y es un estimador del grado de proximidad genética. Un centimorgan equivale a un 1% de probabilidad de que un marcador en un cromosoma sea separado de un segundo marcador sobre el mismo cromosoma debido al fenómeno de recombinación en una sola generación (Pierce, 2012). Cuando la distancia entre dos marcadores permite la generación de dos o más quiasmas entre ellos, los cálculos de las distancias relativas se distorsionan y el porcentaje de recombinación ya no se puede utilizar directamente para estimar la posición relativa de dos *loci*. Para contemplar estos inconvenientes existen funciones de mapeo que corrigen los valores de recombinación observados teniendo en cuenta la probabilidad de que existan quiasmas múltiples. Las funciones más comunes son las de Haldane (1919) y Kosambi (1944). La primera asume que los eventos de recombinación son independientes, mientras que la segunda considera que existe cierto grado de interferencia entre dos quiasmas.

En la actualidad existen paquetes de programas de computación que permiten los análisis en simultáneo de muchos marcadores utilizando un gran número de individuos. Entre ellos podemos mencionar a Mapmaker (Lander *et al.*, 1987), Joinmap (Van Ooijen, 2006) y el paquete R/QTL (Broman *et al.* 2003) del programa R (R Core Team 2014). Estos programas estiman las frecuencias de recombinación, identifican los grupos de marcadores que cosegregan, ordenan los marcadores ligados y calculan las distancias en cM. Cuentan con algoritmos que, generalmente, basan sus cálculos probabilísticos en estimaciones del “LOD score” para detectar ligamiento entre dos *loci*. El LOD score se define como: el logaritmo en base diez del cociente entre la probabilidad de que dos *loci* estén ligados para un dado valor de recombinación, sobre la probabilidad de que ambos *loci* no estén ligados y por lo tanto hayan co-segregado al azar. Por ejemplo, un LOD score = 3.0 para un par de genes indica que es 1000 veces más probable que los genes estén ligados a que no lo estén (Morton, 1996).

I.1.2.4.1 - Mapeo genético en especies apomícticas

La heterocigosidad de las plantas apomícticas hace posible la realización de mapeo genético en generaciones F₁ obtenidas a partir del cruzamiento entre un genotipo sexual y otro

apomítico. En estas poblaciones se espera que la segregación de los modos de reproducción apomítico y sexual muestre una proporción 1:1 (Koltunow *et al.*, 2013) debido a que la apomixis es un carácter dominante que se encuentra en simple dosis. La realización de mapas de ligamiento con el objetivo de localizar marcadores asociados a la apomixis tiene ciertas dificultades relacionadas a la utilización de plantas poliploides. Una de ellas es que presentan una mayor cantidad de alelos por *locus* que los individuos diploides y otra es que en muchos poliploides las constituciones del genoma (alopoliploide vs. autotetraploide) se desconocen, haciendo difícil determinar los patrones de herencia (Sorrells, 1992; Wu *et al.*, 1992). Para sortear estas dificultades, en diversos trabajos se analiza solo la segregación de marcadores que segregan en una relación 1:1 (presencia:ausencia) y a este tipo de marcadores se los denomina alelos en dosis simple (ADS). Los ADS en individuos autopoliploides se refieren a un *locus* simplex (Aaaa, en caso de tetraploide) o a un *locus* heterocigota en uno de los juegos diploides de un aloploiploide. En ambos casos la relación de segregación en un cruzamiento Aaaa x aaaa, es 1:1 (Aaaa:aaaa) (Wu *et al.*, 1992).

En diversas especies apomíticas se obtuvieron mapas de ligamiento a nivel poliploide. En *Poa pratensis* se construyó un mapa de ligamiento utilizando marcadores AFLP y SAMPL (*selective amplification of microsatellite polymorphic loci*) de tipo ADS. En el mismo se obtuvieron 7 grupos de ligamiento y se detectó apareamiento preferencial de algunos cromosomas pero no se realizaron los análisis reproductivos para determinar la asociación de marcadores al carácter apomixis (Porceddu *et al.*, 2002). En *Pennisetum* se generó una población de 397 individuos mediante el cruzamiento interespecífico de *Pennisetum glaucum* (sexual) y *Pennisetum squamulatum* (apomítico apospórico) que permitió la identificación de 13 marcadores moleculares con baja frecuencia de recombinación que cosegregan estrictamente con la formación de sacos apospóricos y algunos de ellos resultaron ser hemicigotas (Ozias-Akins *et al.*, 1998). Posteriormente, la realización de experimentos de mapeo físico de alta resolución por hibridación in situ con sondas fluorescentes (FISH), permitieron estimar que el largo de la ASGR (*Apospory-specific genomic región*) en esta especie es de 50 Mpb, y equivale, aproximadamente, a medio brazo cromosomal (Akiyama *et al.*, 2004). En *Cenchrus ciliaris* se determinó que el carácter es dominante y que la región que lo controla es hemicigota, compuesta de heterocromatina y presenta supresión de la recombinación (Jessup *et al.*, 2002; Ozias-Akins y van Dijk, 2007). Posteriormente, Yadav *et al.*, (2012) realizaron un mapa de ligamiento

genético a partir de una población F₂ de plantas apomícticas facultativas y se determinó que el carácter es dominante y que existe baja supresión de la recombinación en la región que controla el carácter. En *Panicum maximum* Jacq. cv. Se generó una población de mapeo de 71 individuos utilizando un genotipo tetraploide sintético sexual como genotipo femenino y un genotipo tetraploide natural como donante de polen. Utilizando marcadores RAPD y AFLP se realizó un mapa de ligamiento genético para el parental apomíctico. El mapa quedó constituido por 39 grupos de ligamiento y la ASGR fue ubicada en el grupo de ligamiento 8 en una región de baja frecuencia de recombinación (Ebina *et al.*, 2005). En *Brachiaria Worthington et al.*, (2016) generaron una población segregante de la aposporía cruzando un genotipo tetraploide sintético sexual de *Brachiaria ruziziensis* por un genotipo tetraploide apomíctico de *Brachiaria decumbens* y generó dos mapas de ligamiento genético utilizando marcadores SNP (Single Nucleotide Polymorphism). Estos mapas de 34 y 36 grupos de ligamientos determinaron que la ASGR se encuentra una región de recombinación reducida en el cromosoma 5 de *Brachiaria decumbens*. Además, en este trabajo se utilizaron primers específicos (psASGR–BBML) diseñados sobre el gen de *Pennisetum squamulatum* (L.) BABY BOOM relacionado con la partenogénesis y se detectó que el marcador está ligado a la ASGR de *Brachiaria*. En la especie diplospórica *Eragrostis curvula*, Zappacosta *et al.*, (2019) generaron una población segregante para el carácter diplosporía que permitió la construcción de un mapa con 40 grupos de ligamiento combinando el uso de marcadores moleculares tradicionales de tipo AFLP y SSR y marcadores de tipo SNP. El carácter diplosporía se ubicó en el GL 3 en una zona de baja frecuencia de recombinación y cosegregó estrictamente con otros 4 marcadores SNP.

En el género *Paspalum* se realizaron diversos trabajos a nivel tetraploide en donde se identificaron las regiones ligadas a la aposporía. Pupilli *et al.*, (2001) mapearon esta región en *Paspalum simplex* utilizando sondas heterólogas de arroz. En este trabajo identificaron que un grupo de marcadores distribuidos en 15 cM del brazo largo del GL 12 de arroz cosegregan estrictamente con la aposporía. Utilizando los mismos marcadores se obtuvieron resultados similares en *P. procurrens* y en *P. malacophyllum* (Pupilli *et al.*, 2004; Hojsgaard *et al.*, 2011). En *Paspalum notatum* la región que controla la aposporía además de presentar sintenia con el cromosoma 12 de arroz presentó sintenia con el cromosoma 2 de arroz y con los cromosomas 3 y 5 de maíz (Martínez *et al.*, 2003; Podio *et al.*, 2012a), indicando que la estructura de la región que controla la aposporía en *Paspalum* es altamente conservada y presenta

recombinación reducida. Por otra parte, en *Paspalum notatum* tetraploide ($2n=40$) se realizaron dos mapas de ligamiento genético completos (masculino y femenino) utilizando marcadores moleculares de tipo AFLP y RFLP. En este trabajo se generó una población segregante de 113 individuos mediante el cruzamiento de un individuo tetraploide sexual sintético (Q4188) utilizado como parental femenino y un individuo tetraploide apomíctico natural (Q4117) utilizado como donante de polen. El mapa del genotipo femenino se formó con 263 marcadores distribuidos en 26 GL, mientras que el mapa paterno se formó con 261 marcadores distribuidos en 39 GL. En este último mapa se asoció el carácter aposporía al GL 17 en el cual 15 marcadores cosegregaron estrictamente con la aposporía mostrando una marcada restricción de la recombinación y además apareamiento preferencial de cromosomas (Stein *et al.*, 2007).

Los trabajos mencionados anteriormente muestran evidencia suficiente del difícil acceso que presenta la región que controla la apomixis debido a la falta de recombinación que existe a su alrededor en individuos poliploides. A nivel diploide se han reportado especies que presentan algunos componentes de apomixis (por ejemplo, aposporía) y se han realizado mapas de ligamiento genético. Sin embargo, en estos trabajos las poblaciones de mapeo fueron generadas a partir de parentales sexuales. *Paspalum notatum* es una especie que ha manifestado presencia de individuos diploides ($2n=10$) con aposporía en una frecuencia muy baja (Quarín *et al.*, 2001). En esta especie se realizó un mapa de ligamiento genético utilizando marcadores RAPD, RFLP y AFLP, se determinaron 10 grupos de ligamiento y no se evidenciaron zonas con problemas de recombinación. Si bien la población de mapeo utilizada en este trabajo se generó con materiales sexuales, se localizaron marcadores relacionados a la aposporía en *Brachiaria* en los grupos de ligamiento 4 y 5 y relacionados a la diplosporía en híbridos Maíz-*Tripsacum* en el grupo de ligamiento 2 (Ortiz *et al.*, 2001). En *Sorghum bicolor* diploide ($2n=10$) también se han encontrado, con muy baja frecuencia, individuos diploides capaces de formar SEA (Hanna *et al.*, 1970) y se han realizado mapas de ligamiento genético en diversas ocasiones. En estos trabajos se determinaron 10 grupos de ligamientos y no se evidenciaron zonas con ausencia de recombinación (Bhatramakki *et al.*, 2000; Ramu *et al.*, 2009). Sin embargo, la finalidad de estos mapas no fue localizar marcadores asociados a la aposporía sino generar conocimiento para el mejoramiento vegetal, hacer análisis de evolución y realizar mapeo comparativo con caña de azúcar y maíz (Berhan *et al.*, 1993; Xu *et al.*, 1994; Dufour *et al.*, 1997). En este contexto, *Paspalum rufum* diploide, una especie en la cual se ha registrado

abundante cantidad de individuos que manifiestan aposporía y algunos incluso apomixis completa, es una buena especie modelo para el estudio del carácter a nivel diploide.

I.2- Epigenética

En 1942, Waddington acuñó el término "epigenética", que se definió como cambios en el fenotipo sin cambios en el genotipo, para explicar aspectos del desarrollo para los que había poca comprensión de los mecanismos que lo controlan (Waddington, 1942). Casi tres cuartos de siglo más tarde, sabemos que los mecanismos epigenéticos regulan la herencia de los patrones de expresión de genes sin alterar la secuencia de ADN (Allis y Jenuwein, 2016). Los organismos están constantemente expuestos a cambios ambientales y, por lo tanto, han desarrollado mecanismos moleculares complejos para adaptarse. Las nuevas combinaciones genéticas que se producen por recombinación y por mutaciones pueden permitir la adquisición de tolerancia o resistencia a cambios ambientales. Sin embargo, estos cambios genéticos son más lentos comparados con la velocidad con que se producen las modificaciones ambientales. En general, las modificaciones epigenéticas tienen una gran importancia en la adaptación a condiciones de estrés debido a que permiten responder activando o reprimiendo la expresión de genes ya sea por metilación de ADN, modificación de histonas y/o por la acción de ARN pequeños (Grativol *et al.*, 2012).

En el caso de las plantas, cuando se someten a agentes estresantes, estas elaboran diferentes estrategias destinadas a minimizar sus efectos. Algunas estrategias son la alteración fisiológica de las vías metabólicas y la modificación del estado de expresión génica. Esto hace evidente el efecto significativo que ejerce el ambiente tanto en el cambio de la expresión génica como en la estabilidad del genoma. Ahora se sabe que la expresión génica puede variar sin que la secuencia de ADN cambie proporcionando nuevas estrategias de adaptación y es así que el concepto de epigenética se vuelve cada vez más popular en la investigación científica (Causevic *et al.*, 2005).

A pesar de que el término "heredable" nos permite comprender que estas modificaciones pueden transmitirse a la progenie a través de la mitosis y/o la meiosis, las modificaciones epigenéticas son, a diferencia de las mutaciones, de naturaleza reversible. Por lo tanto, las

modificaciones epigenéticas podrían constituir un nivel adicional de complejidad para la variación fenotípica heredable y para el potencial evolutivo de las poblaciones naturales. Estas modificaciones pueden ser inducidas por estímulos ambientales y heredadas por generaciones futuras (Law y Jacobsen, 2010). Las modificaciones epigenéticas, por lo tanto, podrían aumentar el potencial evolutivo de los organismos en respuesta al estrés abiótico y biótico. Según el concepto básico de epigenética, las plantas pueden integrar la señal de fluctuación ambiental memorizándola a través de modificaciones epigenéticas que se transmitirán a la progenie. De esta manera, las poblaciones que han sido sometidas a agentes estresantes, pueden responder eficientemente a la exposición repetida de este estímulo (He y Li, 2018).

Existen diversos mecanismos epigenéticos los cuales se han tratado por separado, sin embargo, todos ellos interactúan de manera conjunta afectando la vía de regulación de la expresión génica. Las diversas perturbaciones ambientales pueden inducir procesos epigenéticos que desencadenan regulaciones específicas sobre el estado de condensación de la cromatina. Este último, de hecho, puede tomar dos formas básicas: eucromatina y heterocromatina. En el primero, el ADN está menos condensado y presenta una fuerte actividad transcripcional y en el segundo está más condensado y transcripcionalmente presenta baja actividad (Pierce, 2012).

I.2.1- Mecanismos epigenéticos

I.2.1.2- Modificación de histonas

Las histonas son las proteínas que forman los nucleosomas, las unidades básicas de la cromatina, y se unen al ADN condensando la cromatina. Cada nucleosoma empaqueta aproximadamente 146 pb de ADN y está compuesto por ocho proteínas: un tetrámero central formado por dos histonas H3 y dos H4 más un par de dímeros H2A-H2B y una secuencia conectora de ADN adicional. El siguiente nivel de empaquetamiento es la formación del cromatosoma que consiste de una histona H1 conectora unida al nucleosoma (Fyodorov *et al.*, 2018). El hecho de que los aminoácidos que forman estas proteínas son principalmente básicos y que el ADN está cargado negativamente hace posible que este último envuelva las proteínas. Las histonas poseen colas N-terminales que están ubicadas en la superficie del nucleosoma y

pueden sufrir modificaciones postraduccionales tales como: acetilación, metilación, fosforilación y ubiquitinación. Estas modificaciones pueden regular la compactación de la cromatina y, en consecuencia, regular el proceso de transcripción (Johnstone, 2002).

La cromatina se puede encontrar en un estado menos condensado asociado a la actividad transcripcional (eucromatina) o en forma más compacta, condensada y transcripcionalmente silenciada (heterocromatina) debido al difícil acceso a los factores de transcripción y a la ARN polimerasa. Este grado de condensación depende del ADN y de las modificaciones que pueden sufrir las histonas. La variedad de modificaciones de las histonas es tan grande que los investigadores han propuesto la existencia de un “código epigenético” capaz de especificar el estado de la cromatina y con ello el estado transcripcional de los genes (Turner, 2000).

I.2.1.3 ARN Pequeños no codificantes

Los ARN pequeños pueden alterar la expresión de ARNm por corte, por represión de la traducción, o por metilación del ADN. Los ARN pequeños son un grupo de moléculas de ARN que no codifican para proteínas, sino que regulan la expresión génica. La clasificación de los ARN pequeños se basa en su vía de biogénesis y en la forma de acción. Los principales ARN pequeños implicados en el proceso regulador genético se conocen como pequeños ARN de interferencia (siARN) y micro ARN (miARN) (Grativol *et al.*, 2012).

Los miARN son cadenas cortas de ARN monocatenario capaces de plegarse en horquillas intramoleculares. Los miARNs regulan el procesamiento postranscripcional del ARN, mediante el apareamiento de bases con su ARN mensajero (ARNm) complementario, conduciendo a la represión de la traducción o al clivaje del ARNm (Grativol *et al.*, 2012). Los miARNs inicialmente son procesados como transcritos primarios en el núcleo por el complejo formado por la proteína de la región crítica del gen 8 del síndrome DiGeorge (DGCR8, del inglés *DiGeorge syndrome critical region gene 8 protein*) y DROSHA, para luego ser exportados al citoplasma. Finalmente, en el citoplasma son procesados por DICER que los corta en fragmentos más pequeños. Posteriormente, estos se unen a proteínas de la familia ARGONAUTA y forman el complejo silenciador inducido por ARN (RISC, del inglés *RNA-Induced Silencing Complex*). Este complejo es el que produce el silenciamiento genético por medio del apareamiento con ARNm blanco e inhibiendo la traducción (Pabón-Martínez, 2011).

Por otra parte, los siARN son moléculas de ARN bicatenario perfectamente complementarias que suelen tener entre 20 y 30 nucleótidos. Se han descubierto varias clases distintas de siARN endógenos y se ha encontrado que regulan la expresión génica a nivel transcripcional y postranscripcional (Grativol *et al.*, 2012). Los siARN en el citoplasma generan silenciamiento génico postranscripcional (PTGS, del inglés *Post-Transcriptional Gene Silencing*) y en el núcleo provocan silenciamiento génico transcripcional dirigiendo modificaciones represoras en el ADN (metilación de citosinas y modificación de histonas). En plantas, la principal vía epigenética mediada por siARN es la metilación del ADN dirigida por ARN (RdDM, del inglés *RNA-directed DNA methylation*). Este mecanismo depende de una maquinaria transcripcional especializada centrada en dos enzimas relacionadas a la ARN polimerasa II específica de plantas, la Polimerasa IV (Pol IV) y la Polimerasa V (Pol V). Brevemente, los transcriptos de la polimerasa IV son copiados en largos ARN de doble cadena (dsARN) que son procesados por DICER-LIKE 3 (DCL3) en pequeños ARN de interferencia (siARN) y exportados al citoplasma. Posteriormente una cadena de estos siARN se une a AGO4 y se reimportan al núcleo donde el siARN guía a AGO4 por complementariedad de secuencia hacia los nuevos fragmentos de ADN que están siendo sintetizados por Pol V. Por último, este complejo recluta la actividad de una ADN metiltransferasa para mediar la metilación *de novo* de las citosinas en todas las clases de contextos de secuencia (es decir, CG, CHG y CHH, donde H representa A, C o T) (Matzke y Mosher, 2014).

Tanto los miRNA y siRNA juegan un papel importante en el desarrollo y en la respuesta al estrés biótico y abiótico. Además, como mecanismo de regulación génica que se puede heredar, los ARN pequeños han adquirido cierta notoriedad en los procesos involucrados en la respuesta al estrés (Grativol *et al.*, 2012).

I.2.1.4 Metilación del ADN

Uno de los mecanismos epigenéticos más frecuentes es la hipermetilación del ADN. Esta modificación covalente post-replicativa, que involucra la incorporación de un grupo metilo en la posición 5' del anillo de citosina, es uno de los mecanismos epigenéticos más ampliamente estudiados tanto en plantas como en animales. En las plantas, el grado de metilación varía entre el 6 y el 30% de las citosinas (Chen y Li, 2004). En mamíferos la metilación del ADN está

restringida a secuencias simétricas de CG, mientras que en plantas la metilación se puede encontrar en sitios CG, CHG (donde H indica A, C o T) y CHH (un sitio asimétrico). Cuando la metilación ocurre en una sola hebra del ADN se los llama de hemi-metilación y a los casos en donde la metilación ocurre en ambas hebras del ADN se los denomina de metilación completa (Chen *et al.*, 2010). Generalmente, se asocia a la condensación de la cromatina y a la represión de la transcripción. El descubrimiento de su papel en el silenciamiento de secuencias repetitivas, virales y transgenes sugiere que este mecanismo evolucionó para asegurar la estabilidad genómica (Rodrigues y Koltunow, 2005).

En *Arabidopsis thaliana*, la metilación simétrica del contexto CG es mantenida por la METHYLTRANSFERASE 1 (MET 1) de ADN y por proteínas de la familia VIM (VARIATION IN METHYLATION). La metilación de CHG es mantenida principalmente por la enzima ADN metiltransferasa CMT3 (“CHROMOMETHYLASE 3”) que funciona en coordinación con la metiltransferasa KYP de histonas. Por otro lado, la metilación de CHH (asimétrica) es mantenida por DRM2 (“DOMAINS REARRANGED METHYLASE 2”), un ortólogo de la metiltransferasa de mamíferos DNMT3 (DE NOVO DNA METHYLTRANSFERASE). Además, DRM2 es responsable de la metilación *de novo* de todos los tipos de contextos en *A. thaliana* y es utilizada para actuar sobre *loci* específicos a través de una vía de ARN de interferencia especializada llamada metilación del ADN dirigida por ARN (RdDM) (Hauser *et al.*, 2011).

La metilación del ADN es enzimáticamente reversible y, por lo tanto, puede ser eliminada por la proteínas ADN glicosilasas (Zhu, 2009). Sin embargo, también puede perderse de forma no enzimática si, durante los ciclos consecutivos de replicación y división celular, los factores involucrados en el mantenimiento están ausentes (Saze *et al.*, 2003). En lo que respecta al contexto, debe enfatizarse que la metilación CG es típica de las regiones génicas, mientras que en elementos transponibles también se encuentra metilación en CHH y CHG. En arroz, la metilación a nivel del contexto CG, es menor entre 100 pb y 500 pb aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción y se estabiliza 1,5 kb aguas abajo del sitio de inicio de la transcripción (Zemach *et al.*, 2010).

Diversos estudios muestran que genes completamente metilados disminuyen su expresión. En estos estudios las observaciones sobre metilaciones de sitios específicos indican

que la metilación en la porción 5' del gen (que incluye la región promotora y parte de la región transcrita) o en la porción 3' (que incluye parte de la región transcrita y secuencias flanqueantes 3') podría inhibir la expresión génica. Además, en muchos genes la metilación en la región promotora 5' tuvo mayor efecto en la expresión (Gehring y Henikoff, 2007). Por otra parte, la metilación aguas arriba de los elementos transponibles, que tienen efectos mutagénicos, determina su silenciamiento, lo que lleva a suponer que la metilación es una estrategia defensiva del genoma, un mecanismo fundamental para garantizar su integridad (Zhang *et al.*, 2010).

I.2.2- Relación entre apomixis y epigenética

Resultados recientes indican que las vías de metilación de ADN dependientes de ARN actúan en el control del desarrollo reproductivo de plantas y pueden ser reguladores claves en la diferenciación entre apomixis y sexualidad (Grimanelli, 2012). Por ejemplo, la identidad de la línea germinal en óvulos de *Arabidopsis* está controlada epigenéticamente mediante silenciamiento mediado por ARN pequeños por una vía que involucra a ARGONAUTA9 (AGO9), los mutantes en este gen producen múltiples células gaméticas capaces de iniciar la megagametogénesis (OlmedoMonfil *et al.*, 2010). Análisis de expresión comparativos entre genotipos apomícticos y sexuales de *Tripsacum* han detectado ADN metil transferasas con menor expresión en los genotipos apomícticos. Los mutantes de maíz con pérdida de función en estos genes (dmt102, dmt103) presentan fenotipos con características similares a los mutantes ago9 y también a la apomixis, con aumento en el número de SEM y presencia de gametas no reducidas, apoyando aún más la teoría de la participación del control por metilación de ADN mediada por ARN en la determinación de la identidad de la línea germinal (García-Aguilar *et al.*, 2010). El control de los procesos de desarrollo reproductivo por medio de modificaciones epigenéticas permite suponer que los procesos relacionados con la apomixis también se relacionan con este tipo de modificaciones. Un trabajo reciente en *Eragrostis curvula* ha detectado que individuos tetraploides artificiales inicialmente sexuales fueron incrementando a lo largo de 5 años la capacidad de producir SEA alcanzando un 85- 90% de SEA en el último período. Los análisis genéticos comparativos del mismo genotipo a través de los años detectaron tanto modificaciones genéticas como epigenéticas posiblemente a través de la actividad de transposones (Zappacosta *et al.*, 2014). Esto sugiere que la expresividad del

carácter podría estar influenciada por metilaciones diferenciales de los genes involucrados en el control de estos procesos. Los estudios realizados hasta el momento, que involucran tanto mutantes como sistemas apomícticos naturales han identificado diversos genes candidatos que podrían determinar la apomixis, sin embargo el hecho de que ambos procesos apomixis y sexualidad se superponen en la misma planta y que mutaciones en las vías epigenéticas producen fenotipos similares a la apomixis proponen una fuerte participación de estas regulaciones en el control del carácter apomixis (Hand and Koltunow, 2014).

La regulación epigenética participa a dos niveles, está involucrada en el desarrollo, como se menciona más arriba, permitiendo la especificación de las células y que esta sea transmitida a través de la división mitótica. Y por otro lado, los patrones epigenéticos pueden ser heredados meióticamente (Grossniklaus *et al.*, 2013). En plantas existen evidencias claras de la transmisión de epialelos a través de generaciones en la que dos fenotipo diferentes están asociado a la misma secuencia con modificaciones epigenéticas diferentes (Grossniklaus *et al.*, 2013; Quadrana y Colot, 2016). Dada la evidencia existente de la participación de la regulación epigenética en los procesos de desarrollo reproductivo, los estudios que permitan identificar genes con modificaciones epigenéticas diferenciales entre inflorescencias con diferente expresividad del carácter permitirán obtener información acerca de los genes involucrados en el control del carácter.

I.2.3- Técnicas utilizadas para estudiar variaciones en los patrones de metilación

Existen diversas tecnologías disponibles para obtener información general sobre la metilación diferencial del ADN, algunas de ellas proveen información relativa de los estados de metilación, mientras que otras otorgan información más completa del nivel de metilación del ADN (Laird, 2010). Una de las técnicas más difundidas es “Polimorfismos Asociados a Amplificaciones Sensibles a Metilación” (MSAP – “*Methylation Sensitive Amplified Polymorphism*”). Esta se basa en la técnica de marcadores moleculares AFLPs, sin embargo, utiliza enzimas de restricción sensibles a la metilación para realizar los cortes previos a las amplificaciones. Generalmente las enzimas de restricción más utilizadas son los isoesquizómeros *HpaII* y *MspI*, ambas enzimas reconocen la secuencia 5'-CCGG- 3' pero presentan diferente sensibilidad en cuanto a la metilación de alguna de las citosinas. Las

reacciones de restricción con ambas enzimas se realizan en paralelo. La metilación completa, en las citosinas inhibe el corte mediado por la enzima *HpaII* que solo es capaz de cortar secuencias hemi-metiladas en cualquier citosina. Mientras que la enzima *MspI* es capaz de cortar secuencias hemi-metiladas o completas pero en la citosina interna (C5mCGG) (Marconi *et al.*, 2013). La desventaja de este tipo de técnicas es que no pueden diferenciar todos los estados de metilación, por lo tanto, los porcentajes de metilación absolutos calculados son inferiores a los totales, además de no brindar información sobre la secuencia de los fragmentos (Baurens *et al.*, 2003). A pesar de esto, la técnica resulta muy útil para comparar de forma general los porcentajes relativos de metilación entre muestras diferentes.

La técnica WGBS (“*Whole-genome bisulfite sequencing*”) permite conocer de forma indirecta prácticamente todos los estados de metilación de citosinas en el genoma. Brevemente, se trata el ADN con bisulfito de sodio y se provoca la desaminación de las citosinas no metiladas en uracilos, dejando intactas las citosinas metiladas. La amplificación por PCR de este ADN convertido reemplaza los uracilos por timinas y la comparación de las secuencias derivadas de los fragmentos tratados y no tratados (reemplazos de T por C, respectivamente) se utiliza para cuantificar el grado de metilación (Zilberman *et al.*, 2007). La desventaja de WGBS es que requiere de una alta cobertura (al menos 5–10x), lo que lo hace costoso en especies con un genoma grande y/o en experimentos con muchas muestras (Ziller *et al.*, 2015). Para evitar estos inconvenientes se han desarrollado otras técnicas alternativas como RRBS (“*Reduced representative bisulfite sequencing*”) donde, previamente a la conversión química, se realiza una digestión con una enzima insensible a la metilación y un filtrado por tamaño de fragmentos. Si bien esta técnica investiga solo una fracción del genoma, otorga mayor cobertura de secuenciación y proporciona una mayor confianza de las mediciones. Aunque se ha demostrado que la técnica es poderosa, aún existen algunos inconvenientes técnicos, si la especie no cuenta con un genoma de referencia, y financieros en especies con un genoma muy grande (Meissner *et al.*, 2005).

En los últimos años se han desarrollado estrategias basadas en los fundamentos de la técnica MSAP en las que se combinan el uso de enzimas de restricción sensibles a la metilación con la utilidad de la secuenciación. Estas técnicas implican la digestión del ADN de las muestras con enzimas con diferente sensibilidad a la metilación y se ligan adaptadores, posteriormente se seleccionan fragmentos por tamaño y se secuencian. Con los recuentos de las lecturas para

cada *locus* se realizan las estimaciones de los niveles relativos de metilación. Si bien estos recuentos no proporcionan medidas absolutas de metilación de citosina, otorgan información útil para inferir diferencias de metilación entre muestras en sitios específicos. Dos de las técnicas que tienen los mismos fundamentos son MRE-seq (*Methylation-sensitive restriction-enzyme digestion and sequencing*) (Maunakea *et al.*, 2010) o EpiRADseq que es una variación de ddRADseq (“*double-digest restriction-site associated DNA sequencing*”) (Schield *et al.*, 2015). Las principales limitaciones de estas técnicas están relacionadas a que son específicas para pocos contextos de metilación (por ejemplo, el contexto CG) y algunas pueden requerir la presencia de un genoma de referencia para mapear los fragmentos.

Recientemente, en la Università degli Studi di Perugia se ha desarrollado una técnica que permite superar algunas de las limitaciones mencionadas anteriormente, denominada MCS_{Se}Ed (“*Methylation content sensitive enzyme double-digest restriction-site-associated DNA*”). Es una extensión muy simple, altamente escalable y rentable del protocolo original de ddRADseq, presentando algunas variantes en relación a las anteriores. La técnica implica una doble digestión de las muestras combinando una enzima sensible a metilación y una insensible, una posterior ligación de adaptadores a los fragmentos generados que son seleccionados por tamaño y por último secuenciados. La ventaja principal de la técnica es se pueden utilizar enzimas sensibles que reconocen distintos contextos de metilación (CG, CHG y CHH) a un costo que no es excesivamente elevado. El recuento de la frecuencia de fragmentos detectados en cada muestra permite determinar la metilación relativa de cada secuencia. Es decir, que la muestra que presente mayor frecuencia de un fragmento determinado presentará menor nivel de metilación que la muestra que presente menor frecuencia de ese fragmento. Además, esta técnica no requiere necesariamente de la presencia de un genoma de referencia y en forma paralela permite la identificación de marcadores SNP en los fragmentos diferencialmente metilados (Marconi *et al.*, 2019).

I.3- Características del género *Paspalum*

El género *Paspalum* L pertenece a la familia de las gramíneas (subfamilia *Panicoideae*, tribu: *Paniceae*) y es uno de los géneros más grandes de plantas carbono 4 (C4) con

aproximadamente 370 especies (Zuloaga y Morrone, 2005). Las especies de *Paspalum* ocupan diversos hábitats en el norte y en el sur de América, mientras que unas pocas especies son nativas de África, Asia y Oceanía, y solo tres son cosmopolitas. El centro de origen del género es Sudamérica tropical (Chase, 1939; Nicora *et al.*, 1987; Williams *et al.*, 2011), pero se han reconocido centros de diversidad secundarios en la ecorregión “El Cerrado” de Brasil, en campos de Argentina, Uruguay y en el sur de Brasil (Zuloaga y Morrone, 2005). El amplio rango de adaptaciones ecológicas encontradas en el género está probablemente relacionado a la gran cantidad de estrategias reproductivas (reproducción sexual, auto- y alo-gamia, reproducción clonal a través de apomixis y de propagación vegetativa) y a los niveles de ploidía encontrados dentro de las especies (Quarin, 1992). Existe una gran variación en los niveles de ploidía de las especies que lo componen que incluyen desde diploides (2x) hasta excepcionalmente decahexaploides (16x) como por ejemplo en *Paspalum floridanum* Michx (Burton, 1940; Quarin y Lombardo, 1986). Por lo general, las especies diploides son sexuales y autoincompatibles y las especies poliploides son sexuales o apomícticos. Sin embargo, es común que muchas especies formen complejos agámicos donde el citotipo diploide es sexual y autoincompatible y convive con citotipos poliploides apomícticos (Savidan, 2000; Quarin y Burson, 1991). El gran número de especies que componen el género, la amplia distribución geográfica que presenta y las características en cuanto a calidad del forraje, palatabilidad y producción de materia seca, hacen del género *Paspalum* uno de los más importantes y promisorios para el desarrollo de cultivares forrajeros adaptados a las regiones cálidas y templadas de América (Burton, 1974).

I.3.1- *Paspalum rufum*

Paspalum rufum Nees ex. Steud es un pasto perenne, erecto y robusto, nativo de Paraguay, sur de Brasil, Uruguay, y noreste de Argentina, donde normalmente se lo encuentra en pantanos, sabanas húmedas, bajos o en campos abiertos (**Figura 2. A-C**). Si bien los estudios de filogenética no han podido agrupar a esta especie dentro de los subgrupos del género *Paspalum* (Zuloaga y Morrone, 2005), trabajos recientes realizados con marcadores moleculares han determinado que está relacionada con especies del grupo Plicatula (Giussani *et al.*, 2010).

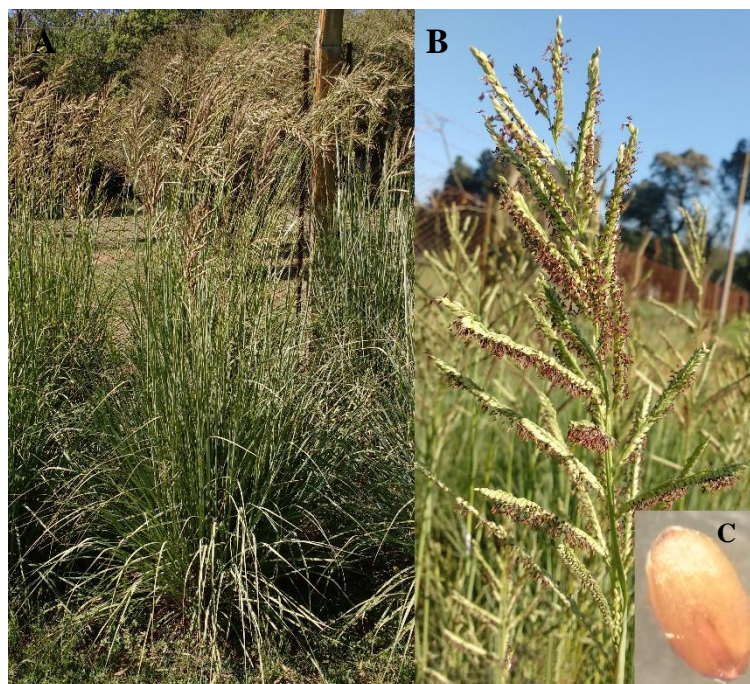


Figura 2. A – Planta adulta de *Paspalum rufum*. B – Panoja en antesis. C – Cariopse

La especie, al igual que otros representantes del género, presenta individuos con varios niveles del ploidía. El número básico de cromosomas de *Paspalum rufum* es $x = 10$ (Burson, 1975) y el contenido de ADN de un complemento de cromosomas haploides no replicados es $1C = 0.75$ pg (Galdeano *et al.*, 2016). Al igual que en la mayoría de las especies del género *Paspalum* el citotipo diploide ($2n=20$) es autoestéril y se reproduce sexualmente, mientras que el citotipo tetraploide es apomítico autocompatible y pseudógamo (Norrman *et al.*, 1994). Sin embargo, desde hace tiempo se conoce que algunos genotipos diploides son capaces de producir SEA (Burson, 1975) y estudios posteriores permitieron identificar por primera vez un individuo diploide capaz de producir algunos descendientes por apomixis completando todos los procesos involucrados, producción de SEA no reducidos (aposporía) y partenogénesis (Siena *et al.*, 2008). Este trabajo demostró la funcionalidad de la vía apomítica completa en las gramíneas a nivel diploide (Siena *et al.*, 2008). En relación con estos resultados se realizaron estudios posteriores para caracterizar el comportamiento reproductivo en 3 poblaciones diploides naturales de *P. rufum* las cuales, en condiciones naturales de polinización abierta, presentan comportamiento completamente sexual (Sartor *et al.*, 2011). Se analizó el comportamiento reproductivo de 5 individuos de cada población por FCSS y se detectaron tres

genotipos capaces de formar semillas BIII y uno de los cuales fue capaz de forma semillas por apomixis (Delgado *et al.*, 2014). Los análisis citoembriológicos de dos genotipos de cada población evidenciaron que todos son capaces de formar SEA (Delgado *et al.*, 2014). Estos resultados confirmaron que los determinantes genéticos de los componentes de la apomixis se encuentran a nivel diploide.

Por otra parte, la existencia de individuos capaces de formar sacos apospóricos, pero no de generar semillas por partenogénesis propone la posibilidad de que exista un desacoplamiento entre ambos procesos. A partir de estos resultados, se seleccionaron dos individuos con comportamientos reproductivos contrastantes, R5#49 capaz de completar los procesos involucrados en la apomixis (aposporía y partenogénesis) y R6#45 que presenta aposporía, pero solo produce semillas a partir de sacos embrionarios reducidos (SEM) y se realizó un cruzamiento que permitió obtener una población segregante F₁ que será parte del objeto de estudio de esta tesis.

II-OBJETIVOS E HIPÓTESIS

II.1- Objetivo General:

El objetivo general del presente trabajo de tesis doctoral es realizar un estudio comparativo de la apomixis a los niveles diploide y tetraploide en *P. rufum*. Asimismo, analizar el efecto de la hibridación y poliploidización sobre la expresión de los componentes del carácter y desarrollar herramientas moleculares que permitan la futura identificación de los genes asociados a esta forma de reproducción.

II.2- Objetivos Específicos:

1. Determinar la herencia de la aposporía y la capacidad de completar la partenogénesis en poblaciones experimentales diploides de *P. rufum*.
2. Caracterizar el comportamiento reproductivo de individuos tetraploides sintéticos obtenidos por duplicación cromosómica de individuos diploides.
3. Construir mapas de ligamiento genético del citotipo diploide en base a marcadores de AFLP y detectar asociaciones significativas con la expresividad de la aposporía.
4. Comparar el desarrollo reproductivo sexual y apomítico entre individuos diploides y poliploides y determinar el momento de aparición de células iniciales de la aposporía.
5. Determinar los patrones globales de metilación del ADN en individuos diploides con capacidad diferencial de producir SEA en distintos estadios del desarrollo reproductivo.

II.3- Hipótesis:

Hipótesis 1:

En el sistema diploide de *P. rufum* la aposporía segrega como un carácter dominante acoplado a la partenogénesis.

Hipótesis 2:

La duplicación cromosómica de individuos diploides de *P. rufum* incrementa la expresividad de los componentes de la apomixis.

Hipótesis 3:

Los mapas de ligamiento femenino y masculino de *P. rufum* cubren la totalidad del genoma de la especie e incluyen marcadores asociados a la expresividad de la aposporía.

Hipótesis 4:

Los procesos de desarrollo reproductivo presentan diferente coordinación entre individuos diploides sexuales y tetraploides apomícticos.

Hipótesis 5:

Individuos diploides de *P. rufum* con alta y baja expresividad de la aposporía presentan marcas epigenéticas (metilación del ADN) específicas.

III- MATERIALES Y MÉTODOS

III.1- Material vegetal y tipos de cruzamientos

Se partió de una población F₁ diploide de 39 plantas generada a partir del cruzamiento de dos genotipos con comportamientos reproductivos diferentes, previamente caracterizados por Delgado *et al.*, (2014) (**Tabla III-1**). El parental femenino, R6#45, producía un 5,77 % de ovarios conteniendo sacos embrionarios apospóricos (%SEA) y no presentaba capacidad de realizar partenogénesis para completar el proceso de apomixis. El parental masculino, R5#49, producía un 13 %SEA y era capaz de producir semillas por apomixis (15%) bajo condiciones de cruzamientos controlados, utilizando polen mentor interespecífico e interploide de *P. urvillei* tetraploide. Estas condiciones provocan de alguna manera la ruptura de la barrera de autoincompatibilidad induciendo la autofecundación (Quarín y Norrmann, 1987; Burton y Hanna, 1992; Siena *et al.*, 2008). Dado que ambos genotipos son autoincompatibles, se espera que los individuos F₁ sean altamente heterocigotas. También se contaba con individuos duplicados por tratamientos con colchicina de semillas: LD1 y LD3, los cuales son tetraploides derivados del genotipo diploide R6#45, y LD2, un individuo mixoploide derivado del genotipo R6#49 (Delgado *et al.*, 2016) (**Tabla III-1**). Estos materiales vegetales fueron mantenidos en el Instituto de Botánica del Nordeste IBONE-CONICET de la ciudad de Corrientes en el campo experimental de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Nordeste (FCA-UNNE).

Para realizar cruzamientos se ensobraron inflorescencias con sobres de papel durante los días previos a la antesis. Las plantas diploides de *Paspalum rufum* no fueron emasculadas ya que son altamente autoincompatibles. Cuando las plantas utilizadas como parentales femeninos alcanzaron la antesis sus estigmas fueron espolvoreados con polen colectado durante las primeras horas de la mañana. Las inflorescencias fueron ensobradas hasta que las semillas alcanzaron su madurez. Para inducir la autofecundación se utilizó polen mentor interploide e interespecífico, de *Paspalum urvillei* según se describe en Siena *et al.* (2008).

Tabla III-1. Descripción del origen y del comportamiento reproductivo del material vegetal utilizado.

| Genotipo | Nivel de ploidía | %SEA ² | Origen reproductivo de las semillas obtenidas por diferentes tipos de polinización ¹ | | Origen | Referencia |
|----------------------------|------------------|-------------------|---|---|---|--|
| | | | Abierta | En presencia de polen mentor (%) ³ | | |
| R5#49 | 2x | 13,3 | S | S/A (15) | Saladas, Corrientes, Argentina | Sartor <i>et al.</i> , (2011). Delgado <i>et al.</i> , (2014) |
| R6#45 | 2x | 5,77 | S | S | Paso Lucero, Corrientes, Argentina | Sartor <i>et al.</i> , (2011). Delgado <i>et al.</i> , (2014) |
| 39 Híbridos F ₁ | 2x | ND | ND | ND | Cruzamiento R5#49 × R6#45 | Delgado <i>et al.</i> , (2016) |
| Q3756 | 4x | 96,2 | ND | ND | Uruguay: germoplasma BR 2186 | Normann <i>et al.</i> , (1989) |
| Q4185 | 4x | 81,4 | ND | ND | Híbrido BIII de 3756 (2x) x 3756 (4x) | Quarin <i>et al.</i> , (1998) |
| Q3785 | 4x | 52,7 | A | ND | Paso de los libres, Corrientes, Argentina | Espinoza <i>et al.</i> , (2002); Galdeano <i>et al.</i> , (2016) |
| LD1 | 4x | ND | ND | ND | R6#49 ⁴ | Delgado <i>et al.</i> , (2016) |
| LD3 | 4x | ND | ND | ND | (R6#45 ⁵ x R2#18) | Delgado <i>et al.</i> , (2016) |
| LD2 | 2x 4x | ND | ND | ND | R5#49 ⁴ | Datos no publicados |

¹ Modo de reproducción determinado mediante el análisis de semillas por citometría de flujo usando el método “Flow Citometry Seed Screening” (FCSS) (Matzk *et al.*, 2000).

² Proporción de óvulos que contienen SEA ya sea solos o acompañados por SEM en antesis.

³ Porcentaje de semillas producidas por apomixis

⁴ Tratamiento por colchicina de cariopses obtenidos a partir de polinización abierta.

⁵ Tratamiento por colchicina de cariopses obtenidos a partir del cruzamiento R6#45 x R2#18

S: Sexualidad, A: Apomixis y ND: no determinado

III.2- Duplicación genómica

Para obtener genotipos duplicados artificialmente se testearon dos protocolos, el tratamiento de semillas con colchicina y por cruzamientos controlados. En el caso de los tratamientos con colchicina se siguió el protocolo descrito previamente por Delgado *et al.*, 2016. Se diseccionaron las semillas para obtener los cariopses, se incubaron 24 horas a 27 °C en cajas de Petri con papel filtro embebido en agua destilada estéril. Posteriormente, se traspararon a placas con papel de filtro humedecido con solución de colchicina fresca (0.1% p/v) en presencia de 2% de dimetilsulfóxido (DMSO), y se incuban durante 6 horas, de acuerdo a lo establecido por Delgado *et al.* (2016). Luego se lavaron los cariopses con agua y se

transfirieron a cajas de Petri en las condiciones iniciales con filtros embebidos en agua destilada para permitir la germinación. Como control para cada tratamiento se utilizaron cariopses sometidos al mismo proceso, pero reemplazando la solución de colchicina por una solución al 2% DMSO. Todas las plántulas obtenidas fueron transferidas a macetas con sustrato estéril en invernadero hasta su posterior análisis de los niveles de ploidía. Por otra parte, para obtener materiales duplicados a partir de cruzamientos controlados se utilizaron individuos diploides con capacidad de formar SEA como parentales femeninos e individuos tetraploides como parentales masculinos. El objetivo de estos cruzamientos fue lograr que una célula huevo no reducida, proveniente de un saco embrionario apospórico en el genotipo diploide ($2n=2x$), sea fecundada por polen reducido de una planta tetraploide ($n=2x$).

III.3- Extracción y cuantificación de ADN

El ADN genómico de las plantas experimentales fue extraído de hojas jóvenes usando el método de CTAB descrito por Saghai-Marooof *et al.*, (1984) con algunas modificaciones. Brevemente, 1 gr de tejido fresco de hojas jóvenes de las plantas experimentales fue molido con mortero en presencia de N_2 líquido hasta obtener un polvo fino. Las muestras fueron transferidas a tubos de polipropileno de 50 ml, se agregaron 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 2 β mercaptoetanol 140 mM) y se incubaron por una hora a 65 °C mezclando suavemente cada 15 min. Se realizaron dos extracciones consecutivas en presencia de un volumen de cloroformo, mezclando cada una durante 10 min, centrifugando a 4.000 rpm por 10 min y recuperando la fase acuosa superior. Posteriormente se precipitó el ADN agregando 1 volumen de isopropanol a la fase acuosa obtenida y se incubó a -20 °C durante una noche. El ovillo de ADN fue recogido con una pipeta Pasteur modificada (formando un gancho en el extremo) o precipitando por centrifugación a 10.000 rpm durante 20 minutos a 4 °C. El ADN obtenido fue lavado durante 20 minutos en una solución de etanol al 70 %, secado al aire y resuspendido en 200 μ l de buffer TE (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1mM; pH 8,0). Cada muestra fue incubada con 0,1 mg/ml ARNasa a 37 °C durante 90 minutos. Las muestras fueron reprecipitadas en 5% v/v de NaCl 5M y un volumen de isopropanol. Posteriormente, fueron centrifugadas a 14.000 rpm durante 20 minutos, lavadas

con etanol 70%, y secadas a 40 °C en estufa durante 20 minutos. Finalmente se disolvieron en 200 µl de agua destilada estéril.

La cantidad de ADN obtenido fue cuantificado por espectrofotometría a 260 nm y se estimó su pureza determinando la relación de absorbancias a 260 nm/280 nm (Sambrook *et al.*, 1989). La integridad de las muestras se analizó por electroforesis en geles de agarosa al 0,8 % teñidos con Bromuro de etidio (Sambrook *et al.*, 1989).

III.4- Marcadores moleculares

Polimorfismos por amplificación al azar del ADN (RAPD): Se utilizaron decámeros al azar de la serie de la Universidad de British Columbia (UBC301310, UBC322, UBC329, UBC347, UBC349, UBC359, UBC361 Y UBC368). Las reacciones de amplificación se realizaron según Martínez *et al.*, (2003), en un volumen final de 25 µl conteniendo 25 ng de ADN, 30 ng de cebador, 1 X buffer Go Taq (Promega), 1,5 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs y 1,25 U Taq polimerasa (Promega). Las condiciones de reacción consistieron en una etapa inicial de desnaturalización de 1 min a 93 °C seguida de 45 ciclos de 1 min a 93° C, 1 min a 36 °C, 2 min a 72 °C y 5 min finales de elongación a 72 °C. Luego de la reacción de amplificación los productos fueron analizados en geles de agarosa al 2,5 % p/v.

Polimorfismo en el largo de fragmentos de amplificación (AFLP): Los experimentos realizados para desarrollar este tipo de marcadores moleculares se llevaron a cabo en la unidad de investigación de Genética Agraria y Biotecnología Genética dependiente de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Perugia en Italia, gracias a la colaboración del Dr. Emidio Albertini y de la Dra. Marika Bocchini.

Los marcadores de AFLP fueron generados de acuerdo al protocolo descrito por Vos *et al.*, (1995). El ADN genómico fue digerido con las enzimas *EcoRI* y *MseI* y ligado a los adaptadores según se describe a continuación. Cada muestra se procesó en reacciones de 20µl de volumen final que incluían: 300 ng de ADN genómico (10 ng/µl), 5U de enzima *EcoRI* (New England Biolabs Inc.), 5U de enzima *MseI* (New England Biolabs Inc.), 1U de enzima ligasa T4 (New England Biolabs Inc.), 25 pmol del adaptador *MseI*, 2,5 pmol del adaptador *EcoRI*,

0,2 mM de ATP y 1X de buffer (5X NEB CutSmart® buffer, New England Biolabs Inc.). Las muestras fueron incubadas durante cuatro horas a 37°C y se detuvo la reacción durante diez minutos a 65°C. Posteriormente, se realizaron dos reacciones de PCRs consecutivas. Una amplificación preselectiva (Preamp) utilizando cebadores cuya secuencia se corresponde con la secuencia de los adaptadores y posee un nucleótido adicional en el extremo 3'. Y una segunda reacción de amplificación selectiva donde se utilizan cebadores que poseen 3 nucleótidos 3' adicionales. En total se realizaron tres tipos de preamplificaciones con las siguientes combinaciones de cebadores: 1 Eco+C-Mse+C, 2 Eco+A-Mse+C y 3 Eco+C-Mse+A. Las reacciones de amplificación se realizaron en 50 µl de volumen final con la siguiente mezcla de reactivos: MgCl₂ 1,5 mM, dNTPs 0,2 mM cada uno, 75 ng de cada cebador, Dream Taq polimerasa (Thermo Scientific) 1U, buffer 1X (Thermo Scientific) y 5µl de una dilución 1:10 de la mezcla de ADN cortado y ligado. Las condiciones de reacción fueron las siguientes: 71°C por 5'; un ciclo a 94°C por 45'', 65°C por 30'' y 72°C por 60''; 12 ciclos disminuyendo la temperatura de hibridación 0,7°C por ciclo hasta alcanzar 55,9°C. Luego, 22 ciclos de 94°C por 30'', 55,9°C por 30'' y 72°C por 60''; por último, una extensión a 72°C por 10'. Las tres preamplificaciones se utilizaron como moldes para 105 amplificaciones selectivas con diferentes combinaciones de cebadores ensayados sobre los padres: 35 con la preamplificación 1, 35 con la 2 y 35 con la 3. Las reacciones de PCR se realizaron en 20 µl de volumen final con la siguiente mezcla: MgCl₂ 1,5 mM, dNTP 0,2 mM cada uno, cebador Eco+3 (marcado con 6-FAM), 20 ng; cebador Mse+3, 30ng, Dream Taq polimerasa (Thermo Scientific) 0,4 U, buffer 1X (Thermo Scientific) y 5 µl de una dilución 1:10 de los productos de la reacción Preamp. Los perfiles de temperatura utilizados fueron los siguientes: 4 ciclos, a 94°C por 45'', 65°C por 30'' y 72°C por 60''; continuando con los 12 ciclos con disminución de la temperatura y los 22 ciclos siguientes en las mismas condiciones descritas más arriba. Los productos de amplificación obtenidos fueron analizados mediante electroforesis capilar utilizando un secuenciador ABI 3130xl Genetic Analyzer (Life technologies). Previamente, cada muestra (1µl) se mezcló con 10 µl de formamida y 0,1µl de un estándar interno de peso molecular (Genescan LIZ 500, Life technologies) y se desnaturalizaron a 94°C por 5 minutos. Se utilizó el software GeneMapper 4.0 version 3.7 (Applied Biosystems) para detectar una serie de picos fluorescentes que representan los fragmentos amplificados. Se consideraron solo los picos por encima de las 100 unidades relativas de fluorescencia en el rango de 50-500 pb. Y se

seleccionaron 33 combinaciones de cebadores para ser utilizadas sobre la población F₁ por poseer más de 10 fragmentos polimórficos entre los padres.

III.5- Confirmación de híbridos

La condición híbrida de los individuos F₁ utilizados en los Capítulos 1 y 3 se verificó de dos maneras diferentes. Para los genotipos híbridos desde el número 1 al 39 se utilizó la segregación del carácter morfológico “color de anteras” y marcadores moleculares del tipo RAPD. Y en los genotipos, del 40-89, se determinó mediante marcadores moleculares del tipo AFLP. En una primera instancia los marcadores moleculares se probaron en los genotipos R6#45 y R5#49 (parentales) con el fin de seleccionar aquellos que presenten polimorfismos entre ellos. Luego para la confirmación de cada híbrido se tuvo en cuenta la presencia de bandas específicas del donante de polen y la segregación de bandas exclusivas del genotipo materno. Este último control se realizó para descartar aquellos individuos que pudieran generarse a partir SEAs fecundados con polen (híbridos BIII). Se usó un test de Chi-cuadrado para determinar la bondad de ajuste entre los valores de segregación de los marcadores observados y los esperados. El nivel de significancia utilizado fue de 0,05 ($p < 0,05$).

III.6- Análisis citoembriológicos

Para determinar la capacidad de formar SEA y cuantificar la expresividad de la aposporía se realizaron análisis citoembriológicos mediante clarificados de ovarios. Las inflorescencias colectadas se fijaron en FAA, (formaldehído; ácido acético; alcohol etílico 70% en proporciones 1:1:18) por 24 horas y luego se transfirieron a etanol 70% por al menos 24 horas. Se removieron los pistilos de las flores y se colocaron nuevamente en etanol 70%. Se trataron las muestras de ovarios con agua oxigenada 3% por 2 horas. Posteriormente, se incubaron durante 30 minutos en cada una de las siguientes soluciones: Etanol/Agua 50%; Etanol 70%; Etanol 95%; Etanol 100%; Etanol/Metilsalicilato 50%/50%; Metilsalicilato 25%/75%; Etanol/Metilsalicilato 15%/85%; Metilsalicilato 100%. Por último, se montaron los ovarios en Metilsalicilato 100% y se observaron con un Microscopio Leica DIASTAR de

transmisión de luz equipado con un sistema de contraste de interferencia diferencial (DIC) y una cámara digital (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania). Los sacos embrionarios meióticos del tipo *Polygonum* fueron reconocidos porque presentan: una célula huevo, dos sinérgidas, una célula central binucleada y una masa de antípodas en el extremo chalazal. Mientras que los SEA de tipo *Paspalum* se diferencian ya que presentan: una célula huevo, dos sinérgidas, una célula central y carecen de antípodas en el extremo chalazal. La expresividad de la aposporía de cada planta se determinó calculando la proporción de ovarios que presentan SEAs, solos o acompañados por un SEM del tipo *Polygonum*, sobre el total de ovarios analizados (**Figura III-1**).

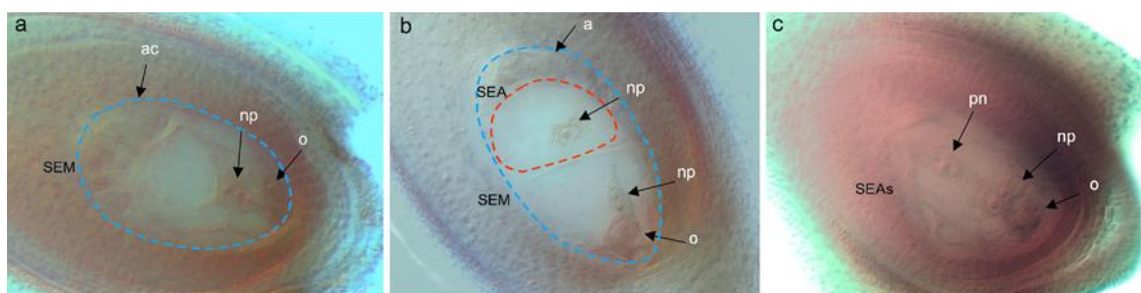


Figura III-1. Sacos embrionarios de *Paspalum rufum*. a) Ovario con un SEM, b) Ovario con un saco embionario meiótico en el extremo micropilar y un saco embionario apospórico en el extremo chalazal, c) Ovario con dos SEA. “np” núcleos polares, “ac” células antípodas, “o” oósfera. “SEM” saco embionario meiótico, “SEA” saco embionario apospórico (Tomado de Delgado *et al.*, 2016).

III.7- Análisis estadísticos para comparar expresividad de aposporía.

La comparación de la expresividad de la aposporía (%SEA) entre diferentes individuos se realizó mediante el Test de Fisher usando el recurso en línea MeasuringU (<https://www.measuringu.com/ab-cal/>). Es importante aclarar que en todos los casos las comparaciones se realizaron con materiales fijados en la misma localización geográfica y en un mismo año, excepto en aquellos casos en que se detalla lo contrario. Para expresar la %SEA en forma gráfica se calcularon los intervalos de confianza sobre las proporciones de SEA observadas siguiendo el método descrito por (Newcombe, 1998), derivado de un procedimiento de Wilson, (1927), sin corrección por continuidad mediante el recurso en línea VassarStats (<http://vassarstats.net/>).

III.8- Determinación del comportamiento reproductivo mediante el análisis FCSS

Con el fin de completar la caracterización del comportamiento reproductivo de las plantas se reconstruyeron las vías de formación de las semillas mediante el análisis “Flow Citometry Seed Screening” desarrollado por Matzk *et al.*, (2000). La relación del contenido de ADN del embrión: endospermo permite discriminar el comportamiento reproductivo que le dio origen a la semilla. Mediante esta técnica es posible diferenciar las semillas provenientes de todos los cruzamientos posibles de acuerdo al saco embrionario que le dio origen (SEA o SEM) y el nivel de ploidía del polen. En la **Figura III-2** se muestra la relación de ploidía entre el embrión y el endosperma correspondiente a cada proceso reproductivo originante según se polinicen con polen proveniente de genotipos tetraploides ($n=2x$) o diploides ($n=x$). Para el aislamiento de los núcleos a partir de los cariopses se procedió según lo descrito en Delgado *et al.*, (2014). Se utilizaron cariopses individuales o grupos de hasta 5 cariopses generados mediante autopolinización, polinización abierta, cruzamientos interploides interespecíficos o interploides coespecíficos. Las muestras se cortaron con bisturí en trozos muy finos en presencia de 0,5 ml de buffer de extracción (CyStain UV Precise P Nuclei Extraction Buffer, Partec, Münster, Germany). Se filtraron usando una malla de nylon de 30 μ m, y se incubaron por 1 minuto antes de agregar 1,5 ml de 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; CyStain UV Precise P Staining Buffer, Partec).

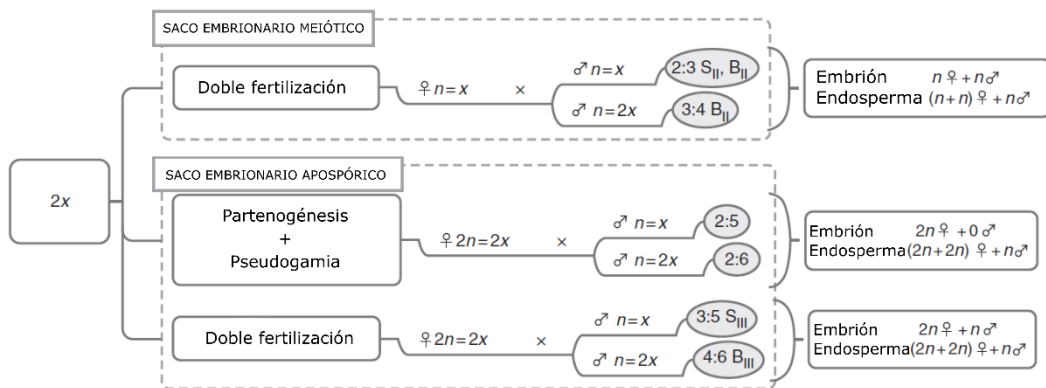


Figura III-2. Posibles vías de formación de semillas a partir de individuos diploides ($2n=2x=20$) de *Paspalum rufum* que poseen SEM y SEA, fertilizados por un donante de polen diploide (autopolinización) ($n=x$) y tetraploide ($n=2x$). Siendo x el nivel de ploidía o número básico de cromosomas; n , número de cromosomas de la gameta; BII, híbrido diploide derivado de la reproducción sexual; BIII, híbrido derivado de la fertilización de una célula huevo no reducida por una gameta haploide ($n=2x$); SII, individuo diploide derivado de una autofecundación por reproducción sexual; SIII,

individuo triploide derivado de la fertilización de una célula huevo no reducida por autofecundación (adaptado de Delgado *et al.*, 2014).

El contenido de ADN de los núcleos (C-value) fue determinado midiendo la intensidad de fluorescencia de los núcleos teñidos con DAPI mediante el uso de un citómetro de flujo Partec PA II (Partec-GmbH), con un detector operando a 355 nm. Se midieron aproximadamente 3000 núcleos por muestra. Como referencia se utilizó una semilla de una planta diploide sexual de *P. rufum* cuyo número de cromosomas se conocía según el conteo de cromosomas a partir de raíces. El análisis de los datos se realizó con el software Partec FloMax de PA II.

III.9- Construcción de un mapa de ligamiento genético del citotipo diploide de *P. rufum*

Debido a que la población de mapeo disponible consistía en una familia F₁ de hermanos completos (full-sib) derivados de dos progenitores diploides altamente heterocigoras, se diseñó una estrategia de mapeo basada en el modelo de cuasi-cruzamiento de prueba (“pseudo-test cross”). Este tipo de poblaciones pueden contener *loci* con diferentes configuraciones alélicas y por lo tanto diferentes tipos de segregación. En el caso de los marcadores polimórficos entre los parentales segregantes desde el progenitor femenino (Aa x aa), o del progenitor masculino (aa x Aa) se esperan relaciones de segregación 1:1 (Aa : aa). En caso de que haya segregación en la población, pero no exista polimorfismo entre los genotipos parentales significa que el alelo dominante se encuentra en heterocigosis en ambos parentales (Aa x Aa, marcador biparental) para lo cual se espera una segregación 3:1 (A-: aa). Estos últimos marcadores fueron considerados como puentes alélicos (Ritter *et al.*, 1990). Los valores de segregación de cada marcador fueron examinados mediante una prueba de ajuste de Chi-cuadrado ($p < 0,05$) contra los valores esperados para una segregación 1:1 (marcadores parentales) o 3:1 (marcadores biparentales). Se generaron dos archivos de datos, uno utilizando los marcadores derivados de la segregación femenina (Aa x aa) junto con los marcadores biparentales (Aa x Aa) y el otro con los marcadores derivados de la segregación masculina (aa x Aa) y los marcadores biparentales (Aa x Aa). Los datos se analizaron siguiendo la metodología descrita en Ortiz *et al.*, (2001). En ambos mapas se utilizaron los mismos marcadores biparentales lo que permitió identificar a los grupos de ligamiento homólogos entre el mapa materno y paterno. La

determinación de los grupos de cosegregación y el ordenamiento de los marcadores en los grupos de ligamiento fueron realizados utilizando el programa JoinMap 4.0 tratando a los datos como derivados de una población del tipo CP (Van Ooijen, 2006). Para el desarrollo del mapa se siguieron los siguientes pasos: a) se corroboró el ajuste de la segregación observada de los marcadores a los valores esperados, b) se realizó un análisis de ligamiento de dos puntos y se determinaron los grupos de cosegregación (ligamiento) con marcadores que presentaban valores de LOD mayores a 6,0 y una frecuencia de recombinación menor a 0,4 ($r_{max}=0,4$); c) se estimaron las distancias en unidades centimorgan (cM) usando la función de mapeo de Kosambi, (1944) y se fijó el orden de los marcadores mediante la función “*fixed order*” del programa informático Joinmap 4.0. d) una vez establecidos los grupos de cosegregación se ordenaron los marcadores dentro de cada grupo a un valor de LOD mayor a 2. e) Finalmente, para unir los grupos de ligamiento homólogos se tomaron los marcadores que se encontraban en fase de repulsión ($r > 0,5$) y se invirtió el código de segregación para unir los grupos de ligamiento homólogos.

Siguiendo esta metodología se obtuvieron dos mapas de ligamiento. Uno presentaba los marcadores que estaban en heterocigosis solo en el parental masculino (aa x Aa) y el otro presentaba los marcadores en heterocigosis del parental femenino (Aa x aa). Además, ambos mapas incluían los mismos marcadores que se encontraban en heterocigosis en ambos parentales (Aa x Aa). Estos últimos marcadores fueron utilizados para reconocer los grupos de ligamiento homólogos en ambos mapas.

III.10- Detección de QTL

Con el objetivo de detectar regiones genómicas asociadas a la alta o baja expresión de la aposporía, los datos genotípicos y mapas de ligamiento obtenidos en el punto anterior fueron utilizados en combinación con los datos fenotípicos de proporción de SEA (%SEA) presentados en la sección 1. Los datos fenotípicos de 39 individuos F_1 fueron tomados en la localidad de Corrientes, mientras que los datos fenotípicos de otros 49 individuos F_1 fueron tomados en la localidad de Zavalla. Por este motivo, para la detección de QTL se dividió a la población F_1 en dos subpoblaciones de hermanos completos: La Población F_1-1 con los datos fenotípicos

obtenidos en Corrientes y la población F₁-2 con los datos obtenidos en Zavalla. La normalidad de la variable dependiente se determinó utilizando el test de Shapiro-Wilk. Como los datos no ajustaron a una distribución normal fueron transformados utilizando la fórmula: $Y = \text{Log} (\% \text{ aposporía} + 1)$.

La detección de QTL (*Loci* de caracteres cuantitativos) relacionados con el %SEA se realizó mediante el análisis simple por marcador utilizando el programa estadístico Statgraphics (Collard *et al.*, 2005). En este análisis se realiza una regresión lineal considerando a los marcadores como variable independiente y al %SEA como variable dependiente. A fin de determinar asociaciones se consideró como significativo un valor de $p < 0,05$ y se utilizó el valor de R^2 para estimar el porcentaje de variancia fenotípica total explicada por cada QTL estudiado. Por último, se realizó una comparación de las regiones ligadas a la expresividad de la aposporía obtenidas en ambas poblaciones y se determinaron las regiones genómicas compartidas.

III.11- Detalle de la construcción del calendario

Con el objetivo de describir el desarrollo reproductivo en individuos tetraploides y diploides de *Paspalum rufum* se realizaron mediciones de diferentes variables morfológicas en diferentes estadios de desarrollo sexual femenino. Se seleccionaron las inflorescencias según los estadios de desarrollo del polen según se describe en la **Figura 4.1-A** que para simplificar la lectura se colocó en la sección 4. Se consideró estadio I: a la presencia de células madres de la micróspora (CMMi) en las anteras; el estadio II: díadas o tétradas de micrósporas de polen producidas luego de la meiosis; estadio III: presencia de micrósporas unicelulares sin vacuola; estadio IV: micrósporas unicelulares con vacuolas visibles y, por último, el estadio V: presencia de granos de polen bicelulares. Las mediciones cuantitativas se realizaron en ovarios en 6 estadios de desarrollo reproductivo según lo descrito en la **Figura 4.1-A** de la sección 4. Se consideró estadio I: a la presencia de células madres de la megáspora (CMM); estadio II: díadas o tétradas de megásporas producidas luego de la meiosis; estadio III: megáspora funcional (MF) y/o megásporas degeneradas en el extremo micropilar; los siguientes estadios (IV, V y VI) incluyeron el desarrollo del megagametofito sexual (que se denominan con la abreviación FG

basado en las descripciones del sistema estándar de *Arabidopsis*) que incluye tres rondas de mitosis y una celularización (Christensen *et al.*, 1997). Estadio IV: se caracteriza por la presencia de un megagametofito de dos núcleos (FG2) producto de la primera mitosis; estadio V: agrupa FG4-FG6 que incluye las últimas etapas de desarrollo de la megagametogénesis después de la segunda mitosis (FG4) hasta la celularización y por último, el estadio VI: presenta sacos embrionarios totalmente desarrollados en antesis.

Con el objetivo de describir el desarrollo reproductivo mediante parámetros cuantitativos se realizaron mediciones sobre algunas variables de crecimiento del ovario. Tanto para el ovario como para el lóculo del ovario (que en *P. rufum* coincide con el óvulo) se midieron el largo (Ov-l, Loc-l); el ancho (Ov-an, Loc-an); el área (Ov-ar, Loc-ar) y el perímetro (Ov-p, Loc-p). También se midieron la apertura de la micrópila (A-m), el largo del integumento interno (I-l), el ancho de la epidermis del óvulo (e) y el ángulo de rotación del óvulo (Ar). Para medir el ángulo de rotación del óvulo se trazó una línea desde el punto medio de apertura de la micrópila hacia la base del óvulo y otra línea a través del eje longitudinal del óvulo (entre los puntos más distantes de los integumentos externos) (**Figura 4.1-B** de la sección 4). Las mediciones se realizaron sobre imágenes de ovarios que fueron orientados en posición sagital usando el software ImageJ (Schneider *et al.*, 2012). Se midieron 469 ovarios, 265 en genotipos diploides y 204 en genotipos tetraploides. Además, en cada estadio de desarrollo se realizaron entre 8 y 86 observaciones por citotipo

Debido a que los órganos reproductivos del citotipo tetraploide tienen mayor tamaño que el diploide, todos los parámetros fueron estandarizados para poder realizar las comparaciones correspondientes, excepto el ángulo de rotación del óvulo. El ancho de la epidermis, así como todos los parámetros cuantitativos relacionados al ovario y al lóculo fueron estandarizados dividiéndolos por el valor promedio que presenta cada variable en el estadio de antesis. El parámetro Loc-l fue estandarizado dividiendo por el valor Loc-p en cada estadio de desarrollo y la apertura de la micrópila fue estandarizada utilizando Loc-l en cada estadio de desarrollo.

Para realizar una comparación cuantitativa entre el desarrollo femenino y masculino dentro de cada citotipo se colectaron espiguillas y se agruparon según el estadio de desarrollo del polen. Para realizar esto, las anteras fueron teñidas utilizando carmín acético.

Posteriormente, se disectaron los pistilos, se clarificaron y se clasificaron como se describió anteriormente. En algunos casos, los pistilos y las anteras se clarificaron juntos para observar tanto el desarrollo masculino como el femenino.

Las comparaciones de los parámetros de crecimiento del ovario entre individuos diploides y tetraploides se llevaron a cabo utilizando una prueba-*t* y/o prueba de Wilcoxon dependiendo de la normalidad de los residuos y de la homogeneidad de varianzas ($p < 0,01$). Se realizaron análisis de la varianza y pruebas de Kruskal-Wallis para comparar los parámetros del crecimiento durante el desarrollo en cada citotipo utilizando los programas estadísticos STATGRAPHIC Plus 5.0 (Statgraphics.Net, Madrid, Spain) e InfoStat 2011e (Di Rienzo *et al.*, 2011). Se utilizaron todos los parámetros independientes del crecimiento para obtener una matriz de distancia Euclídea entre todos los estadios de desarrollo. Esta matriz fue utilizada para agrupar los estadios de desarrollo de ambos citotipos según los parámetros de crecimiento. El algoritmo que realiza el análisis de conglomerados utiliza el método de grupo de pares no ponderados con media aritmética (UPGMA – “*unweighted pair group method with arithmetic mean*”). Esto se realizó utilizando InfoStat 2011 (Di Rienzo *et al.*, 2011). Se determinó el coeficiente de correlación cofenética para probar la bondad del ajuste del dendrograma generado.

III.12- Construcción de bibliotecas y secuenciación para implementar la técnica MCSeEd

Se construyeron bibliotecas genómicas utilizando el protocolo de Peterson *et al.* (2012) con algunas modificaciones, como se describe más abajo. Para poder inferir los diferentes contextos de metilación se seleccionaron 3 enzimas sensibles a la metilación (*AciI*, *PstI* y *EcoT22I*) que se combinaron cada una de ellas con una enzima insensible a la metilación (*MseI*). La combinación “*AciI / MseI*” permitió inferir la metilación en el contexto CG, la combinación “*PstI / MseI*”, permitió inferir la metilación en el contexto CHG, mientras que la combinación “*EcoT22I / MseI*” permitió inferir la metilación en el contexto CHH (**Tabla III-2**).

Se determinó la concentración del ADN mediante el uso de un fluorómetro Qubit (Life Technologies, Grand Island, NY, USA). Para cada muestra de ADN se realizó una doble digestión usando cada una de las tres combinaciones de enzimas nombradas anteriormente. En la misma reacción, se ligó un adaptador en el extremo cohesivo de la enzima de restricción sensible a la metilación. Este adaptador presenta un “barcode” específico para cada muestra (RAD/Paired-end RADSeq/ddRAD-Seq), mientras que en el extremo cohesivo dejado por la enzima *MseI* se ligó un adaptador común. Se digirieron y ligaron 140 ng de ADN genómico en un volumen final de 50 µl conteniendo: 5U de enzima *MseI* (New England Biolabs Inc.) y 5U de una de las enzimas sensible a la metilación (*AciI*, *PstI* o *EcoT22I*) (New England Biolabs Inc.), 1U de enzima ligasa T4 (New England Biolabs Inc.), 2 µM de adaptador *MseI*, 2 µM de adaptador con “barcode” específico, 0,4 mM de ATP y buffer 1X (5X NEB CutSmart® buffer, New England Biolabs Inc.). Las muestras fueron incubadas durante cuatro horas a 37°C y la reacción se detuvo colocando las muestras a 65°C durante diez minutos.

Tabla III-2. Características de las enzimas de restricción utilizadas en la técnica MCSed.

| Enzima | Sitio de reconocimiento | Sitio de corte | Sensibilidad a metilación | Corte bloqueado por | Contexto metilado |
|----------------|-------------------------|----------------|---------------------------|---------------------|-------------------|
| <i>AciI</i> | CCGC / GCGG | C'CGC / G'CGG | Si | C 5mCGC / G 5mCGG | CG |
| <i>PstI</i> | CTGCAG | CTGCA'G | Si | CTG 5mCAG | CHG |
| <i>EcoT22I</i> | ATGCAT | ATGCA'T | Si | ATG 5mCAT | CHH |
| <i>MseI</i> | TTAA | T'TAA | No | | "" |

H puede ser A, C o T.

Luego de la reacción de ligación, las muestras fueron precipitadas utilizando 0,5 volúmenes de una solución al 30% de PEG 8000 (Polietilenglicol 8000) centrifugando 20' a 11.500 rpm y se resuspendieron en 30 µl de agua ultrapura.

Posteriormente, las fracciones de ADN para cada combinación de enzimas se purificaron utilizando 1.1X de perlas magnéticas AMPure XP (Agencourt AMPure XP; Beckman Coulter, MA, USA) (las perlas magnéticas permiten purificar fragmentos de ADN genómico superior a 200 - 250 pb). Las muestras se incubaron junto a las perlas magnéticas durante 5' y se colocaron en una placa magnética por 5'. Se lavó 2 veces consecutivas con etanol 70% por 30''. Y se dejaron secar por 8-10' para eliminar el etanol a temperatura ambiente. A continuación, se retiraron las muestras de la placa magnética y se resuspendieron

las perlas en 20 µl de agua ultra pura. Para separar las perlas del ADN purificado y resuspendido, se colocaron las muestras nuevamente en la placa magnética, y se extrajo el sobrenadante con el ADN digerido y purificado en tubos nuevos.

Con el objetivo de seleccionar solo un rango de tamaños de fragmentos de entre 200 y 650 pb se realizó un gel de agarosa al 1 % y se extrajeron los fragmentos de ADN del gel mediante el kit “QIAquick Gel Extraction kits” (Qiagen). Posteriormente, se realizó una purificación con perlas magnéticas utilizando 0,8 X de AMPure XP (Agencourt AMPure XP; Beckman Coulter, MA, USA) como se describió anteriormente. Las muestras se resuspendieron en 30 µl de agua ultra pura y fueron cuantificadas utilizando un fluorómetro Qubit (Life Technologies).

Las bibliotecas fueron enriquecidas por PCR en la cual se introdujeron cebadores que presentaban un index de Illumina para la demultiplexación. La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 50 µl conteniendo: 20 ng de ADN, dNTPs 0,2 mM, cebadores 0,2 µM, Phusion HighFidelity DNA Polymerase (New England Biolabs Inc.) 1,2 U, buffer 1X (New England Biolabs Inc.) y agua ultra pura. Las condiciones de la reacción fueron las siguientes: 98°C por 2'; 16 ciclos a 98 °C por 20'', 56 °C por 30'' y 72 °C por 20'' y por último una extensión a 72°C por 5'.

Las bibliotecas enriquecidas se purificaron utilizando una concentración 1X de perlas magnéticas (AMPure; Beckman Coulter, Brea, CA, EE. UU.), se resuspendieron en 21 µl de agua ultrapura y se cuantificaron utilizando el fluorómetro Qubit (Life Technologies). Las bibliotecas fueron analizadas por su calidad a través de un Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Cruz, CA, EE. UU.), agrupadas de manera equimolar, y secuenciadas con tecnología Illumina (Hiseq 2500) utilizando 150-bp paired-end (**Figura III-3**).

El diseño experimental incluyó dos réplicas biológicas en cada tratamiento. En los tratamientos de baja aposporía se utilizaron las plantas F1#9 y F1#12 y en los tratamientos de alta aposporía se utilizaron los genotipos F1#15 y F1#39. Para poder contar con tres réplicas en cada uno de los grupos, se realizó una replica técnica de una de las muestras (en premeiosis F1#9 y F1#39 y en postmeiosis F1#12 y F1#15). De esta forma en cada uno de los grupos de baja y de alta aposporía alcanzó un número total de 3 muestras: dos réplicas biológicas y una

réplica técnica (**Tabla III-3**). Cada grupo quedó definido por las siguientes variables: Expresividad de la aposporia (alta y baja), estadios de desarrollo reproductivo (Premeiosis y postmeiosis) y contexto de metilación: 1) CG (*AciI/MseI*), 2) CHG (*PstI/MseI*) y 3) CHH (*EcoT22I/MseI*).

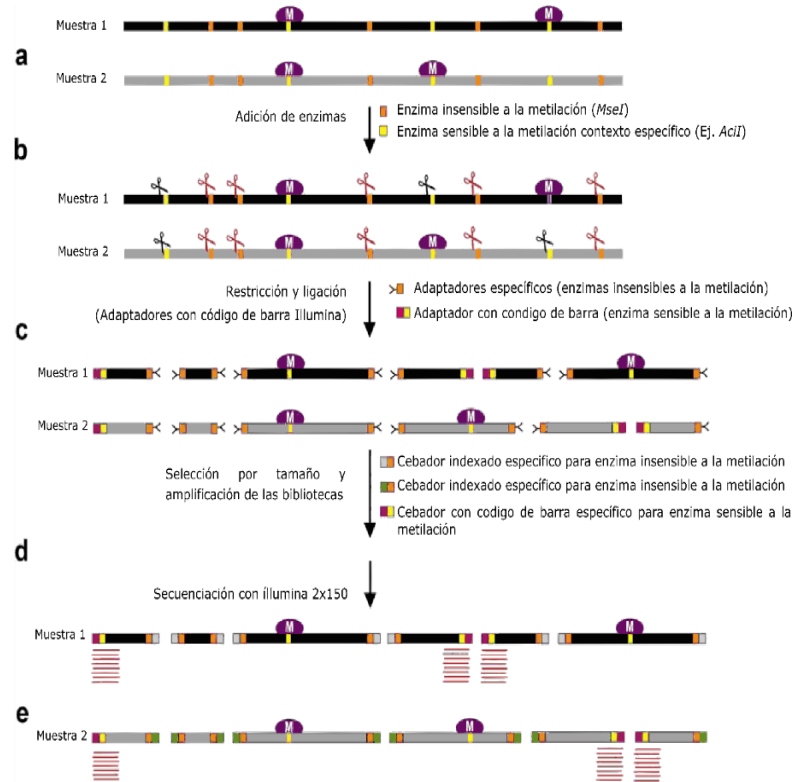


Figura III-3. Representación esquemática de la técnica MCSed extraída de Marconi *et al.*, (2019) a) dos muestras (Ej: control y estresadas), b) son doblemente digeridas con una enzima de restricción insensible a la metilación (*MseI*) y una enzima sensible a la metilación (*AciI*, *PstI*, *EcoT22I*) y ligadas, c) con adaptadores específicos: se utiliza un adaptador “Y” para el sitio de la enzima *MseI* y un adaptador con código de barra específico para el sitio de la enzima de restricción sensible a la metilación. Después de una selección por tamaño, las muestras son agrupadas y amplificadas con cebadores a partir del adaptador *MseI* (cada cebador tiene un índice específico para cada biblioteca). Las muestras son secuenciadas usando tecnología Illumina 2 x 150, d). Las lecturas son demultiplexadas, e) y analizadas con la pipeline diseñada para MCSed (Marconi *et al.*, 2019).

Tabla III.4. Muestras analizadas con los adaptadores correspondientes.

| Estadio | Aposporía | Planta | <i>Ac</i> I (CG) | <i>Eco</i> T22I (CHH) | <i>Pst</i> I (CHG) | Index |
|-------------|-----------|--------|---------------------|--------------------------|-----------------------|-------------------------------|
| Premeiosis | Baja | F1#9 | Pre0_1_P25 | Pre0_1_P31 | Pre0_1_P1 | Illumina Index 12 (CTTGTA) |
| | | F1#9 | Pre0_2_P26 | Pre0_2_P32 | Pre0_2_P2 | |
| | | F1#12 | Pre0_3_P27 | Pre0_3_P33 | Pre0_3_P3 | |
| | Alta | F1#15 | PreA1_P25 | Pre25_1_P31 | Pre25_1_P1 | Illumina Index 15 (ATGTCA) |
| | | F1#39 | PreA2_P26 | Pre25_2_P32 | Pre25_2_P2 | |
| | | F1#39 | PreA3_P27 | Pre25_3_P33 | Pre25_3_P3 | |
| Postmeiosis | Baja | F1#9 | Pos0_1_P25 | Pos0_1_P31 | Pos0_1_P1 | Illumina Index 14 (AGTTCC) |
| | | F1#12 | Pos0_2_P26 | Pos0_2_P32 | Pos0_2_P2 | |
| | | F1#12 | Pos0_3_P27 | Pos0_3_P33 | Pos0_3_P3 | |
| | Alta | F1#15 | Pos25_1_P25 | Pos25_1_P31 | Pos25_1_P1 | Illumina Index 16 (CCGTCC) |
| | | F1#15 | Pos25_2_P26 | Pos25_2_P32 | Pos25_2_P2 | |
| | | F1#39 | Pos25_3_P27 | Pos25_3_P33 | Pos25_3_P3 | |

III.13- Flujo de trabajo informático sin genoma de referencia

Las lecturas (reads) sin procesar de la secuenciación de Illumina de las bibliotecas de la metilación de CG, CHG, CHH se demultiplexaron utilizando la herramienta `process_radtags` (paquete `STACKS` v.2.3b). Esto identifica y asigna reads a cada individuo sobre la base de un código de barras personalizado de 7 pb. (eliminadas después del análisis). Después de procesar las reads, se ejecutó el pipeline `MCSed` siguiendo los procedimientos independientes del genoma (<https://bitbucket.org/capemaster/mcseed/src/master/>) diseñado por Marconi *et al.*, (2019). Esta herramienta es una extensión muy simple, altamente escalable y rentable del protocolo `ddRAD` original (Peterson *et al.*, 2012) que permite la detección de cambios de metilación para los contextos CG, CHG y CHH. Brevemente, como no se cuenta con un genoma de referencia todas las lecturas crudas se ensamblaron usando `Rainbow 2.0.4` (<https://sourceforge.net/projects/biorainbow/>) (Chong y Ruan, 2012) y `CDHit` (<https://github.com/weizhongli/cdhit>) (Li y Godzik, 2006), para crear un pseudo genoma de referencia que consiste en un archivo multifasta que contiene todos los ensamblados o contigs. Este archivo sirve como guía para el algoritmo de mapeo. Después de mapear las lecturas usando el algoritmo `bwa mem` con su configuración predeterminada, se creó una matriz de conteo para cada muestra usando `Samtools`, que cuenta la cantidad de secuencias mapeadas por

contig. Esta matriz podrá luego utilizarse para identificar cuantitativamente las regiones diferencialmente metiladas.

III.14- Conteo de *Loci*

La matriz de conteo consiste en columnas que representan cada una de las muestras y filas que representan los contigs. Esta matriz fue filtrada y procesada, mediante dos scripts realizados en Perl (Marconi *et al.*, 2019) en los cuales: (1) se normalizaron y balancearon las bibliotecas según lecturas por millón (reads per millions); (2) se retuvieron aquellos *loci* que contaban con más de 10 lecturas; (3) se estimó el nivel relativo de metilación por contig; (4) los datos filtrados se analizaron para su uso por el paquete methylKit R. En particular, los niveles de metilación relativos en cada sitio (punto 3) se calcularon siguiendo un procedimiento de reescalado que se basó en el número máximo de recuentos de lecturas observadas. En la práctica, se asumió que la muestra que mostraba el mayor número de lecturas era la referencia no metilada para ese sitio, o que tenía 0% de metilcitosina y 100% de citosina, y todas las muestras restantes se escalaron proporcionalmente (**Tabla III-5**). Como la referencia fue común a todas las muestras, las estimaciones del nivel de metilación se pueden usar para inferir los cambios de metilación entre las muestras. Por lo tanto, las posiciones diferencialmente metiladas (PDM) se identificaron como sitios que mostraban diferencias significativas ($FDR < 0.05$) en los niveles de metilación entre los diferentes grupos de muestras, utilizando la regresión logística implementada en methylKit.

Tabla III-5. Matriz de conteo.

| Contigs | Conteo de lecturas reales observadas | | | | | | Mayor número de lecturas | número de lecturas con metilación relativa inferida | | | | | | |
|---------|--------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|--------------------------|---|-------|-------|-------|-------|-------|--|
| | PreB1 | PreB2 | PreB3 | PreA1 | PreA2 | PreA3 | | PreB1 | PreB2 | PreB3 | PreA1 | PreA2 | PreA3 | |
| E | | | | | | | | | | | | | | |
| E1635 | 7 | 6 | 6 | 24 | 25 | 20 | 25 | 18 | 19 | 19 | 1 | 0 | 5 | |
| E1426 | 35 | 41 | 38 | 14 | 17 | 13 | 41 | 6 | 0 | 3 | 27 | 24 | 28 | |

III. 15- Análisis estadístico de las bibliotecas genómicas

Para los análisis estadísticos se utilizó la versión 3.3.2 de R (www.rproject.org) con los paquetes 'stats', 'factoextra' y 'gplots'. El paquete 'stats' se utilizó para estimar las correlaciones y la regresión binomial y logística. El paquete 'factoextra' para realizar el análisis de componentes principales (ACP). El análisis de agrupamiento se llevó a cabo utilizando la función 'heatmap.2' del paquete 'gplots', en combinación con las funciones 'hclust' y 'dist', y con 'ward.D2' como el método de agrupamiento. El paquete de R 'MethylKit' se utilizó para estimar los cambios de metilación entre las muestras de alta y baja aposporía.

Los fragmentos diferencialmente metilados fueron anotadas mediante comparaciones de secuencia utilizando la herramienta BLASTN contra bases de datos de nucleótidos no redundantes (nr) del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), con un valor de corte de e-value de 10^{-5} . Asimismo, se crearon diagramas de Venn utilizando la página web jvenn (<http://jvenn.toulouse.inra.fr/app/example.html>) (Bardou *et al.* 2014), con el objeto de identificar aquellas regiones/fragmentos epigenéticamente diferentes en los genotipos con diferente grado de expresividad de la aposporía, en los distintos estadios del desarrollo, y para los diferentes contextos de metilación.

IV- RESULTADOS

SECCIÓN 1: HERENCIA DE LOS COMPONENTES DE LA APOMIXIS EN EL CITOTIPO DIPLOIDE DE *PASPALUM RUFUM*

IV.1.1- Caracterización de la aposporía en individuos F₁

Como material vegetal de partida se contaba con una población F₁ segregante obtenida a partir de un cruzamiento entre dos genotipos diploides de *P. rufum* (R6#45 x R5#49) que mostraban 90,4% y 58,5% de ovarios, respecto del total analizados conteniendo solo SEM, mientras 5,77% y 13% presentaban SEAs acompañado del SEM, respectivamente (Delgado *et al.*, 2014) (**Figura 1.1-A**). En una primera instancia, 39 individuos de la población F₁ estuvieron localizados en la ciudad de Corrientes (Latitud: -27.4667, Longitud: -58.8333), Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Noreste (UNNE-IBONE). Este grupo de plantas se denominó subpoblación F₁-1. Posteriormente, F₁-1 se trasladó hacia la localidad de Zavalla (Latitud: -33.0167, Longitud: -60.8833), Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Rosario (FCA-IICAR) donde se plantaron en condiciones naturales.

Se confirmó la condición híbrida de los individuos de F₁-1 por medio un marcador fenotípico, el color de las anteras, que difiere entre los genotipos parentales (**Figura 1.1-B**) y marcadores moleculares de tipo RAPD. El genotipo materno R6#45 presenta anteras de color amarillo (**Figura 1.1-C**) y el genotipo paterno R5#49 de color marrón (**Figura 1.1-D**). La caracterización fenotípica de la población mostró que 17 plantas presentaban anteras de color amarillo y 22 plantas presentaban anteras de color marrón. La segregación observada ajustó para una segregación esperada de 1:1 ($\chi^2_{1:1; 1.d.f.} = 0,621, p = 0,423$) correspondiente a un *locus* heterocigota dominante sugiriendo que las plantas con anteras marrones eran de origen híbrido.

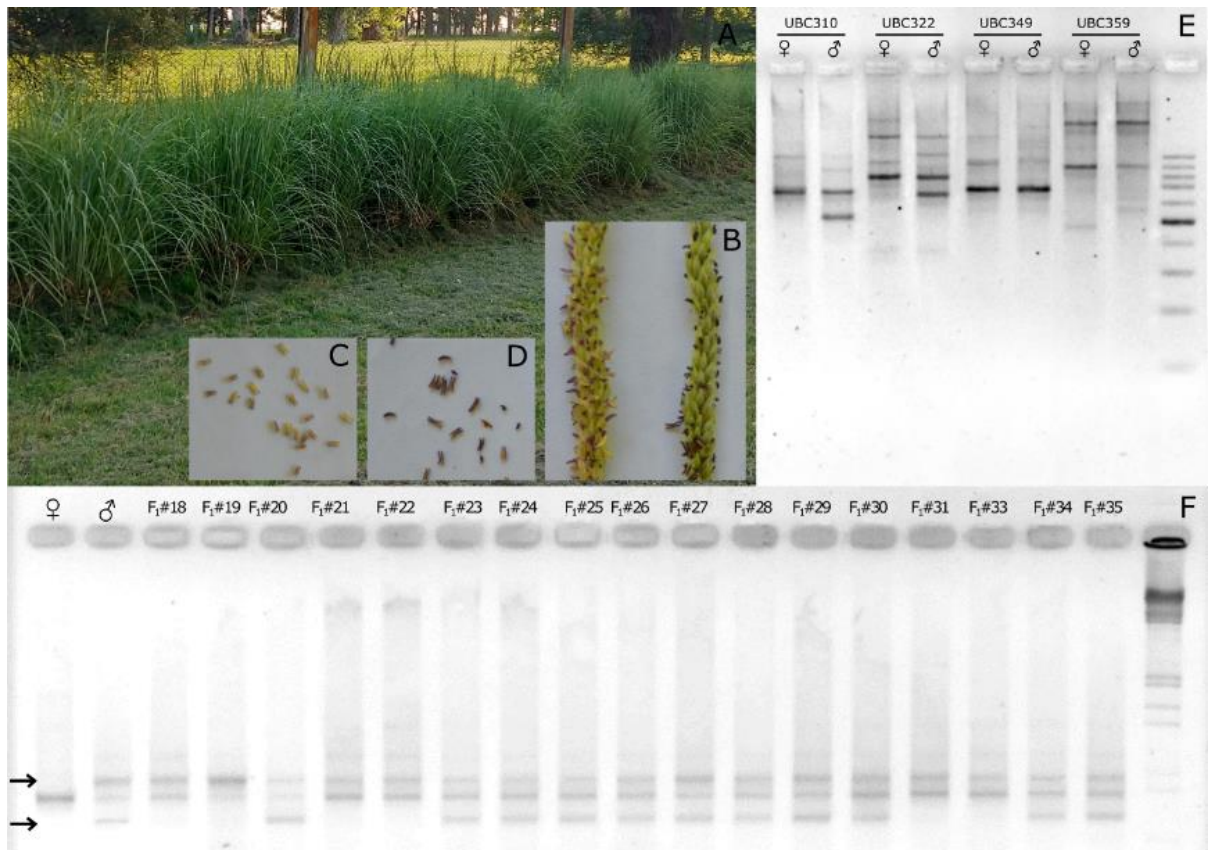


Figura 1.1. Población F₁ derivada de un cruzamiento entre los genotipos R6#45 y R5#49 de *Paspalum rufum*; **A**, individuos F₁ en terrenos de la Facultad de Ciencias Agrarias UNR/IICAR; **B**, espigas de una panoja de R6#45 a la izquierda y de R5#49 a la derecha; **C**, detalles de anteras de R6#45; **D**, detalles de anteras de R5#49. **E**, ejemplos de polimorfismos entre padres de marcadores moleculares RAPD utilizados para determinar el origen híbrido de los individuos. **F**, detalle de un gel de agarosa utilizando los cebadores 310 de la serie UBC sobre individuos de la población F₁. Las flechas indican bandas informativas utilizadas para confirmar el origen híbrido de los individuos.

Para el análisis por medio de marcadores moleculares, se seleccionaron 6 combinaciones de cebadores de RAPD de la serie UBC la presencia de claros polimorfismos entre los padres (UBC302, UBC304, UBC306, UBC308, UBC310 y UBC322) (**Figura 1.1-E**). La amplificación con estos cebadores en las progenies F₁₋₁ permitió la generación de 12 marcadores segregantes (8 pertenecientes al parental dador de polen, dos al parental pistilado y dos de ambos parentales). Todos los marcadores excepto uno segregaron de acuerdo a los valores esperados para un *locus* heterocigota, indicando que pueden ser usados para la identificación de híbridos (**Tabla 1.1**). El análisis de las progenies mostró que todos los individuos fueron híbridos ya que presentaban al menos dos marcadores provenientes del

parental masculino y no se detectaron plantas provenientes de autofecundación (**Figura 1.1-D**). Asimismo, el análisis de los niveles de ploidía en hoja por citometría de flujo, confirmó que todas las plantas de la población F₁₋₁ eran diploides, descartando de esta manera la posibilidad de que algún individuo tenga origen híbrido, pero provenga de la fecundación de gametas femeninas no reducidas (fecundación de un SEA de la planta R6#45).

Con el propósito de incrementar el número de individuos de la población segregante en el año 2015 se sembraron más semillas del cruzamiento original entre el individuo R6#45 y el R5#49. En esta ocasión se obtuvieron 49 nuevas plantas F₁ que fueron establecidas en el campo experimental de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Rosario (UNR-IICAR). Este grupo de plantas fue denominada subpoblación F₁₋₂. La condición híbrida de estas plantas se determinó mediante marcadores moleculares AFLP tal como se describe en la parte 3.

Tabla 1.1. Análisis de segregación de marcadores RAPD y color de anteras en la subpoblación F₁₋₁ diploide de *Paspalum rufum*.

| Locus | Número ^a | Marcador asociado | | χ^2 (<i>p</i> ^b) |
|------------------|---------------------|-------------------|----------|------------------------------------|
| | | Presencia | Ausencia | |
| Color de anteras | 39 | 17 | 22 | 0,641 (0,423) |
| 302 a ♂ | 39 | 21 | 18 | 0,231 (0,631) |
| 304 ♂ | 39 | 20 | 19 | 0,026 (0,872) |
| 306 a ♂ | 40 | 37 | 3 | 0,225 (0,635) |
| 306 b ♀ | 41 | 26 | 15 | 2,951 (0,086) |
| 306 b ♂ | 40 | 19 | 21 | 0,100 (0,752) |
| 308 a ♀ | 39 | 22 | 17 | 0,640 (0,420) |
| 308 b ♂ | 39 | 13 | 26 | 4,330 (0,040)* |
| 310 a ♂ | 40 | 17 | 23 | 0,900 (0,343) |
| 310 b ♂♀ | 38 | 27 | 11 | 0,316 (0,574) |
| 310 c ♂♀ | 38 | 27 | 11 | 0,316 (0,574) |
| 322 a ♂ | 41 | 0 | 41 | 0,000 (1,000) |
| 322 b ♂ | 41 | 19 | 22 | 0,220 (0,640) |

^aNúmero total de individuos analizados; ♀ y ♂ indican marcadores segregantes de los genotipos R6#54 y R5#49, respectivamente.

^bValores *p*<0,05 fueron considerados como segregación distorsionada.

Para analizar la segregación del carácter aposporía en la población F₁ (subpoblaciones F₁₋₁ y F₁₋₂) se realizaron observaciones citoembriológicas de clarificados de ovarios en antesis en 39 individuos de la F₁₋₁ y en 49 individuos de la F₁₋₂. Es importante destacar que la recolección de los ovarios en antesis de la población F₁ se realizó en dos ambientes diferentes.

Las inflorescencias en antesis de la subpoblación F₁-1 fueron colectadas en el mes de octubre en el IBONE, Corrientes, mientras que las inflorescencias de las plantas de la subpoblación F₁-2 fueron colectadas en el mes de noviembre en Zavalla, Santa Fe. El comportamiento reproductivo de los individuos se determinó teniendo en cuenta la presencia de ovarios conteniendo SEM, SEM y SEA, o solamente SEA, según se describe en Materiales y Métodos. Además, se determinó la expresividad de la aposporía como %SEA, es decir cuantificando la proporción de ovarios que contenían SEA, ya sea que estén o no acompañados por SEM, sobre el total de ovarios analizados. Se analizó un promedio de 88 ovarios por planta, con un mínimo de 29 y un máximo de 132. En aquellos individuos donde la proporción de SEA fue baja (menos del 5%), se examinaron un mayor número de ovarios ($n < 95$) con el objetivo de aumentar la probabilidad de detectar SEA. Las observaciones citoembriológicas revelaron que del total de plantas analizadas en ambas poblaciones (88 híbridos F₁), 83 producían SEA y en 5 plantas no se detectaron ovarios con SEA, es decir solo presentaban SEM (**Tabla 1.2 y 1.3**). Por lo general, los híbridos con capacidad de producir sacos no reducidos presentaron además, en el mismo ovario, SEM bien desarrollados del tipo *Polygonum*. En estos casos, los SEA se observaron localizados ectópicamente dentro del óvulo (**Figura 1.2-C**). El SEM siempre estuvo localizado en el centro del óvulo con el aparato oosférico en el extremo micropilar (**Figura 1.2-A**). En 12 individuos se detectaron algunos ovarios que presentaban solo SEA y en pocas ocasiones más de uno (**Figura 1.2-B**). Las plantas híbridas que mostraron exclusivamente SEM fueron analizadas exhaustivamente, se examinaron más de 100 óvulos, y no se detectó aposporía en ninguno de ellos, indicando un muy bajo nivel o ausencia de la expresión de la aposporía. (**Tabla 1.2 y 1.3**).

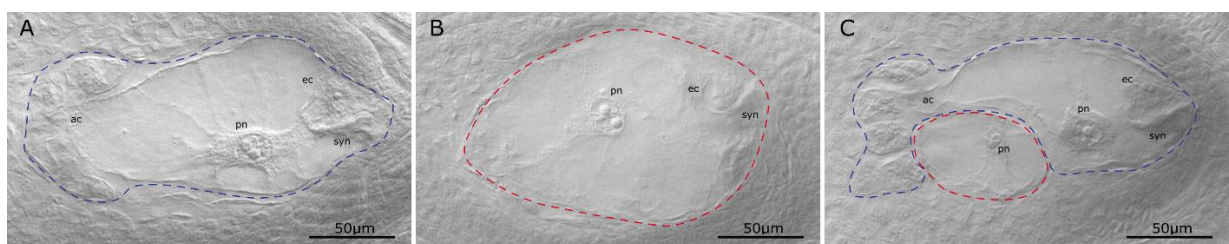


Figura 1.2. Sacos embrionarios de *Paspalum rufum*. A) Ovario con un SEM, B) Ovario con SEAs, C) Ovario con un saco embionario meiótico en el extremo micropilar y un saco embrionario apospórico deslocalizado. Líneas discontinuas azules marcan un SEM y las líneas discontinuas rojas marcan un SEA. “ec” célula huevo, “syn” sinérgidas, “pn” núcleos polares. “ac” antípodas.

Tabla 1.2. Análisis citoembriológico de híbridos diploides de *P. rufum* correspondientes a la Población híbrida de la localidad de Corrientes (F₁-1).

| Individuos | Número de ovarios | | | | | | %SEA ^a |
|------------|-------------------|------|-----|-----|---------|----|-------------------|
| | Totales | SEAb | SEM | SEA | SEM+SEA | NC | |
| #12 | 112 | 10 | 96 | 0 | 0 | 6 | 0,00 |
| #5 | 95 | 31 | 59 | 0 | 1 | 2 | 1,05 |
| #9 | 82 | 9 | 70 | 0 | 1 | 2 | 1,22 |
| #40 | 39 | 3 | 35 | 0 | 1 | 0 | 2,56 |
| #30 | 115 | 2 | 99 | 0 | 3 | 10 | 2,61 |
| #34 | 38 | 2 | 34 | 0 | 1 | 1 | 2,63 |
| #21 | 33 | 6 | 25 | 0 | 1 | 0 | 3,03 |
| #18 | 32 | 3 | 27 | 0 | 1 | 1 | 3,13 |
| #17 | 31 | 1 | 29 | 0 | 1 | 0 | 3,23 |
| #1 | 57 | 1 | 52 | 0 | 2 | 2 | 3,51 |
| #28 | 87 | 4 | 54 | 1 | 3 | 25 | 4,60 |
| #23 | 43 | 12 | 29 | 0 | 2 | 0 | 4,65 |
| #36 | 96 | 1 | 75 | 0 | 5 | 15 | 5,21 |
| #37 | 38 | 1 | 32 | 0 | 2 | 3 | 5,26 |
| #41 | 38 | 0 | 36 | 0 | 2 | 0 | 5,26 |
| #8 | 36 | 2 | 30 | 0 | 2 | 2 | 5,56 |
| #19 | 35 | 5 | 27 | 0 | 2 | 1 | 5,71 |
| #22 | 65 | 4 | 54 | 0 | 4 | 3 | 6,15 |
| #43 | 65 | 1 | 59 | 0 | 4 | 1 | 6,25 |
| #7 | 45 | 9 | 32 | 0 | 3 | 1 | 6,67 |
| #35 | 29 | 5 | 12 | 0 | 2 | 10 | 6,90 |
| #6 | 98 | 2 | 87 | 0 | 7 | 2 | 7,14 |
| #33 | 38 | 3 | 32 | 1 | 2 | 0 | 7,89 |
| #16 | 48 | 5 | 37 | 0 | 4 | 2 | 8,33 |
| #2 | 57 | 1 | 49 | 0 | 5 | 1 | 8,77 |
| #29 | 44 | 3 | 36 | 0 | 4 | 1 | 9,09 |
| #38 | 42 | 4 | 34 | 0 | 4 | 0 | 9,52 |
| #27 | 31 | 0 | 15 | 2 | 1 | 0 | 9,68 |
| #20 | 35 | 4 | 26 | 4 | 0 | 1 | 11,43 |
| #13 | 33 | 1 | 25 | 1 | 3 | 3 | 12,12 |
| #4 | 39 | 0 | 34 | 0 | 5 | 0 | 12,82 |
| #25 | 37 | 3 | 28 | 0 | 5 | 1 | 13,51 |
| #10 | 43 | 2 | 33 | 0 | 6 | 2 | 13,95 |
| #42 | 43 | 3 | 34 | 1 | 5 | 0 | 13,95 |
| #24 | 40 | 14 | 20 | 5 | 1 | 0 | 15,00 |
| #3 | 57 | 10 | 35 | 7 | 3 | 2 | 17,54 |
| #31 | 38 | 3 | 27 | 0 | 8 | 0 | 21,05 |
| #15 | 58 | 2 | 33 | 2 | 17 | 4 | 32,76 |
| #39 | 53 | 5 | 27 | 2 | 17 | 2 | 35,85 |

SEAb ovarios con sacos embrionarios abortados, SEM ovarios mostrando sacos embrionarios meióticos, SEA ovarios mostrando sacos embrionarios apospóricos, NC no clasificados.

^a Calculado como porcentaje de ovarios portando SEA sobre el total de ovarios analizados.

Tabla 1.3. Análisis citoembriológico de híbridos diploides de *P. rufum* correspondientes a la Población de Zavalla (F₁-2).

| Individuos | Número de ovarios | | | | | NC | %SEA ^a |
|------------|-------------------|------|-----|-----|---------|----|-------------------|
| | Totales | SEAb | SEM | SEA | SEM+SEA | | |
| #52 | 95 | 19 | 76 | 0 | 0 | 0 | 0,00 |
| #67 | 118 | 33 | 84 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| #74 | 132 | 81 | 43 | 0 | 0 | 8 | 0 |
| #89 | 104 | 2 | 102 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| #91 | 117 | 17 | 97 | 0 | 1 | 2 | 0.85 |
| #93 | 109 | 24 | 84 | 0 | 1 | 0 | 0.92 |
| #55 | 105 | 4 | 100 | 0 | 1 | 0 | 0.95 |
| #79 | 103 | 3 | 98 | 0 | 1 | 1 | 0.97 |
| #83 | 99 | 1 | 97 | 0 | 1 | 0 | 1.01 |
| #71 | 90 | 2 | 87 | 0 | 1 | 0 | 1.11 |
| #45 | 73 | 13 | 57 | 0 | 1 | 2 | 1.37 |
| #73 | 115 | 6 | 107 | 0 | 2 | 0 | 1.74 |
| #69 | 105 | 53 | 50 | 0 | 2 | 0 | 1.9 |
| #63 | 97 | 2 | 92 | 0 | 2 | 1 | 2.06 |
| #66 | 92 | 30 | 49 | 0 | 2 | 11 | 2.17 |
| #47 | 106 | 30 | 71 | 0 | 3 | 2 | 2.83 |
| #90 | 103 | 6 | 64 | 0 | 3 | 30 | 2.91 |
| #87 | 100 | 4 | 91 | 0 | 3 | 2 | 3 |
| #53 | 99 | 5 | 91 | 0 | 3 | 0 | 3.03 |
| #68 | 98 | 5 | 89 | 0 | 3 | 1 | 3.06 |
| #85 | 98 | 2 | 93 | 0 | 3 | 0 | 3.06 |
| #81 | 130 | 21 | 102 | 0 | 4 | 3 | 3.08 |
| #61 | 96 | 2 | 89 | 0 | 3 | 1 | 3.13 |
| #58 | 94 | 6 | 83 | 0 | 3 | 2 | 3.19 |
| #48 | 92 | 6 | 83 | 0 | 3 | 0 | 3.26 |
| #84 | 89 | 3 | 83 | 0 | 3 | 0 | 3.37 |
| #57 | 100 | 5 | 78 | 0 | 4 | 13 | 4 |
| #44 | 98 | 52 | 35 | 2 | 2 | 7 | 4.08 |
| #59 | 95 | 1 | 55 | 0 | 4 | 35 | 4.21 |
| #77 | 117 | 44 | 68 | 0 | 5 | 0 | 4.27 |
| #62 | 100 | 8 | 83 | 0 | 5 | 4 | 5 |
| #49 | 76 | 4 | 67 | 0 | 4 | 1 | 5.26 |
| #50 | 112 | 3 | 103 | 0 | 6 | 0 | 5.36 |
| #70 | 110 | 16 | 88 | 0 | 6 | 0 | 5.45 |
| #51 | 72 | 3 | 65 | 0 | 4 | 0 | 5.56 |
| #56 | 114 | 4 | 103 | 0 | 7 | 0 | 6.14 |
| #75 | 108 | 6 | 93 | 0 | 7 | 2 | 6.48 |
| #82 | 108 | 10 | 90 | 0 | 7 | 1 | 6.48 |
| #76 | 86 | 28 | 52 | 0 | 6 | 0 | 6.98 |
| #78 | 78 | 0 | 72 | 0 | 6 | 0 | 7.69 |
| #64 | 103 | 6 | 88 | 0 | 8 | 1 | 7.77 |
| #92 | 112 | 1 | 101 | 0 | 9 | 1 | 8.04 |
| #88 | 94 | 0 | 86 | 0 | 8 | 0 | 8.51 |
| #65 | 105 | 3 | 93 | 0 | 9 | 0 | 8.57 |
| #54 | 109 | 4 | 95 | 0 | 10 | 0 | 9.17 |
| #60 | 82 | 9 | 64 | 0 | 9 | 0 | 10.98 |
| #46 | 47 | 3 | 37 | 0 | 6 | 1 | 12.77 |
| #72 | 79 | 1 | 67 | 1 | 10 | 0 | 13.92 |
| #86 | 95 | 0 | 78 | 0 | 17 | 0 | 17.89 |

SEAb ovarios con sacos embrionarios abortados, SEM ovarios mostrando sacos embrionarios meióticos, SEA ovarios mostrando sacos embrionarios apospóricos, NC no clasificados.

^a Calculado como porcentaje de ovarios portando SEA sobre el total de ovarios analizados.

IV.1.1.2- Postulación de modelos de herencia de la aposporía

A fin de postular un modelo de herencia del carácter aposporía al nivel diploide se consideraron como apospóricos a todos los individuos que mostraron capacidad de desarrollar sacos embrionarios de tipo apospóricos (independientemente de su nivel de expresión) y sexuales a todos los individuos que mostraron solamente la capacidad de generar sacos embrionarios meióticos. De acuerdo a este criterio la población F₁ segregó en 83 individuos con al menos 1 SEA y 5 individuos sexuales.

Las pruebas de bondad de ajuste de segregación del carácter aposporía en las poblaciones F₁ permitieron descartar una herencia de tipo monogénica ($\chi^2_{3:1; 1d.f.} = 17.51; p < 0.05$) y modelos de herencia poligénica donde existan tres o más genes segregando en la población ($\chi^2_{63:1; 1d.f.} = 9.71; p < 0.05$). La segregación observada ajustó mejor para un modelo en donde ambos parentales pueden presentar dos genes duplicados dominantes en heterocigosis (Aa Bb) ($\chi^2_{15:1; 1d.f.} = 0.05; p > 0.05$). Sabiendo que estos parentales diploides son autoincompatibles se espera que sean altamente heterocigotas, por lo tanto, se descartaron modelos en donde uno de los parentales presente genes en homocigosis (**Tabla 1.4**).

Tabla 1.4. Pruebas Chi cuadrado de bondad de ajuste en una población F₁ con 83 individuos apospóricos y 5 sexuales.

| Genotipos posibles | | Proporción de segregación esperada | | χ^2 | p |
|--------------------|------------|------------------------------------|--------|----------|------|
| Parental 1 | Parental 2 | Apospórico | Sexual | | |
| Aa | Aa | 3 | 1 | 17,52 | 0,00 |
| Aa Bb | Aa Bb | 15 | 1 | 0,05 | 0,83 |
| Aa Bb Cc | Aa Bb Cc | 63 | 1 | 9,71 | 0,00 |

IV.1.1.3- Expresividad de la aposporía en la población F₁

Con el objetivo de analizar la expresividad de la aposporía en la población diploide se analizaron los valores de %SEA (% de ovarios llevando SEA en relación al total de ovarios observados) en ambas subpoblaciones. En la subpoblación F₁-1 (Corrientes), el %SEA tuvo un amplio rango de variación (**Tabla 1.2; Figura 1.3**). Los valores estuvieron comprendidos entre 0 y 35,85 % ($\mu = 8,86$ $sd = 7.67$). La distribución de los % de SEA manifestó una continuidad

entre los valores 1%-15%, mientras que no se detectaron individuos con %SEA comprendidos entre 15%-17,5% y 17,5%-21% y 21%-32% (**Figura 1.4**). Si bien la mayoría de los híbridos mostraron proporciones de SEA incluidas dentro del rango de expresividad de los genotipos parentales (R6#45=5,77% y R5#49=13 %, $\mu=9.385$ $sd = 5,12$), algunos individuos como F1#15 y F1#39 mostraron valores que resultaron significativamente mayores al de los progenitores (32,76 %SEA y 35,85 %SEA, respectivamente). Por otro lado, el individuo F1#12 no presentó SEA (0 %SEA) y los genotipos F1#5 y F1#9 mostraron proporciones muy bajas (1,05 %SEA y 1,22 %SEA, respectivamente), sin embargo, los análisis estadísticos no detectaron diferencias significativas respecto del genotipo R6#45.

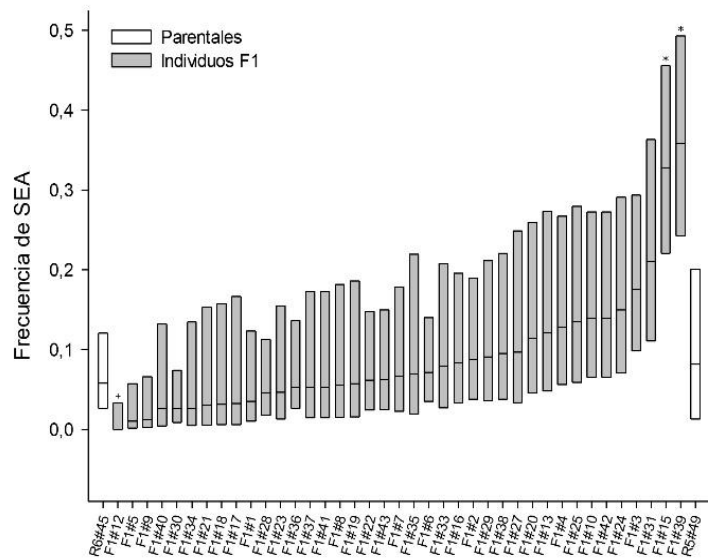


Figura 1.3. Expresividad de la aposporía, medida en Corrientes, de la progenie F₁-1 proveniente del cruzamiento entre los genotipos R6#45 y el R5#49 de *Paspalum rufum*. Las cajas representan los intervalos de confianza al 95%, de la frecuencia de ovarios que contienen SEA, en cada planta y la línea el valor promedio. Los genotipos parentales están representados con cajas blancas y la progenie con cajas grises. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al genotipo paterno ($p < 0,05$) y el signo positivo las que no presentan SEA.

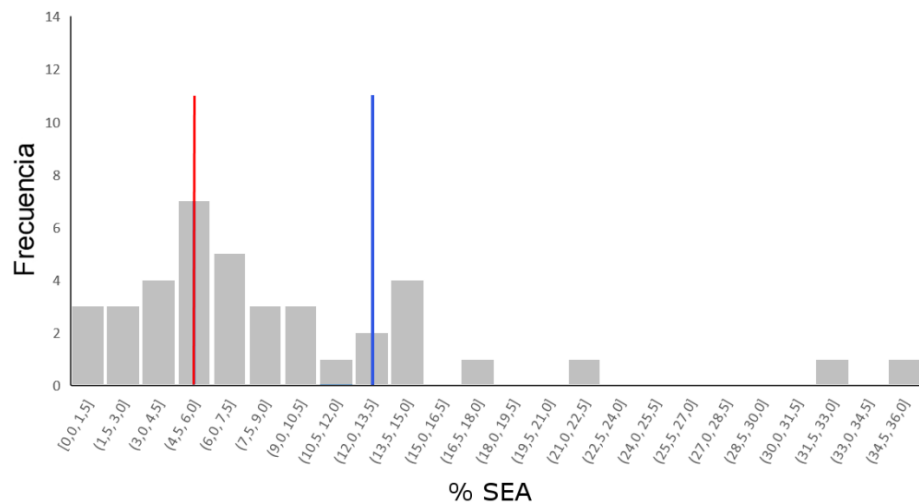


Figura 1.4. Histograma de frecuencia de la variable %SEA, medida en Corrientes sobre la población F₁-1, proveniente del cruzamiento entre los genotipos R6#45 (línea vertical roja) y R5#49 (línea vertical azul) de *Paspalum rufum*.

El análisis de la subpoblación F₁-2 (individuos #44 al #93) mostró un rango de variación del carácter %SEA que osciló entre 0 y 17,89 % ($\mu = 4,56$, $sd = 3,82$) (**Tabla 1.3; Figura 1.5**). En cuanto a la distribución de frecuencia de los valores de %SEA, se observó mayor continuidad que en el caso de Corrientes y no se detectaron individuos con %SEA en el rango 14%-17,8% (**Figura 1.6**). Es importante destacar que la expresividad de aposporía de los genotipos parentales R6#45 y R5#49 en el ambiente Zavalla (en el año 2016) fue de 3,6% y 6,61%, respectivamente ($\mu = 5,10$ $sd = 2,12$). Al igual que en la F₁-1, muchos individuos híbridos presentaron %SEA comprendidos entre los valores parentales, sin embargo, también se encontraron híbridos con expresividad de aposporía significativamente diferentes a estos valores. Por ejemplo, los genotipos F1#72 y F1#86 mostraron proporciones significativamente superiores (13,92% y 17,89 %) al valor del parental R5#49. Mientras que los genotipos F1#52, F1#67, F1#74 y F1#89 no presentaron SEA (0%).

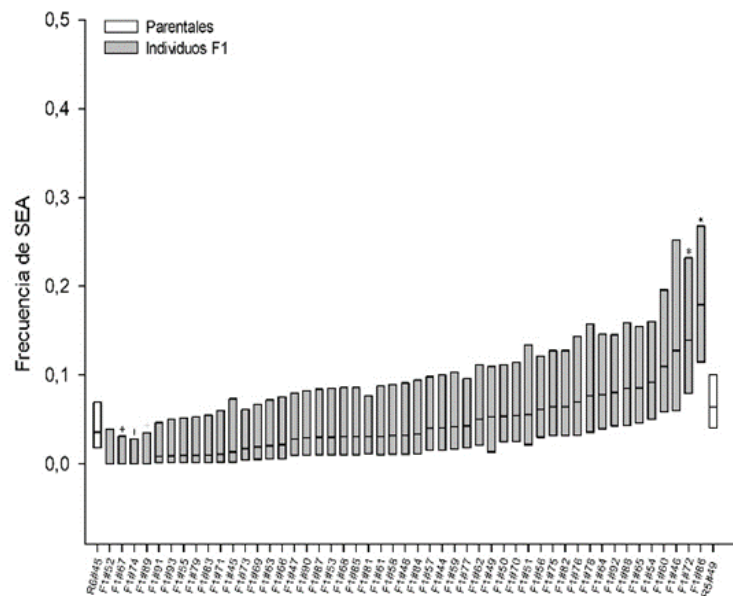


Figura 1.5. Expresividad de la aposporía, medida en Zavalla, de la progenie F₁-2 provenientes del cruzamiento entre los genotipos R6#45 y el R5#49 de *Paspalum rufum*. Las cajas representan los intervalos de confianza al 95%, de la frecuencia de ovarios que contienen SEA, en cada planta y la línea el valor promedio. Los genotipos parentales están representados con cajas blancas y la progenie con cajas grises. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al genotipo paterno ($p < 0,05$) y el signo positivo indica las que no presentan SEA.

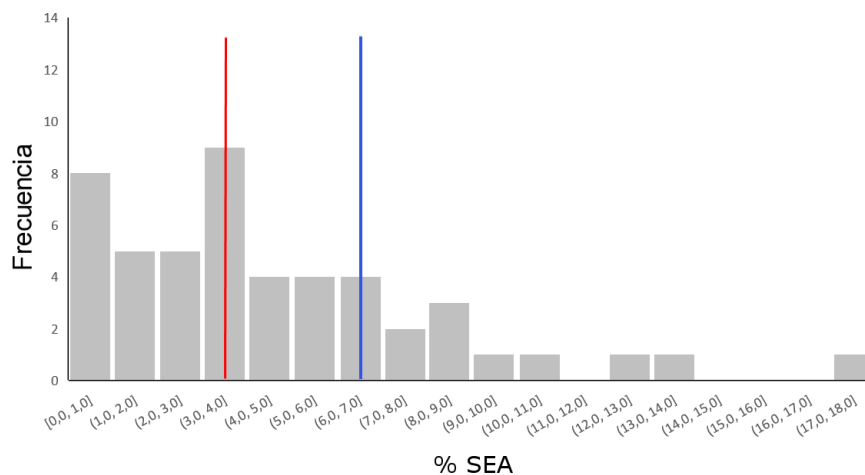


Figura 1.6. Histograma de frecuencia de la variable %SEA, medida en Zavalla sobre la población F₁-2 proveniente del cruzamiento entre los genotipos R6#45 (línea vertical roja) y R5#49 (línea vertical azul) de *Paspalum rufum*.

Con el objetivo de profundizar en el análisis cuantitativo de la expresividad de la aposporía, además de analizar individuos F_1 , se obtuvieron algunos individuos producto de la autopolinización del parental R5#49. Debido a que el citotipo diploide de *P. rufum* es autoincompatible, la producción de semillas por autofecundaciones fue muy baja. De todas maneras, se obtuvieron cinco individuos diploides, de los cuales hasta el momento sólo tres alcanzaron la floración y por lo tanto pudieron ser caracterizados fenotípicamente. En la **Figura 1.7** se muestra el %SEA de estos individuos y del genotipo que les dio origen. Los genotipos 49S#1 y 49S#8 (7,8 %SEA y 2,9 %SEA) no mostraron diferencias significativas respecto al genotipo parental R5#49 (7,5 %SEA). Sin embargo, el individuo 49S#6, presentó un incremento significativo en la %SEA (31,5 % SEA) respecto al parental R5#49. Este tipo segregación transgresiva del carácter, que coincide con lo observado en la F_1 , es la esperada por el origen híbrido supuesto para el genotipo parental dada la autoincompatibilidad típica del citotipo diploide.

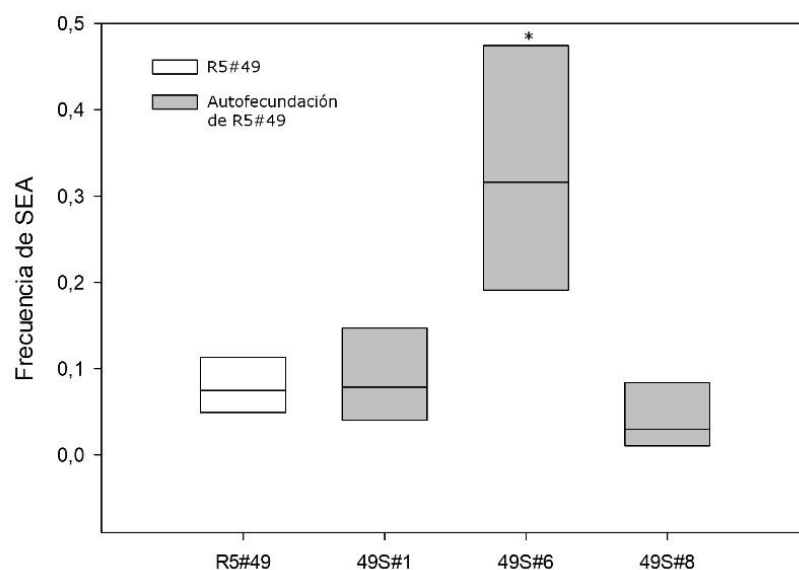


Figura 1.7. Expresividad de la aposporía en el ambiente Zavalla, de individuos provenientes de la autofecundación de R5#49. Las cajas representan los intervalos de confianza al 95%, de la frecuencia de ovarios que contienen SEA, en cada planta y siendo la línea el valor promedio. El genotipo parental R5#49 se representa con la caja blanca y la progenie (por autofecundación) se representa con cajas grises. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al genotipo R5#49 ($p < 0,05$).

IV.1.2- Influencia del ambiente sobre la expresividad de la aposporía

Como se describió en la sección anterior, los análisis cuantitativos de la expresividad de la aposporía mostraron que el rango de variación era diferente según la localidad en la que se encontraban la población, Corrientes y Zavalla. Estos resultados nos alertaron acerca de posibles efectos del ambiente sobre el carácter. Con el propósito de profundizar en este análisis se decidió analizar el %SEA de los mismos genotipos en ambas localidades, Corrientes (Latitud: -27.4667, Longitud: -58.8333) y Zavalla (Latitud: -33.0167, Longitud: -60.8833) y en diferentes campañas en una misma localidad.

En el primer caso se seleccionaron los genotipos parentales y cinco individuos de la población F₁-1. Entre estos cinco individuos dos presentaban bajo %SEA y tres, alto %SEA. Como resultado de estas mediciones se observó que algunos individuos diferían en el %SEA producido según la localidad en la que se fijaran las muestras (**Figura 1.8**). En Zavalla el parental R5#49 presentó un 6,4 %SEA siendo significativamente menor al %SEA observado en las mediciones realizadas en Corrientes (13 % SEA). Algo similar ocurrió sobre el parental R6#45, si bien no fueron diferencias estadísticamente significativas, disminuyó desde un 6 % SEA en Corrientes a un 3,4 %SEA en Zavalla. En el caso de los individuos híbridos F1#12 y F1#9 con bajos %SEA en la localidad de Corrientes (0 y 1,22 %SEA, respectivamente) los valores se mantuvieron bajos en Zavalla (0 y 2,76 %SEA, respectivamente). Sin embargo, los híbridos F₁ (F1#31, F1#15 y F1#39) que mostraban una alta expresividad de la aposporía en Corrientes (22,2 %SEA, 32,7 %SEA y 35,8 %SEA, respectivamente) mostraron una disminución estadísticamente significativa cuando fueron medidos en Zavalla (9,6 %SEA, 7,0 %SEA y 9,2 %SEA, respectivamente). Todos los genotipos con valores relativamente altos de %SEA mostraron diferencias significativas entre las dos localidades, siendo los valores significativamente menores en Zavalla respecto de Corrientes (**Figura 1.8**).

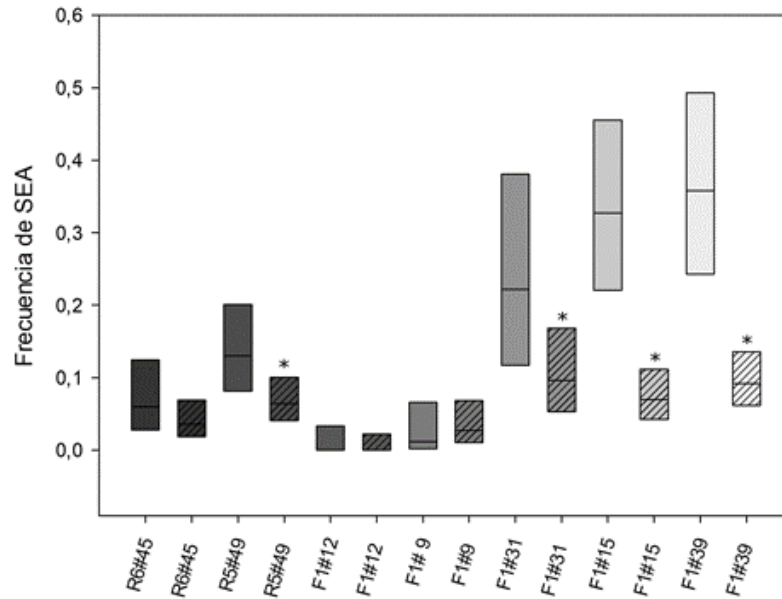


Figura 1.8. Expresividad de la aposporía en genotipos diploides de *Paspalum rufum* medidos en dos localidades. Las cajas representan los intervalos de confianza al 95%, de la frecuencia de ovarios que contienen SEA, en cada planta y siendo la línea el valor promedio. Los tonos de grises indican los diferentes genotipos. Las cajas lisas representan a las mediciones realizadas en Corrientes mientras que las cajas rayadas indican mediciones realizadas en Zavalla. Los asteriscos representan diferencias significativas entre ambas localidades ($p < 0,05$).

En el análisis de la estabilidad del carácter en diferentes años se seleccionaron híbridos de la F₁-1 que mostraron baja (F1#12, F1#89, F1#67 y F1#52) y alta expresividad del carácter (F1#15 y F1#39) y se midieron durante dos años seguidos (2017 y 2018) en Zavalla. En la **Figura 1.9**, se muestran los resultados de estas mediciones. Ningún individuo mostró diferencias estadísticamente significativas en el %SEA entre los dos años analizados. Los individuos F1#12, F1#89 y F1#67 que durante el primer año presentaron solo ovarios con SEM (0 %SEA) mantuvieron esta característica en el segundo año. Sin embargo, el individuo F1#52 que presentó solo SEM durante el primer año, al igual que los genotipos anteriores, no lo hizo en el segundo año presentando un 1,41 % de aposporía (de un total de 142 ovarios medidos). Tampoco los individuos de mayor porcentaje de aposporía (F1#15 y F1#39) mostraron diferencias estadísticamente significativas entre el primer año: 6,98 %SEA y 9,21 %SEA; respecto de: 9,33 %SEA y 9,9 %SEA en el segundo año. Estos resultados muestran que, si bien la expresividad de la aposporía está influenciada por el ambiente, la variación estacional en una misma latitud no afecta al carácter.

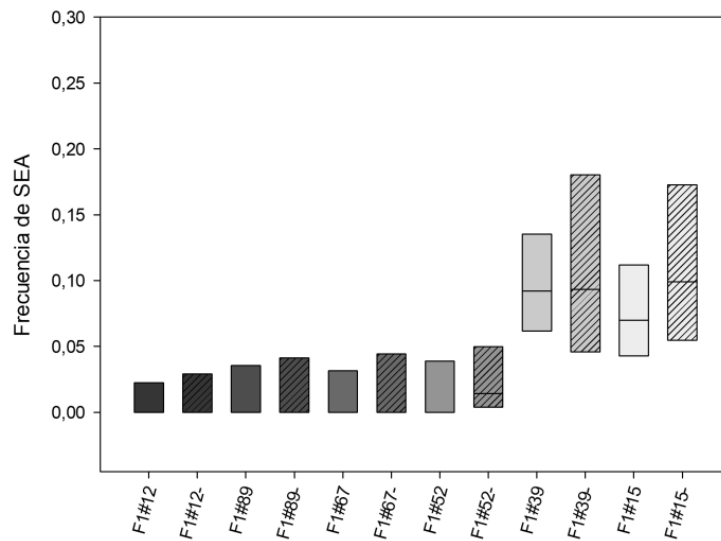


Figura 1.9. Expresividad de la aposporía en genotipos diploides de *Paspalum rufum* medidos en diferentes campañas. Las cajas representan los intervalos de confianza al 95%, de la frecuencia de ovarios que contienen SEA, en cada planta y siendo la línea el valor promedio. Los tonos de grises indican los diferentes genotipos. Las cajas lisas representan las mediciones realizadas en 2017 mientras que las cajas rayadas indican mediciones realizadas en 2018.

IV.1.3- Caracterización de la aposporía en individuos F₂

Con el propósito de continuar con el análisis de la transmisión de la expresividad de la aposporía se realizaron dos cruzamientos entre individuos F₁ con %SEA similares. Por un lado, se seleccionaron dos plantas con baja expresividad del carácter para generar la población F₂-1. El genotipo F1#9 (1,22 %SEA) se utilizó como parental femenino y F1#12 (0 %SEA) como parental masculino. Cabe aclarar que en el momento que se realizaron estos cruzamientos sólo se había caracterizado a la F₁-1. Por otro lado, el segundo cruzamiento, F₂-2, se realizó entre dos individuos que producían %SEA significativamente mayor a sus parentales. Se utilizó al genotipo F1#15 (32,76 %SEA) como parental femenino y a F1#39 (35,85 % SEA) como parental masculino. De esta forma se obtuvieron dos poblaciones (F₂-1 y F₂-2) de 9 individuos F₂ para cada cruzamiento, los cuales fueron analizados durante dos campañas seguidas (2016 y 2017) en la localidad de Zavalla. La condición híbrida de los nueve individuos de cada población fue confirmada mediante marcadores moleculares AFLP.

El resultado de la cuantificación de SEA en los híbridos F₂-1 puede observarse en la **Tabla 1.5**. El %SEA producido por cada individuo parental y por cada individuo de la progenie F₂-1 no mostró diferencias estadísticamente significativas entre un año y otro. Sí se detectaron algunas diferencias en cuanto a la ausencia completa de SEA. Por ejemplo, pudo apreciarse que durante el primer año, el genotipo F1#7, no presentó SEA, pero durante el segundo año sí se detectaron tres SEA (2,9 % SEA). Y en el genotipo F2#6, que durante el primer año había mostrado presencia de SEAs (1,1% SEA), no presentó durante el segundo período (81 ovarios analizados). Por otro lado, puede notarse que todos los individuos, excepto el F2#1, fueron capaces de formar SEA en alguno de los dos años al igual que el parental F1#9.

Tabla 1.5. Proporciones de SEA en híbridos F₂ diploides de *Paspalum rufum* correspondientes a la población F₂-1 (F1#9 x F1#12) medidos durante dos años consecutivos en Zavalla.

| Individuos | 1° medición | | | 2° medición | | | Media (σ) |
|------------|-------------|-------|------|-------------|-------|------|-------------|
| | n | % SEA | Año | n | % SEA | Año | |
| F1#12 | 89 | 0 | 2017 | 128 | 0 | 2018 | 0 |
| F1#9 | N.D. | N.D. | | 145 | 2,8 | | 2,8 |
| F2#1 | 95 | 0 | 2016 | 111 | 0 | 2017 | 0 |
| F2#6 | 94 | 1,1 | | 81 | 0 | | 0,53 (0,75) |
| F2#9 | 90 | 2,2 | | 94 | 2,1 | | 2,17 (0,07) |
| F2#2 | 110 | 0,9 | | 92 | 1,1 | | 1 (0,13) |
| F2#8 | 101 | 1 | | 92 | 1,1 | | 1,04 (0,07) |
| F2#5 | 109 | 0,9 | | 79 | 2,5 | | 1,72 (1,14) |
| F2#7 | 60 | 0 | | 102 | 2,9 | | 1,47 (2,08) |
| F2#3 | 71 | 7 | | 111 | 5,4 | | 6,22 (1,16) |
| F2#10 | 83 | 16,9 | | 113 | 9,7 | | 13,3 (5,04) |

% SEA: porcentaje de ovarios mostrando sacos embrionarios apospóricos; n: Número de ovarios analizados; N.D.: valor no determinado.

La comparación entre los valores de aposporía de los parentales F1#9 y F1#12 y su descendencia se realizó considerando las mediciones tomadas en un mismo año y en una misma localidad, condición que solo se cumplió en la floración 2017 de Zavalla (**Figura 1.10**). El genotipo F1#9 no pudo ser medido durante ese año por lo que se reemplazó el valor por el presentado en el período 2018 (en Zavalla) considerando que los genotipos con proporciones bajas de SEA no presentan variaciones significativas aún con cambios en la localidad. Después de realizar este análisis en la población F₂-1 se observó que la mayoría de los individuos no mostraron diferencias estadísticamente significativas en la proporción de SEA respecto a sus parentales F₁, exceptuando el genotipo F2#10 que aumentó significativamente la expresividad

de la aposporía (9,7 %SEA) respecto del genotipo F1#9 (2,8 %SEA). Por otra parte, el valor promedio de los parentales ($\mu= 1,40$ $sd = 1.98$) y su progenie ($\mu= 2,76$ $sd = 3.09$) no mostró diferencias estadísticamente significativas durante la temporada 2017 ($p = 0,576$).

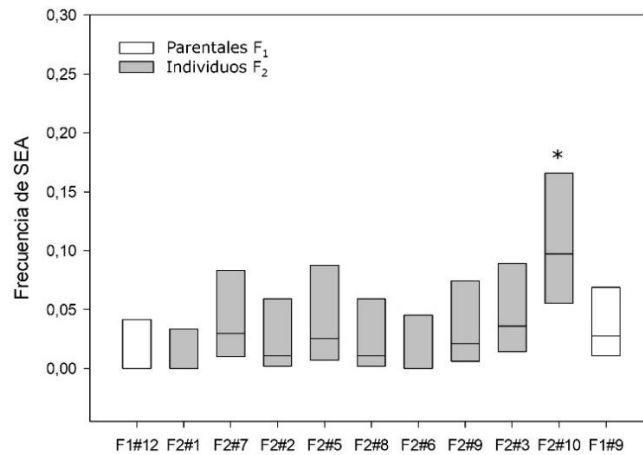


Figura 1.10. Expresividad de la aposporía en genotipos F₂-1 diploides de *Paspalum rufum* y sus parentales (F1#9 y F1#12) medidos en Zavalla (2017). Las cajas representan los intervalos de confianza al 95%, de la frecuencia de ovarios que contienen SEA, en cada planta y siendo la línea el valor promedio. Los genotipos parentales F₁ están representados con cajas blancas y los individuos F₂ están representados con cajas grises. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a los genotipos parentales ($p < 0,05$).

En la **Tabla 1.6** se observa la cuantificación de SEA en los híbridos de la población F₂-2 medidos en Zavalla durante dos campañas anuales (2016 y 2017). Todos los individuos fueron capaces de formar SEA al igual que sus parentales F₁. La proporción de SEA producida por los individuos F₂ varió entre 1,82 y 15,6. Además, ninguno de los parentales de este cruzamiento y los híbridos F₂ mostraron diferencias estadísticamente significativas entre un año y otro. Por otra parte, al igual que en la población F₂-1 se realizó la comparación de la expresividad de la aposporía de la progenie F₂ respecto a la de sus parentales F1#15 y F1#39 (9,9 y 9,3 % respectivamente) con los datos tomados en la campaña 2017 en Zavalla (**Figura 1.11**). En este análisis se observa que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los individuos F₂ y sus parentales a excepción del individuo F2#7 que expresó menor proporción de SEA (0,9 %) que ambos individuos F₁. Por otra parte, al igual que en la población F₂-1, el valor promedio de los parentales no presentó diferencias estadísticamente significativas ($\mu= 7,95$ $sd = 2.62$) respecto al de su progenie ($\mu= 7,19$ $sd = 3,84$) durante la temporada 2017 ($p =$

0,799). Además, es importante resaltar que tanto en la temporada 2016 como 2017, los valores medios de la población F₂-2 ($\mu= 9,61$ y $\mu= 7,19$, respectivamente) fueron significativamente mayores a los valores medios de la población F₂-1 ($\mu= 3,33$ y $\mu= 2,76$, respectivamente).

Tabla 1.6. Proporciones de SEA en híbridos F₂ diploides de *Paspalum rufum* correspondientes a la población F₂-2 (F1#15 x F1#39) medidos durante dos años consecutivos en Zavalla.

| Individuos | 1º medición | | | 2º medición | | | Media (σ) |
|------------|-------------|-------|------|-------------|-------|------|--------------------|
| | n | % SEA | Año | n | % SEA | Año | |
| F1#15 | 131 | 6,1 | 2017 | 101 | 9,9 | 2018 | 8 (2,68) |
| F1#39 | 122 | 9,8 | | 75 | 9,3 | | 9,58 (0,36) |
| F2#7 | 73 | 2,7 | 2016 | 111 | 0,9 | 2017 | 1,82 (1,3) |
| F2#5 | 112 | 6,3 | | 78 | 7,7 | | 6,97 (1,02) |
| F2#6 | 88 | 6,8 | | 100 | 5 | | 5,91(1,29) |
| F2#4 | 118 | 7,6 | | 107 | 6,5 | | 7,08 (0,77) |
| F2#3 | 102 | 10,8 | | 96 | 9,4 | | 10,08 (1) |
| F2#1 | 105 | 12,4 | | 81 | 9,9 | | 11,13 (1,77) |
| F2#9 | 74 | 13,5 | | 100 | 6 | | 9,76 (5,31) |
| F2#8 | 103 | 9,7 | | 124 | 4,8 | | 7,27 (3,44) |
| F2#2 | 96 | 16,7 | | 55 | 14,5 | | 15,61 (1,5) |

% SEA: porcentaje de ovarios mostrando sacos embrionarios apospóricos; n: Número de ovarios analizados.

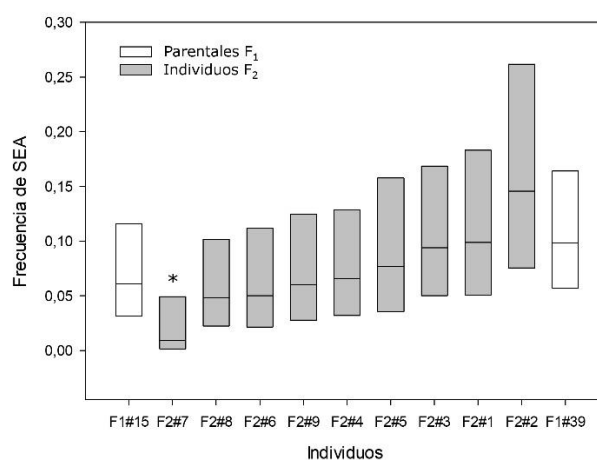


Figura 1.11. Expresividad de la aposporía en genotipos híbridos F₂-2 diploides de *Paspalum rufum* y sus parentales (F1#15 y F1#39) medidos en Zavalla en la campaña 2017. Las cajas representan los intervalos de confianza al 95%, de la frecuencia de ovarios que contienen SEA, en cada planta y siendo la línea el valor promedio. Los genotipos parentales F₁ están representados con cajas blancas y los individuos F₂ están representados con cajas grises. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a los genotipos parentales ($p<0,05$).

IV.1.4- Evaluación de la capacidad de completar la partenogénesis

Para completar la caracterización del comportamiento reproductivo se determinó la capacidad de producir semillas mediante partenogénesis en individuos de la F₁-1. Se sabe que las plantas diploides de *P. rufum* son pseudógamas, por lo tanto, el endosperma se desarrolla si se produce la fertilización de la célula central, ya sea por sexualidad o por apomixis. Según estudios previos de caracterización de poblaciones naturales diploides de *P. rufum* se determinó que, en condiciones naturales de polinización abierta, todas las semillas se producen por sexualidad (Sartor *et al.* 2011). Sin embargo, análisis más exhaustivos detectaron que algunos individuos diploides son capaces de completar la apomixis cuando son forzados a la autopolinización en presencia de polen mentor interespecífico e interploide de *P. urvillei* (Siena L. *et al.*, 2008, Delgado L. *et al.*, 2014). Teniendo en cuenta estos antecedentes se obtuvieron semillas mediante cruzamientos en presencia de polen tetraploide de *Paspalum urvillei* de cinco individuos F₁-1 (F1#12, F1#15, F1#20, F1#31 y F1#39) que generan diferentes proporciones de SEA.

De cada individuo se obtuvieron entre 30 (F1#12) y 194 semillas (F1#15) para ser analizadas mediante citometría flujo y poder determinar la vía reproductiva que les dio origen. Los resultados obtenidos mostraron que, de cinco individuos analizados que presentan entre 0 %SEA y 35 %SEA, sólo los individuos F1#31 (22.2 %SEA) y F1#39 (35 %SEA) fueron capaces de producir semillas por partenogénesis ($2n + 0n$) en presencia de polen interespecífico e interploide ($n=2x$), y produjeron 0,8 % y 2 % de semillas por apomixis, respectivamente (**Figura 1.12**). En ambos casos se observa una disminución significativa respecto del genotipo parental R5#49, que presentaba el 15% de semillas por apomixis en presencia de polen mentor interespecífico (Delgado L. *et al.*, 2014). Por otro lado, para el individuo F1#15 (32% SEA) no se detectaron semillas generadas por apomixis a pesar de haber analizado un gran número de semillas ($n = 194$) (**Tabla 1.7**). Estos resultados sugieren que las altas proporciones de SEA no garantizan la capacidad de completar la apomixis por partenogénesis.

Tabla 1.7. Determinación del origen reproductivo de semillas obtenidas mediante polinización con *P. urvillei* (4x) en individuos diploides de *P. rufum*.

| Individuo | %SEA* | Polen | N° de semillas | | % Apomixis | |
|--------------------|-------|----------------------------|----------------|-------------------|------------|----------|
| | | | Total | Modo reproductivo | | |
| | | | | Sexual | | Apomixis |
| R6#45 ¹ | 5,77 | | 108 | | 0 | |
| #12 | 0 | | 30 | 30 | 0 | |
| #20 | 11.45 | | 50 | 50 | 0 | |
| #31 | 22.22 | <i>P. urvillei</i> (4x) | 50 | 49 | 1 | 2 |
| #15 | 32.76 | | 194 | 194 | | 0 |
| #39 | 35.85 | | 122 | 121 | 1 | 0.8 |
| R5#49 ¹ | 13,01 | | 20 | 17 | 3 | 15 |

¹Los valores extraídos de Delgado L. *et al.*, 2014.

* Los valores de %SEA fueron medidos en Corrientes

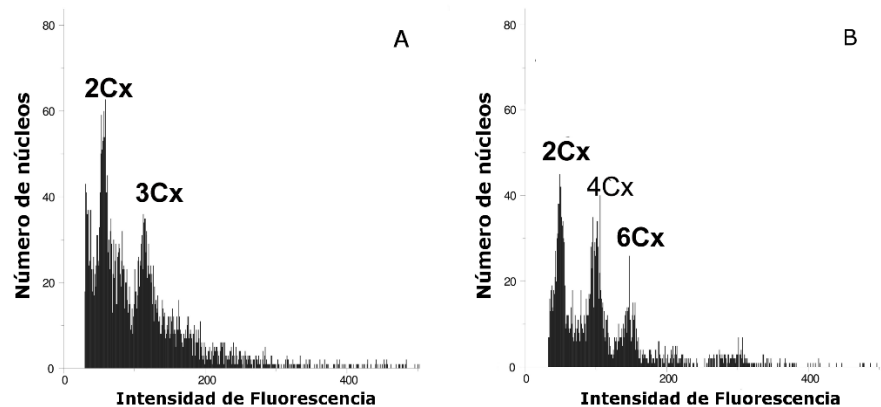


Figura 1.12. Histogramas de semillas individuales mostrando diferentes relaciones embrión: endosperma de ADN. **A**, histogramas de semillas mostrando una relación embrión: endosperma 2:3 de ADN correspondiente a la doble fecundación de un SEM por un núcleo espermático reducido de *P. rufum* diploide. **B**, histogramas de semillas con una relación embrión: endosperma 2:6 de ADN, derivada del desarrollo por partenogénesis de una célula huevo de un SEA y de la fertilización de los núcleos polares mediante una célula espermática reducida de *P. urville* tetraploide.

IV.1- DISCUSIÓN

En la presente sección se analizó la transmisión del carácter aposporía, su expresividad en poblaciones F_1 y F_2 y la capacidad de completar la apomixis por partenogénesis en el citotipo diploide de *P. rufum*. Dado que los diploides presentan autoincompatibilidad, se asumió que ambos parentales presentan un alto nivel de heterocigosis y por ende, la población F_1 segregó para el color de las anteras y una serie de marcadores moleculares polimórficos entre los progenitores. Todos los individuos de la progenie fueron confirmados como híbridos provenientes de la reproducción sexual. Estos resultados confirman las observaciones previas realizadas por Sartor *et al.*, (2011) y por Delgado *et al.*, (2014), en las que informan que en condiciones de polinización abierta los genotipos diploides se reproducen principalmente por sexualidad, aun teniendo la capacidad de formar SEA. Esto esta de acuerdo con los estudios citoembriológicos que muestran que los SEM se posicionan correctamente respecto al extremo micropilar, independientemente de la presencia o no de SEA, los cuales, mayormente se localizan ectópicamente. Otra dificultad que obstaculizaría la obtención de semillas a partir de los SEA en presencia de polen proveniente de genotipos diploides sería la formación del endosperma. Se sabe que existe una fuerte limitación al desarrollo del endosperma si no se respeta el aporte genómico materno:paterno en una proporción 2:1 (Birchler, 1993). Cualquier desviación de esta proporción es la causa principal de aborto de semillas en los cruzamientos inter-ploides o inter-específicos (Quarín, 1999). En el caso de que los SEA ($2n$) de los genotipos diploides sean polinizados con polen reducido (n), el aporte materno:paterno del endosperma sería 4:1 y por lo tanto inviable en los sistemas sexuales. Tanto en los trabajos previos de caracterización de genotipos diploides naturales de *P. rufum* (Delgado *et al.*, 2014) como en los resultados aquí presentados, las semillas apomícticas sólo se obtienen a partir de la fertilización del SEA por polen proveniente de genotipos tetraploides ($n=2x$) y por lo tanto se respeta el aporte 2:1 materno:paterno. Sin embargo, no podemos dejar de mencionar que en los trabajos previos (Delgado *et al.*, 2014) algunos genotipos diploides parecen tener esta restricción más relajada dado que forman semillas híbridas a partir de SEA con polen propio o a partir del SEM y polen del genotipo tetraploide, desviándose en ambos casos del aporte genómico

materno:paterno 2:1. Esta capacidad está de acuerdo con trabajos previos en *P. notatum* (Quarin et al. 1999).

Los análisis citoembriológicos de las subpoblaciones F₁-1 y F₁-2 mostraron que la mayoría de los individuos fueron capaces de producir SEA y que solo 5 individuos de un total de 88 no mostraron la capacidad de aposporía. Sumado a esto, el modelo que mejor ajustó a la segregación observada del carácter es la de 2 genes independientes. Estos resultados sugieren que la aposporía está controlada genéticamente por 2 genes. Si bien las poblaciones F₂ no fueron utilizadas en los análisis de herencia cualitativa (debido al bajo número de individuos), nos parece pertinente realizar las siguientes observaciones: suponiendo que los parentales F1#9 (1,22 %SEA) y F1#12 (0 %SEA) poseen los genotipos AaBb y aabb, respectivamente, la segregación esperada para la aposporía sería 3:1 (apospóricas:sexuales). Este modelo ajusta con la segregación observada (8:9) presentando un $\chi^2 = 0,93$ y un $p = 0,34$. En relación a esto, Marcon *et al.* (2019) realizaron un trabajo en donde analizaron la aposporía en progenies provenientes de cruzamientos entre parentales con diferente distancia genética y observaron que la mayor proporción de progenie con individuos apospóricos se alcanza cuando se cruzan parentales con mayor distancia genética. Por lo cual sugieren que la aposporía podría estar controlada por múltiples genes. Por otra parte, con los resultados obtenidos en este trabajo no podemos descartar la alternativa de que la aposporía no esté segregando en la población. Es decir, toda la progenie podría poseer los componentes genéticos que determinan la generación de SEA, sin embargo, algunos individuos producen proporciones tan bajas que no se detectan experimentalmente. En este contexto, se sugiere que existan varios genes/alelos con distinto grado de influencia sobre el carácter y que una diferente combinación de los mismos provoca diferencias en la expresividad.

Como se menciona en los resultados, las repeticiones interanuales han detectado que muchos de los genotipos que no habían mostrado SEA en una repetición, si han presentado finalmente la capacidad de producir SEA, aunque siempre en muy bajas proporciones (F1#52 y F2#6). Otros estudios en híbridos intraespecíficos de *Eragrostis curvula* reportaron también que alguno de los híbridos clasificados como completamente sexuales mostraron capacidad de formar sacos diplospóricos en años siguientes (Rodrigo et al, 2017). Estos resultados están de acuerdo con nuestros análisis y sugieren que aunque la capacidad de formar sacos embrionarios no reducidos esté presente no siempre se detecta.

Los análisis genéticos de segregación del carácter aposporía en tetraploides de *P. notatum* y *P. simplex* indican que se corresponde con un *locus* simple dominante (Martínez *et al.*, 2001; Pupilli *et al.*, 2001). En la mayoría de los casos se observa una distorsión en la segregación con mayor proporción de individuos sexuales respecto a la esperada (Martínez *et al.*, 2001; Stein *et al.*, 2004; Acuña *et al.*, 2011; Zilli *et al.*, 2015; Marcón *et al.*, 2019), obteniéndose resultados similares en especies del grupo *Plicatula* del género *Paspalum* (Aguilera *et al.*, 2011, 2015). La explicación posible para justificar esta distorsión fue la presencia de algún factor letal ligado a la aposporía (Martínez *et al.*, 2001; Pupilli *et al.*, 2001). En los modelos analizados a nivel tetraploide el hecho de una herencia simple y dominante, no descarta la intervención de múltiples genes incluidos en la región genómica ligada a la apomixis (ACL - *apomixis controlling locus*) ya que muchos trabajos han reportado falta de recombinación asociada a esta región (Martínez *et al.*, 2003. Stein *et al.*, 2004. Pupilli *et al.*, 2004. Stein *et al.*, 2007). Además, se ha informado una alta frecuencia de anomalías meióticas en las razas apomícticas que están ausentes en las sexuales (Podio, *et al.*, 2012b) y una gran tamaño de la región ACL que contiene secuencias altamente repetitivas (Martínez *et al.*, 2003; Akiyama *et al.*, 2004; Pupilli *et al.*, 2004; Stein *et al.*, 2004, 2007; Podio, *et al.*, 2012a) lo que dificulta el clonado de los genes que se encuentran en esta región.

Otro de los aspectos abordados en esta sección es el análisis cuantitativo de la expresividad de la aposporía y de la posibilidad de transferirse a la progenie. Para poder realizar estos estudios de forma consistente, en primer lugar, se analizó la estabilidad del carácter en diferentes condiciones ambientales. Nuestros análisis aportan luz al hecho de que, si bien la expresividad de la aposporía es variable frente a cambios de localidad, con gran variación en la latitud (desde -27.4667° a -33.0167°), las mediciones interanuales revelan estabilidad del carácter para todos los genotipos analizados. Otros estudios han revelado que la proporción de ovarios conteniendo sacos diplospóricos presenta variación interanual, en híbridos intraespecíficos de *Eragrostis curvula*. Los autores asignan estas variaciones al estrés producido por la interacción de genomas provenientes de genotipos tetraploides sexuales y apomícticos dado que frente a otras condiciones de estrés también se detectan variaciones en el comportamiento reproductivo (Rodrigo *et al.*, 2017). Esta variabilidad interanual también fue informada en la misma especie pero para genotipos tetraploides artificiales, que a pesar de ser considerados sexuales durante el primer año, la proporción de apomixis fue creciendo a lo largo

de cinco años de seguimiento, alcanzando un 85% de sacos no reducidos. Estos cambios estuvieron acompañados de cambios genéticos y epigenéticos involucrando posiblemente transposones (Zappacosta *et al.*, 2014). De esta manera se evidencia la variabilidad cuantitativa que presenta el comportamiento reproductivo, más específicamente la capacidad de generar sacos embrionarios no reducidos, frente a cambios ambientales y que se relacionan con los cambios que observamos en nuestro sistema cuando se cambia la localización de las plantas.

La cuantificación de la aposporía en las poblaciones F_1 muestra una gran variabilidad del carácter tras la hibridación. Existen varios trabajos en los que se analiza la transmisión de la expresividad de la apomixis en diferentes contextos y especies. Por ejemplo en *Ranunculus auricomus*, una especie apomíctica gametofítica, han analizado la transmisión de la expresividad de la apomixis en generaciones F_1 (Hojsgaard *et al.*, 2014) y F_2 (Barke *et al.*, 2018). El estudio citoembriológico de una población F_1 diploide generada a partir de la hibridación entre genotipos diploides sexuales permitió detectar células similares a las células iniciales de la aposporía en un 11-15% de los ovarios analizados (Hojsgaard *et al.*, 2014). Los análisis citoembriológicos de poblaciones F_2 mostraron que la frecuencia de aposporía se incrementa en la progenie respecto de los parentales en caso de que uno o ambos padres presenten capacidad de formar sacos no reducidos (Barke *et al.*, 2018). En función de estos resultados los autores proponen que la hibridación podría ser un activador de la reproducción apomíctica. Nuestros resultados estarían en línea con esta propuesta dado que la hibridación de dos genotipos diploides naturales con %SEA similares genera individuos (F_1) con incrementos significativos respecto de los parentales. Además, en el trabajo de *Ranunculus* observan que en las poblaciones F_2 los incrementos son mayores si ambos progenitores presentan aposporía y sugieren que la expresividad depende de un efecto de dosaje. Lo mismo podría deducirse de la expresividad de la aposporía en las poblaciones F_2 de *P. rufum*, en las que el grado de expresividad parece depender de los genotipos parentales. Esta variación se explicaría por las diferentes combinaciones/dosaje de alelos que segregan en la población. Otros trabajos realizados en *Paspalum notatum* muestran que las progenies provenientes de cruzamientos entre apomícticos y sexuales tetraploides generan una amplia variabilidad del carácter (Zilli *et al.*, 2015), resultados parecidos se observaron para *Boechera* (Aliyu *et al.*, 2010). Este tipo de resultados también inducen a proponer la existencia de factores genéticos que controlan la expresividad de la aposporía en diferentes dosajes (Zilli *et al.*, 2015).

Estos efectos de dosaje también pueden inferirse de la caracterización de los individuos generados a partir de la autopolinización del genotipo parental R5#49. Entre estos, uno de los descendientes muestra un incremento significativo, produciendo un alto porcentaje de SEA (31%) aun habiendo sido determinado en la localidad de Zavalla en donde nunca se obtuvieron valores mayores al 17%. Este incremento podría justificarse si pensamos que los alelos/genes que se encuentran en heterocigosis alcanzan la homocigosis después de la autopolinización y producen un incremento en la expresividad de la aposporía.

Otro de los temas abordados en esta sección es el análisis de la capacidad de completar la partenogénesis en la población F₁. Si bien la intención inicial era analizar la segregación de este carácter en toda la población, la necesidad de realizar cruzamientos controlados de todos los individuos en condiciones de campo dificultó mucho este estudio, sumado al requerimiento de obtener polen interespecífico de *P. urvillei* al mismo tiempo que las plantas de *P. rufum* se encontraban en plena floración. Esto nos forzó a analizar un número más acotado de individuos y por esta razón se seleccionaron genotipos con bajo y alto %SEA. En este punto tenemos que destacar que la población F₁ se obtuvo por el cruzamiento entre dos genotipos parentales que presentaban capacidades similares de producir SEA pero que solo uno de los genotipos parentales (R5#49) era capaz de completar la apomixis en un 15% de las semillas producidas por cruzamiento inter-ploide e inter-específico (*P. urvillei*) (Delgado *et al.*, 2014). En estos primeros trabajos, de caracterización de genotipos naturales diploides de *P. rufum*, se puso en evidencia que la capacidad de generar SEA no estaba estrictamente asociada con la capacidad de producir semillas por apomixis. Los genotipos diploides con SEA funcionales, que habían generado semillas BIII a partir de SEAs, no fueron capaces de producir semillas maternas, lo que sugirió que la partenogénesis podría ser el paso limitante para la reproducción apomíctica en estos genotipos diploides y ambos procesos aposporía y partenogénesis podrían estar desacoplados (Delgado *et al.*, 2014).

En *Poa pratensis* se propuso que la partenogénesis depende de la aposporía pero no viceversa y que son controlados por factores genéticos diferentes (Albertini *et al.*, 2001; Matzk *et al.*, 2005). Según nuestros resultados los genotipos que presentan mayor %SEA son los que forman semillas por apomixis, sin embargo en el híbrido F1#15 que tiene alto %SEA no se detectó apomixis a pesar de haberse analizado un gran número de semillas. Por otro lado, la proporción de semillas obtenidas por apomixis en los genotipos híbridos (0,8% y 2%) fue

mucho menor que la detectada en el genotipo parental R5#49 (15%). Esta baja transmisión de la capacidad de completar la apomixis también fue detectada en los individuos diploides F₁ de *Ranunculus* (0 semillas por apomixis) y en las F₂. En este trabajo de 600 semillas analizadas provenientes de 12 cruzamientos, solo 2 semillas se generaron por apomixis (Hojsgaard *et al.*, 2014; Barke *et al.*, 2018). En función de los análisis de la partenogénesis, si bien no podemos elaborar un modelo de herencia, si podemos inferir que la transferencia del carácter a la progenie, a nivel diploide, es mucho menos eficiente y probablemente este influenciada por otros factores genéticos/epigenéticos y el nivel de ploidía. Hasta el momento los estudios de apomixis gametofítica apospórica a nivel diploide han sido mucho más exhaustivos en el análisis de la producción de SEA que de la capacidad de completar la partenogénesis, lo que siempre es más difícil de evaluar. Por ejemplo, en un trabajo de *P. malacophyllum* en el que se evalúan diferentes accesiones, se observa que las semillas se producen mayoritariamente por apomixis, sin embargo en estadios tempranos del desarrollo se detectan SEM y megásporas funcionales (Hojsgaard *et al.*, 2013). Estos resultados llevan a proponer que en estadios jóvenes de desarrollo ambas rutas, sexual y apomíctica, coexisten y son inestables pero la apomixis es progresivamente estabilizada bajo las condiciones genéticas/epigenéticas y los niveles de ploidía adecuados. De esta manera, en los genotipos diploides de *P. rufum* si bien en estadios tempranos del desarrollo ambos procesos coexisten, el contexto genético/epigenético y la condición diploide favorecerían el desarrollo de sexual.

En breve podemos decir que en esta sección se demuestra la funcionalidad de los diferentes componentes de la apomixis a nivel diploide así como la posibilidad de transmitirlos trans-generacionalmente. Más aún la expresividad de la aposporía puede incrementarse a través de la hibridación de genotipos diploides y su grado podría depender de un efecto de dosaje de alelos o genes. El sistema propuesto en el presente trabajo permitirá la comprensión de la regulación de la apomixis a nivel diploide lo que posibilitaría su transmisión a especies diploides sexuales de gran importancia agronómica. Pero además, el conocimiento de los factores que afectan su grado de expresión se torna de especial importancia para los programas de mejoramiento. Estos se realizan con especies del género *Paspalum* de interés forrajero, y han informado que la frecuencia de individuos altamente apomícticos es siempre menor a la esperada (Acuña *et al.*, 2011; Zilli *et al.*, 2015).

IV.1- CONCLUSIONES

1. La expresividad de la aposporía se incrementa por la hibridación entre genotipos diploides.
2. La segregación del carácter aposporía en el citotipo diploide de *P. rufum* ajusta a un modelo de herencia dominante controlado por dos genes.
3. La expresividad de la aposporía en híbridos diploides experimentales de *P. rufum* es estable frente a variaciones interanuales del ambiente.
4. La expresividad de la aposporía en híbridos diploides experimentales de *P. rufum* disminuye significativamente con el aumento de la latitud.
5. La expresividad de la aposporía al nivel diploide en *P. rufum* se transmite transgeneracionalmente.
6. La mayor expresividad de la aposporía, a nivel diploide en *P. rufum*, no se asocia a una mayor capacidad de completar la apomixis.

SECCIÓN 2: CARACTERIZACIÓN DEL COMPORTAMIENTO REPRODUCTIVO DE INDIVIDUOS TETRAPLOIDES OBTENIDOS POR DUPLICACIÓN CROMOSÓMICA

IV.2.1- Obtención de individuos tetraploides por duplicación cromosómica mediante tratamientos con colchicina

Con el objetivo de analizar el efecto del incremento en los niveles de ploidía sobre el comportamiento reproductivo y la expresión de los componentes de la apomixis se procedió a la generación de individuos tetraploides a partir de genotipos diploides con comportamientos reproductivos contrastantes y conocidos. Al inicio de la presente tesis se contaba con dos genotipos tetraploides generados a partir semillas del genotipo diploide R6#45 tratadas con colchicina, denominados LD1 y LD3 (Delgado *et al.*, 2016). Además, se disponía de una planta mixoploide que presentaba mosaicos de células diploides y tetraploides, generada por medio de la misma técnica a partir del genotipo R5#49 (Delgado *et al.*, 2014). También se contaba con híbridos (F₁) diploides con alta expresividad de la aposporía y otros completamente sexuales (Delgado *et al.*, 2016). De esta forma con el propósito de obtener individuos duplicados a partir de individuos diploides con diferente comportamiento reproductivo se seleccionaron los genotipos: R5#49, F1#39, F1#9, F1#15 y F1#12.

Se realizaron cruzamientos entre F1#39 y F1#15 (32,8 y 35,8 %SEA) y entre F1#12 y F1#9 (0 y 1,22 %SEA) de los cuales se obtuvieron 120 y 50 semillas, respectivamente. Además, se obtuvieron 43 semillas de la autofecundación de la planta F1#9 y 5 semillas de la planta F1#12. Estas semillas fueron tratadas con diferentes soluciones de colchicina, según se describe en los Materiales y Métodos. Como resultado germinaron 13 plantas del primer cruzamiento y 4 plantas del segundo. Con el objetivo de detectar el nivel de ploidía de las plántulas obtenidas, se analizaron fragmentos de hojas provenientes de los diferentes macollos mediante citometría de flujo. Como control se empleó tejido foliar de un genotipo diploide. Estos análisis se llevaron

a cabo dos veces en el intervalo de un año. En ninguno de los casos fue posible encontrar tejidos duplicados por lo cual se decidió proceder con el protocolo alternativo.

Los genotipos diploides producen SEA y en muchos casos se verificó su funcionalidad, ya que producen individuos triploides y tetraploides a partir de la doble fertilización del SEA ($2n=2x$) con polen propio ($n=x$) (SIII) o con polen de individuos tetraploides ($n=2x$) (BIII) (Ver **Figura III-2** en materiales y métodos) (Delgado *et al.*, 2014). Por esto se optó por la estrategia de generar genotipos tetraploides a partir de cruzamientos controlados, se utilizó el genotipo diploide R5#49 ($2x$), que presenta alta proporción de SEA funcionales y capacidad de completar la apomixis y el genotipo tetraploide Q3756 ($2n=4x$). Mediante estos cruzamientos fue posible obtener 5 plantas tetraploides que fueron nombradas con el prefijo “MS” (**Figura 2.1-C**). Por otro lado, como se mencionó anteriormente, se contaba con el genotipo mixoploide LD2, por lo cual nos pareció una estrategia interesante realizar autofecundaciones en esa planta. Dada su condición, esta planta contiene mosaicos de células diploides y tetraploides, por lo tanto el nivel de ploidía de los SE dependería del nivel de ploidía de la célula que le da origen y de que el SE sea o no reducido. Por otro lado, el polen también podría presentar diferentes niveles de ploidía ($n=x$ o $n=2x$) dependiendo del nivel de ploidía del tejido de origen ($2n=2x$ o $2n=4x$). Explicado esto, las semillas tetraploides se podrían obtener a partir de SE reducidos ($n = 2x$) formados desde células duplicadas, o de SE no reducidos ($2n=2x$) formados a partir de células diploides y en ambos casos fecundados con polen reducido ($n=2x$) formado a partir de tejido duplicado. Esta estrategia permitió obtener 5 nuevos individuos tetraploides ($2n=4x$) provenientes del genotipo R5#49, los cuales fueron nombrados con el prefijo “LD2S” (**Figura 2.1-B**).

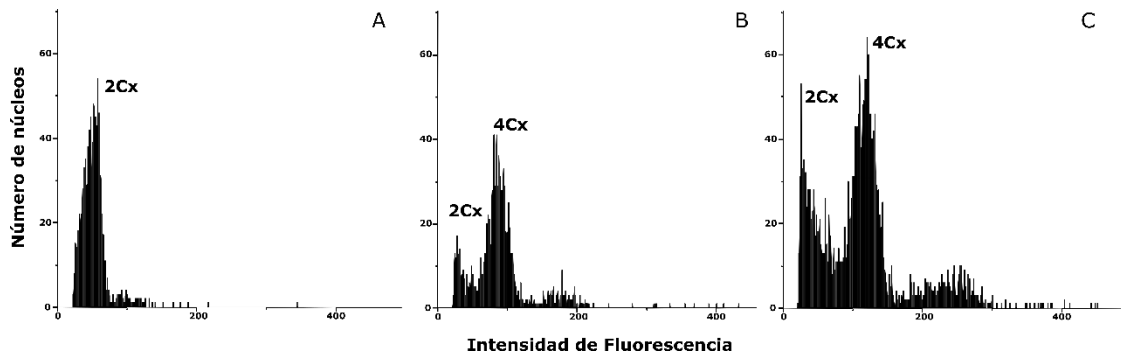


Figura 2.1. Histogramas (en escala lineal) de los niveles de contenido de ADN medido en hojas de plantas diploides y tetraploides de *Paspalum rufum*. A, histograma correspondiente a una planta diploide usada como control. B, planta tetraploide LD2S#3 obtenida a partir del genotipo LD2. C, planta tetraploide MS#9 obtenida mediante el cruzamiento de R5#49 y Q3756.

IV.2.2- Evaluación del comportamiento reproductivo de los individuos tetraploides

IV.2.2.1- Capacidad de producir sacos embrionarios apospóricos

Las primeras mediciones de la capacidad de generar sacos embrionarios apospóricos fueron realizadas en la localidad de Corrientes sobre individuos tetraploides provenientes del individuo R6#45, LD1 y LD3. Las observaciones citoembriológicas en anthesis de 72 óvulos de la planta LD1 mostraron que 23 de ellos (32%) producían ovarios con al menos un SEA acompañados siempre de un SEM. Para el individuo LD3 se observaron 61 ovarios, de los cuales 11 (18%) mostraron ovarios con un SEM junto a uno o más SEAs. En cuatro ovarios (6,55%) se observaron exclusivamente SEAs, mostrando un total de 24,6% de SEA. Las comparaciones del %SEA de las plantas duplicadas respecto de las diploides originales mostraron un incremento significativo ($p < 0,05$) de LD1 y LD3 en relación a R6#45 (**Figura 2.2**).

Las plantas LD1 y LD3 fueron trasladadas a Zavalla donde se continuó con las tareas de caracterización reproductiva. Las observaciones citoembriológicas realizadas sobre el genotipo LD1 mostraron que seis ovarios contenían SEA acompañados de SEM en un total de 53 óvulos analizados (11,32 % SEA). Mientras que el genotipo LD3 presentó 7 ovarios conteniendo SEA acompañados de SEM de 47 ovarios observados (14,89 % SEA). La comparación de las proporciones de sacos embrionarios apospóricos de estos genotipos,

respecto al individuo diploide que les dio origen (R6#45) (3,6% SEA) mostró nuevamente que ambos genotipos tetraploides generaron aumentos significativos ($p < 0,05$) en la proporción de SEA con respecto al diploide (**Figura 2.3-A; Tabla 2.1**).

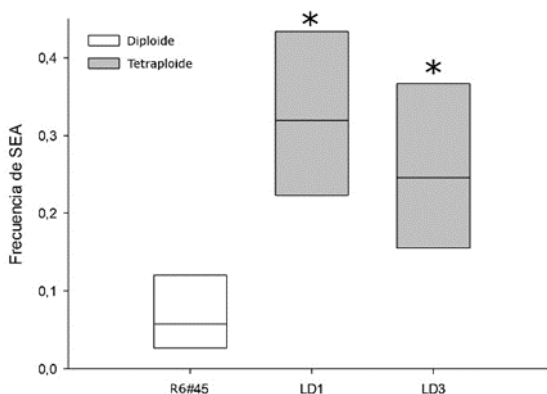


Figura 2.2. Gráficos de cajas mostrando los intervalos de confianza al 95%, de la frecuencia de ovarios que contienen SEA, en cada planta y siendo la línea el valor promedio. Las cajas grises representan los individuos duplicados con colchicina (LD1 y LD3) y la blanca el individuo R6#45 que les dio origen. Todas las mediciones se realizaron en Corrientes. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a R6#45 ($p < 0,05$).

Por otro lado, las cuantificaciones de los %SEA realizadas sobre los genotipos tetraploides generados a partir del genotipo diploide R5#49 se observan en la **Figura 2.3-B** y **Tabla 2.1**. Dos de los genotipos tetraploides (LD2S#15 y LD2S#22) produjeron un incremento significativo en el %SEA (13,4 %SEA y 15,1 %SEA, respectivamente) respecto al genotipo diploide que les dio origen (6,4 % SEA). Mientras que los tres genotipos tetraploides restantes (LD2S#16, LD2S#34 y LD2S#22) no mostraron diferencias significativas respecto al diploide (**Figura 2.3-B**).

De los genotipos duplicados obtenidos mediante cruzamientos con un tetraploide natural (R5#49 x Q3756) solo se colectaron inflorescencias para realizar mediciones de aposporía de la planta MS#9. La cual mostró una formación de 2,9 %SEA en 103 óvulos medidos en el año 2018. Este porcentaje no fue significativamente diferente al generado (6,4 %SEA) por el individuo diploide que le dio origen (R5#49) en Zavalla (**Tabla 2.1**).

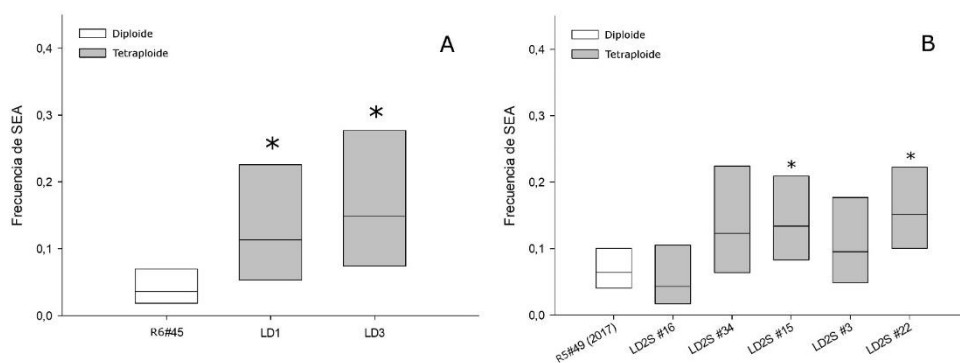


Figura 2.3. Gráficos de cajas mostrando los intervalos de confianza al 95%, de la frecuencia de ovarios que contienen SEA, en cada planta y siendo la línea el valor promedio. Las cajas grises representan los individuos duplicados con colchicina y las blancas el individuo diploide que les dio origen. Todas las mediciones se realizaron en Zavalla. **A** muestra los genotipos tetraploides generados a partir de R6#45. **B** muestra los genotipos tetraploides generados a partir de R5#49. Los asteriscos indican diferencias significativas de con respecto al diploide ($p < 0,05$).

IV.2.2.2.- Influencia del ambiente sobre la expresividad de la aposporía

De manera similar a lo realizado en la sección anterior para los individuos diploides, se realizaron comparaciones de las proporciones de SEA de los individuos tetraploides generados experimentalmente en dos ambientes (Corrientes y Zavalla) y en dos años seguidos. Para realizar las comparaciones entre las dos localidades se utilizaron los datos de los genotipos LD1 y LD3 mencionados en la sección anterior. Los resultados de esta comparación mostraron que el genotipo LD1 medido en Zavalla (11,32 % SEA) disminuyó significativamente la cantidad de SEA respecto de cuando fue medido en Corrientes (32% SEA). Asimismo, el genotipo LD3 también generó menor cantidad de SEA en la localidad de Zavalla (14,89 % SEA) que en Corrientes (24,6% SEA), aunque en este caso las diferencias no fueron estadísticamente significativas. **Tabla 2.1.**

Otra comparación fue realizada entre los genotipos LD2S durante dos años consecutivos (2017 y 2018), en ambos casos en la localidad de Zavalla. Los genotipos utilizados para este ensayo fueron: LD2S#3, LD2S#34 y LD2S#22. Ninguna de las plantas duplicadas medidas en este ensayo mostró diferencias estadísticamente significativas entre un año y otro. Los intervalos de confianza (IC) para las proporciones de óvulos llevando SEA se observan en la **Figura 2.4.**

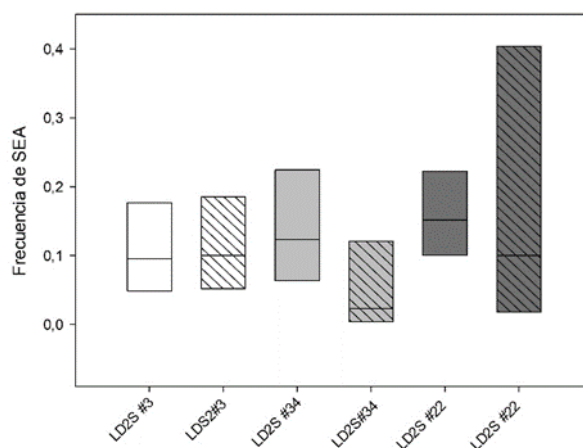


Figura 2.4. Expresividad de la aposporía en genotipos tetraploides experimentales de *Paspalum rufum* medidos en dos campañas diferentes (2017/18 y 2018/19). Las cajas representan los intervalos de confianza al 95%, de la frecuencia de ovarios que contienen SEA, en cada planta y la siendo línea el valor promedio. Los diferentes colores indican cada genotipo. Las cajas lisas representan las mediciones realizadas en 2017/18 mientras que las cajas rayadas indican las mediciones realizadas en 2018/19. Los asteriscos indican diferencias significativas de expresividad de aposporía entre los dos años. ($p < 0,05$).

Tabla 2.1. Detalle de la caracterización reproductiva mediante análisis citoembriológicos de individuos tetraploides de *Paspalum rufum* obtenidos artificialmente.

| Individuos | Individuo diploide originante | Año de medición | Lugar | Nº de ovarios | %SEA |
|------------|-------------------------------|-----------------|------------|---------------|------|
| LD1 | R6#45 Ch | 2014 | Corrientes | 72 | 31,9 |
| LD3 | R6#45 Ch | 2014 | Corrientes | 61 | 24,6 |
| LD1 | R6#45 Ch | 2018 | Zavalla | 53 | 11,3 |
| LD3 | R6#45 Ch | 2018 | Zavalla | 47 | 14,9 |
| LD2S #3 | R5#49 Ch | 2017 | Zavalla | 84 | 9,5 |
| LD2S #34 | R5#49 Ch | 2017 | Zavalla | 65 | 12,3 |
| LD2S #15 | R5#49 Ch | 2017 | Zavalla | 112 | 13,4 |
| LD2S #16 | R5#49 Ch | 2017 | Zavalla | 93 | 4,3 |
| LD2S #22 | R5#49 Ch | 2017 | Zavalla | 132 | 15,2 |
| LD2S#3 | R5#49 Ch | 2018 | Zavalla | 80 | 10,0 |
| LD2S#34 | R5#49 Ch | 2018 | Zavalla | 43 | 2,3 |
| LD2S#22 | R5#49 Ch | 2018 | Zavalla | 10 | 10,0 |
| MS#9 | R5#49 Cr | 2018 | Zavalla | 103 | 2,9 |
| MS#1 | R5#49 Cr | nd | Zavalla | nd | nd |
| MS#3 | R5#49 Cr | nd | Zavalla | nd | nd |
| MS#4 | R5#49 Cr | nd | Zavalla | nd | nd |
| MS#6 | R5#49 Cr | nd | Zavalla | nd | nd |

%SEA, porcentaje de sacos embrionarios apospóricos (solos o acompañados)

nd, no determinado

Ch, obtenido mediante tratamiento de semillas con colchicina

Cr, obtenidos por cruzamientos interploides

IV.2.2.3- Producción de semillas y capacidad de completar la apomixis en los individuos tetraploides

Como se describe en los Materiales y Métodos la capacidad de realizar partenogénesis se evalúa mediante citometría de flujo utilizando el método de FCSS (Matzk *et al.* 2000). Este método determina la vía reproductiva de cada semilla a partir de la comparación de los niveles de ploidía del embrión y del endosperma (**Figura III-2** de Materiales y Métodos). Para realizar esta determinación se obtuvieron semillas de las plantas duplicadas mediante varios tipos de cruzamientos (ver detalle en Materiales y Métodos). Para obtener semillas por autopolinización se procedió tanto ensobrando inflorescencias antes de la antesis o en presencia de polen de *Paspalum urvillei* (polen mentor) como se hizo con los individuos diploides. Por último, se dejaron algunas inflorescencias para obtener semillas por polinización abierta. En la **Tabla 2.2** se muestra el número de espiguillas llenas sobre el total de espiguillas cosechadas para cada cruzamiento. Tanto en las plantas duplicadas provenientes del genotipo R6#45 como del genotipo R5#49 los porcentajes de semillas obtenidos en cualquier tipo de cruzamiento fueron bajos. La escasa cantidad de semillas logradas bajo autopolinización y bajo cruzamientos con *P. urvillei* sugiere que la duplicación genómica no modificó la/s barrera/s de autoincompatibilidad. Sin embargo, tampoco se obtuvo gran cantidad de semillas 12,89 % (MS#6) bajo polinización abierta. Estas determinaciones se realizaron en los genotipos: LD1, LD3, LD2S#3, LD2S#22 y LD2S#34.

En la **Tabla 2.3** se muestra el resultado del análisis de las semillas realizado mediante citometría de flujo para determinar la vía reproductiva que originó a las mismas y en la **Figura 2.5** se muestran ejemplos de los diferentes histogramas obtenidos para los genotipos duplicados. La **Figura 2.5-A** muestra un ejemplo del gráfico de citometría de una semilla de origen sexual formada a partir de un SEM, es decir, con una relación de contenido de ADN embrión:endosperma 4:6 (embrión contiene una contribución materna y otra paterna ($2x + 2x$) y el endosperma dos maternas ($4x$) y una paterna ($2x$)). La **Figura 2.5-B** muestra de una semilla formada a partir de un SEA polinizado por el polen propio reducido con una relación embrión:endosperma 6:10 (el embrión presenta una contribución materna ($4x$) y una contribución paterna ($2x$) y el endosperma dos contribuciones maternas ($8x$) y una contribución paterna ($2x$)). Y por último la **Figura, 2.5-C** muestra un gráfico de citometría de una semilla

generada por apomixis, donde la relación embrión: endosperma es 4:10 (embrión formado por una contribución materna de ADN (4x) y un endosperma con dos contribuciones maternas (8x) y una paterna (2x)).

Todos los individuos, mostraron habilidad para completar la apomixis bajo alguna de las condiciones de polinización, especialmente bajo autopolinización. Es decir, estas plantas formaron sacos embrionarios no reducidos, los embriones se formaron por partenogénesis y el desarrollo del endosperma tuvo un balance genómico materno: paterno diferente del 2:1.

Los genotipos LD1 Y LD3 no formaron semillas por apomixis en condiciones de polinización abierta pero sí lograron completar la apomixis por autopolinización y por cruzamientos con *P. urvillei*, algo que las diferencia del genotipo diploide original R6#45 que no fue capaz de producir semillas a partir de los SEA bajo ninguna condición de polinización (Delgado *et al.*, 2014). En LD1, de un total de ocho semillas generadas por autofecundación se detectó una de origen apomítico, mientras que para el genotipo LD3 se detectaron cuatro semillas apomíticas de 29 analizadas, alcanzando porcentajes de 12,5 % y de 13 % de apomixis, respectivamente (**Figura 2.5-C**). En el genotipo LD3 el cruzamiento con *P. urvillei* (4x) produjo una semilla apomítica y otra semilla híbrida BIII de 169 analizadas (**Tabla 2.3** y **Figura 2.5-B**).

Tabla 2.2. Producción de semillas según los diferentes tipos de cruzamientos de los genotipos duplicados artificialmente.

| Individual | Polinización abierta (%) | Autopolinización (%) | Cruzamiento con <i>P. urvillei</i> 4x (%) |
|------------|--------------------------|----------------------|---|
| LD1 | 32 (2.53) | 8 (0.21) | 7 (0.36) |
| LD3 | 154 (7.59) | 29 (2.04) | 169 (7.68) |
| LD2S#3 | 27 (0,45) | 8 (0,34) | ND |
| LD2S#22 | 6 (0,02) | 38 (0,36) | ND |
| LD2S#34 | 13 (0,51) | 1 (0,04) | ND |
| LD2S#15 | 1 (0,84) | 0 | ND |
| LD2S #16 | 16 (4.63) | 0 | ND |
| MS#9 | 93 (9.61) | 10 (2.44) | ND |
| MS#6 | 39 (12.89) | ND | ND |

(%) Porcentaje de espiguillas llenas respecto al total de espiguillas recolectadas
ND no determinado

En el caso de los individuos duplicados derivados del genotipo diploide R5#49, se observó que todos fueron capaces de formar semillas apomíticas, ya sea mediante autofecundación, por polinización abierta o por ambas vías. Los genotipos LD2S#3 y LD2S#22 mediante autofecundación, lograron alcanzar un 25 % y un 9,7 % de apomixis en un total de 8 y 31 semillas analizadas, respectivamente. Para el genotipo LD2S#34 no se obtuvieron suficientes semillas para su análisis. Mientras que, en polinización abierta, en los genotipos LD2S#3 y LD2S#34 se obtuvieron 3,7 % y 6,7 % de semillas de origen apomítico de un total de 27 y 12 semillas analizadas, respectivamente (**Tabla 2.3**). Además, bajo esta condición, no fue posible detectar semillas de origen apomítico para el individuo LD2S#22, posiblemente debido al bajo número de semillas que se analizaron (6). Las plantas tetraploides generadas a partir del genotipo diploide R5#49 no generaron un incremento significativo en el porcentaje de semillas apomíticas respecto al diploide original, sin embargo, la principal diferencia que se observa es que estos tetraploides lograron generar semillas apomíticas bajo polinización abierta.

Tabla 2.3. Determinación del origen reproductivo de semillas producidas bajo diferentes tipos de polinización en individuos tetraploides artificiales de *P. rufum*.

| Individuo | Polinización | N° de semillas | | | % de SEA | % de Apomixis |
|-----------|------------------------|----------------|------------------|------|----------|---------------|
| | | total | Vía reproductiva | | | |
| | | | Sexual | BIII | | |
| LD1 | Abierta | 32 | 32 | 0 | 0 | 0 |
| | Autopolinización | 8 | 7 | 0 | 1 | 11,32 |
| | x <i>P.urvillei</i> 4x | 6 | 6 | 0 | 0 | 0 |
| LD3 | Abierta | 20 | 20 | 0 | 0 | 0 |
| | Autopolinización | 29 | 25 | 0 | 4 | 14,89 |
| | x <i>P.urvillei</i> 4x | 169 | 167 | 1 | 1 | 0,6 |
| LD2S # 3 | Abierta | 27 | 26 | 0 | 1 | 3,7 |
| | Autopolinización | 8 | 6 | 0 | 2 | 25 |
| LD2S # 22 | Abierta | 6 | 6 | 0 | 0 | 0 |
| | Autopolinización | 31 | 28 | 0 | 3 | 9,7 |
| LD2S # 34 | Abierta | 12 | 10 | 0 | 2 | 16,7 |

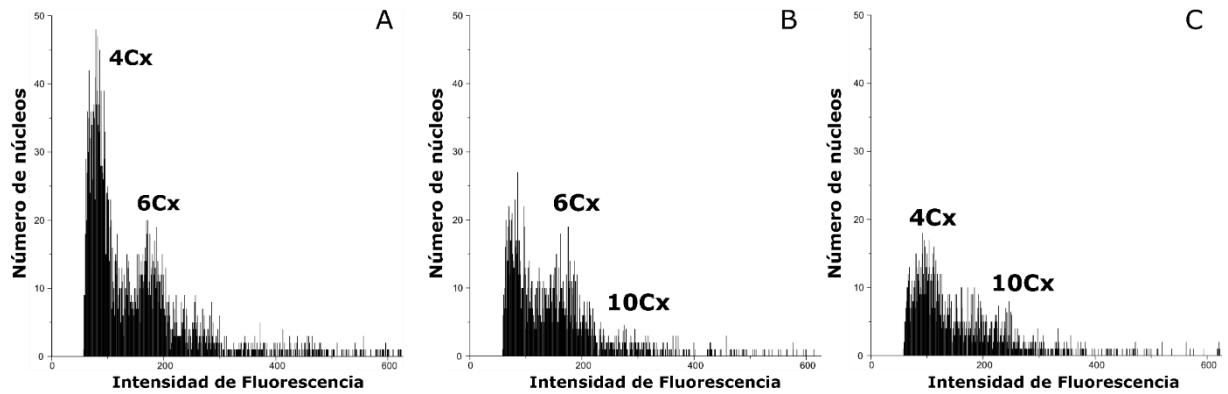


Figura 2.5. Histogramas de semillas individuales mostrando diferentes relaciones embrión:endosperma de ADN. **A**, histogramas de semillas mostrando una relación embrión:endosperma 4:6 de ADN correspondiente a la doble fecundación de un SEM por un núcleo espermático reducido de *P.rufum* tetraploide. **B**, histogramas de semillas con una relación embrión:endosperma 6:10 de ADN, derivada de la doble fecundación de un SEA mediante una célula espermática reducida de *P.rufum* tetraploide. **C**, histogramas de semillas con una relación embrión:endosperma 4:10 de ADN, derivada del desarrollo por partenogénesis de una célula huevo de un SEA y de la fertilización de los núcleos polares mediante una célula espermática reducida de *P.rufum* tetraploide.

IV.2- DISCUSIÓN

Como se describe en la introducción existe una asociación muy fuerte entre la apomixis gametofítica, la hibridación y la poliploidía (Savidan, 2000). Sin embargo, los mecanismos mediante los cuales estos factores modifican la presencia y expresión del carácter aún se desconocen. En la sección 1 se analizó el efecto de la hibridación sobre la expresividad de la apomixis a nivel diploide, detectándose un incremento de la expresividad de la aposporía y una transmisión de la partenogénesis después de la hibridación entre genotipos con capacidad de producir SEA y de completar la apomixis.

Con el propósito de continuar con estos análisis en esta sección se analizó el efecto de la poliploidización sobre genotipos diploides previamente caracterizados en cuanto a su modo de reproducción. Según estudios previos, Carman (1997) postula la hipótesis de la “asincronía de los genes duplicados” asociada a la expresión de la apomixis. El autor propone que los genes duplicados por la poliploidización se expresan asincrónicamente y causan anomalías en el desarrollo. De esta manera la apomixis podría desencadenarse si dos genomas diferentes, superpuestos en el poliploide, expresan sus señales relacionadas al desarrollo reproductivo asincrónicamente, generando, por ejemplo, la aparición ectópica de SE, como sucede en las plantas apomícticas (Carman, 1997). La asincronía, podría también ser inducida por la poliploidía en sí misma, provocando diferencias en la duración de los distintos estadios de desarrollo femenino (Carman, 1997). Uno de los postulados que apoya este mecanismo manifiesta que la mayor duración de la meiosis que se observa en los genotipos poliploides respecto de los diploides, favorecería la formación de SEA (Savidan, 1982; Roche *et al.*, 2001).

Muchas de las especies que integran el género *Paspalum* se encuentran organizadas en complejos agámicos compuestos por citotipos diploides, sexuales y autoincompatibles y citotipos poliploides, mayoritariamente tetraploides apomícticos, pseudógamos y autofértiles (Quarin, 1992). Como se menciona previamente la evidencia de genotipos diploides de *Paspalum rufum* capaces de completar la apomixis confirman la presencia de los determinantes

genéticos del carácter, pero su expresividad, por razones aún desconocidas, estaría reprimida a este nivel de ploidía.

Con el propósito de comprender la relación entre la poliploidía y el desarrollo de la apomixis se han realizado muchos experimentos de duplicación genómica ya sea por tratamiento con colchicina de tejidos o semillas, así como por cruzamientos controlados. En varios de estos trabajos, se han obtenido autoploidos a partir de duplicaciones genómicas de diploides en especies apomícticas como *P. notatum*, *P. plicatulum*, *Tripsacum*, *Panicum* y *Brachiaria decumbens* y en todos estos casos los individuos obtenidos fueron completamente sexuales (Burton *et al.*, 1970; Savidan, 1982; Leblanc *et al.*, 1995; Salon y Earle, 1998; Sartor *et al.*, 2009; Simioni y Borges Do Valle, 2009). Quarin *et al.*, (2001) obtuvieron un autotetraploide completamente sexual a partir de *Paspalum notatum*, pero en este caso particular el genotipo diploide había sido analizado por citoembriología y se lo había clasificado como completamente sexual. Sin embargo, en otros experimentos en *Paspalum hexastachyum* y *Paspalum notatum* la duplicación genómica, por los mismo tratamientos, generó genotipos tetraploides capaces de producir SEA (Quarin y Hanna, 1980; Quarin *et al.*, 2001). En cuanto a nuestros resultados se observa que todos los genotipos tetraploides obtenidos son capaces de generar SEA, lo que es de esperar dado que los diploides originales presentan capacidad de formar SEA.

Para profundizar la caracterización analizamos nuevamente la influencia de las modificaciones ambientales sobre la expresividad de la aposporía. El cambio de localidad de Corrientes a Zavalla, disminuye la expresividad del carácter, para los dos genotipos analizados (LD1 y LD3), sin embargo, en el caso de las mediciones interanuales no se observan variaciones significativas de la expresividad de la aposporía en ninguno de los tres autotetraploides evaluados.

Los análisis comparativos entre los genotipos diploides originarios y los autotetraploides muestran que en la mayoría de los individuos duplicados (cuatro de siete), la expresividad de la aposporía aumenta significativamente respecto de los diploides, sin embargo, en otros tres autoploidos no se detectan variaciones significativas respecto de las diploides originales. Nuestros resultados pueden compararse con trabajos similares realizados por Quarin *et al.* (1998) en *P. rufum* en los que obtienen un autoploide por tratamiento con colchicina

que presenta menor %SEA respecto del diploide original (Quarin *et al.*, 1998; Siena *et al.*, 2008). Pero en otros trabajos de Quarin *et al.* (2001), los análisis cuantitativos de autotetraploides de *P. notatum* muestran una alta proporción de SEA en las plantas duplicadas (42 %SEA – 66 %SEA), respecto a los genotipos de la población diploide originaria (0,4 %SEA - 1,1 %SEA). Estos resultados apoyan la hipótesis de que el fondo genético de los diploides originales podría afectar, probablemente por efecto de dosaje, la expresividad del carácter de los autotetraploides.

Antes de continuar con la evaluación del comportamiento reproductivo de los autotetraploides es necesario aclarar que los tipos de análisis que se realizan para esta caracterización brindan diferente información que debe considerarse para no malinterpretar los resultados. Los estudios citoembriológicos permiten cuantificar el %SEA, los que se diferencian claramente de los SEM, sin embargo esta observación no garantiza la funcionalidad de los mismos ni la capacidad de la planta de poder producir semillas por apomixis. Para completar la caracterización se realizan análisis de citometría de flujo de semillas y test de progenies. En el primer caso se puede deducir el comportamiento reproductivo que dio origen a las semillas, a partir de la relación genómica embrión/endosperma, y en el segundo caso se identifican aquellos individuos que son clonales respecto del genotipo materno. Siguiendo este razonamiento nos propusimos analizar la funcionalidad de los SEA y la capacidad de completar la apomixis de los autotetraploides por medio de citometría de flujo. Para tal fin el primer paso fue producir semillas a partir de polinización abierta, autopolinización y por cruzamientos controlados con *P. urvillei*, es decir, utilizando polen inter-específico como mentor para favorecer la autopolinización. En el caso de *P. rufum* se sabe que en las poblaciones naturales el citotipo tetraploide es apomítico y autofértil, mientras el citotipo diploide es sexual y autoincompatible aun cuando se encuentren individuos capaces de producir SEA y completar la apomixis en condiciones forzadas de autopolinización (Sartor *et al.*, 2011; Delgado *et al.*, 2014). En el presente trabajo se observa que todos los autotetraploides analizados generaron semillas por apomixis en alguno de los cruzamientos. Además, hay dos características que llaman la atención, por un lado que aquellos genotipos duplicados a partir del genotipo R6#45, que no mostró capacidad de producir semillas por partenogénesis (Delgado *et al.*, 2014), tras el solo hecho de incrementar los niveles de ploidía se obtuvieron semillas por apomixis (bajo autopolinización), aun cuando las semillas obtenidas en estas condiciones fueron muy pocas. Y

por otro lado, en el caso de los genotipos duplicados a partir del genotipo diploide R5#49 también se detectaron semillas provenientes de la apomixis en condiciones de autopolinización, en mayores proporciones que LD1 y LD3, y en condiciones de polinización abierta, lo que no había sido observado en ningún diploide (Delgado *et al.*, 2014) ni autotetraploide de *P. rufum*. En el caso de *P. notatum* uno de los genotipos duplicados obtenidos por Quarín *et al.* (2001) fue evaluado según su comportamiento reproductivo a través de test de progenies tanto de las plantas provenientes de autopolinización como de cruzamientos controlados intraespecíficos confirmando apomixis en ambos casos. En función de estos resultados se propone un efecto de dosaje alélico que se incrementa en el autopoliploide respecto de los diploides, y por lo tanto incrementa el grado de expresión de los genes responsables de la apomixis. Nuestros resultados, están en línea con esta propuesta de manera que la expresión de la apomixis se ve favorecida a nivel tetraploide respecto de los genotipos diploides. Esta expresión varía de acuerdo al genotipo diploide original dado que algunos de los autopoliploides solo producen semillas por partenogénesis en condiciones especiales de autopolinización (provenientes de R6#45) y otros (provenientes de R5#49) en condiciones de polinización abierta alcanzando hasta un 16% de semillas producidas por apomixis. Por lo tanto, podemos decir que claramente el fondo genético original de los genotipos diploides afecta la expresión de la apomixis en los genotipos autopoliploides. Por otro lado, es importante remarcar que los resultados presentados muestran que la poliploidización, en ningún caso induce la expresión de la apomixis en niveles comparables con los apomícticos naturales de *Paspalum ssp.* Que presentan entre 70 % -100 % de apomixis (Rebozzio *et al.*, 2011; Sartor *et al.*, 2011).

En cuanto a las causas que puedan provocar estos cambios en el comportamiento tras la poliploidización existen estudios en *Paspalum* y *Eragrostis* que evidencian modificaciones genómicas asociadas a los incrementos en los niveles de ploidía, que están principalmente relacionadas con regiones metiladas, las cuales son traducidas en cambios en el transcriptoma (Martelotto *et al.*, 2007; Mecchia *et al.*, 2007). Estudios más recientes en *Eragrostis curvula* sugieren que el incremento en la expresión de la apomixis en plantas autotetraploides se asocia con cambios genéticos y epigenéticos que incluyen además transposones (Zappacosta *et al.*, 2014).

De esta manera podemos resumir que, según los resultados previos, los determinantes genéticos de la apomixis están presentes a nivel diploide en el género *Paspalum*, sin embargo,

a este nivel de ploidía la expresión de la sexualidad prevalece sobre la apomixis. La poliploidía favorece la expresión de la apomixis probablemente porque se producen cambios genéticos/epigenéticos que modifican la expresión de genes relacionados con el desarrollo reproductivo o por el dosaje de alelos/genes que inducen la aparición de mayor cantidad de SEA o la capacidad de completar la partenogénesis y/o el desarrollo del embrión. Los resultados mostrados en el sección 1 muestran que la hibridación a nivel diploide permite incrementar el grado de aposporía probablemente mediante diferentes combinaciones de alelos/genes. En la presente sección se verifica que la autoploidía puede aumentar el grado de aposporía y favorecer la expresión de la apomixis dependiendo del genotipo diploide original.

IV.2- CONCLUSIONES

1. Es posible obtener individuos tetraploides a partir del individuo R5#49 mediante cruzamientos interploides (2x vs. 4x).
2. Es posible incrementar la expresividad de la aposporía mediante la poliploidización.
3. La expresividad de la aposporía en los individuos tetraploides artificiales es estable frente a variaciones interanuales.
4. La expresividad de la aposporía en los individuos tetraploides artificiales se ve afectada por el factor latitud.
5. La poliploidización incrementa la capacidad de completar la apomixis, pero no es suficiente para lograr genotipos completamente apomíctico.

SECCIÓN 3: MAPEO GENÉTICO Y DETECCIÓN DE MARCADORES ASOCIADOS A LA AOSPORÍA EN UNA POBLACIÓN F₁ SEGREGANTE

IV.3.1- Mapeo de ligamiento genético en una población F₁ de *Paspalum rufum* diploide

Con el propósito de caracterizar el genoma de *P. rufum*, construir un mapa de ligamiento genético y detectar regiones genómicas asociadas a la aposporía se generaron marcadores moleculares del tipo AFLP en una población diploide obtenida a partir del cruzamiento entre los genotipos R6#45 y R5#49. La estrategia de mapeo se basó en la detección de ligamientos en una población de tipo F₁ (*pseudo-test cross*), obtenida a partir de dos genotipos diploides heterocigotas que mostraron 5,77% (R6#45) y 13% (R5#49) de óvulos conteniendo sacos embrionarios apospóricos, respectivamente. La totalidad de los individuos de la población fueron caracterizados en cuanto a su modo reproductivo tal como se describe en la sección 1.

El método de extracción ADN utilizado permitió la obtención de muestras de buena calidad de ambos progenitores y de 88 plantas F₁ totales. Sin embargo, la planta F1#86 no pudo ser incluida en los análisis de ligamiento debido a problemas en la reacción de restricción y ligación de adaptadores durante la preparación de los marcadores de AFLP, por lo que finalmente se utilizaron 87 plantas para los estudios de ligamiento. Luego de la preamplificación, se ensayaron 105 combinaciones de cebadores selectivos utilizando solamente los genotipos parentales por duplicado. Cada combinación presentó en promedio 59,5 ($\pm 15,7$) fragmentos de las cuales 17,5 ($\pm 5,3$) mostraron polimorfismos entre los genotipos parentales. A partir de estos resultados, se seleccionaron 33 combinaciones de cebadores que presentaban al menos 15 fragmentos polimórficos entre los parentales para ser analizadas en toda la población. Los marcadores fueron resueltos utilizando electroforesis capilar en un secuenciador ABI 3130xl Genetic Analyzer (Bocchini *et al.*, 2018). Los perfiles de electroforesis de los progenitores y de cada individuo F₁ fueron comparados gráficamente utilizando el programa informático GeneMapper version 3.7 (Applied Biosystems). Para los análisis de los

marcadores moleculares de AFLP se seleccionaron los picos que presentaron una absorción por encima 100 unidades relativas de fluorescencia, que estaban en el rango de 50-500 pb y que mostraron segregación en la población. En la **Figura 3.1** se muestra un detalle de los perfiles de amplificación.

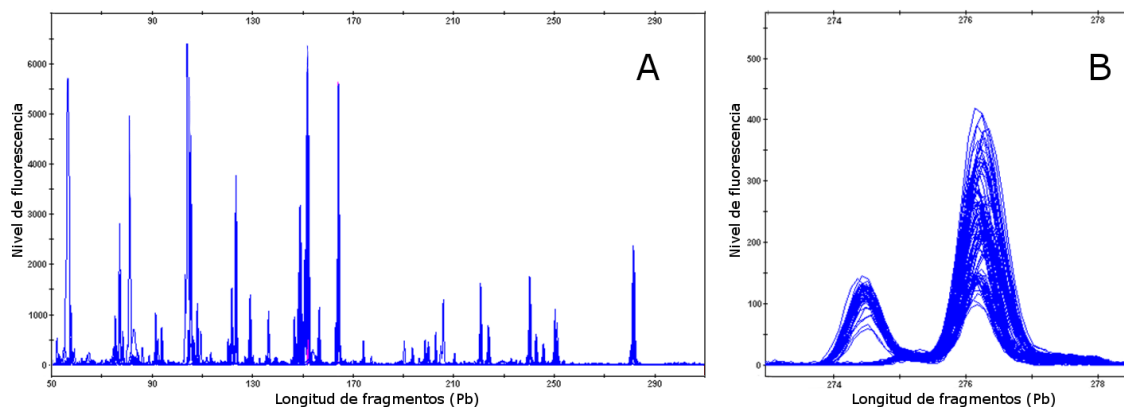


Figura 3.1. Gráficas de los perfiles de amplificación de marcadores de AFLP obtenidos con el secuenciador ABI 3130xl, visualizados con el programa Genetic Analyzer (Life technologies). **A)** Detalle del perfil de amplificación de la combinación de cebadores *EcoRICAC-MseICTG* en el rango de 10- 300 pb sobre la población. **B)** Detalle de un perfil de amplificación con aumento de escala. El pico de la izquierda representa un marcador polimórfico mientras que el pico de la derecha representa un marcador monomórfico.

Los datos de presencia/ausencia de los marcadores detectados fueron volcados en una matriz binaria en donde 1 y 0 indican la presencia y ausencia del marcador, respectivamente. En total se obtuvieron 627 marcadores polimórficos, de los cuales 278 correspondieron a marcadores segregantes solo a partir del parental R6#45, 239 a marcadores segregantes solo del parental R5#49 y 110 a marcadores segregantes desde ambos progenitores. A partir de la matriz binaria obtenida, se determinaron las configuraciones alélicas de cada marcador de acuerdo a los valores esperados para marcadores en dosis simples en cada uno de los genotipos parentales 1:1 (parentales) o marcadores en dosis simple segregantes desde ambos genotipos parentales 3:1 (biparentales). De esta forma se obtuvieron 266 marcadores que ajustaron a la segregación esperada 1:1 provenientes del parental R6#45 ($\chi^2 = 0 - 3,4$), 221 marcadores provenientes del genotipo R5#49 ($\chi^2 = 0 - 3,4$) y 94 marcadores presentes en ambos parentales que ajustaron a una segregación 3:1 ($\chi^2 = 0 - 3,8$). Se detectaron además, 46 (7,3 %) marcadores que no ajustaron a ninguno de los valores esperados ($\chi^2 = 4,1 - 104,3$) (**Tabla 3.1**).

Tabla 3.1. Segregación de marcadores AFLP en la población de mapeo.

| Parental | Pares de cebadores de AFLP | Número de marcadores | Tipos de segregación | | |
|-------------|----------------------------|----------------------|----------------------|-----|---------------------|
| | | | 1:1 | 3:1 | dist ^a . |
| R6#45 | 33 | 278 | 266 | - | 12 |
| R5#49 | 33 | 239 | 221 | - | 18 |
| R6#45-R6#49 | 33 | 110 | - | 94 | 16 |

^a segregación distorsionada ($p < 0.05$)

Con la finalidad de construir mapas de ligamiento correspondientes a cada genotipo parental se generaron 2 matrices de datos teniendo en cuenta los datos de segregación de cada genotipo. La matriz correspondiente al progenitor materno incluyó 360 marcadores segregantes de R6#45 (266 marcadores parentales y 94 biparentales) y la del progenitor paterno 315 marcadores provenientes de R5#49 (221 parentales y 94 biparentales). En ninguna de las dos bases de datos genotípicos se incluyeron los marcadores clasificados como distorsionados. Para la construcción de los mapas (detección de ligamientos y el ordenamiento de los marcadores) se utilizó el programa JoinMap 4.0, utilizando la opción CP (*outbreeder full-sib family*) y fase de ligamiento desconocida (Van Ooijen, 2006).

En un primer paso se detectaron y descartaron marcadores con un porcentaje de similitud mayor al 98% (utilizando la opción *similarity of loci* de JoinMap 4.0), así como los individuos genéticamente idénticos (mediante la opción *similarity of individuals* de JoinMap 4.0) (ver más abajo). Posteriormente, la secuencia de trabajo fue la siguiente: se conformaron grupos de cosegregación de marcadores a un valor de LOD mayor a 6,0 y una frecuencia de recombinación menor a 0,4 ($r_{max}=0,4$). Una vez establecidos los grupos de cosegregación se realizó el ordenamiento de los marcadores y se estimaron las distancias en unidades centimorgan (cM) usando la función de mapeo de Kosambi, (1944). Posteriormente, se fijó el orden de los marcadores mediante la función "*fixed order*" del programa JoinMap 4.0 y se asignaron nuevos marcadores a cada grupo a valores de LOD $> 2,0$. Por último, se combinaron los grupos de ligamiento homólogos dentro de cada genotipo según se describe en materiales y métodos.

En principio a partir de los datos de segregación del progenitor femenino (R6#45), se descartaron 75 marcadores por presentar una segregación similar a la de otros marcadores

incluidos en la misma matriz (similitud > 98%). Posteriormente, se descartaron 2 individuos por presentar un 96,5% de similitud genética (#30 y #69).

El análisis de agrupamiento utilizando un valor umbral de LOD > 6 permitió la formación de 10 grupos de cosegregación de 2 o más marcadores. Posteriormente, se llevó a cabo el ordenamiento de los marcadores en cada grupo utilizando la función de mapeo de Kosambi. En esta instancia el programa utilizado tiene la característica de reconocer automáticamente marcadores que segregan en fase de repulsión ($r > 0,5$) y los separa estableciendo grupos homólogos que contienen marcadores en fase de acoplamiento, por lo tanto, se definieron los 20 grupos de ligamiento (GL) correspondientes a los 10 pares de cromosomas homólogos esperados para *P. rufum* diploide ($2n = 20$).

Esta primera aproximación permitió fijar el orden de 219 marcadores en 20 grupos de ligamiento (en acoplamiento). El promedio de marcadores por grupo resultó de 10,9 ($\pm 7,05$) con un máximo de 31 marcadores para el grupo 1 y un mínimo de 2 para el grupo 20. La distancia promedio fue de 7,5 cM ($\pm 6,4$). Una vez ordenados y fijados, se realizó un segundo test de agrupamiento a LOD >2. Esto permitió agregar 35 nuevos marcadores a los grupos ya establecidos, extendiendo la totalidad del mapa desde 1478,4 a 1672,0 cM y acortando la distancia promedio entre marcadores a 7,14 cM ($\pm 6,5$). Posteriormente, a fin de combinar los grupos de cosegregación en ambas fases de ligamiento (acoplamiento y repulsión), se invirtió la codificación de segregación de uno de los grupos homólogos siguiendo lo descrito por Stein *et al.*, (2004). Con esta codificación se realizó un nuevo ordenamiento de los marcadores dentro de cada grupo. El mapa del genotipo R6#45 quedó formado por 234 marcadores distribuidos en 10 GL. (**Figura 3.2**). La distancia total cubierta fue de 1071,8 cM, la distancia promedio entre marcadores 4,78 cM ($\pm 4,8$) y la distancia máxima entre dos marcadores fue de 28,74 cM. El promedio de marcadores por grupo fue de 23,4 ($\pm 11,7$) con un máximo de 44 marcadores para el grupo 1 y un mínimo de 6 para el grupo 10. El grupo de ligamiento más largo fue el grupo 4, el cual cubrió una distancia de 151,9 cM y se formó con 33 marcadores. Por otro lado, el grupo de ligamiento más corto fue el grupo 10 el cual quedó formado por 10 marcadores y cubrió una distancia de 62,7 cM.

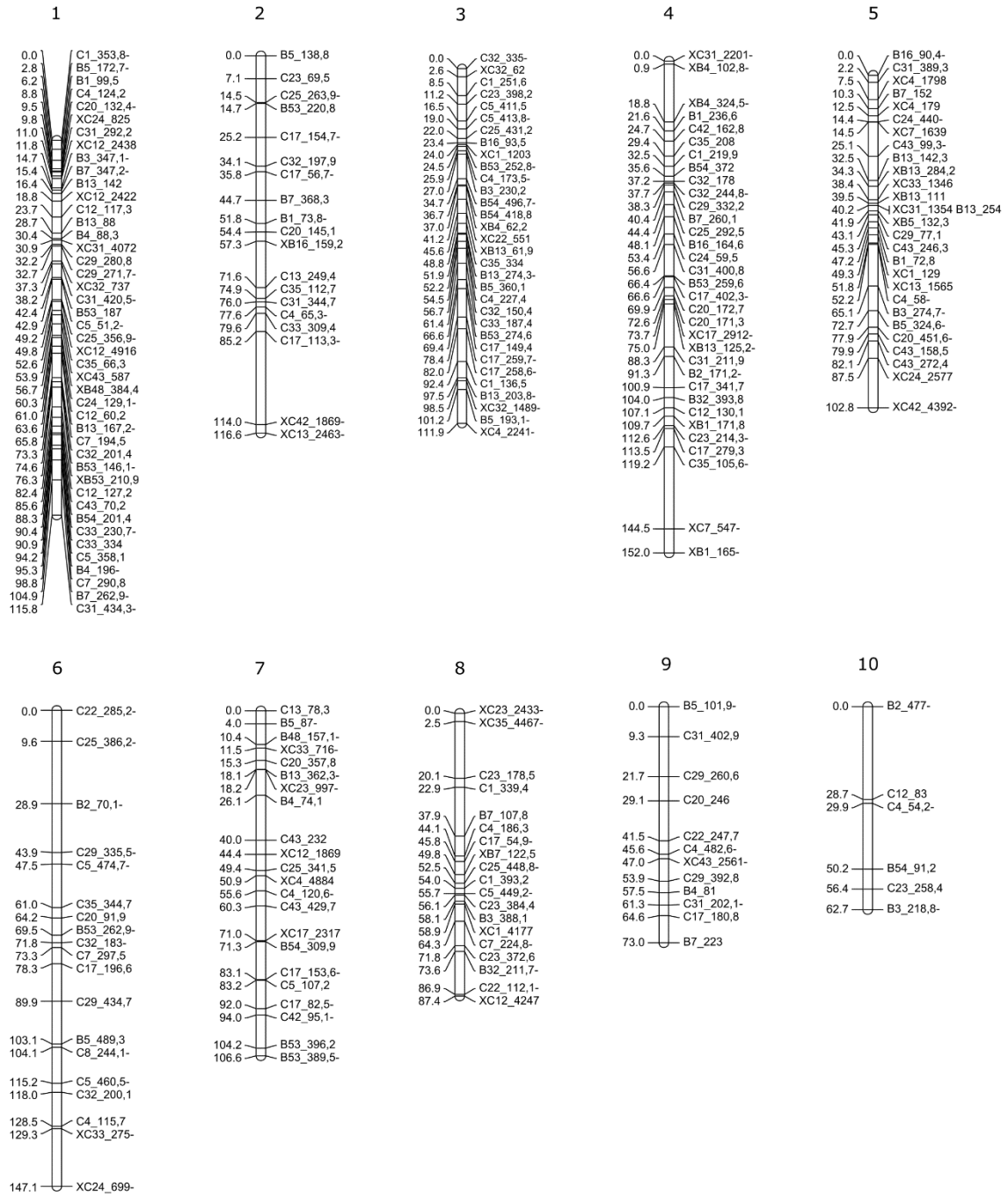


Figura 3.2. Mapa de ligamiento de R6#45 obtenido a partir de la población de F₁ diploide de *P. rufum*. El “-” indica los marcadores mapeados en fase de repulsión.

La misma metodología fue aplicada para confeccionar el mapa del progenitor masculino (R5#49). En el mismo se descartaron 74 marcadores por presentar valores de similitud mayores al 98%. Se establecieron los marcadores en los grupos de ligamiento a un valor de LOD > 6, formando también en este caso 10 grupos de cosegregación. Al realizar el ordenamiento de los marcadores en cada grupo se agruparon los marcadores que se encontraban en fase de acoplamiento como se describió anteriormente. De esta forma, el primer mapeo permitió ordenar 185 marcadores en 20 GL que cubrieron un total de 965,8 cM. El promedio de marcadores por GL resultó de 9,26 ($\pm 6,1$) con un máximo de 25 en el GL 1 y un mínimo de 2 en GL 20 y la distancia promedio entre marcadores fue de 5,85 cM ($\pm 5,3$). Posteriormente, el segundo test de agrupamiento a LOD >2 permitió agregar 29 nuevos marcadores a los grupos ya establecidos, extendiendo la totalidad del mapa a 1193 cM y la distancia promedio entre marcadores a 6,15 cM ($\pm 6,3$). Por último, los GL homólogos fueron unificados siguiendo la metodología descrita anteriormente. De esta forma el mapa paterno quedó formado por 212 marcadores distribuidos en 10 GL cubriendo una distancia total 914 cM (**Figura 3.3**). La distancia promedio entre marcadores se redujo a 4,53 cM ($\pm 5,4$) y la distancia máxima entre dos marcadores fue de 34,9 cM. Los GL tuvieron un promedio de 21,2 marcadores, con un máximo de 50 ubicados en el GL 1 y un mínimo de 10 en el GL 9. Además, el GL más largo fue el 7, formado por 27 marcadores que cubrieron una distancia de 117,2 cM, mientras que el GL más corto fue el 10 formado por 14 marcadores distribuidos en una distancia de 46,7 cM.

La localización de marcadores biparentales (codificados con la letra X) en los grupos de ligamiento maternos y paternos permitió asignar 8 de los 10 posibles grupos homólogos de los mapas de los genotipos R6#45 (materno) y R5#49 (paterno) (**Tabla 3.2**). Los GL 6 y 10 del mapa materno no incluyeron marcadores biparentales en común con dos GL del mapa paterno (7 y 9), por lo cual, se asignó un número arbitrario a estos grupos en base a su longitud. De esta manera los GL 6 de los mapas materno y paterno cuentan con 147,1 y 89,7 cM, respectivamente y los GL 10 de los mapas materno y paterno cuentan con 62,7 y 46,7 cM, respectivamente.

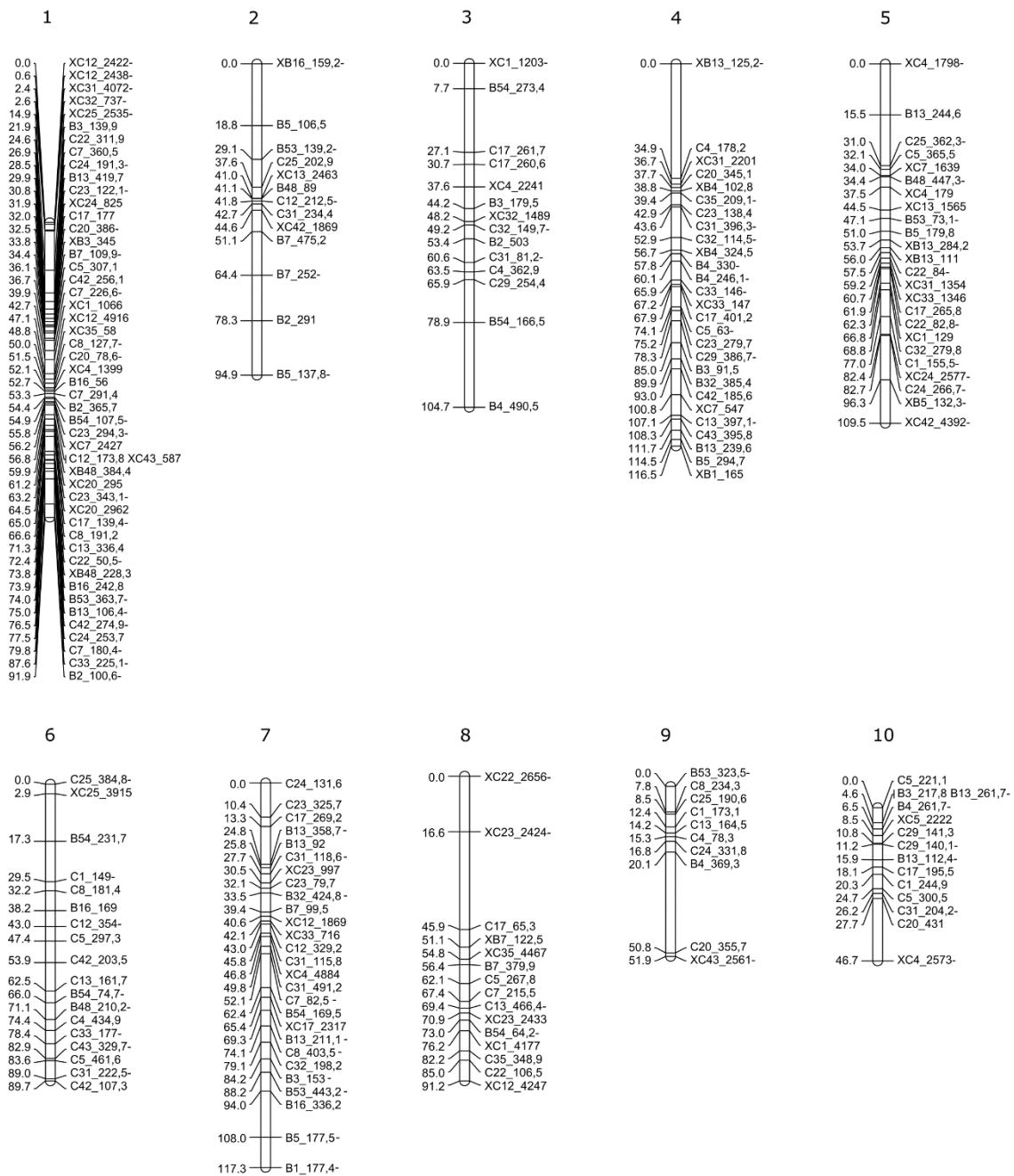


Figura 3.3. Mapa de ligamiento del genotipo R5#49 obtenido de la población de F₁ diploide de *P. rufum*). El “-” indica los marcadores mapeados en fase de repulsión.

Tabla 3.2. Marcadores biparentales compartidos por los mapas de los genotipos R6#45 y R5#49

| GL. | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 7 | 8 | 9 |
|-------------------------|-----------|------------|-----------|------------|------------|-----------|-----------|-----------|
| Marcadores biparentales | XB48_384 | XB16_159,2 | XC32_1489 | XB1_165 | XC4_1798 | XC12_1869 | XB7_122,5 | XC43_2561 |
| | XC43_587 | XC42_1869 | XC4_2241 | XB4_324,5 | XC7_1639 | XC4_4884 | XC1_4177 | |
| | XC12_4916 | XC13_2463 | XC1_1203 | XC31_2201 | XC4_179 | XC17_2317 | XC12_4247 | |
| | XC32_737 | | | XB4_102,8 | XC13_1565 | XC33_716 | XC35_4467 | |
| | XC31_4072 | | | XB13_125,2 | XB13_284,2 | XC23_997 | XC23_2433 | |
| | XC12_2438 | | | | XC31_1354 | | | |
| | XC12_2422 | | | | XC33_1346 | | | |
| | XC24_825 | | | | XB13_111 | | | |
| | | | | | XB5_132,3 | | | |
| | | | | | XC1_129 | | | |
| | | | | | XC24_2577 | | | |
| | | | | | XC42_4392 | | | |

Una vez identificados los grupos de ligamiento homólogos correspondientes a los mapas materno y paterno se comparó el orden de los marcadores biparentales en ambos grupos. El análisis mostró que en la totalidad de los grupos homólogos los marcadores respetaron el orden relativo en los grupos de ligamientos femeninos y masculinos (**Figura 3.3**).

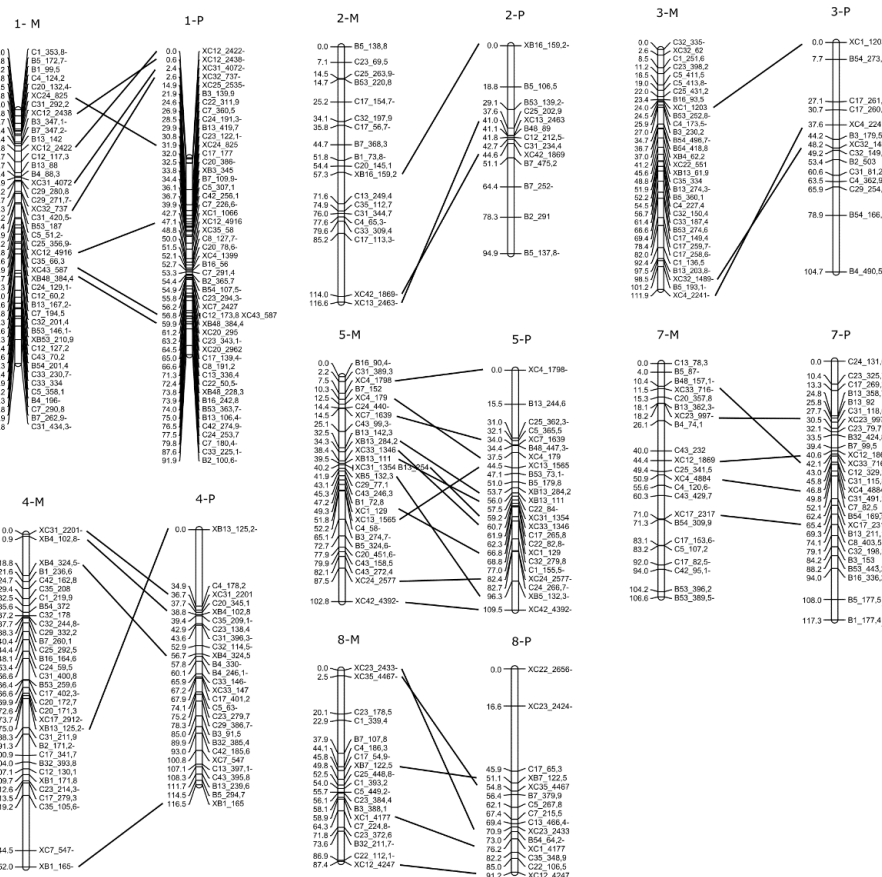


Figura 3.3. Comparación de grupos de ligamiento homólogos en los mapas de ligamientos materno y paterno de *P. rufum*. M: materno. P: paterno. El “-” indica los marcadores mapeados en fase de repulsión. Las líneas horizontales señalan los marcadores biparentales localizados en los grupos de ligamiento maternos y paternos.

IV.3.2- Identificación de regiones genómicas asociadas a la expresividad de la aposporía

Con el objetivo de detectar regiones del genoma materno y paterno posiblemente asociadas a la expresividad de la aposporía, se realizó un análisis de regresión simple (*Single-point analysis*) en donde los datos genotípicos fueron considerados como la variable independiente y el carácter fenotípico (%SEA) fue considerado como variable dependiente (Tanksley, 1993; Collard *et al.*, 2005). Es de destacar que si bien ambos genotipos parentales presentan valores similares de %SEA (5,77 % y 13%, sin diferencias significativas $p < 0.05$), la población F₁ mostró un amplio rango de variación en el carácter (0 - 35,85 %), lo cual sugiere la presencia de factores genéticos que podrían estar influenciado la expresividad del carácter (ver sección 1). Dado que, como se describió en sección anterior, el valor fenotípico (% de ovarios con sacos embrionarios apospóricos) de 39 individuos fue determinado (“*fenotipado*”) en la localidad de Corrientes (F₁-1) y de otros 49 individuos en Zavalla (F₁-2), la detección de asociaciones se realizó por separado considerando los datos obtenidos de cada localidad (ambientes).

En ninguna de las dos localidades los datos de expresividad de aposporía ajustaron a una curva de distribución normal ($p < 0,05$). Los datos fenotípicos fueron transformados utilizando la fórmula: $Y = \text{Log} (\% \text{ aposporía} + 1)$ y ajustaron a una distribución normal tanto en el ambiente Corrientes ($p=0,95$) como Zavalla ($p=0,34$). Los gráficos de distribución de frecuencias de la variable transformada en ambas poblaciones están representados en las **Figuras A1 y A2** del ANEXO. Para los datos fenotípicos de F₁-1 dicha transformación arrojó valores de media de $0,89 \pm 0,32$. Mientras que para la población F₁-2 los datos fenotípicos transformados presentaron una media de $0,66 \pm 0,31$.

El análisis de regresión simple mostró 41 marcadores con asociación significativa con el carácter en estudio ($p < 0,05$) (R^2 mínimo = 0,10; R^2 máximo = 0,34). Utilizando los datos fenotípicos de F₁-1 tomados en Corrientes se identificaron 27 *loci* asociados a la expresividad del carácter %SEA (R^2 mínimo=0,10; R^2 máximo=0,34). De éstos, 20 fueron ubicados en los mapas de ligamiento presentados anteriormente, mientras que 7 de ellos no pudieron ubicarse ya que habían sido excluidos durante la construcción del mapa. Si bien los GL que poseen

mayor cantidad de marcadores asociados a la variable utilizada fueron los GL 3 (7) y 4 (8), también se detectaron marcadores asociados al carácter en los GL 2, 5 y 10. A los marcadores que no fueron mapeados por presentar alta similitud (98%) con otro marcador se les asignó el GL correspondiente a este último. De esta forma, a C33_331,9 se le asignó el GL 3 materno por presentar alta similitud de segregación con C32_150,4 mapeado en este GL, mientras que a los marcadores C43_342,7 y C8_142,5 se les asignó el GL 4 materno correspondiente a C32_244 y a C32_178 (**Tabla 3.3**).

De los 27 marcadores detectados utilizando la población F₁-1, 17 marcadores tuvieron efecto positivo (valor estadístico b) sobre el carácter, mientras que 20 tuvieron un efecto negativo. Los marcadores con mayor R² (R² > 0,15) detectados en la población F₁-1, fueron C25_263,9 (R² = 0,21) del GL 2; B5_360,1 (R² = 0,15) del GL 3 y los marcadores XC31_2201 (R² = 0,20), B1_236,6 (R² = 0,34) y C32_244,8 (R² = 0,19) del GL 4. Los marcadores C43_342,7 (R² = 0,19) y C8_142,5 (R² = 0,15) presentaron un R² superior a 0,15 pero no fueron mapeados, sin embargo, como se mencionó anteriormente, por similitud de segregación con otros marcadores se les asignó el GL 4. De todos estos marcadores es importante destacar a B1_236,6 que presenta un R² = 0,34 (p = 0,04) y se encuentra en una región del GL 4 que comprende un mayor número de marcadores asociados a %SEA.

El análisis de detección de marcadores asociados a %SEA realizado utilizando los datos fenotípicos tomados de F₁-2 (Zavalla) permitió identificar 14 *loci* con asociaciones significativas al carácter expresividad de la aposporía (R² mínimo = 0,10; R² máximo = 0,17) (**Tabla 3.4**). De estos marcadores, 11 fueron ubicados en los mapas de ligamiento presentados anteriormente, mientras que 3 no fueron mapeados. El GL que presentó mayor cantidad de marcadores asociados a la aposporía fue el GL 3 (5), sin embargo, también se detectaron marcadores en los GL 1, 6, 7 y 8. Como se describió para la población F₁-1, a los marcadores que no fueron mapeados por presentar similitud mayor al 98% con otro marcador se asignó el GL de este último marcador. De esta forma, al marcador C31_336,5 se le asignó el GL 10 por presentar similitud al marcador C12_83 y al marcador XB53_430,8 se le asignó el GL 3 correspondiente a XC4_2241.

Del total de 14 marcadores detectados utilizando la población F₁-2, 10 tuvieron un efecto positivo sobre el %SEA, mientras que 4 tuvieron un efecto negativo. Los marcadores

con mayor R^2 ($R^2 > 0,15$) detectados utilizando la población F₁-2 fueron: B5_193,1 ($R^2 = 0,15$) y XC4_2241 ($R^2 = 0,16$) presentes en GL 3 y B54_309,9 ($R^2 = 0,17$) del GL 7, todos correspondientes a GLs del mapa materno, excepto XC4_2241 que también fue ubicado en el mapa paterno.

Tabla 3.3. Marcadores asociados a la expresividad de la aposporía detectados en F₁-1 (ambiente Corrientes).

| Marcador | Tipo de marcador | GL (M/P) | Posición (cM) (M/P) | Estadístico b ¹ | R ² | R ² ajustado | p-value |
|------------------------|------------------|-----------|---------------------|----------------------------|----------------|-------------------------|---------|
| C25_263,9 | Materno | 2-M | 14,5 | 0,29 | 0,21 | 0,18 | 0,00 |
| B4_490,5 | Paterno | 3-P | 0,0 | 0,24 | 0,13 | 0,11 | 0,03 |
| C5_411,5 | Materno | 3-M | 16,5 | -0,22 | 0,12 | 0,10 | 0,03 |
| C35_334 | Materno | 3-M | 48,9 | -0,23 | 0,13 | 0,11 | 0,03 |
| B5_360,1 | Materno | 3-M | 52,2 | -0,25 | 0,15 | 0,12 | 0,02 |
| C4_227,4 | Materno | 3-M | 54,5 | -0,22 | 0,11 | 0,08 | 0,04 |
| C32_150,4 | Materno | 3-M | 56,7 | -0,23 | 0,13 | 0,11 | 0,03 |
| C33_187,4 | Materno | 3-M | 61,4 | -0,23 | 0,13 | 0,11 | 0,03 |
| XC31_2201 | Biparental | 4-M / 4-P | 0,0 / 36,67 | 0,42 | 0,20 | 0,18 | 0,01 |
| XB4_324,5 | Biparental | 4-M / 4-P | 18,8 / 56,65 | 0,27 | 0,12 | 0,09 | 0,04 |
| C23_279,7 | Paterno | 4-P | 75,2 | 0,21 | 0,10 | 0,08 | 0,05 |
| B1_236,6 | Materno | 4-M | 21,6 | -0,22 | 0,34 | 0,12 | 0,04 |
| C32_244,8 | Materno | 4-M | 37,7 | 0,29 | 0,19 | 0,17 | 0,01 |
| C25_283,4 | Materno | 4-M | 44,4 | 0,21 | 0,10 | 0,08 | 0,05 |
| C33_384,1 | Materno | 4-M | 48,1 | 0,22 | 0,12 | 0,09 | 0,04 |
| C17_402,3 | Materno | 4-M | 66,6 | 0,24 | 0,13 | 0,11 | 0,02 |
| B1_72,8 | Materno | 5-M | 47,2 | -0,23 | 0,13 | 0,11 | 0,03 |
| C5_221,1 | Paterno | 10-P | 0,0 | 0,22 | 0,12 | 0,09 | 0,04 |
| B3_217,8 | Paterno | 10-P | 4,6 | 0,22 | 0,12 | 0,09 | 0,04 |
| C29_141,3 | Paterno | 10-P | 10,8 | 0,22 | 0,11 | 0,09 | 0,04 |
| C33_331,9 ² | Materno | 3-M | - | -0,23 | 0,13 | 0,11 | 0,03 |
| C43_342,7 ² | Materno | 4-M | - | -0,29 | 0,19 | 0,17 | 0,01 |
| C8_142,5 ² | Materno | 4-M | - | 0,25 | 0,15 | 0,13 | 0,02 |
| XC5_1093 | Biparental | No M | - | 0,25 | 0,11 | 0,09 | 0,04 |
| C29_151,4 | Paterno | No M | - | 0,22 | 0,11 | 0,09 | 0,04 |
| C5_194,8 | Paterno | No M | - | 0,22 | 0,12 | 0,09 | 0,04 |
| B48_256,83 | Paterno | No M | - | 0,22 | 0,12 | 0,10 | 0,03 |

¹ representa la pendiente de la curva de regresión lineal

² marcadores no mapeados por presentar segregación similar a otros marcadores. Se les asigna el GL correspondiente al marcador similar mapeado.

No M: marcador no mapeado

(M/P): materno / paterno

En gris se resaltan los marcadores con $R^2 > 0,15$

Es importante destacar que con ambas poblaciones se detectaron marcadores moleculares asociados significativamente a la expresividad de la aposporía ubicados en los GL

3 materno y paterno. Considerando que estos GL presentan más de 2 marcadores biparentales comunes, se utilizó la función “*Combine Groups for Map Integration*” del programa JoinMap 4.0 para unir los dos GL homólogos materno y paterno y localizar regiones del genoma asociadas con %SEA detectadas en ambas localidades. La integración de los GL permitió obtener un nuevo GL 3 de 131,2 cM compuesto por 39 marcadores en donde se detectó una región de 5,7 cM con efecto positivo sobre %SEA entre los marcadores B4_490,5 ($R^2 = 0,13$; $p = 0,03$) detectado utilizando F₁-1 y C4_173,5 ($R^2 = 0,12$; $p = 0,02$) detectado utilizando F₁-2 (**Figura 3.4**).

Tabla 3.4. Marcadores asociados a la expresividad de la aposporía detectados en F₁-2 (ambiente Zavalla).

| Marcador | Tipo de marcador | GL (M/P) | Posición (cM) (M/P) | Estadístico b ¹ | R ² | R ² ajustado | p-value |
|-------------------------|------------------|-----------|---------------------|----------------------------|----------------|-------------------------|---------|
| XC4_1399 | Biparental | 1-P | 37,8 | 0,24 | 0,12 | 0,10 | 0,02 |
| C4_173,5 | Materno | 3-M | 25,9 | 0,22 | 0,12 | 0,10 | 0,02 |
| C17_260,6 | Paterno | 3-P | 74,0 | 0,20 | 0,10 | 0,09 | 0,02 |
| C17_261,7 | Paterno | 3-P | 77,6 | 0,21 | 0,11 | 0,09 | 0,02 |
| B5_193,1 | Materno | 3-M | 101,2 | 0,24 | 0,15 | 0,13 | 0,01 |
| XC4_2241 | Biparental | 3-M / 3-P | 111,89 / 67,2 | 0,27 | 0,16 | 0,14 | 0,00 |
| XC25_3915 | Biparental | 6-P | 2,9 | -0,27 | 0,11 | 0,09 | 0,02 |
| B54_74,7 | Paterno | 6-P | 68,0 | -0,19 | 0,10 | 0,08 | 0,03 |
| C4_120,6 | Materno | 7-M | 55,6 | 0,22 | 0,12 | 0,10 | 0,02 |
| B54_309,9 | Materno | 7-M | 71,3 | -0,26 | 0,17 | 0,15 | 0,00 |
| C23_372,6 | Materno | 8-M | 71,8 | -0,21 | 0,11 | 0,09 | 0,02 |
| C31_336,5 ² | Materno | 10-M | - | 0,25 | 0,14 | 0,13 | 0,01 |
| XB53_430,7 ² | Biparental | 3-M / 3-P | - | 0,24 | 0,12 | 0,10 | 0,02 |
| C12_214,8 | Materno | No M | - | 0,23 | 0,13 | 0,11 | 0,01 |

¹ representa la pendiente de la curva de regresión línea.

² marcadores no mapeados por presentar segregación similar a otros marcadores. Se les asigna el GL correspondiente al marcador similar mapeado.

No M: marcador no mapeado

(M/P): materno / paterno

En gris se resaltan los marcadores con $R^2 > 0,15$

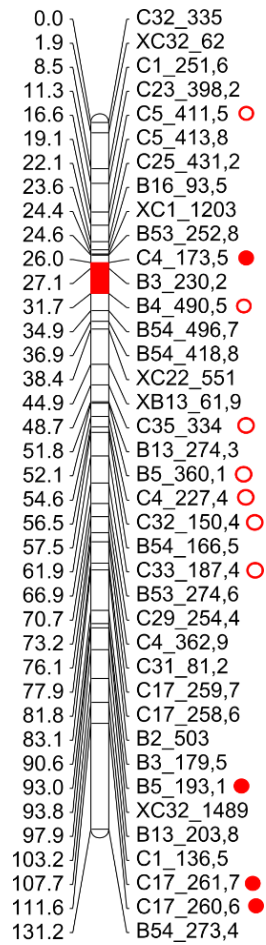


Figura 3.4. Grupo de ligamiento integrado por los grupos homólogos 3 de los mapas materno (M) y paterno (P). La región de color rojo sobre el GL representa la región del genoma asociada a %SEA detectada utilizando F₁-1 y F₁-2. ○ Marcadores asociados a %SEA detectados usando F₁-1. ● Marcadores asociados a %SEA detectados utilizando F₁-2.

IV.3- DISCUSIÓN

La combinación del uso de marcadores de AFLP, su análisis mediante electroforesis capilar y la condición natural altamente heterocigota de los genotipos parentales R6#45 y R5#49 (diploides naturales autoincompatibles), permitió la detección de un abundante número de polimorfismos, correspondientes a *loci* segregantes entre ambos parentales. Esta característica posibilitó la generación de dos mapas de ligamiento genético, uno por cada genotipo parental. La extensión (cM) de los mapas obtenidos (1071,8 y 914 cM) fue coincidente con la de mapas previos de especies filogenéticamente cercanas como *Setaria italica* (964 cM) (Wang *et al.*, 1998), *Sorghum bicolor* (1095 cM) (Dufour *et al.*, 1997) y *Paspalum notatum* (991 cM) (Ortiz *et al.*, 2001). Esto indica que se alcanzó una buena cobertura del genoma. Tanto el mapa de ligamiento del parental materno como el del paterno presentaron 10 GL correspondientes a los 10 pares de cromosomas diploides que presenta la especie *P. rufum* ($2n = 2x = 20$). Los marcadores presentes en dosis simple en ambos parentales (biparentales) permitieron, por un lado identificar 8 de los 10 cromosomas homólogos entre ambos mapas y por otro lado, confirmaron el ordenamiento de los marcadores generados durante el mapeo. Además, la menor distancia promedio entre dos marcadores obtenida en este trabajo en relación con los mapas de ligamiento realizados previamente en *P. notatum* (Ortiz *et al.*, 2001; Stein *et al.*, 2007), indicaría que se ha logrado una buena densidad.

Estudios de mapeo de la región genómica que determina la apomixis en especies apomícticas poliploides han reportado, como una característica común, que esta región presenta una marcada disminución o ausencia de recombinación (Ozias-Akins *et al.*, 1998; Ebina *et al.*, 2005; Worthington *et al.*, 2016; Zappacosta *et al.*, 2019). También en especies del género *Paspalum* se han reportado un gran número de marcadores asociados al *locus* de la apomixis, confirmando la falta de recombinación, entre ellos en *P. simplex* (Pupilli *et al.*, 2001), *P. notatum* (Martínez *et al.*, 2003; Stein *et al.*, 2007), *P. procurrens* y *P. malacophyllum* (Hojsgaard *et al.*, 2011). Trabajos posteriores, realizados en el género *Paspalum* han evidenciado anomalías en la meiosis (Podio *et al.*, 2012b) y un gran tamaño del *locus* de la

apomixis posiblemente debido a rearrreglos cromosómicos o rearrreglos de pequeña escala generados por elementos transponibles o deleciones y mutaciones puntuales (Pupilli *et al.*, 2004; Stein *et al.*, 2004; Calderini *et al.*, 2006; Podio *et al.*, 2012b). De esta forma, la falta de recombinación en la región que determina la apomixis en los genotipos poliploides, se convierte en el principal inconveniente para determinar los factores genéticos que controlan el carácter. Por otra parte, los mapas realizados en el citotipo diploide, de especies multiploides que presentan apomixis, como *P. notatum* (Ortiz *et al.*, 2001), *Setaria itálica* (Wang *et al.*, 1998) y *Sorghum bicolor* (Dufour *et al.*, 1997) no informaron la presencia de regiones con ausencia de recombinación, pero tampoco realizaron la búsqueda de regiones asociadas a la apomixis debido a la ausencia del carácter en las poblaciones utilizadas. El mapa de ligamiento que aquí presentamos, realizado en *Paspalum rufum* diploide con capacidad de completar la apomixis, no ha identificado posiciones con acumulación de marcadores que representen ausencia de recombinación, sin embargo en algunos GLs se observaron algunas con mayor concentración de marcadores que posiblemente correspondan a la ubicación de los centrómeros (Kao *et al.*, 2006; Mézard, 2006).

La mayoría de los estudios genéticos realizados para determinar la herencia de la aposporía consideran al carácter como cualitativo (presencia/ausencia de SEA) y generalmente no tienen en cuenta las variaciones cuantitativas. Si bien algunos estudios en especies diplospóricas y apospóricas analizan la variabilidad de la expresión y su transmisión a generaciones sucesivas (Aliyu *et al.*, 2010; Hojsgaard *et al.*, 2014; Zilli *et al.*, 2015; Barke *et al.*, 2018), hasta el momento solo se abordó un análisis de QTL para la expresividad de la diplosporía en *Eragrostis curvula* (Zappacosta *et al.*, 2019). En la presente sección se utilizó la población F₁, mencionada en la sección 1, que además de ser una población segregante a partir de la cual se pudo construir un mapa de ligamiento, presenta una segregación transgresiva respecto de la expresividad de la aposporía. También anteriormente se confirmó que la expresividad de la aposporía (%SEA) es estable en mediciones interanuales en una misma localidad, sin embargo se puso en evidencia que los cambios de localidad provocan variaciones significativas del carácter. Estos estudios previos fueron determinantes para tener en cuenta en los análisis que se presentan en esta sección, dado que la población F₁ diploide de *P. rufum* fue analizada en dos etapas y en diferentes localidades: Corrientes (F₁-1) y Zavalla (F₁-2). La población F₁ proviene de parentales que no son significativamente diferentes en cuanto a la

expresividad de la aposporía (5,77% y 13%) por lo tanto, se esperaba que la mayoría de los individuos de la progenie presentaran SEA en proporciones similares a los parentales. Sin embargo, los análisis citoembriológicos mostraron que existe una gran variación de la expresividad de la aposporía en la población F_1 , evidenciando que la hibridación permite incrementar significativamente la expresividad del carácter. Estos resultados y el hecho de que la expresividad de la aposporía es estable en el tiempo y que además se transmite a la progenie F_2 , supone la existencia de diferentes factores genéticos, combinaciones de alelos/genes, que pueden regular la expresividad del carácter. Esto nos indujo a realizar un primer abordaje cuantitativo de la expresividad de la aposporía, mediante un análisis de regresión simple de cada marcador respecto del carácter en estudio. Estos estudios muestran que diversos marcadores, distribuidos en varios grupos de ligamientos, tanto en el mapa materno como en el mapa paterno, están significativamente asociados a regiones genómicas que podrían modificar el %SEA. En el trabajo realizado por Zappacosta *et al.* (2019) en la especie diplospórica *Eragrostis curvula* se obtuvo una población de mapeo realizando un cruzamiento entre genotipos tetraploides, uno sexual y otro con capacidad de formar sacos embrionarios diplospóricos, y se demostró que la presencia del carácter está determinada por un gen dominante que se encuentra en una región con baja recombinación. Sin embargo, los análisis cuantitativos del grado de diplosporía demostraron que su expresividad podría ser modificada por factores genéticos que se encuentran distribuidos en diferentes grupos de ligamiento. Estos resultados están de acuerdo con los del presente estudio, ya que se observa que existen marcadores asociados a la aposporía en diferentes GL. Además, es importante destacar una mayor presencia de marcadores asociados al %SEA en los GL 3 y 4. Si bien ningún marcador asociado coincidió entre las dos poblaciones (F_{1-1} y F_{1-2}), en el GL 3 se detectó una zona de 5,7 cM, delimitada por un marcador de la población F_{1-1} y otro de la población F_{1-2} , que merece ser considerada para futuras investigaciones. Además, es importante mencionar que la mayor cantidad de marcadores asociados al %SEA fueron detectados en la población F_{1-1} . Esto puede ser debido a que en este ambiente el carácter %SEA posee un mayor rango de variación entre sus individuos, que el presentado por la población medida en Zavalla (F_{1-2}). Por otro lado, en el trabajo de Ortiz *et al.* (2001) en el cual se realiza un mapa de ligamiento genético en *P. notatum* diploide, se ubicaron marcadores moleculares de arroz y *Tripsacum* relacionados a la formación de SEA en diferentes GL.

Los resultados obtenidos en la presente sección muestran el primer mapa de ligamiento genético realizado en la especie *Paspalum rufum* utilizando una población F₁ diploide compuesta por individuos capaces de generar sacos embrionarios apospóricos y de generar semillas por apomixis. La segregación cuantitativa del carácter %SEA en la población permitió detectar regiones del genoma que podrían modificar la expresividad del carácter.

Por último, es importante resaltar que los padres de la población presentan capacidad diferencial de completar la partenogénesis y análisis preliminares indican que se encuentra segregando en la población. Esto será un punto de partida para próximos trabajos a fin de analizar su herencia en toda la población y asociar marcadores implicados en la partenogénesis en individuos diploides.

IV.3- CONCLUSIONES

1. Se obtuvieron los primeros mapas de ligamiento genético de *Paspalum rufum* diploide a partir de una población F₁.
2. No se detectaron zonas con ausencia de recombinación asociadas al carácter %SEA.
3. De acuerdo a los análisis de regresión simple existe más de una región genómica asociada a la expresividad de la aposporía en *Paspalum rufum*.
4. Una sola región asociada a %SEA localizada en el GL 3 fue validada en dos ambientes diferentes.

SECCIÓN 4: DESARROLLO REPRODUCTIVO SEXUAL Y APOMÍCTICO EN GENOTIPOS DIPLOIDES Y TETRAPLOIDES

La apomixis gametofítica se encuentra estrechamente asociada a la poliploidía (Savidan, 2000), sin embargo existen evidencias de que el citotipo diploide de los géneros *Paspalum* y *Brachiaria* es capaz de producir SEA (Quarin, 1986, Quarín y Norrmann, 1987; Norrmann *et al.*, 1989; Naumova *et al.*, 1999, Quarin *et al.*, 2001). En el caso especial de *P. rufum* algunos individuos son capaces además de completar la apomixis, aunque en condiciones naturales estas plantas produzcan semillas exclusivamente por sexualidad (Siena *et al.*, 2008; Sartor *et al.*, 2011; Delgado *et al.*, 2014). Esta coexistencia de ambos procesos reproductivos, apomixis y sexualidad, también se observa en el citotipo tetraploide que produce mayoritariamente semillas por apomixis, aunque en muchos casos mantiene la sexualidad en niveles bajos (Nogler, 1984; Asker y Jerling, 1992; Ozias-Akins y van Dijk, 2007). Por alguna razón que aún se desconoce la preponderancia de uno de los dos procesos se impone sobre el otro dependiendo de los niveles de ploidía (sexualidad al nivel diploide y apomixis al nivel poliploide). Como se menciona en capítulos anteriores una de las teorías, para justificar el éxito de la apomixis a nivel poliploide, es la propuesta por Carman (1997) que plantea que el aumento en los niveles de ploidía induce una asincronía en los procesos de desarrollo reproductivo favoreciendo la expresión de la apomixis.

Con el propósito de probar esta hipótesis, consideramos analizar la sincronización entre los procesos de desarrollo reproductivo en el sistema *P. rufum*. Para esto contamos con genotipos tetraploides apomícticos que producen SEM en bajas proporciones (Quarin *et al.*, 1989, 1998; Espinoza *et al.*, 2002; Galdeano *et al.*, 2016) y genotipos diploides que presentan capacidad de formar SEA pero producen semillas exclusivamente por sexualidad en condiciones naturales (Sartor *et al.*, 2011). En este contexto analizamos los procesos de desarrollo reproductivo comparando genotipos diploides y tetraploides con comportamientos reproductivos diferentes.

IV.4.1- Desarrollo reproductivo sexual en los citotipos diploide y tetraploide

La evaluación del desarrollo reproductivo se llevó a cabo utilizando accesiones tetraploides apomícticas (Q3756, Q4185 y Q3785) (Norrman *et al.*, 1989; Quarín *et al.*, 1998; Espinoza *et al.*, 2002; Galdeano *et al.*, 2016) e individuos diploides sexuales con capacidad de generar sacos embrionarios apospóricos (R5#49, F1#31 y F1#39) (Sartor *et al.*, 2011; Delgado *et al.*, 2014, 2016). La caracterización del desarrollo reproductivo se llevó a cabo mediante observaciones citoembriológicas de clarificados de ovarios. Las muestras fueron tomadas desde la diferenciación de la célula madre de la megáspora (CMM) y de la célula madre de la micróspora (CMMi) hasta la formación del saco embrionario maduro y el polen en anthesis. Se caracterizó, la distribución temporal y espacial de la megasporogénesis y de la megagametogénesis, así como de la microsporogénesis y la microgametogénesis. En Materiales y Métodos se describen los estadios de desarrollo seleccionados (**Figura 4.1-A**) y las variables morfológicas medidas para la realizar la caracterización del desarrollo reproductivo (**Figura 4.1-B**).

Los análisis citoembriológicos mostraron que el desarrollo reproductivo sexual femenino en los citotipos diploide y tetraploide es muy similar. El estadio inicial (estadio I) comienza con la diferenciación de la célula arquesporrial en el tejido nucelar del ovario, que se diferencia en una CMM, fácilmente reconocible por su forma rectangular y su gran tamaño comparado con el resto de las células de la nucela. (**Figura 4.2-A y D**). Las CMMs se forman justo debajo de la epidermis del óvulo (capa L1), la cual está formada por una sola capa de células en los individuos diploides (**Figura 4.2-A**) y por dos o más capas de células en los individuos tetraploides (**Figura 4.2-D**). En el extremo chalazal de la CMM, se observa frecuentemente una célula de mayor tamaño que las células de la nucela que no se diferencia. Esta célula, llamada “*large stack cell*” (LSC), fue también descrita en el desarrollo reproductivo de *Sorghum* por Carman *et al.* (2011) y permanece visible en los estadios I, II (**Figura 4.2-A, B, D**) y hasta el estadio de megáspora funcional (estadio III) (no mostrado). En ambos citotipos, la meiosis genera tétradas lineales (**Figura 4.2-B**), aunque en algunos casos se observaron tríadas de megásporas (**Figura 4.2-E**). Al final de la megasporogénesis tres megásporas degeneran dejando una sola megáspora funcional (MF) en el extremo chalazal (**Figura 4.2-C, F**).

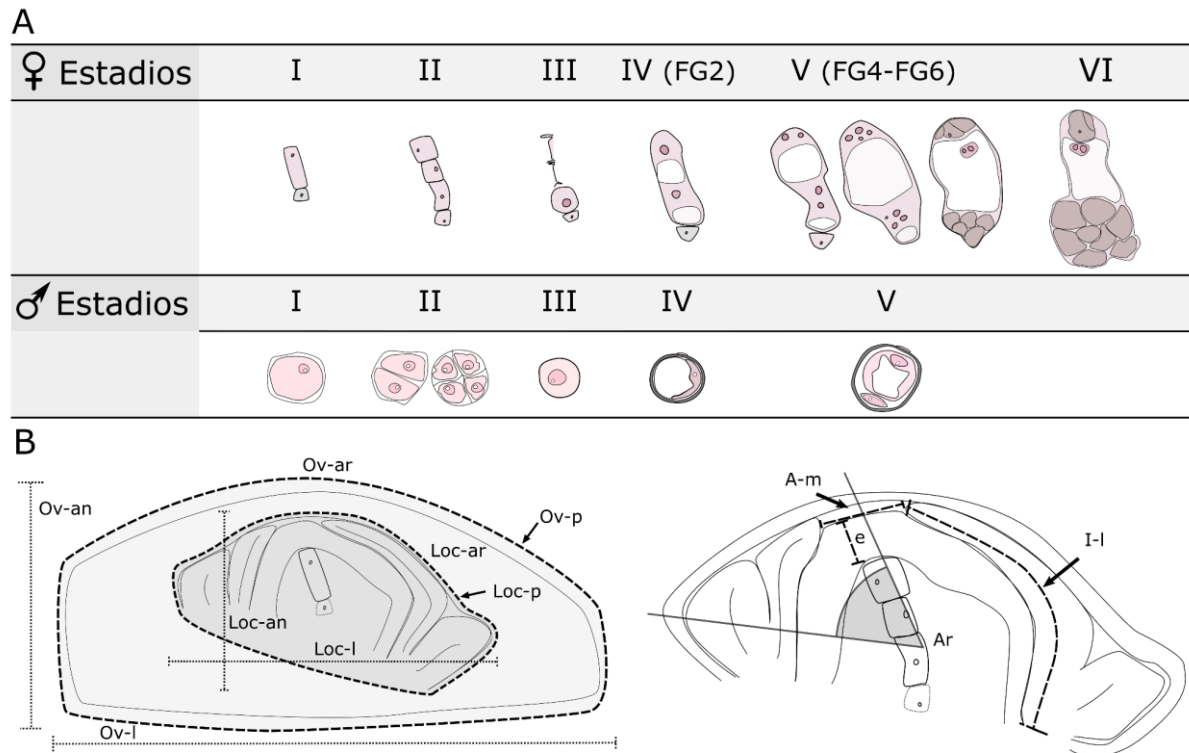


Figura 4.1. Esquema de los estadios de desarrollo reproductivo sexual masculino y femenino y parámetros del desarrollo del óvulo analizados. **A)** El panel superior describe los seis estadios de desarrollo femenino considerados: Célula madre de la megáspora (I), tétradas o tríadas después de la meiosis (II), megáspora funcional y megásporas degeneradas (III) y megagametofito binucleado inmediatamente después de la primera mitosis (IV; FG2). El estadio (V; FG4-FG6) incluye megagametofitos con cuatro núcleos, con ocho núcleos y celularizados, el último estadio comprende óvulos en antesis (VI) (desde el estadio I al IV las células LSC se muestran con línea punteada y los extremos micropilar y chalazal se encuentran en la parte superior e inferior, respectivamente). Los nucléolos se muestran en color rosa oscuro, las vacuolas en blanco y las células del megagametofito en marrón. En el panel inferior se muestran 5 estadios de desarrollo masculino considerados de la siguiente manera: Células madre de la micróspora (I), díadas y tétradas (II), micrósporas unicelular (III), micróspora unicelular con vacuola (IV) y grano de polen bicelular (V). Los nucléolos y las vacuolas se muestran en color blanco y los núcleos en color rosa oscuro. **B)** Diagrama que describe las variables del crecimiento del ovario: Ancho del lóculo, *Loc-an*; largo del lóculo, *Loc-l*; perímetro del lóculo, *Loc-p*; área del lóculo, *Loc-ar* (color gris oscuro); ancho del ovario, *Ov-a*; largo del ovario, *Ov-l*; perímetro del ovario, *Ov-p*; área del ovario, *Ov-ar* (gris claro); largo del integumento, *I-l*; ancho de la epidermis, *e*; apertura de la micrópila, *A-m*; ángulo de rotación, *Ar*. LSC hace referencia a grandes células que frecuentemente se encuentran en el extremo chalazal de la línea germinal.

En el estadio II (después de la meiosis), en los ovarios diploides y en el estadio I (CMM) en los ovarios tetraploides, se observan divisiones periclinales de la epidermis dando lugar a la formación de óvulos pseudo-crassinucleados (**Figura 4.2-B, D**). Además, con respecto al desarrollo del ovario, se observa que el integumento externo no se alarga demasiado durante

todo el desarrollo y por lo tanto la micrópila se forma exclusivamente por el crecimiento del integumento interno, adaptándose a lo que se considera un óvulo endostémico. El crecimiento del integumento interno es constante durante todo el desarrollo hasta alcanzar su longitud final en antesis (**Figura 4.2-M, N**). En ambos citotipos la megáspora funcional presenta 3 divisiones mitóticas y da lugar a la formación de un saco embrionario de tipo *Polygonum*. Brevemente, se observa que después de la primera mitosis (en estadio IV-FG2), se generan dos núcleos que migran hacia ambos extremos de la célula empujados por una vacuola formada en el centro (**Figura 4.2-G, J**). Luego, cada uno de ellos sufre otras dos divisiones mitóticas (FG4 y FG5) (**Figura 4.2-H, I, K, L**) seguidas de una celularización (FG6) y se forma finalmente el SEM (**Figura 4.2-M, N**). En el momento de la antesis, el SEM se caracteriza por presentar un aparato oosférico (una célula huevo y dos sinérgidas), una célula central binucleada (dos núcleos polares) y un grupo de células antipodales en el extremo chalazal (**Figura 4.2-M, N**).

Aunque en ambos citotipos, el desarrollo reproductivo sexual muestra las mismas características, se detectaron algunas diferencias respecto del desarrollo del ovario. En el estadio I, la diferenciación de la CMM en diploides, ocurre en ovarios con un menor grado de desarrollo que en los tetraploides, es decir, en un mismo estadio reproductivo, el lóculo era más pequeño, la epidermis del óvulo más estrecha y el integumento interno más corto. Además, la rotación del óvulo estaba menos avanzada en los ovarios diploides que en los tetraploides (**Figura. 4.2-A, D**) y estas características se mantuvieron a lo largo de todo el desarrollo reproductivo (**Figura. 4.2**).

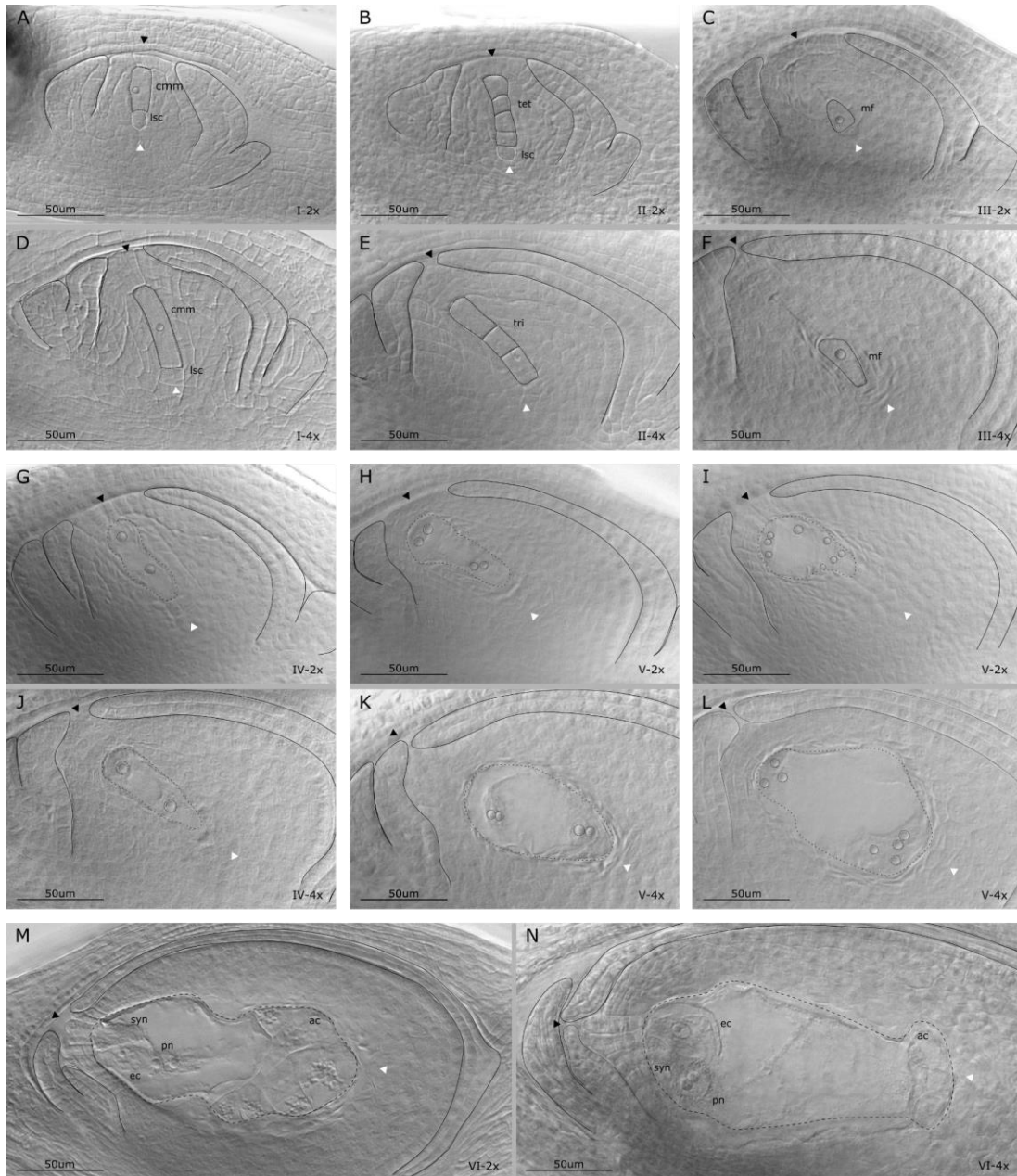


Figura 4.2. Desarrollo reproductivo sexual femenino en los citotipos diploide y tetraploide de *P. rufum*. Megaesporogénesis en los citotipos diploide (A-C) y tetraploide (D-F). A y D) CMM (cmm); B y E) tétradas/triadas después de la meiosis (tet/tri); C y F) megáspora funcional (mf). Megagametogénesis en los citotipos diploide (G-I) y tetraploide (J-L). G y J) Saco embrionario binucleado luego de la primera mitosis (FG2); H y K) Saco embrionario de cuatro núcleos luego de la segunda mitosis (FG4); I y L) SEM de ocho núcleos (línea negra discontinua corta) después de la tercer mitosis (FG5) y M y N) un megagametofito femenino maduro (delineado por una línea negra discontinua larga) conteniendo una célula huevo (*ec*), sinérgidas (*syn*), una célula central binucleada (*pn*) y un grupo de antípodas (*ac*) al momento de la antesis de los citotipos diploide y tetraploide, respectivamente. Las estructuras y células se marcan con líneas discontinuas negras, mientras que los nucléolos con líneas punteadas negras. Las células LSCs se resaltan con líneas discontinuas blancas. Los extremos micropilares y chalazales se indican con flechas negras y blancas, respectivamente y los integumentos se delinean en negro. La barra de escala indica 50 µm. Los estadios de desarrollo y los niveles de ploidía se especifican abajo y a la derecha de la imagen. Los materiales utilizados encadenan imagen son: R5#49 (A, B), F1#39 (C, G, H, I, M), Q3756 (D, N), Q3785 (E, L) y Q4485 (F, J, K).

En relación con el desarrollo reproductivo masculino, en el estadio I se observan inicialmente CMMis localizadas al lado de las células del tapetum. Las CMMis se identificaron fácilmente por no tener una forma definida (amorfas), presentar un mayor tamaño respecto a las células del tapetum y un nucléolo visible (**Figura 4.3-A**). En la microesporogénesis, que se considera el estadio II, se produce la primera división meiótica que origina una díada (**Figura 4.3-B**) y luego una segunda división que genera tétradas de meiositos isobilaterales (**Figura 4.3-C**). Después de completarse la meiosis, en el estadio III, se observan micrósporas aisladas caracterizadas por poseer un citoplasma denso y un núcleo posicionado en el centro (**Figura 4.3-D**). El estadio IV, incluye el inicio de la microgametogénesis, en el cual se presenta un agrandamiento de la vacuola central de la micróspora y un concomitante desplazamiento del núcleo contra sus paredes (**Figura 4.3-E**). Por último, en el estadio V, el núcleo se divide por mitosis y forma un grano de polen bicelular que contiene dos núcleos haploides, es decir, un núcleo vegetativo y un núcleo generativo (**Figura 4.3-F**).

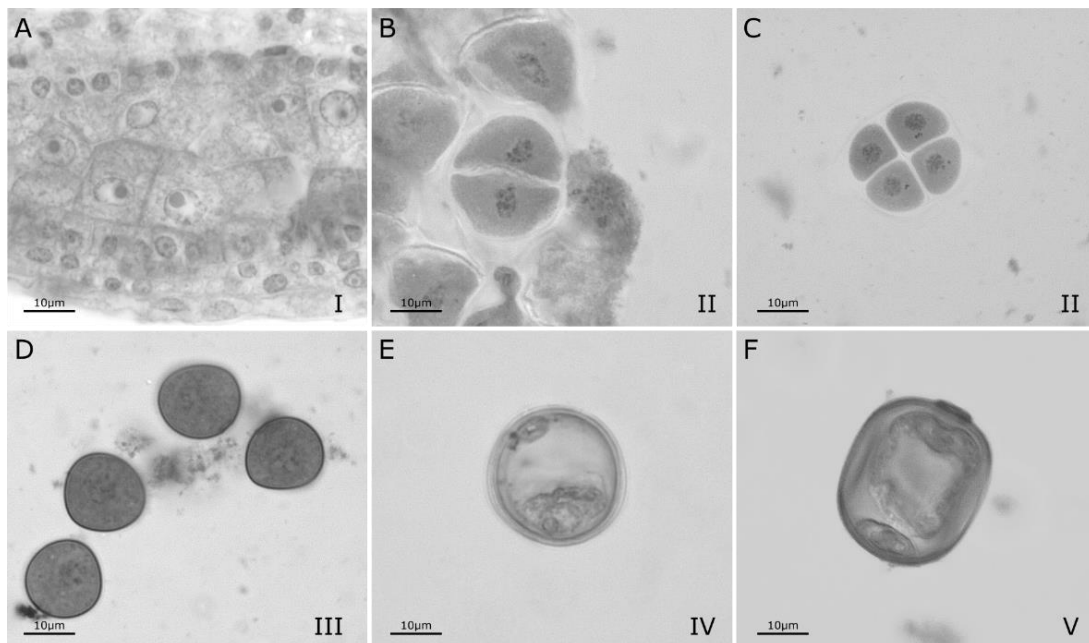


Figura 4.3. Microsporogénesis y microgametogénesis en *P. rufum*. Anteras mostrando A) el tapetum y las CMMis; B) díadas después de la primera división meiótica; C) tétradas después de la segunda división meiótica; D) una micróspora unicelular recién formada; E) una micróspora unicelular con una vacuola; y F) un grano de polen bicelular. Los estadios de desarrollo de la micróspora y del microgametofito se especifican en la parte inferior derecha de cada imagen. Las barras de escala indican 10 µm. Todas las imágenes corresponden al genotipo F1#39.

El análisis comparativo entre los procesos involucrados en el desarrollo reproductivo masculino y femenino, en el citotipo diploide muestra que ambos procesos están igualmente sincronizados. La meiosis se produce de forma simultánea en las anteras y en los óvulos. Asimismo, se observa un alto grado de coincidencia entre el desarrollo femenino y masculino en todos los estadios observados (**Tabla 4.1**). Cuando en las anteras se observan CMMis (estadio I), la mayoría de los óvulos contienen CMMs (estadio I). Luego, mientras en las anteras en el estadio II, se observan díadas/tétradas, el 87,5% de los óvulos también están en el estadio II. Igualmente, cuando las anteras presentan micrósporas unicelulares recién formadas (estadio III), el 90,7% de los óvulos presentan megásporas funcionales (estadio III). Por último, cuando las anteras contienen micrósporas unicelulares vacuoladas (estadio IV), el 97,4% de los óvulos también están en el estadio IV de desarrollo del megagametofito (**Tabla 4.1**).

Tabla 4.1. Niveles de coincidencia entre el desarrollo reproductivo sexual femenino y masculino en los genotipos diploide y tetraploide de *Paspalum rufum*.

| Nivel de ploidía | | Desarrollo reproductivo Masculino* | | | |
|------------------------|-----------------------------|------------------------------------|--------------------------|--------------------------------|--|
| | | CMMi (I) | Diadas/ Tétradas (II) | Micróspora unicelular (III) | Micróspora unicelular con vacuola (IV) |
| Diploide | | | | | |
| Desarrollo Femenino | I | 46 | 4 | 1 | 0 |
| | II | 1 | 30 | 3 | 1 |
| | III | 1 | 1 | 39 | 0 |
| | IV | 0 | 0 | 0 | 37 |
| | % coincidencia [†] | 95.8% | 85.7% | 90.7% | 97.4% |
| Tetraploide | | | | | |
| Desarrollo Femenino | I | 23 | 26 | 2 | 0 |
| | II | 0 | 2 | 8 | 3 |
| | III | 0 | 0 | 1 | 32 |
| | IV | 0 | 0 | 0 | 20 |
| | % coincidencia [†] | 100 | 7.1 | 9.1% | 36% |

Los valores en negrita indican los estadios que presentan el mayor número de ovarios

* Número de ovarios en cada estadio de desarrollo reproductivo femenino encontrado para un estadio de desarrollo masculino en particular.

[†] Proporciones de espiguillas que coinciden en los estadios de desarrollo masculino y femenino

En los genotipos tetraploides, la sincronización entre los estadios de desarrollo masculino y femenino mostró algunas diferencias respecto a lo observado en el citotipo diploide. El estadio I es simultáneo en óvulos y anteras; CMMs y CMMis están presentes en la misma espiguilla. Sin embargo, cuando las espiguillas alcanzan el estadio II conteniendo díadas o tétradas, en el óvulo todavía se observan CMM (se detectó solo un 7,1% de coincidencia en

este estadio) (**Tabla 4.1**). Posteriormente, cuando las anteras alcanzan el estadio III y se forman micrósporas, en los óvulos todavía se observan MFs. Finalmente, cuando las micrósporas alcanzan el estadio IV (micróspora unicecular vacuolada), solo el 36% de los óvulos alcanzan el estadio IV y el resto se mantiene en el estadio III (**Tabla 4.1**).

IV.4.2- Caracterización cuantitativa del crecimiento y desarrollo del óvulo en los citotipos diploide y tetraploide.

Como se menciona en el apartado anterior, en el análisis visual de los estudios citoembriológicos se percibe un menor desarrollo del ovario para un mismo estadio de desarrollo reproductivo femenino en los diploides respecto de los tetraploides. Por esta razón se decidió referenciar los estadios reproductivos femeninos al crecimiento del ovario, evaluando cuantitativamente parámetros inherentes al desarrollo y crecimiento del ovario como se detallan en Materiales y Métodos. Para cada citotipo se determinaron los 12 parámetros en los diferentes estadios de desarrollo reproductivo femenino (**Figura 4.4**). Los parámetros de crecimiento fueron: largo (Ov-l), ancho (Ov-an), perímetro (Ov-p) y área del ovario (Loc-ar), largo (Loc-l); ancho (Loc-an), perímetro (Loc-p) y área del lóculo (Loc-ar), la apertura de la micrópila (A-m), el largo del integumento interno (I-l), el ancho de la epidermis del óvulo (e) y el ángulo de rotación del óvulo (Ar).

A nivel diploide, la comparación de los parámetros de crecimiento entre los diferentes estadios, mostró que el ovario mantiene un crecimiento continuo desde el estadio II del desarrollo reproductivo femenino. En particular, se observó que ninguno de los parámetros mostró variación significativa entre los estadios I (CMM) y II (Mei) (**Figura 4.4-A**). Sin embargo, entre los estadios II (Mei) y el estadio III (MF) todos los parámetros de crecimiento aumentaron significativamente. Entre los estadios III y IV (Mit-I), seis de 12 variables (Loc-l, Loc-p, Loc-ar, Ov-ar, I-I y A-r) fueron significativamente mayores. Las comparaciones siguientes, desde la primera mitosis (Mit-I) hasta la antesis (Ant) mostraron que casi todos los parámetros de crecimiento se incrementan significativamente (**Figura 4.4-A**). Estas observaciones sugieren que la meiosis sucede sin un crecimiento significativo de los tejidos que componen el ovario. Sin embargo, durante la diferenciación de la megáspora funcional y

durante la megagametogénesis, el tamaño del ovario y del óvulo se incrementa de manera significativa hasta alcanzar la antesis.

En el caso del citotipo tetraploide se observaron diferencias respecto al diploide. Todos los parámetros de crecimiento del ovario se incrementaron significativamente entre los estadios I y II (MMC y Mei) (**Figura 4.4-B**), y casi todos los parámetros de crecimiento mostraron crecimiento significativo entre los estadios II (Mei) y III (MF) y los estadios III y IV (Mit-I) (**Figura 4.4-B**). Posteriormente desde el estadio IV al V (MII-Cel) los ovarios prácticamente no crecieron. Como tampoco lo hicieron desde V a VI (Ant) (solo Loc-l, Ov-p, e, A-m y Ar mostraron diferencias significativas) (**Figura 4.4-B**). Estos resultados indican que en tetraploides el crecimiento del ovario ocurre principalmente entre los primeros estadios de desarrollo I al IV (**Figura 4.4-B**).

Los análisis de los parámetros de crecimiento del ovario en los diferentes estadios reproductivos para cada citotipo evidencian una diferente coordinación entre los citotipos. Se observa claramente que la meiosis en el diploide se produce en ausencia de crecimiento del ovario que se lleva a cabo desde los estadios II hasta antesis. Sin embargo, en el tetraploide el ovario presenta un crecimiento significativo en todos los parámetros analizados entre los estadios I y II que continúa hasta la primera mitosis. Si bien estos resultados son claros nos pareció interesante comparar el crecimiento del ovario entre los citotipos para conocer qué estadio de desarrollo reproductivo femenino comparte el mismo crecimiento del ovario en los dos citotipos. La comparación de los parámetros de crecimiento del ovario en cada estadio del desarrollo reproductivo entre los dos citotipos mostró que, en todos los estadios las magnitudes de las variables fueron mayores en el citotipo tetraploide que en el diploide (**ANEXO, Tabla 1**). En el caso de A-m (Apertura de la micrópila), que se vuelve menor a medida que avanza el desarrollo, el tetraploide siempre fue menor que en el diploide. Estas diferencias también se observaron en antesis, lo cual manifiesta que las estructuras que componen el ovario tienen un mayor tamaño absoluto en los individuos tetraploides respecto de los diploides. Esto significa que para poder comparar el desarrollo reproductivo de ambos citotipos mediante el uso de los parámetros de crecimiento del ovario es necesaria una relativización de los mismos.

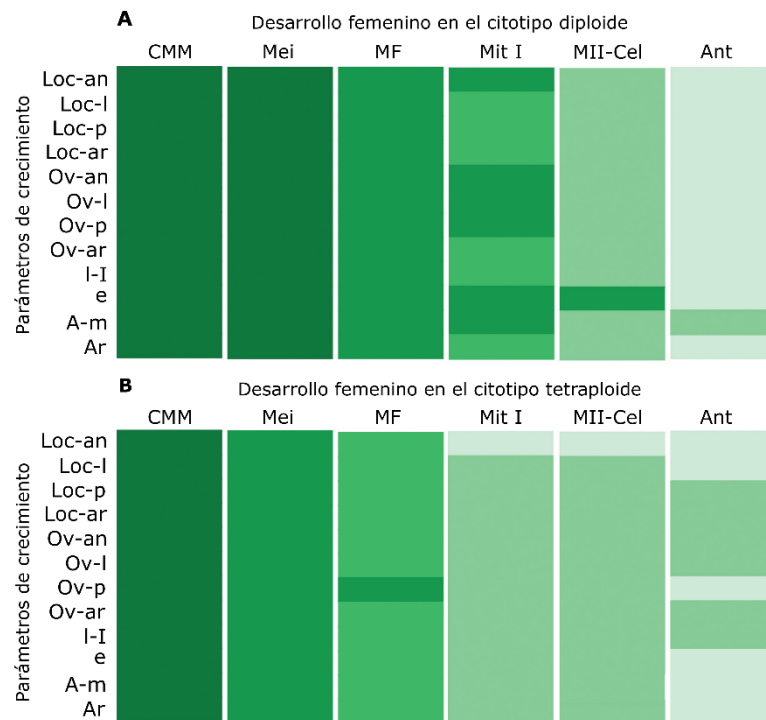


Figura 4.4. Variación de los parámetros de crecimiento del ovario a través del desarrollo reproductivo sexual femenino en los citotipos diploide y tetraploide. Los diagramas muestran los 12 parámetros del crecimiento medidos durante los 6 estadios de desarrollo femenino. Los diferentes colores de las celdas indican que los parámetros de crecimiento del ovario correspondientes a diferentes etapas del desarrollo sexual femenino son significativamente diferentes ($p < 0.01$). Parámetros del ovario: *Loc-an*, ancho del lóculo; *Loc-l*, longitud del lóculo; *Loc-p*, perímetro del lóculo; *Loc-ar*, área del lóculo; *Ov-an*, ancho del ovario; *Ov-l*, largo del ovario; *Ov-p*, perímetro del ovario; *Ov-ar*, área del ovario; *l-I*, largo del integumento; *e*, ancho de la epidermis; *A-m*, apertura de la micrópila; *Ar*, ángulo de rotación. Los estadios de desarrollo reproductivo femenino están especificados en materiales y métodos.

Por lo tanto, según se describe en forma detallada en los Materiales y Métodos se optó por realizar una segunda comparación, pero relativizando los parámetros de crecimiento de manera de hacerlos independientes del tamaño absoluto del ovario, denominándolos parámetros independientes del tamaño del ovario (IT). El único parámetro que no necesitó relativización fue el ángulo de rotación (R-an) ya que es independiente del tamaño *per se*. Los análisis estadísticos revelaron que en los estadios de desarrollo reproductivo temprano (desde I a V), casi todas las variables IT presentaron mayores valores promedio en el citotipo tetraploide que en el citotipo diploide (**Figura 4.5 A-C** y **ANEXO, Tabla 2**). Sin embargo, ninguna variable en anthesis mostró diferencias estadísticamente significativas entre los citotipos. Las comparaciones cuantitativas de las variables IT de crecimiento del ovario mostraron que, para

el mismo estadio de desarrollo reproductivo femenino, los ovarios tetraploides estaban más desarrollados que los ovarios diploides, lo cual está de acuerdo con las observaciones cualitativas previamente realizadas, indicando nuevamente, que los citotipos diploide y tetraploide presentan una diferencia en la coordinación entre el desarrollo reproductivo femenino y el crecimiento del ovario que se manifiesta desde el principio del desarrollo reproductivo.

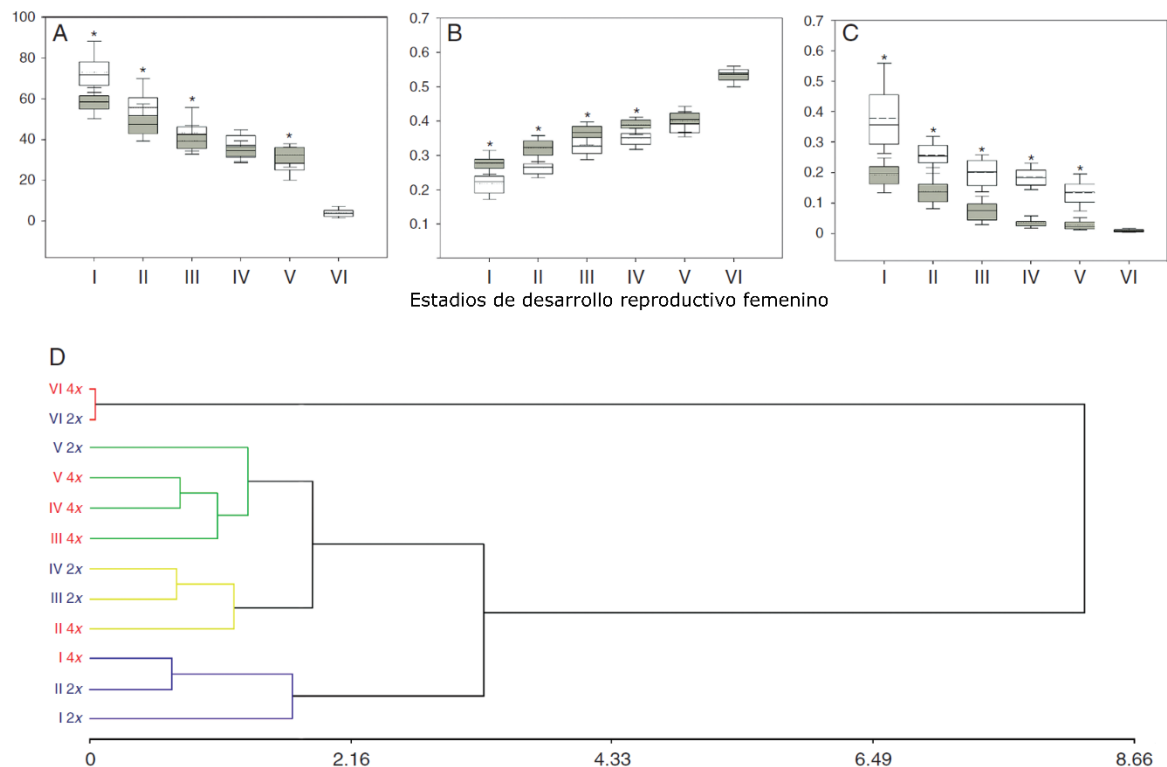


Figura 4.5. Análisis comparativo del crecimiento del óvulo a través del desarrollo reproductivo sexual femenino entre los citotipos diploide y tetraploide. Los primeros tres paneles (A–C) muestran gráficos de caja de tres parámetros de crecimiento independientes del tamaño (IT) de individuos diploides (blanco) y tetraploides (gris): A) ángulo de rotación, B) longitud relativa del integumento y C) apertura relativa de la micrópila. Los límites de las cajas representan los percentiles 25 y 75; la línea llena dentro de las cajas indica el valor medio de la variable y la línea discontinua indica la mediana. Los asteriscos marcan diferencias estadísticamente significativas entre los valores medios de los parámetros relativos de crecimiento. D) Dendrograma derivado de la distancia Euclídea basada en UPGMA, incluye todos los parámetros IT analizados en los seis estadios de desarrollo reproductivo tomados de individuos diploides y tetraploides (Coeficiente de correlación cofenética: 0.939). Los grupos principales se muestran en diferentes colores (corte de distancia Euclídea, 1.75). Los citotipos diploide y tetraploide están expresados como 2x (azul) y 4x (rojo); Los estadios de desarrollo reproductivo sexual femenino se nombran como se describe en Materiales y Métodos.

Para complementar este estudio y determinar que estadios del diploide comparten parámetros de crecimiento del ovario comparables en el tetraploide, se realizó un análisis de conglomerados utilizando todas las variables IT de ambos citotipos. Estos análisis nos permiten visualizar que estadios de desarrollo reproductivo de los citotipos diploide y tetraploide presentan el mismo nivel de crecimiento relativo del ovario. Según se detalla en los Materiales y Métodos se realizó un dendograma UPGMA que presentó un coeficiente de correlación cofenética de 0,939 (**Figura 4.5-D**). Este análisis mostró 4 grupos de mayor importancia: el primer grupo de menor crecimiento incluye el estadio I de ambos citotipos junto al estadio II del citotipo diploide, sin embargo, el crecimiento del ovario tetraploide parece estar más cercano al estadio II del citotipo diploide. El segundo grupo se forma por el estadio II del tetraploide junto los estadios III y IV del diploide. El tercer grupo contiene los estadios III, IV y V del tetraploide y el estadio V del diploide. Finalmente, el cuarto grupo se forma por los estadios VI de ambos citotipos en anthesis. Estos análisis confirman que el desarrollo reproductivo en tetraploides inicia su meiosis cuando los ovarios están más desarrollados que los diploides. Este desfase va disminuyendo hasta alcanzar el crecimiento completo en anthesis en ambos citotipos.

IV.4.3- Aparición de las células iniciales de la aposporía en los citotipos diploide y tetraploide

Dado que, según los estudios previos, ambos citotipos presentan la capacidad de formar SEA, este sistema permite analizar además la sincronización del desarrollo de los SEA respecto al desarrollo reproductivo sexual. De esta manera con el propósito de caracterizar los primeros pasos en la iniciación del desarrollo apospórico se determinó la diferenciación de las células IA durante el desarrollo reproductivo femenino en ambos citotipos. Las células IA se identifican del resto de las células nucleares por su mayor tamaño, su forma ovalada y por poseer un nucléolo notablemente denso (**Figura 4.6, B-K**). En ambos citotipos las células IA se detectaron a lo largo de diferentes estadios de desarrollo reproductivo sexual femenino, comenzando antes de meiosis (en tetraploides) hasta avanzada la megagametogénesis (FG5) (en diploides) (**Figura 4.6-A**). En los estadios de desarrollo más avanzados, posteriores a FG5, se observan con mucha más frecuencia SEA y, por lo tanto, ya no se detectan células IA. Por esta razón,

durante este trabajo nos limitamos a cuantificar las proporciones de ovarios que contienen células IA (**Figura 4.6-A**). Es importante destacar que frecuentemente se observaron células de tipo LSCs (como se menciona previamente). Estas células están únicamente localizadas en el extremo chalazal de la megáspora funcional y a pesar de su similitud con células IA, nunca presentan un desarrollo posterior (**Figura 4.6-B, G, H**).

En los genotipos diploides, a partir del estadio II, se observan AI junto a las tétradas, y aparecen de forma continua hasta el estadio FG5 en proporciones constantes y bajas (1,6–4,3 %; **Figura 4.6-A, F**). En los tetraploides, las células IA se observaron a partir del estadio I hasta el estadio FG4, la segunda mitosis de la megagametogénesis (**Figura 4.6-A, G-K**). En este citotipo las proporciones de ovarios conteniendo células IA variaron desde 8% acompañando la CMM (**Figura 4.6-A, G**) hasta superar el 21% de los ovarios en el estadio III de MF (**Figura 4.6-A, I**). Los primeros estadios muestran bajas proporciones de células IA, pero en presencia de la MF y las megásporas degeneradas (estadio III) se observan con mayor frecuencia (**Fig 4.6-A, H, I**). Estas observaciones sugieren que durante el desarrollo reproductivo femenino se produce una diferenciación continua de células IA durante los primeros estadios hasta el estadio III. Además, es interesante destacar que las células IA se localizan siempre alrededor de la línea germinal, sugiriendo que existe una fuerte relación con las señales de diferenciación de la CMM. (**Figura 4.6-B, C**).

Como se evidencia en la **Figura 4.6** y como era esperado, la proporción de óvulos conteniendo células IA fue siempre menor en diploides que en tetraploides. Además, otra diferencia que se detecta entre ambos citotipos es que en tetraploides las células IA aparecen concomitantemente con estadios de desarrollo femenino más jóvenes en comparación con los genotipos diploides y se extiende hasta FG4, sin embargo, en los diploides se siguen detectando células IA hasta el estadio FG5.

Otra característica referida al desarrollo de los SEA que se puede destacar, es que pueden presentar uno o dos núcleos polares. Revisiones previas de imágenes obtenidas de SEA en antesis de 20 individuos de la población F₁ (P1) (Delgado *et al.*, 2016), mostraron que un 18% de los SEA analizados presentaban un núcleo polar y 82% tenían dos núcleos polares.

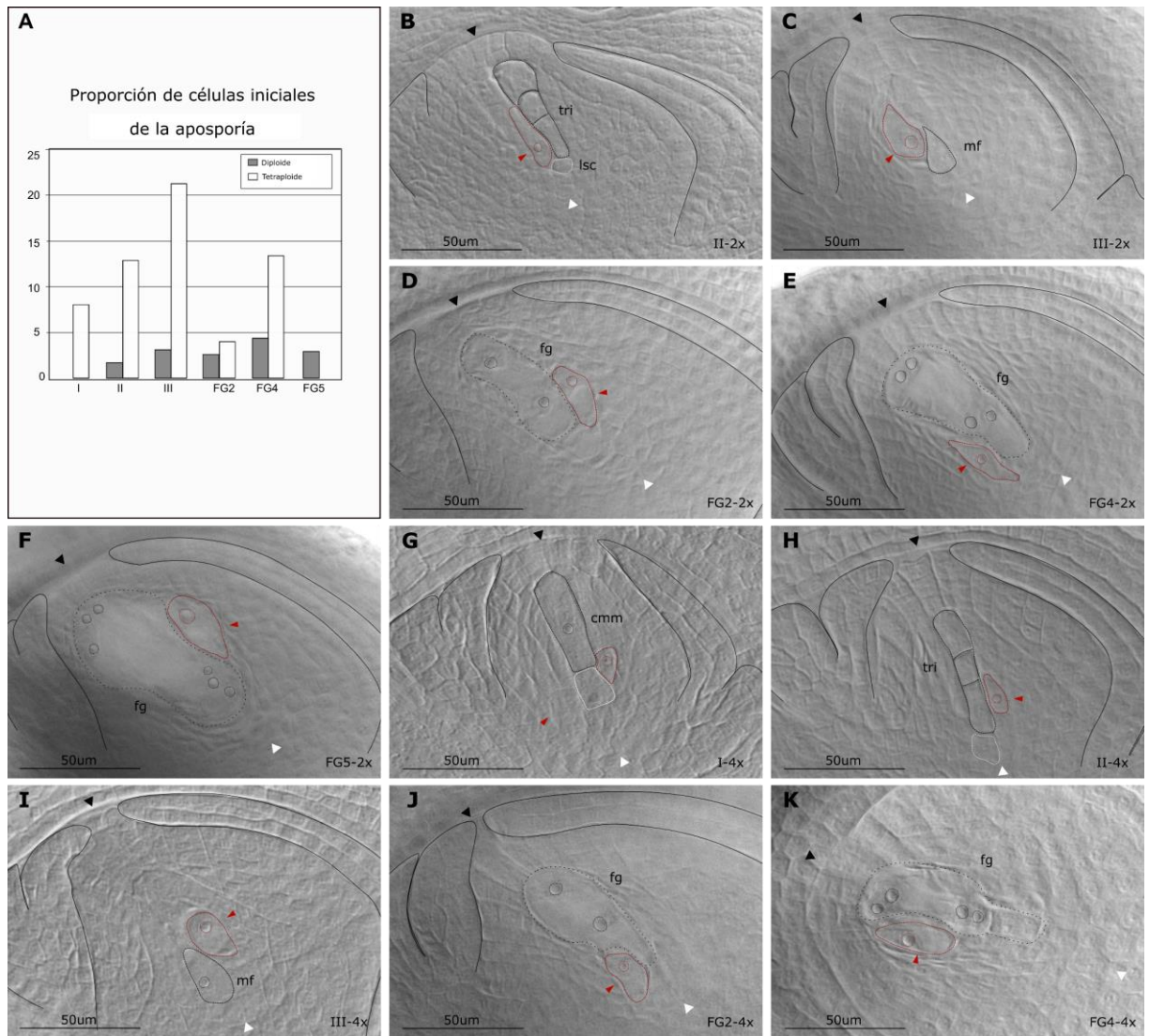


Figura 4.6. Emergencia de células iniciales de la aposporia durante el desarrollo reproductivo sexual femenino en los citotipos diploide y tetraploide. A) Proporción de ovarios que contienen células AI en cada estadio de desarrollo reproductivo en los citotipos diploides (gris) y tetraploides (blanco). B–K) Clarificados de ovarios que contienen células IA en diferentes estadios de desarrollo reproductivo sexual femenino. En diploides: B) tríada (*tri*) después de la meiosis; C) Megáspora funcional (*mf*); D) estadio de megagametogénesis después de la primera mitosis (FG2); E) segunda mitosis (FG4) y F) la tercera mitosis (FG5). En tetraploides: G) CMM (*cmm*); H) tríada (*tri*) después de la meiosis, I) Megáspora funcional (*mf*); J) estadios de la megagametogénesis después de la primera mitosis (FG2) y K) segunda mitosis (FG4). Las estructuras y células están marcadas con líneas discontinuas color rojo/negro, mientras que los nucléolos están marcados con líneas punteadas negras/rojas. Las líneas discontinuas y las flechas rojas indican células IA. Las células LSC fueron marcadas con líneas discontinuas color blanco. Los extremos micropilares y chalazales se indican con flechas negras y blancas, respectivamente. Los integumentos se señalan con líneas negras. La barra de la escala indica 50 μ m. Los estadios de desarrollo y los niveles de ploidía están especificados en la parte inferior derecha de cada imagen. Los genotipos utilizados en estas imágenes son: R5#49 (B), F1#31 (C), F1#39 (D–F), Q3756 (G–I), Q3785 (J) y Q4485 (K).

Como resumen general de los resultados obtenidos, la **Figura 4.7** recopila la información presentada en esta sección para construir un calendario reproductivo detallado. Los diferentes paneles ilustran las etapas del desarrollo reproductivo sexual femenino para los genotipos diploides y tetraploides de *P. rufum*, y ambos se comparan con el desarrollo reproductivo masculino. También se detalla el período de detección de las células IA (barras azules) en ambos citotipos.

| | | | | | | | | |
|------------------|--------------------------------|---------------------|---------------------------|--|-----------------------------|---------|---------|---------|
| | Microsporogénesis | | | Microgametogénesis | | | Antesis | |
| Polen 2x y 4x | CMMi | Díadas/ Tétradas | Micróspora uniceclular | Micróspora uniceclular con vacuola | Grano de polen Bicelular | | | |
| | | | | | | | | |
| Diploide | Megasporogénesis | | | Megagametogénesis | | | Antesis | |
| | CMM | Díadas/tétradas | Megáspora F. | FG2 | FG4-FG6 | | Antesis | |
| | | | | | | | | |
| | Célula inicial de la aposporía | | | | | | | |
| Tetraploide | Megasporogénesis | | | Megagametogénesis | | | Antesis | |
| | CMM | CMM | Díadas/tétradas | Megáspora F. | FG2 | FG4-FG6 | | Antesis |
| | | | | | | | | |
| | Célula inicial de la aposporía | | | | | | | |

Figura 4.7. Comparación de los procesos de desarrollo reproductivo en los citotipos diploide y tetraploide. El desarrollo reproductivo masculino diploide y tetraploide se describe en la parte superior del panel (verde claro). Los estadios de desarrollo sexual femenino para los citotipos diploide (lila) y tetraploide (amarillo claro) se presentan de forma separada de acuerdo a su sincronización con el desarrollo reproductivo masculino. El período durante el cual se diferencian las células iniciales de la aposporía también se especifica con una banda de color azul debajo de cada panel. Las células LSC se muestran con líneas discontinuas.

IV.4- DISCUSIÓN

La transferencia de la apomixis a especies diploides de gran cultivo requiere aún de la comprensión de los determinantes moleculares y genéticos que la controlan. La evidencia de la presencia de los determinantes genéticos de la apomixis a nivel diploide en *P. rufum* convierten a esta especie en un modelo interesante para comprender la influencia de la poliploidía en el éxito de la apomixis. Como fue mencionado, existen fuertes evidencias que avalan la presencia de heterocronía en los procesos de desarrollo reproductivo entre genotipos apomícticos y sexuales en especies de diversos géneros (Asker y Jerling, 1992; Leblanc, Duenas, *et al.*, 1995; Carman, 1997; Koltunow *et al.*, 1998; Grimanelli *et al.*, 2003; Bradley *et al.*, 2007; Carman *et al.*, 2011; Sharma *et al.*, 2014), que según la hipótesis de Carman (1997), favorecería la expresión de la apomixis en poliploides. Por lo tanto, resulta particularmente interesante, para probar esta hipótesis, comparar la coordinación entre los procesos reproductivos tanto sexuales como apomícticos en el sistema diploide/tetraploide de *P. rufum* y de esta manera aportar información acerca de la relación entre apomixis y poliploidía.

En esta sección se presenta un estudio detallado del desarrollo reproductivo femenino (megaesporogénesis y megagametogénesis) y masculino (microesporogénesis y microgametogénesis) en los citotipos diploide y tetraploide, capaces de completar la apomixis. En ambos casos se observó que el crecimiento y desarrollo del óvulo presentaba características similares a las descritas en especies relacionadas. En los estadios iniciales del desarrollo, las CMM se localizaron inmediatamente por debajo de la epidermis de la nucela, en la cual se producían algunas divisiones periclinales, generando de esta manera óvulos pseudo-crasinucelados que se han documentado previamente en otras especies de *Panicoideas* (Bhanwra, 1988; Bhanwra *et al.*, 1991; Kellogg y Kubitzki, 2015). La micrópila se forma casi exclusivamente por el crecimiento del integumento interno, mientras que el integumento externo detiene su crecimiento en estadios muy tempranos del desarrollo, lo cual determina la formación de un óvulo endostémico, esta característica también se ha documentado en otras gramíneas (Kellogg y Kubitzki, 2015). Nuestras observaciones ponen en evidencia que el óvulo

de *P. rufum* rota casi 90° durante el desarrollo reproductivo, por lo cual puede definirse como hemianátropo (Sajo *et al.*, 2008). Por otra parte, el desarrollo de la megáspora y del megagametofito concuerdan con las descripciones realizadas previamente para especies de la subfamilia de las Pooideas y Panicoideas (Burson, 1985; Bhanwra *et al.*, 1991; Burson y Hussey, 1998). Otra particularidad observada frecuentemente fue la presencia de tríadas lineales en lugar de tétradas después de la meiosis, estas también habían sido reportadas en otras especies de *Paspalum* como *P. simplex* (Espinoza y Quarín, 1997), *P. malacophyllum*, *P. procurrens* (Hojsgaard *et al.*, 2008), y *Thrasya petrosa*, gramíneas estrechamente relacionadas con *Paspalum* spp. (Acuña *et al.*, 2005). En estos casos parece que la segunda división de la meiosis se produce únicamente en el miembro chalazal de la díada proveniente de la primera división meiótica. En cuanto a la microesporogénesis, la meiosis procede con dos divisiones sucesivas generando díadas y tétradas, como se ha observado previamente en la mayoría de las gramíneas (Nakamura *et al.*, 2010; Kellogg y Kubitzki, 2015). Mientras que la microgametogénesis comienza con la formación de una vacuola central, que se forma antes de la primera mitosis, al igual que en maíz y otras gramíneas (Chang y Neuffer, 1989; Pacini *et al.*, 2011).

Con el propósito de comparar el desarrollo reproductivo femenino entre los citotipos diploide y tetraploide se utilizaron los parámetros de crecimiento del ovario como referencia. Nuestros resultados muestran que la meiosis en el diploide ocurría sin un crecimiento significativo del ovario, ya que los estadios I y II de desarrollo reproductivo mostraban parámetros de crecimiento similares, coincidiendo además con el estadio I del tetraploide. Sin embargo, en el tetraploide los parámetros de crecimiento evidenciaron diferencias significativas entre los estadios I y II, presentando este un crecimiento similar a los ovarios que ya presentan MF o la primera división mitótica en el diploide (estadio III y IV). En estadios más avanzados, el citotipo tetraploide ya no muestra crecimiento significativo (entre los estadios IV y V) y presenta similitud con los ovarios del estadio V en el diploide. Estos resultados ponen en evidencia un retraso de los individuos tetraploides en el desarrollo reproductivo femenino durante el desarrollo de la megáspora, principalmente de la meiosis, cuando se toma como referencia al crecimiento del ovario.

Si se analiza el desarrollo reproductivo femenino en referencia al desarrollo reproductivo masculino también se pone en evidencia un retraso del primero en el tetraploide.

Los análisis mostraron que en diploides ambos desarrollos, femenino y masculino, están perfectamente coordinados entre los estadios I y IV, indicando que las señales de diferenciación son simultáneamente percibidas por ambos procesos. Observaciones similares respecto a la coordinación de los desarrollos reproductivos femenino y masculino fueron reportadas en *P. chaseanum*, *P. simplex* y *P. plicatulum* (Espinoza y Quarín, 1997). Esta coordinación también fue detectada en *Brachiaria decumbens* (Dusi y Willemse, 1999). Por otro lado, en el tetraploide, la meiosis de la CMMi y los primeros estadios de desarrollo de la microgametogénesis están adelantados respecto de la meiosis de la CMM y de los primeros estadios de la megagametogénesis. Estos resultados coinciden con los informados previamente en genotipos tetraploides de *P. notatum* (Bonilla y Quarín, 1997; Laspina *et al.*, 2008), en apomícticos pentaploides de *P. minus* (Bonilla y Quarín, 1997) y en el citotipo tetraploide de tres especies apomícticas facultativas de *Brachiaria* (Lutts *et al.*, 1994).

Con respecto a los análisis comparativos, entre apomícticos y sexuales, de la coordinación entre los eventos de desarrollo reproductivo realizados en otras especies, si bien suele tomarse como referencia el crecimiento del ovario o el desarrollo reproductivo masculino, los sistemas de estudio son diferentes y por lo tanto se dificulta arribar a una conclusión general. Por ejemplo, Carman *et al.* (2011) compara el desarrollo reproductivo femenino entre genotipos diploides de *Sorghum* que producen diferentes proporciones de SEA pero que se desconoce su capacidad de completar la apomixis por partenogénesis. En estos trabajos reportan que la aposporía acelera el inicio de la meiosis. Por otro lado, sí se han informado evidencias de desarrollo aposórico o diplospórico, precoz o adelantado en una gran variedad de géneros (Asker y Jerling, 1992; Leblanc, *et al.*, 1995; Peel *et al.*, 1997a,b ; Koltunow *et al.*, 1998; Grimanelli *et al.*, 2003; Bradley *et al.*, 2007; Carman *et al.*, 2011; Galla *et al.*, 2011; Sharma *et al.*, 2014).

En función de los resultados obtenidos y de acuerdo a los antecedentes presentados podemos afirmar que en el complejo multiploide de *P. rufum* existe una heterocronía entre los procesos de desarrollo reproductivo asociados a la poliploidía, que podría relacionarse con la preponderancia de la apomixis sobre la sexualidad en los tetraploides. Para comenzar a evaluar esta hipótesis se analizó la presencia de las células iniciales de la aposporía (IAs) a lo largo del desarrollo reproductivo femenino en ambos citotipos.

El análisis citoembriológico permitió detectar IAs en un período prolongado del desarrollo reproductivo sexual, desde estadios tempranos del desarrollo, acompañando al CMM, hasta la tercera división mitótica durante la megagametogénesis. En el caso del citotipo diploide las IAs se detectaron a partir del estadio II, acompañando la tétrada, hasta el estadio FG5, tercera mitosis. En todos los estadios la proporción de ovarios conteniendo IAs fue baja, y muy similar. Las observaciones en el citotipo tetraploide mostraron diferencias respecto al diploide, en primer lugar, el intervalo en el cual se detectaron IAs fue distinto, abarcó desde el estadio I, acompañando la CMM, hasta el FG4, segunda mitosis durante la megagametogénesis. Las proporciones de ovarios conteniendo IAs fue mayor en los tetraploides respecto a los diploides y también varió entre los estadios, siendo el estadio MF en el que se detectó una mayor proporción de IAs. En trabajos previos en diferentes especies del género *Paspalum* se ha informado que las IAs aparecen preferencialmente junto con la MF y algunas veces después de la meiosis acompañando la tétrada (Burson y Bennett, 1970, 1971; Quarín y Burson, 1991; Espinoza y Quarín, 1997; Quarín *et al.*, 1997, 2001, Laspina *et al.*, 2008). Otros autores han reportado la presencia de IAs junto con la CMM, en genotipos tetraploides apomícticos de *B. brizantha* y *B. decumbens* (Lutts *et al.*, 1994; Dusi y Willemse, 1999) y en genotipos diploides de *S. bicolor*, en los cuales las IAs se detectaron en el período comprendido entre la CMM hasta la MF (Carman *et al.*, 2011). Tanto los resultados previos como los obtenidos en esta tesis sugieren que las células de la nucela pueden modificar su destino celular durante diferentes estadios del desarrollo reproductivo sexual, principalmente durante la megasporogénesis. El hecho de que este período de desarrollo sea más extenso en los tetraploides respecto de los diploides, según lo observado en nuestros análisis, podría representar una ventaja para el desarrollo de la apomixis.

Esta asociación entre el desarrollo sexual y el apomíctico también se pone en evidencia en estudios de genes que están involucrados en los procesos de desarrollo sexual cuyo patrón de expresión se modifica entre plantas apomícticas y sexuales. Por ejemplo el gen *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE (SERK)*, relacionado con la transición de las células somáticas a embriogénicas (Schmidt *et al.*, 1997). En *P. notatum* y *Poa pratensis* se expresa únicamente en las CMM en los genotipos sexuales, sin embargo, en plantas apomícticas aparece en células de la nucela sugiriendo que este gen podría tener un papel en la especificación de las IAs (Albertini *et al.*, 2005; Podio *et al.*, 2014b). Otro ejemplo es el gen

TRIMETHYLGUANOSINE SYNTHASE (TGS1), cuya expresión está disminuida en el desarrollo apomítico (Laspina *et al.*, 2008, Siena *et al.*, 2014) y sus niveles de expresión, en la nucela se correlacionan positivamente con el grado de sexualidad (Siena *et al.*, 2014). Estudios de genes mutantes en *Arabidopsis* también evidencian la relación entre la reproducción sexual y la apomixis presentando fenotipos similares a la apomixis. En el caso de los mutantes del gen *ARGONAUTE9 (AGO9)*, involucrado en la formación de la gameta femenina, la desregulación de su expresión provoca la formación de células similares a la CMM en el óvulo que recuerdan a las células iniciales de la aposporia (Garcia-Aguilar *et al.*, 2010; Olmedo-Monfil *et al.*, 2010; Schmidt *et al.*, 2015). Estos resultados proponen que los genes que participan en el desarrollo sexual, en los estadios de desarrollo temprano se encuentran desregulados y refuerzan la propuesta que sugieren los resultados obtenidos en el presente trabajo en cuanto a que la poliploidía podría afectar el desarrollo reproductivo normal mediante una heterocronía de los desarrollos reproductivos favoreciendo el desarrollo apomítico.

Los resultados presentados en la presente sección constituyen el primer informe exhaustivo de la cronología del desarrollo reproductivo sexual y la formación de IAs en genotipos diploides y tetraploides en el género *Paspalum* spp. La obtención del calendario detallado del complejo multiploide de *P. rufum* permite identificar los estadios de desarrollo específicos para poder determinar, en un futuro, cuáles son los factores claves que intervienen en el proceso de desarrollo apomítico.

IV.4- CONCLUSIONES

1. El calendario reproductivo muestra que el desarrollo del polen puede ser utilizado como referencia para inferir los estadios de desarrollo sexual femenino en ambos citotipos.
2. Los procesos de microsporogénesis y megagametogénesis están diferencialmente coordinados en los citotipos diploide y tetraploide.
3. Se observa un retraso en el desarrollo reproductivo sexual femenino en el citotipo tetraploide respecto al diploide en referencia a los parámetros de crecimiento del ovario.
4. La iniciación de la meiosis está retrasada en el citotipo tetraploide respecto al diploide considerando los parámetros de crecimiento del ovario.
5. Las células iniciales de la aposporía se diferencian durante un período prolongado del desarrollo reproductivo sexual en ambos citotipos.
6. Las células iniciales de la aposporía se diferencian más temprano en el citotipo tetraploide que en el diploide con respecto al desarrollo reproductivo sexual femenino.

SECCIÓN 5: DETERMINACIÓN DE PATRONES DE METILACIÓN EN GENOTIPOS DIPLOIDES CON DIFERENTE EXPRESIVIDAD DE AOSPORÍA.

IV.5.1- Aplicación de la técnica MCSeEd en muestras con diferente expresividad de aposporía.

En base a evidencias previas que manifiestan que los procesos de desarrollo reproductivo están influenciados por modificaciones epigenéticas (Garcia-Aguilar *et al.*, 2010; Olmedo-Monfil *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2011; Grimanelli, 2012) y con el propósito de avanzar en la comprensión de la regulación de la aposporía a nivel molecular, se utilizó el citotipo diploide para detectar marcas epigenéticas asociadas a la expresividad de la aposporía. Los estudios realizados en este tema fueron desarrollados en la unidad de investigación de Genética Agraria y Biotecnología Genética dependiente de la Università degli Studi di Perugia, Italia, en el marco del proyecto: “*Harnessing Plant Reproduction for Crop Improvement (PROCROP)*”, Programa: Research and Innovation Staff Exchange (RISE) – H2020-MSCA-RISE-2014 y la colaboración del Dr. Emidio Albertini (coordinador del proyecto). Parte de las tareas experimentales se realizaron bajo la supervisión y colaboración de la Dra. Marika Bocchini, en tanto los análisis bioinformáticos fueron realizados por el Dr. Gianpiero Marconi.

Para cumplir con esta objetivo se aplicó la técnica MCSeEd que permite detectar los perfiles de metilación del ADN global en diferentes contextos de metilación (CG, CHG y CHH) (Marconi *et al.*, 2019). Se analizaron dos grupos de individuos de hermanos completos, derivados de la población F₁-1, que presentan baja y alta expresividad de la aposporía. Los híbridos con baja expresividad de la aposporía fueron: F1#9 y F1#12 (1,22 %SEA y 0 %SEA, respectivamente y sin capacidad de completar la apomixis) y los híbridos con alta expresividad de la aposporía fueron F1#15 y F1#39 (32,76 %SEA y 35,85 %SEA, respectivamente). De cada

individuo se extrajo ADN genómico a partir de inflorescencias en dos estadios distintos del desarrollo reproductivo: premeiosis y postmeiosis siguiendo el calendario descrito en la sección 4. De esta forma, el experimento quedó definido por las siguientes variables: 1) expresividad de la aposporía (alta y baja), 2) estadios de desarrollo reproductivo (premeiosis y postmeiosis) y 3) contexto de metilación (CG: *AciI/MseI*, CHG: *EcoT22I/MseI* y CHH: *PstI/MseI*). Cabe aclarar que el experimento quedó conformado por tres réplicas (dos biológicas y una técnica) de cada comportamiento reproductivo, para cada estadio y cada contexto de metilación. De esta manera se construyeron 36 bibliotecas de MCS_{SeEd} (**Tabla 5.1**). Las mismas fueron agrupadas según las variables baja y alta aposporía (denominadas 0 y 25, respectivamente) y el estadio de desarrollo reproductivo premeiosis (Pre) y postmeiosis (Pos). De esta manera, las réplicas agrupadas se denominaron: Pre0, Pre25, Pos0 y Pos25 (**Tabla 5.1**).

A partir de las bibliotecas producidas utilizando los genotipos con baja o nula expresión de la aposporía en premeiosis se generaron 43.335.448 lecturas (Index_12), mientras que en postmeiosis se obtuvieron 29.025.375 lecturas (Index_14). Las bibliotecas provenientes de genotipos con alta expresión de la aposporía permitieron obtener 41.919.365 lecturas en premeiosis (Index_15) y 37.460.672 lecturas en postmeiosis (Index_16). El 88% de estas lecturas pasó el control de calidad, por lo tanto, se trabajó con muestras que contaban con un promedio de 3,7 millones de lecturas de aproximadamente 143 pb cada una.

IV.5.1.1- Identificación de posiciones diferencialmente metiladas

Dado que aún no contamos con un genoma de referencia para mapear las lecturas obtenidas se generó un pseudo-genoma de referencia a través del protocolo bioinformático de MCS_{SeEd} (MethylKit) y las lecturas se procesaron y se mapearon sobre este (Marconi *et al.* 2019). Se realizó un alineamiento para las muestras en premeiosis y otro para las muestras en postmeiosis con 1.183.546 y 1.092.373 contigs, respectivamente. A partir de esto, se estimó el nivel relativo de metilación por contig (ver Materiales y Métodos) y se comparó cuantitativamente el grado de metilación entre los tratamientos Pre0 vs Pre25 y Post0 vs Post25 (**Tabla III-5** de materiales y métodos) (Marconi *et al.*, 2019).

Tabla 5.1. Conteo de lecturas obtenidas después de la secuenciación Illumina

| Index | ID_Muestra | Código de barra | Muestra_Barcode | Nombre de muestra | Total | Retenido | Suma | Promedio |
|-------------------------------|--------------|-----------------|-----------------|-------------------|------------------|------------------|----------|----------------|
| Illumina Index 12 (CTGTGA) | #9_pre_P1 | GCTACAA | pstl_P1 | pre0_1 | 3745558 | 3437449 | | |
| | #9_pre_P2 | AGCATCA | pstl_P2 | pre0_2 | 5871210 | 4156221 | 10750386 | 3583462 |
| | #12_pre_P3 | CCATCCA | pstl_P3 | pre0_3 | 3552859 | 3156716 | | |
| | #9_pre_P25 | AACACAA | aci_P25 | pre0_1 | 6361196 | 5934404 | | |
| | #9_pre_P26 | AACGTGA | aci_P26 | pre0_2 | 4964215 | 4533832 | 13887293 | 4629098 |
| | #12_pre_P27 | AAGGAAT | aci_P27 | pre0_3 | 3630091 | 3419057 | | |
| | #9_pre_P31 | CACGCTA | eco_P31 | pre0_1 | 5940535 | 5092887 | | |
| | #9_pre_P32 | CAGGGCA | eco_P32 | pre0_2 | 4728398 | 4127892 | 12737365 | 4245788 |
| #12_pre_P33 | CAGGTGT | eco_P33 | pre0_3 | 4541386 | 3516586 | | | |
| Total Index 12 | | | | | 43335448 | 37375044 | | 4152782 |
| Illumina Index 15 (ATGTCA) | #15_pre_P1 | GCTACAA | pstl_P1 | pre25_1 | 3899249 | 3236767 | | |
| | #39_pre_P2 | AGCATCA | pstl_P2 | pre25_2 | 2843163 | 2350699 | 7846191 | 2615397 |
| | #39_pre_P3 | CCATCCA | pstl_P3 | pre25_3 | 2747355 | 2258725 | | |
| | #15_pre_P25 | AACACAA | aci_P25 | pre25_1 | 5379651 | 5189137 | | |
| | #39_pre_P26 | AACGTGA | aci_P26 | pre25_2 | 4467226 | 4346611 | 14233379 | 4744460 |
| | #39_pre_P27 | AAGGAAT | aci_P27 | pre25_3 | 4787147 | 4697631 | | |
| | #15_pre_P31 | CACGCTA | eco_P31 | pre25_1 | 5931277 | 4862083 | | |
| | #39_pre_P32 | CAGGGCA | eco_P32 | pre25_2 | 5003748 | 4147607 | 14729307 | 4909769 |
| #39_pre_P33 | CAGGTGT | eco_P33 | pre25_3 | 6860549 | 5719617 | | | |
| Total Index 15 | | | | | 41919365 | 36808877 | | 4089875 |
| Illumina Index 14 (AGTTCC) | #9_post_P1 | GCTACAA | pstl_P1 | post0_1 | 2355786 | 2126705 | | |
| | #12_post_P2 | AGCATCA | pstl_P2 | post0_2 | 3010022 | 2357298 | 6902709 | 2300903 |
| | #12_post_P3 | CCATCCA | pstl_P3 | post0_3 | 3086079 | 2418706 | | |
| | #9_post_P25 | AACACAA | aci_P25 | post0_1 | 3283534 | 3129149 | | |
| | #12_post_P26 | AACGTGA | aci_P26 | post0_2 | 3278966 | 3132026 | 9231387 | 3077129 |
| | #12_post_P27 | AAGGAAT | aci_P27 | post0_3 | 3043110 | 2970212 | | |
| | #9_post_P31 | CACGCTA | eco_P31 | post0_1 | 3136075 | 2447104 | | |
| | #12_post_P32 | CAGGGCA | eco_P32 | post0_2 | 4345875 | 3607077 | 9040576 | 3013525 |
| #12_post_P33 | CAGGTGT | eco_P33 | post0_3 | 3485928 | 2986395 | | | |
| Total Index 14 | | | | | 29025375 | 25174672 | | 2797185 |
| Illumina Index 16 (CCGTCC) | #15_post_P1 | GCTACAA | pstl_P1 | post25_1 | 2776134 | 2662589 | | |
| | #15_post_P2 | AGCATCA | pstl_P2 | post25_2 | 3210029 | 2877491 | 8511755 | 2837252 |
| | #39_post_P3 | CCATCCA | pstl_P3 | post25_3 | 3204307 | 2971675 | | |
| | #15_post_P25 | AACACAA | aci_P25 | post25_1 | 4894638 | 4764689 | | |
| | #15_post_P26 | AACGTGA | aci_P26 | post25_2 | 3315593 | 3209057 | 11746109 | 3915370 |
| | #39_post_P27 | AAGGAAT | aci_P27 | post25_3 | 3835936 | 3772363 | | |
| | #15_post_P31 | CACGCTA | eco_P31 | post25_1 | 4033918 | 3376148 | | |
| | #15_post_P32 | CAGGGCA | eco_P32 | post25_2 | 5074325 | 4404007 | 14289691 | 4763230 |
| #39_post_P33 | CAGGTGT | eco_P33 | post25_3 | 7115792 | 6509536 | | | |
| Total Index 16 | | | | | 37460672 | 34547555 | | 3838617 |
| Total general | | | | | 151740860 | 133906148 | | 3719615 |

En premeiosis, se identificaron 17.003 posiciones, de un total de 1.183.546 de contigs detectados en el pseudo-genoma de referencia (contigs), que mostraban diferencias significativas en los niveles de metilación entre las muestras de baja y alta aposporía utilizando la regresión logística implementada en methylKit ($FDR < 0,05$). Se detectaron 358 contigs correspondientes al contexto CG, 826 a CHG y 16.638 a CHH (**Tabla 5.2**).

Tabla 5.2. Número contigs obtenidos en el pseudogenoma de referencia y número de secuencias diferencialmente metiladas para cada contexto para las muestras en premeiosis

| Muestras | Contexto | Contigs formados del pseudogenoma | Diferencialmente metilados |
|---|----------|-----------------------------------|----------------------------|
| Premeiosis baja vs alta aposporía | CG | 669.290 | 358 |
| | CHG | 179.662 | 826 |
| | CHH | 334.594 | 16.638 |
| | TOTAL | 1.183.546 | 17.822 |

Para establecer si existían diferencias en el estado de metilación entre los dos niveles de aposporía analizados, se realizaron análisis de componentes principales (ACP) en función de los niveles relativos de metilación de los contigs del pseudo-genoma (**Figura 5.1**). El primer componente principal (PC1) representó el 61%, 68% y 62% de la varianza total, para los contextos CG, CHG y CHH, respectivamente, y claramente discriminó entre muestras con baja y alta expresividad de la aposporía, lo cual indicó que existen diferencias de metilación entre los genomas de espiguillas de *P. rufum* de genotipos con comportamientos reproductivos diferentes.

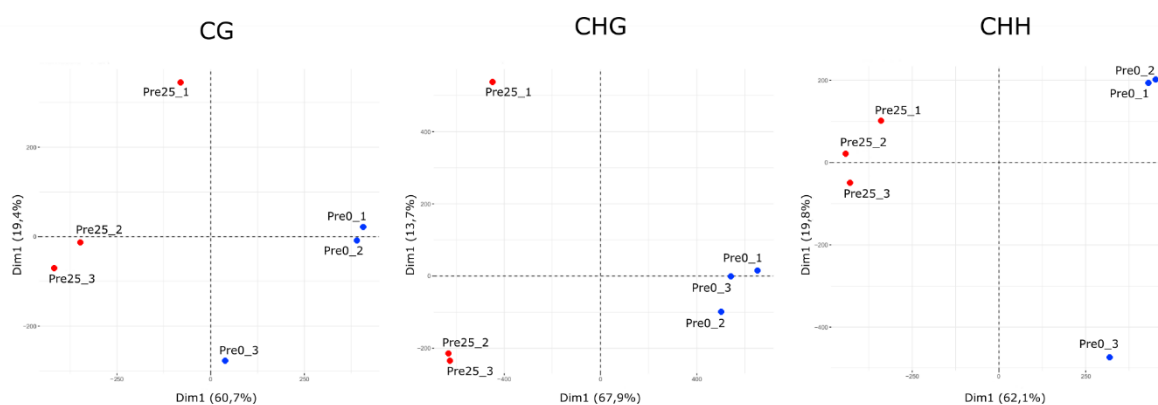


Figura 5.1. Gráficos de ACP realizados usando las frecuencias relativas de metilación diferencial de los contigs identificados a partir de la comparación entre las muestras de baja (puntos azules) y de alta aposporía (puntos rojos) en el estadio de premeiosis en los diferentes contextos de metilación (CG, CHG y CHH).

Por otro lado, los niveles de metilación relativa pertenecientes a cada contig fueron jerárquicamente agrupados y graficados mediante *heatmaps*. Los resultados observados por ambas metodologías fueron coincidentes para los contextos de metilación CHG y CHH, ya que se observó que los mismos permiten discriminar por comportamiento reproductivo, mientras que el contexto de metilación CG presenta una pequeña desviación. Según lo que se observa en los gráficos de *heatmap*, en el contexto CHG la proporción de contigs con aumento de metilación (amarillo) es levemente mayor en las muestras con mayor expresividad de la aposporía. Mientras que el contexto CHH, en las muestras de alta expresividad de la aposporía, la proporción de contigs que aumentan la metilación (amarillo) es levemente menor a la proporción de contigs que están desmetilados (rojo) (**Figura 5.2**).

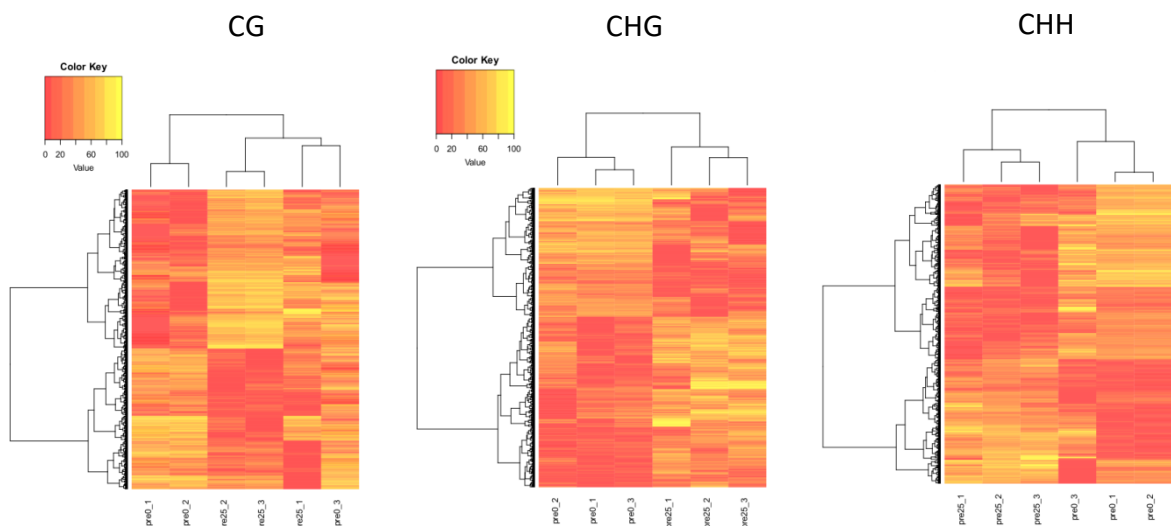


Figura 5.2. Gráficos Heatmaps realizados usando las frecuencias relativas de metilación diferencial de los contigs identificados a partir de la comparación entre las muestras de baja (Pre0) y de alta aposporía (Pre25) en premeiosis en los diferentes contextos de metilación (CG, CHG y CHH).

En el caso de los análisis realizados sobre espiguillas en el estadio de postmeiosis, los análisis estadísticos permitieron detectar 31.618 contigs ($FDR < 0,05$) diferencialmente metilados debido a diferencias en la expresividad de la aposporía de 1.092.373 contigs detectados en el pseudo-genoma. De todos ellos, 11.855 tuvieron diferencias en la metilación en el contexto CG, 17.676 en CHG y 2.087 contigs en el contexto CHH. (**Tabla 5.3**).

Tabla 5.3. Número de contigs obtenidos en el pseudogenoma de referencia y número de secuencias diferencialmente metiladas para cada contexto para las muestras en el estadio de postmeiosis.

| | Contexto | Contigs formados del pseudogenoma | Diferencialmente metilados |
|--|----------|-----------------------------------|----------------------------|
| Postmeiosis baja vs alta aposporía | CG | 588.468 | 11.855 |
| | CHG | 189.434 | 17.676 |
| | CHH | 314.474 | 2.087 |
| | TOTAL | 1.092.376 | 31.618 |

Los ACP realizados permitieron discriminar las muestras según baja y alta aposporía utilizando la componente principal 1 para los contextos de metilación CG, CHH y CHG (**Figura 5.3**). La componente principal 1 (PC1) representó el 51%, 62% y 67% de la varianza total, para los contextos CG, CHG y CHH, respectivamente. Esto indica que la mayoría de las diferencias de metilación observadas se deben a diferencias relacionadas con alta y baja expresión de la aposporía.

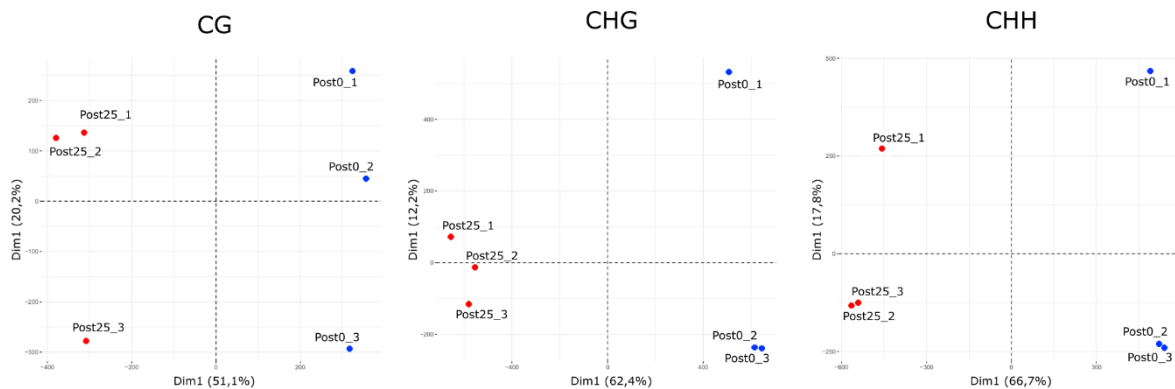


Figura 5.3. Gráficos de ACP realizados usando las frecuencias relativas de metilación diferencial de los contigs identificados a partir de la comparación entre las muestras de baja (puntos azules) y de alta aposporía (puntos rojos) en el estadio de postmeiosis en los diferentes contextos de metilación (CG, CHG y CHH).

Estos resultados se condicen con los heatmaps realizados para todos los contextos de metilación, los cuales indican que las diferencias en la metilación parecen corresponderse a diferencias de alta y baja aposporía (post25 y post0, respectivamente) (**Figura 5.4**). También de forma cualitativa, podemos decir que existe una misma proporción de aumentos de metilación (amarillo) que disminuciones (rojo) en todos los contextos de metilación, especialmente en CHG y CHH.

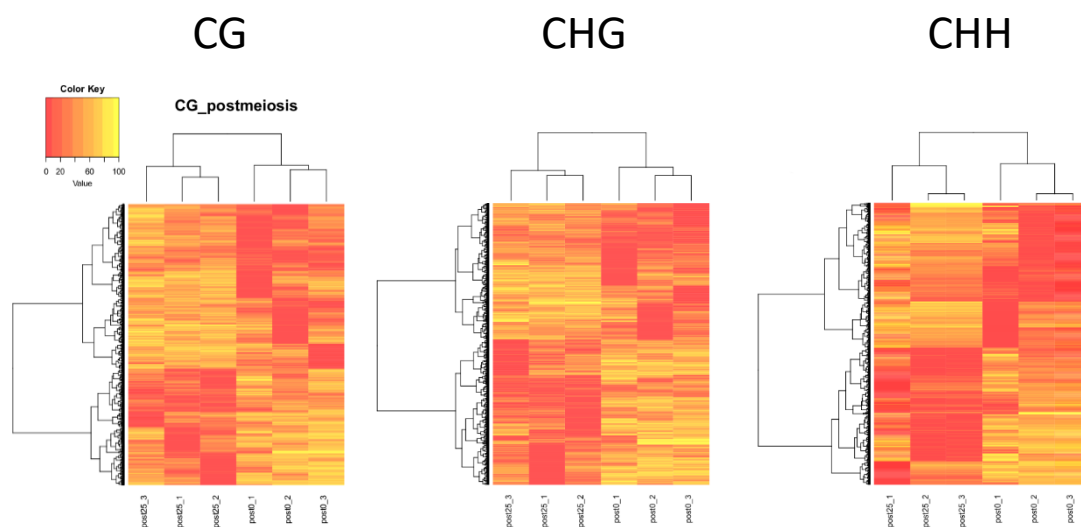


Figura 5.4. Gráficos Heatmaps realizados usando las frecuencias relativas de metilación diferencial de los contigs identificados a partir de la comparación entre las muestras de baja (Pre0) y de alta aposporía (Pre25) en postmeiosis en los diferentes contextos de metilación (CG, CHG y CHH).

IV.5.1.2- Validación de las bases de datos obtenidas

Con el objetivo de detectar genes posiblemente controlados por mecanismos epigenéticos asociados a la alta y baja expresividad de la aposporía, las secuencias nucleotídicas diferencialmente metiladas se analizaron en estudios de BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) sobre la base de datos de NCBI (National Center for Biotechnology Information). En el estadio de premeiosis, para los contextos de metilación CG, CHG y CHH que cuentan con 358, 826 y 16638 contigs diferencialmente metilados respectivamente, se encontró que 33, 184 y 1581 (entre un 9 y 22 % de los contigs) mostraron homología con secuencias de especies relacionadas como: *Paspalum ionanthum*, *Paspalum inaequivalve*, *Paspalum virgatum*, *Zea mays*, *Zea luxurians*, *Tripsacum dactyloides*, *Sorghum bicolor*, *Setaria italica*, entre otras. Por otra parte, en postmeiosis, los contigs diferencialmente metilados de los contextos CG, CHG, y CHH (11.855, 17.676 y 2087, respectivamente) presentaron homología de secuencia con 1213, 3503 y 232 (entre 10 y 22 % de los contigs) secuencias de las mismas especies mencionadas anteriormente.

Este análisis permitió validar la técnica utilizada y sugiere que numerosas secuencias asociadas con el desarrollo reproductivo de plantas, señalización de hormonas vegetales, transporte de vesículas y control de la regulación del ciclo celular están diferencialmente

metiladas durante el desarrollo reproductivo. En la **tabla 3** del ANEXO se detallan las primeras 40 anotaciones con menor e-value detectadas para contexto de metilación y para cada estadio de desarrollo.

Con el resultado de las anotaciones en el NCBI, se realizaron diagramas de Venn (<http://jvenn.toulouse.inra.fr>) para determinar aquellas secuencias que presentaban metilaciones en más de un contexto. De esta forma, en premeiosis se detectaron tres secuencias que presentaron metilaciones en los contextos CG y CHH y 19 secuencias que exhibieron metilaciones en los contextos CHG y CHH (**Tabla 4** del ANEXO). En este estadio del desarrollo reproductivo no se encontraron secuencias que presenten metilaciones en los tres contextos analizados (**Figura 5.5-a**). Por otro lado, en el estadio postmeiosis, fue posible localizar ocho secuencias con cambios epigenéticos entre muestras de baja y alta aposporía que presentan metilación para los tres contextos (CG, CHG y CHH). Además, se detectaron 67 secuencias con citosinas metiladas en contextos CG y CHG, cuatro secuencias con metilación en los contextos CG y CHH y otras 13 secuencias que presentaron metilación en los contextos CHG y CHH (**Figura 5.5- b** y **Tabla 5** del ANEXO).

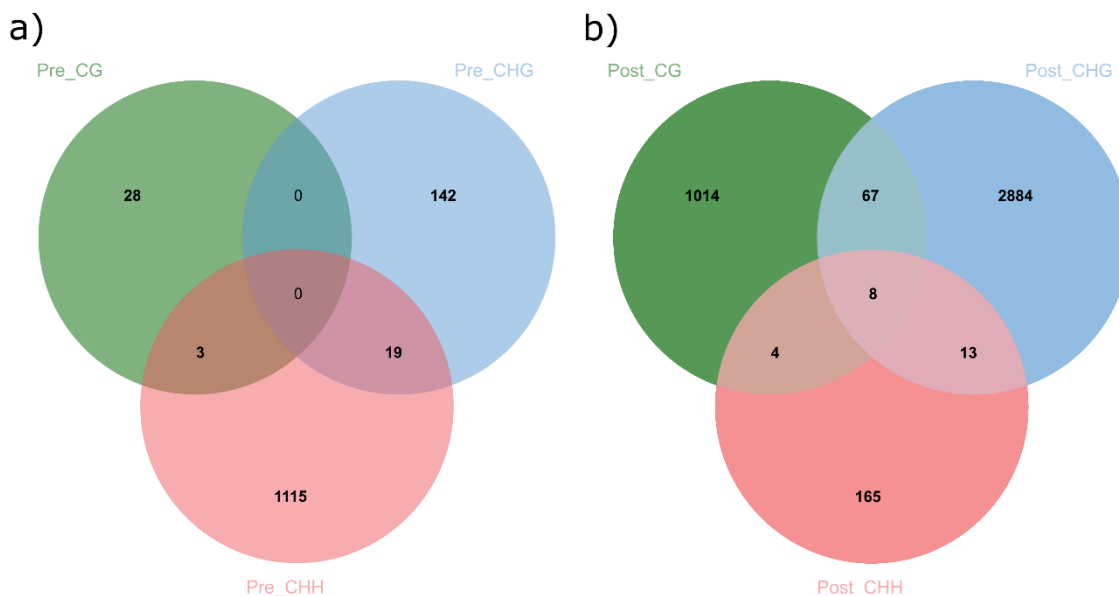


Figura 5.5. Diagrama de Venn realizados usando la anotación proveniente de la base de datos del NCBI de secuencias que presentan diferencias de metilación entre plantas con baja y alta expresividad de la aposporía. A) Secuencias diferencialmente metiladas en el estadio de premeiosis. B) Secuencias diferencialmente metiladas en el estadio de postmeiosis.

También, se realizaron análisis para identificar las secuencias que presentaban patrones de metilación diferencial específico de cada estadio o que estaban diferencialmente metiladas en ambos estadios, para cada contexto de metilación. Para todos los contextos de metilación se identificaron secuencias, diferencialmente metiladas, que son específicas para cada estadio. En total 21, 75 y 1024 contigs de los contextos de metilación CG, CHG y CHH respectivamente, solo presentaron diferencias de metilación en premeiosis (**Figura 5.6.** y **Tabla 6** del ANEXO). Mientras que 1083, 2886 y 177 contigs de los contextos de metilación CG, CHG y CHH, respectivamente solo presentaron diferencias de metilación en el estadio de postmeiosis (**Figura 5.6.** y **Tabla 7** del ANEXO).

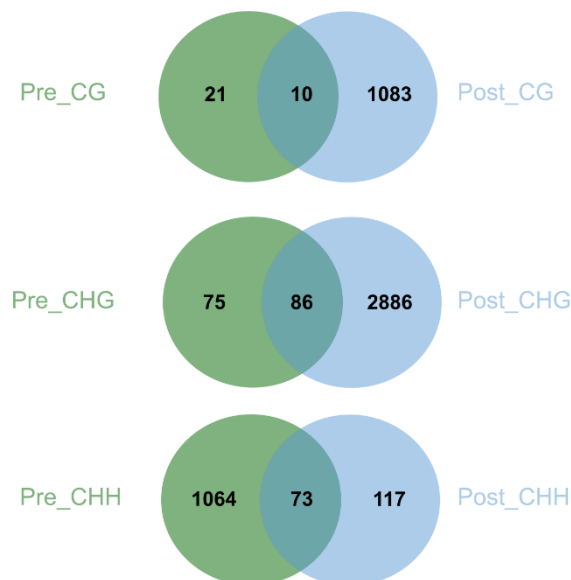


Figura 5.6. Diagrama de Venn en la anotación proveniente del NCBI de secuencias que presentan diferencias de metilación entre plantas con baja y alta expresividad de la aposporía en todos los contextos de metilación.

Como información relevante, dentro de las anotaciones funcionales de las secuencias diferenciales, se identificaron varias de ellas que están involucradas en procesos relacionados con el desarrollo reproductivo y por lo tanto resultan de interés. A continuación se detallan algunas de estas secuencias: 1) meiosis: *PUTATIVE MEIOTIC RECOMBINATION PROTEIN (SPO11)*; *MEIOSIS 5-LIKE PROTEIN GENE*; *MALE MEIOCYTE DEATH 1-LIKE*; *MEIOSIS 5-LIKE PROTEIN GENE*; 2) Vías de ubiquitinación: *E3 UBIQUITIN-PROTEIN LIGASE*; *BIG BROTHER*; *UBIQUITIN CARBOXYL-TERMINAL HYDROLASE*; *E3 SUMO-PROTEIN LIGASE (SIZ1)*, 3) vías de señalización hormonal: *TRANSCRIPTIONAL FACTOR B3 FAMILY*

PROTEIN/AUXIN-RESPONSIVE FACTOR AUX/IAA-RELATED; AUXIN RESPONSE FACTOR 7; AUXIN TRANSPORT PROTEIN (BIG); AUXIN RESPONSE FACTOR 16 (ARF16), 4) regulación transcripcional: AP2-LIKE ETHYLENE-RESPONSIVE TRANSCRIPTION FACTOR (BBM2); WRKY TRANSCRIPTION FACTOR 29 y 5) proliferación y ciclo celular: SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE (SERK1-SERK2); ARGONAUTE 16; ARGONAUTE MEL1-LIKE; WUSCHEL-RELATED HOMEBOX 10; ORIGIN OF REPLICATION COMPLEX 3B (ORC3B). Siendo varias de ellas específicas para un estadio del desarrollo en particular (**Tablas 6 y 7** del ANEXO). Un estudio más exhaustivo de estos genes candidatos nos permitirá también evaluar los cambios epigenéticos específicos producidos durante el desarrollo en etapas clave para la reproducción apomíctica.

Actualmente, nuestro grupo de trabajo se encuentra en proceso de ensamblado el genoma de *Paspalum notatum* el cual será utilizado como genoma de referencia para ensamblar secuencias diferencialmente metiladas de mayor tamaño (500 pb aproximadamente). Esto nos permitirá mapear contigs diferencialmente metilados de manera más confiable y distinguir regiones diferencialmente metiladas (RDM), lo cual otorgará mayor seguridad al momento de seleccionar posibles genes candidatos, además de permitir inferir en el grado de metilación de la región que controla la apomixis.

IV.5- DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos durante los primeros años del proyecto de tesis, así como los avances realizados sobre la participación de las modificaciones epigenéticas en la regulación de la apomixis fueron fundamentales para planificar los experimentos propuestos en la presente sección.

Como se describe en la Introducción existen múltiples estudios de mutantes en *Arabidopsis* y otras especies, que evidencian la participación de las modificaciones epigenéticas, modificando los patrones de expresión y controlando el desarrollo reproductivo (García-Aguilar *et al.*, 2010; Olmedo-Monfil *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2011; Grimanelli, 2012). En concordancia con estos resultados los estudios en especies naturalmente apomícticas también ponen en evidencia la participación de estas vías en la regulación de la apomixis. En *P. notatum* y *P. rufum* se registraron las primeras demostraciones de cambios genéticos, epigenéticos y de expresión asociados a los aumentos de ploidía (Martelotto *et al.*, 2005, 2007; Rodríguez *et al.*, 2012). Los análisis de expresión diferencial en *P. simplex* también mostraron la expresión específica de alelos, posiblemente pseudogenes, que provocarían la desregulación de un mismo alelo entre apomícticos y sexuales (Polegri *et al.*, 2010).

En el presente trabajo se propone un sistema innovador tanto por la técnica implementada como por el sistema comparativo utilizado. La técnica, que fue recientemente publicada por Marconi *et al.* (2019), es un análisis cuantitativo de secuencias diferencialmente metiladas que a su vez son secuenciadas en un mismo procedimiento relativamente sencillo. Como se menciona en la introducción esta técnica ha brindado varias ventajas a este tipo de análisis, entre ellas que permite analizar al mismo tiempo varios contextos de metilación. Esto es interesante en plantas ya que aunque la metilación del ADN en citosinas, en un contexto simétrico CG, es una modificación conservada del ADN detectada en muchos organismos vivientes (Klose y Bird, 2006), las plantas han desarrollado mecanismos adicionales de

metilación de citosinas en contextos simétricos (CHG) y asimétricos (CHH) (Matzke y Mosher, 2014).

Los estudios previos de los perfiles de metilación de citosinas en contextos CG se han enfocado en las diferencias de metilación asociadas a la poliploidización en *P. notatum*, detectando epialelos relacionados con el cambio de ploidía (Rodríguez *et al.*, 2012) o por ejemplo en un estudio más reciente, a cambios del comportamiento reproductivo identificando un número, relativamente bajo (26), de secuencias diferencialmente metiladas (Bocchini *et al.*, 2018). En todos estos trabajos, se han implementado mayoritariamente análisis diferenciales de metilación que identifican cualitativamente presencia y ausencia de marcas de metilación entre diferentes genotipos poliploides con comportamientos reproductivos diferentes y que en algunos casos también difieren en los niveles de ploidía.

El sistema comparativo que se utiliza en el presente trabajo, incluye varios genotipos diploides con un mismo fondo genético con comportamiento reproductivo contrastante, que simplifica el análisis y refuerzan los resultados obtenidos por contar con réplicas biológicas con bajas variaciones genéticas debido a que pertenecen a la misma población y al mismo nivel de ploidía. Teniendo en cuenta los estudios previos que proponen que la apomixis ha evolucionado como un sistema reproductivo alternativo por reordenamiento de los programas de desarrollo que intervienen en la reproducción sexual (Grimanelli *et al.*, 2001) y la relación existente entre las modificaciones epigenéticas con el control del desarrollo reproductivo, el sistema propuesto incluye comparaciones entre dos estadios del desarrollo reproductivo que resultan especialmente interesantes para detectar los genes involucrados en la expresividad de la apomixis y son regulados por epigenética.

En los análisis observamos que la proporción de contigs que presentaron un aumento de metilación en las plantas con baja expresividad de la aposporía es equivalente a la proporción observada en las plantas con alta expresividad de la aposporía en los dos estadios de desarrollo analizados y en la mayoría de los contextos de metilación, excepto en las muestras de premeiosis y contexto CG, estos resultados coinciden con los análisis de MSAP realizados por Rodríguez *et al.* (2012) y por Bocchini *et al.* (2018), quienes tampoco evidenciaron diferencias importantes en las proporciones de secuencias metiladas entre genotipos sexuales y apomícticos de *P. notatum*.

Los análisis de los patrones de metilación, teniendo en cuenta las secuencias diferencialmente metiladas, permitieron discriminar por comportamiento reproductivo. En el caso de premeiosis se observa que en los contextos CHH y CHG, los patrones de metilación agrupan las muestras según la expresividad de la aposporía, en el caso de postmeiosis las diferencias en los patrones de metilación son capaces de agrupar los genotipos por comportamiento reproductivo para los tres contextos de metilación. Estos resultados también concuerdan con los estudios comparativos realizados por Rodríguez *et al.*, 2012 en los cuales los perfiles de metilación permiten agrupar los genotipos principalmente según su comportamiento reproductivo a pesar de las grandes diferencias genotípicas del sistema implementado.

Es llamativo que el número de contigs, en premeiosis, diferencialmente metilados sean comparables en los contextos CG y CHG, y muy inferiores respecto a los encontrados en el contexto CHH. En el caso de postmeiosis, se presenta la distribución opuesta dado que el número de contigs en el contexto CG y CHG es similar entre ellos y mucho mayor al número de contigs detectados en el contexto CHH. En relación con estos resultados es interesante tener en cuenta las diferencias entre los mecanismos moleculares que regulan las modificaciones epigenéticas de los distintos contextos (Law y Jacobsen, 2010). El contexto simétrico CG es mantenido durante la replicación por MET1, metiltransferasa en plantas, estos contextos están asociados a secuencias génicas y se encuentran, además alrededor de transposones (TE) (Trucci *et al.*, 2016). En contextos no-CG, la metilación es más abundante en plantas y se encuentra predominantemente alrededor de TE (Trucci *et al.*, 2016). La metilación en CHG es controlada por la metiltransferasa CMT3, por metilación de Histonas mientras el contexto CHH es guiada por ARN pequeños a través de la metil-transferasa DRM2 (Law y Jacobsen 2010). Los resultados obtenidos en este trabajo indican por lo tanto que las vías controladas por ARN pequeños sería una de las preponderantes en la regulación de la expresión génica durante el desarrollo previo a la meiosis.

Las anotaciones de los contigs diferencialmente metilados en las bases de datos arrojaron entre 9% y 22% de homología con secuencias codificantes de especies relacionadas, en ambos estadios del desarrollo. La utilización en un futuro de un genoma de referencia permitirá profundizar este análisis ya que será posible identificar regiones de mayor tamaño y también la región genómica en la que se localizan. Las secuencias identificadas permitieron en

principio validar la técnica utilizada y además aportan información interesante dado que los genes que incluyen las secuencias diferencialmente metiladas participan de la regulación del desarrollo reproductivo tanto directa como indirectamente. Más aún estas secuencias homologas diferencialmente metiladas fueron comparadas entre los estadios reproductivos y se observó que en general son específicas de cada estadio de desarrollo por lo que estos análisis podrían permitir identificar los genes que están involucrados en los procesos de desarrollo específicos que inducen cambios en la expresividad de la aposporía. En un trabajo previo realizado en *Eragrostis curvula*, una especie apomíctica diplospórica, en la cual analizan la expresividad de la diplosporía, muestran que existen variaciones epigenéticas asociadas a este carácter. El seguimiento de individuos tetraploides artificiales que inicialmente eran sexuales y que a lo largo de 5 años aumentaron la capacidad de producir SEA alcanzado un 85-90%, permitió detectar tanto modificaciones genéticas como epigenéticas asociadas a estas variaciones, posiblemente a través de la actividad de transposones (Zappacosta *et al.*, 2014).

Existe un amplio repertorio de evidencias que avalan la estrecha relación entre las modificaciones epigenéticas con el control de la apomixis. En *P. simplex*, por ejemplo se detectó un alto nivel de metilación en la región que controla la apomixis después de realizar análisis de marcadores RFLP sensibles a la metilación utilizando sondas localizadas en la ACR (región que controla la apomixis) y de realizar análisis de FISH junto con inmunodetección de 5mC utilizando clones de BAC ligados al carácter (Podio *et al.*, 2014a). También se demostró que las variaciones provocadas durante los cambios de ploidía en *P. plicatulum* no están distribuidos al azar sino que se localizan en regiones conservadas (Weihmüller *et al.*, 2014). Esta estrecha asociación sugiere que la identificación y la localización de los genes diferencialmente metilados entre genotipos con comportamientos reproductivos diferentes constituye un sistema ideal para identificar genes relacionados con el control de la expresividad de la aposporía. Más aún la posibilidad de acotar los análisis a tejidos reproductivos en desarrollo pueden aumentar la proporción de genes de interés.

Nuestro trabajo confirma la aplicación de la técnica MSCeEd para detectar genes diferencialmente metilados entre individuos con comportamientos reproductivos contrastantes. Las secuencias diferencialmente metiladas que fueron validadas por búsqueda de homología son del rango de 1000 para cada contexto de metilación, un valor alto comparado con los análisis previos de Bocchini *et al.* (2018) por un análisis de MSAP. El incremento en el número

de réplicas biológicas probablemente restringirá este número, sin embargo, consideramos que los resultados obtenidos son interesantes como punto de partida para su validación más exhaustiva y próximos análisis. Es importante destacar que varios de los genes diferencialmente metilados en el sistema bajo estudio han sido asociados a procesos de reproducción e inclusive a la apomixis (por ejemplo: ARFs, AP2, ORC3) (Ozias-Akins, 2014; Li *et al.*, 2016; Siena *et al.*, 2016). Esto abre nuevas líneas de investigación para determinar el rol de las modificaciones epigenéticas en la transición entre sexualidad y apomixis a nivel diploide.

IV.5- CONCLUSIONES

1. La utilización de la técnica de MCS_{Ed} permitió la identificación de secuencias diferencialmente metiladas entre plantas con diferente expresividad de la aposporía en *P. rufum*.
2. Las variaciones en la expresividad de la aposporía (alta vs baja) en individuos diploides de *P. rufum*, está asociada a cambios en los patrones de metilación.
3. Las modificaciones epigenéticas detectadas son mayoritariamente específicas para los estadios de desarrollo analizados.
4. Las secuencias que presentan modificaciones epigenéticas poseen homología con secuencias codificantes relacionadas con los procesos de crecimiento y desarrollo reproductivo.

V- CONCLUSIONES GENERALES

El género *Paspalum* constituye un sistema excepcional para el estudio de la apomixis dado que cuenta con un gran número de especies que se reproducen por esta vía y son a su vez, recursos forrajeros importantes para las regiones tropicales y subtropicales de América. El objetivo principal de la tesis es implementar un sistema modelo para el estudio de la apomixis al nivel diploide en la especie *Paspalum rufum* e identificar los principales factores que afectan la herencia y expresividad del carácter en el entorno diploide. Para esto se desarrolló un sistema comparativo entre individuos diploides y tetraploides con diferentes comportamientos reproductivos.

Por medio de la caracterización del comportamiento reproductivo de una población F₁ se identificaron individuos diploides con comportamientos reproductivos contrastantes que serán de gran utilidad para futuros estudios comparativos relacionados con la caracterización molecular del control de la apomixis a nivel diploide. Los estudios de segregación del carácter en esta misma población sugieren que la herencia de la aposporía ajusta a un modelo de dos genes independientes dominantes a diferencia de lo observado en otras especies del género al nivel poliploide. Los análisis cuantitativos del carácter “aposporía” mostraron una gran variabilidad entre los individuos hermanos completos alcanzando niveles relativamente altos, considerando el nivel de ploidía. Estos incrementos se mostraron estables frente a cambios ambientales en una misma localidad, aunque sí se observaron variaciones frente a grandes cambios de latitud. Por otro lado, la cuantificación de los %SEA en las generaciones F₂ reveló que los niveles de expresividad de la aposporía de los genotipos parentales son transmitidos a las progenies. Los análisis cuantitativos del %SEA en los genotipos tetraploides artificiales mostraron que los aumentos en los niveles de ploidía inducen incrementos en la expresividad de la aposporía respecto a los diploides originales. Los incrementos observados en los híbridos diploides, así como en los tetraploides artificiales apoyan la idea de que diferentes combinaciones o dosajes de alelos modifican la expresividad del carácter.

Con el propósito de desarrollar herramientas moleculares en el sistema propuesto se desarrollaron mapas de ligamiento genético para los dos genotipos parentales de la población F₁ diploide, los cuales se utilizaron para realizar un primer abordaje en la búsqueda de regiones genómicas que modifican la expresividad de la aposporía. Estos análisis detectaron regiones asociadas al carácter en diferentes grupos de ligamiento, lo que está de acuerdo con lo propuesto por los resultados previos, y que sugiere que la expresividad del carácter estaría influenciada por diferentes combinaciones de alelos/genes. Estos resultados preliminares deberán ser analizados con mayor profundidad y validados en nuevas poblaciones.

Si bien la hibridación a nivel diploide y la duplicación genómica provocaron incrementos en la expresividad de la aposporía era necesario completar la caracterización reproductiva para determinar la capacidad de completar la apomixis por medio de la partenogénesis. En el caso de los genotipos diploides los aumentos de los %SEA no fueron suficiente para aumentar la capacidad de completar la apomixis. Sin embargo, sí se logró cuando se duplicaron los cromosomas ya que se obtuvieron individuos capaces de generar semillas por apomixis incluso bajo condiciones de polinización abierta. Estos resultados revelan que los incrementos en los niveles de ploidía favorecen la expresión de la apomixis, pero no son suficientes para lograr genotipos completamente apomícticos.

Aunque existe una estrecha relación entre la poliploidía y la expresión de la apomixis no se conocen las razones que la provocan. Una de las propuestas para justificar esta relación es que los genes duplicados durante la poliploidización, involucrados en el desarrollo reproductivo, se expresan asincrónicamente produciendo desregulación de los programas reproductivos. En función de esta teoría se compararon los desarrollos reproductivos diploide/tetraploide mediante observaciones citoembriológicas. Estos análisis confirmaron la existencia de una asincronía entre el desarrollo reproductivo de ambos citotipos. Principalmente se observó un retraso en el desarrollo reproductivo femenino tetraploide (meiosis), respecto al desarrollo femenino diploide. Esta variación podría estar relacionada con el éxito de la apomixis dado que las células iniciales de la aposporía se producen durante este periodo del desarrollo reproductivo.

Estudios previos proponen que la apomixis ha evolucionado como un sistema reproductivo alternativo por reordenamiento de los programas de desarrollo que intervienen en la reproducción

sexual. Por otro lado, existe una estrecha relación entre las modificaciones epigenéticas, el control del desarrollo reproductivo y la apomixis. Teniendo en cuenta esta información se implementó el sistema comparativo diploide de *P. rufum* para comparar los patrones de metilación entre genotipos con altos y bajos niveles de expresión de la aposporía, analizando además dos estadios de desarrollo reproductivo. Los resultados obtenidos mostraron que las variaciones de los patrones de metilación se relacionan con el comportamiento reproductivo verificando la utilidad del sistema de estudio propuesto para la identificación de genes relacionados con el control de la aposporía. Además, las secuencias diferencialmente metiladas presentaron homología a genes relacionados con procesos biológicos del desarrollo reproductivo. Las bases de datos obtenidas serán el punto de partida para estudios posteriores.

Los resultados obtenidos permitieron desarrollar y caracterizar un nuevo sistema de estudio de la apomixis que presenta la ventaja de analizarla a nivel diploide y facilitará la comprensión de la transición de la sexualidad a la apomixis.

VI- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acuña CA, Martínez EJ, Quarín CL (2005) Sexual diploid and apomictic tetraploid races in *Thrasya petrosa* (Gramineae). *Australian Journal of Botany* 53: 479.
- Acuña CA, Blount AR, Quesenberry KH, Kenworthy KE, Hanna WW (2011) Tetraploid bahiagrass hybrids: Breeding technique, genetic variability and proportion of heterotic hybrids. *Euphytica* 179: 227-235.
- Aguilera PM, Sartor ME, Galdeano F, Espinoza F, Quarín CL (2011) Interspecific tetraploid hybrids between two forage grass species: Sexual *Paspalum plicatulum* and apomictic *P. guenoarum*. *Crop Science* 51: 1544-1550.
- Aguilera PM, Galdeano F, Quarín CL, Ortiz JPA, Espinoza F (2015) Inheritance of Aposporous Apomixis in Inter-specific Hybrids Derived from Sexual and Apomictic. *Crop Science* 55: 1947-1956.
- Akiyama Y, Conner JA, Goel S, Morishige DT, Mullet JE, Hanna WW, Ozias-Akins P (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, Porceddu A, Ferranti F, Reale L, Barcaccia G, Romano B, Falcinelli M (2001) Apospory and parthenogenesis may be uncoupled in *Poa pratensis*: a cytological investigation. *Sexual Plant Reproduction* 14: 213-217.
- Albertini E, Marconi G, Reale L, Barcaccia G, Porceddu A, Ferranti F, Falcinelli M (2005) SERK and APOSTART. Candidate genes for apomixis in *Poa pratensis*. *Plant Physiology* 138(4):2185-99.
- Aliyu OM, Schranz ME, Sharbel TF (2010) Quantitative variation for apomictic reproduction in the genus *Boechera* (Brassicaceae). *American Journal of Botany* 97: 1719-1731.
- Allis CD, Jenuwein T (2016) The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nature Reviews Genetics* 17: 487-500.
- Armenta-Medina A, Demesa-Arévalo E, Vielle-Calzada JP (2011) Epigenetic control of cell specification during female gametogenesis. *Sexual Plant Reproduction* 24: 137-147.
- Asker SE, Jerling L (1992) Apomixis in plants. Boca Raton, FL, Florida, CRC Press, USA.
- Barcaccia G, Albertini E (2013) Apomixis in plant reproduction: A novel perspective on an old dilemma. *Plant Reproduction* 26(3): 159–179.

-
- Barke BH, Daubert M, Hörandl E (2018) Establishment of apomixis in diploid F2 hybrids and inheritance of apospory from F1 to F2 hybrids of the *Ranunculus auricomus* complex. *Frontiers in Plant Science* 9: 1111.
- Barker MS, Arrigo N, Baniaga AE, Li Z, Levin DA (2016) On the relative abundance of autopolyploids and allopolyploids. *New Phytologist* 210: 391-398.
- Bashaw E, Hanna W (1990) Apomictic reproduction. Reproductive versatility in the grasses. Cambridge University Press 100-130.
- Baurens FC, Bonnot F, Bienvenu D, Causse S, Legavre T (2003) Using SD-AFLP and MSAP to assess CCGG methylation in the banana genome. *Plant Molecular Biology Reporter* 21: 339-348.
- Berhan AM, Hulbert SH, Butler LG, Bennetzen JL (1993) Structure and evolution of the genomes of *Sorghum bicolor* and *Zea mays*. *Theoretical and Applied Genetics* 86: 598-604.
- Bhanwra RK (1988) Embryology in Relation to Systematics of Gramineae. *Annals of Botany* 62: 215-233.
- Bhanwra RK, Kaur N, Kaur N, Garg A (1991) Embryological studies in some grasses and their taxonomic significance. *Botanical Journal of the Linnean Society* 107: 405-419.
- Bhat V, Dwivedi KK, Khurana JP, Sopory SK (2005) Apomixis: An enigma with potential applications. *Current Science-Bangalore* 89(11): 1879.
- Bhatramakki D, Dong J, Chhabra AK, Hart GE (2000) An integrated SSR and RFLP linkage map of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Genome* 43: 988-1002.
- Bicknell, R A, & Koltunow, A M (2004). Understanding apomixis: recent advances and remaining conundrums. *The Plant Cell*, 16(suppl 1), S228-S245.
- Birchler JA (1993) Dosage analysis of maize endosperm development. *Annual review of genetics* 27: 181-204.
- Birchler JA, Yao H, Chudalayandi S, Vaiman D, Veitia RA (2010) Heterosis. *The Plant cell* 22: 2105-12.
- Bocchini M, Galla G, Pupilli F, Bellucci M, Barcaccia G, Ortiz JPA, Pessino SC, Albertini E (2018) The vesicle trafficking regulator PN-SCD1 is demethylated and overexpressed in florets of apomictic *Paspalum notatum* genotypes. *Scientific Reports* 8(1):3030.
- Bonilla JR, Quarin CL (1997) Diplosporous and aposporous apomixis in a pentaploid race of *Paspalum minus*. *Plant Science* 127: 97-104.
- Borg M, Twell D, Borg M (2016) Pollen: Structure and Development. e LS.
- Bradley JE, Carman JG, Jamison MS, Naumova TN (2007) Heterochronic features of the female germline among several sexual diploid *Tripsacum L.* (Andropogoneae, Poaceae). *Sexual Plant Reproduction* 20: 9-17.

-
- Brink RA, Cooper DC (1940) Double Fertilization and Development of the Seed in Angiosperms. *Botanical Gazette* 102: 1-25.
- Brukhin V, Baskar R (2019) A brief note on genes that trigger components of apomixis. *Journal of Biosciences* 44: 45.
- Burson BL, Bennett H (1970) Cytology and reproduction of three *Paspalum species*. *Journal of Heredity* 61: 129–132.
- Burson BL, Bennett HW (1971) Chromosome Numbers, Microsporogenesis, and Mode of Reproduction of Seven *Paspalum Species*. *Crop Science* 11: 292.
- Burson BL (1975) Cytology of Some Apomictic *Paspalum Species*. *Crop Sci.* 15: 229-232.
- Burson BL (1985) Cytology of *Paspalum chacoense* and *P. durifolium* and Their Relationship to *P. dilatatum*. *Botanical Gazette* 146: 124-129.
- Burson BL, Hussey MA (1998) Cytology of *Paspalum malacophyllum* and its relationship to *P. juergensii* and *P. dilatatum*. *International Journal of Plant Sciences* 159: 153-159.
- Burton GW (1940) A cytological study of some species in the genus *Paspalum*. *Journal of Agricultural Research* 60: 193-7.
- Burton GW, Forbes I, Jackson J (1970) Effect of Ploidy on Fertility and Heterosis in Pensacola Bahiagrass. *Crop Science* 10: 63.
- Burton GW (1974) Recurrent Restricted Phenotypic Selection Increases Forage Yields of Pensacola Bahiagrass. *Crop Science* 14: 831.
- Caceres ME, Pupilli F, Quarín CL, Arcioni S (1999) Feulgen-DNA densitometry of embryo sacs permits discrimination between sexual and apomictic plants in *Paspalum simplex*. *Euphytica* 110: 161-167.
- Calderini O, Chang SB, De Jong H, Busti A, Paolocci F, Arcioni S, De Vries SC *et al.* (2006) Molecular cytogenetics and DNA sequence analysis of an apomixis-linked BAC in *Paspalum simplex* reveal a non pericentromere location and partial microcolinearity with rice. *Theoretical and Applied Genetics.* 112(6), 1179-1191.
- Carman JG (1997) Asynchronous expression of duplicate genes in angiosperms may cause apomixis, bispory, tetraspory, and polyembryony. *Biological Journal of the Linnean Society* 61: 51-94.
- Carman JG, Jamison M, Elliott E, Dwivedi KK, Naumova TN (2011) Apospory appears to accelerate onset of meiosis and sexual embryo sac formation in *Sorghum* ovules. *BMC Plant Biology* 11: 9.
- Cass DD, Peteya DJ, Robertson BL (1985) Megagametophyte development in *Hordeum vulgare* . 1. Early megagametogenesis and the nature of cell wall formation. *Canadian Journal of Botany* 63: 2164-2171.

-
- 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 of the United States of America 103(49): 18650-18655.
- Causevic A, Delaunay A, Ounnar S, Righezza M, Delmotte F, Brignolas F, Hagege D, Maury S (2005) DNA methylating and demethylating treatments modify phenotype and cell wall differentiation state in sugarbeet cell lines. Plant Physiol Biochem. 43: 681-691.
- Chang MT, Neuffer MG (1989) Maize microsporogenesis. Genome 32: 232-244.
- Chase A (1939) *Paspalum* of South America. Cont US Natl Herb Vol 28: Part1.
- Chen M, Lv S, Meng Y (2010) Epigenetic performers in plants. Development Growth and Differentiation 52: 555-566.
- Chen T, Li E (2004) Structure and Function of Eukaryotic DNA Methyltransferases. Current Topics in Developmental Biology 60: 55-89.
- Collard BCYY, Jahufer MZZZ, Brouwer JBJ, Pang ECKK (2005) An introduction to markers, quantitative trait *loci* (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: the basic concepts. Euphytica 142: 169-196.
- Corral JM, Vogel H, Aliyu OM, Hensel G, Thiel T, Kumlehn J, Sharbel TF (2013) A Conserved Apomixis-Specific Polymorphism Is Correlated with Exclusive Exonuclease Expression in Premeiotic Ovules of Apomictic *Boechera* Species. Plant Physiology 163: 1660-1672.
- Crang R, Lyons-Sobaski S, Wise R, Crang R, Lyons-Sobaski S, Wise R (2018) Female Reproductive Structures and Embryogenesis. Plant Anatomy, Springer, Cham. 615-648.
- Crismani W, Girard C, Mercier R (2013) Tinkering with meiosis. Journal of Experimental Botany 64: 55-65.
- Curtis MD, Grossniklaus U (2008) Molecular control of autonomous embryo and endosperm development. Sexual Plant Reproduction 21: 79-88.
- Darlington CD (1939) The evolution of genetic systems. The evolution of genetic.
- Delgado L, Galdeano F, Sartor ME, Quarin CL, Espinoza F, Ortiz JP (2014) Analysis of variation for apomictic reproduction in diploid *Paspalum rufum*. Ann.Bot 113: 1211-1218.
- Delgado L, Sartor ME, Espinoza F, Soliman M, Galdeano F, Ortiz JPA (2016) Hybridity and autopolyploidy increase the expressivity of apospory in diploid *Paspalum rufum*. Plant Systematics and Evolution 302: 1471-1481.
- Dufour P, Deu M, Grivet L, D'Hont A, Paulet F, Bouet A, Lanaud C *et al.* (1997) Construction of a composite *Sorghum* genome map and comparison with sugarcane, a related complex polyploid. Theoretical and Applied Genetics 94: 409-418.
- Dusi DMA, Willemse MTM (1999) Apomixis in *Brachiaria decumbens* stapf.: Gametophytic development and reproductive calendar. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica 41: 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 Guinea grass (*Panicum maximum* Jacq.). *Grassland Science* 51: 71-78.
- Espinoza F, Quarín CL (1997) Cytoembryology of *Paspalum chaseanum* and sexual diploid biotypes of two apomictic *Paspalum* species. *Australian Journal of Botany* 45: 871-877.
- Espinoza F, Pessino SC, Quarín CL, Valle EM (2002) Effect of pollination timing on the rate of apomictic reproduction revealed by RAPD markers in *Paspalum notatum* 105. *Ann. Bot.* 89: 165-170.
- Espinoza F, Daurelio LD, Pessino SC, Valle EM, Quarín CL (2006) Genetic characterization of *Paspalum notatum* accessions by AFLP markers. *Plant Systematics and Evolution* 258: 147-159.
- Fei X, Shi J, Liu Y, Niu J, Wei A, Planta AW-, undefined 2019, Wei A (2019) The steps from sexual reproduction to apomixis. *Planta* 249: 1715-1730.
- Fyodorov D V., Zhou BR, Skoultchi AI, Bai Y (2018) Emerging roles of linker histones in regulating chromatin structure and function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 19: 192-206.
- Galdeano F, Urbani MH, Sartor ME, Honfi AI, Espinoza F, Quarín CL (2016) Relative DNA content in diploid, polyploid, and multiploid species of *Paspalum* (Poaceae) with relation to reproductive mode and taxonomy. *Journal of Plant Research* 129: 697-710.
- Galla G, Barcaccia G, Schallau A, plant ... MPM-S, undefined 2011, Puente Molins M, Bäumlein H *et al.* (2011) The cytohistological basis of apospory in *Hypericum perforatum* L. *Springer* 24: 47-61.
- García-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(10): 3249-3267.
- Gehring M, Henikoff S (2007) DNA methylation dynamics in plant genomes. *Biochim. Biophys. Acta* 1769: 276-286.
- Giussani LM, Zuloaga FO, Quarín CL, Cota-Sánchez JH, Ubayasena K, Morrone O (2010) Phylogenetic Relationships in the Genus *Paspalum* (Poaceae: Panicoideae: Paniceae): An Assessment of the Quadrifaria and Virgata Informal Groups. *Systematic Botany* 34: 32-43.
- Grativol C, Hemerly AS, Ferreira PCG (2012) Genetic and epigenetic regulation of stress responses in natural plant populations. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms* 1819: 176-185.
- Grimanelli D, Hernández M, Perotti E, Savidan Y (1997) Dosage effects in the endosperm of diplosporous apomictic *Tripsacum* (Poaceae). *Sexual Plant Reproduction* 10: 279-282.
- Grimanelli D, Leblanc O, Espinosa E, Perotti E, González De León D, Savidan Y (1998) Mapping diplosporous apomixis in tetraploid *Tripsacum*: One gene or several genes? *Heredity*.80(1): 33.

-
- Grimanelli D, Leblanc O, Perotti E, Grossniklaus U (2001) Developmental genetics of gametophytic apomixis. *Trends in Genetics*. 17(10): 597-604.
- Grimanelli D, Garcia M, Kaszas E, Perotti E, Leblanc O (2003) Heterochronic expression of sexual reproductive programs during apomictic development in *Tripsacum*. *Genetics* 165: 1521-1531.
- Grimanelli D (2012) Epigenetic regulation of reproductive development and the emergence of apomixis in angiosperms. *Current Opinion in Plant Biology*. 15(1), 57-62.
- Grossniklaus U, Kelly WG, Ferguson-Smith AC, Pembrey M, Lindquist S (2013) Transgenerational epigenetic inheritance: how important is it? *Nature reviews. Genetics* 14: 228.
- Haig D, Westoby M (1991) Genomic Imprinting in Endosperm: Its Effect on Seed Development in Crosses between Species, and between Different Ploidies of the Same Species, and Its Implications for the Evolution of Apomixis. *Philosophical Transactions: Biological Sciences* 333: 1-13.
- Hand ML, Koltunow AMG (2014) The genetic control of apomixis: Asexual seed formation. *Genetics*. 197(2): 441-450.
- Hanna WW, Schertz KF, Bashaw EC (1970) Apospory in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Science* 170: 338-339.
- Harlan JR, Brooks MH, Borgaonkar DS, de Wet JMJ (1964) Nature and Inheritance of Apomixis in *Bothriochloa* and *Dichanthium*. *Botanical Gazette* 125: 41-46.
- Hauser MT, Aufsatz W, Jonak C, Luschnig C (2011) Transgenerational epigenetic inheritance in plants. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms* 1809: 459-468.
- He Y, Li Z (2018) Epigenetic Environmental Memories in Plants: Establishment, Maintenance, and Reprogramming. *Trends in Genetics* 34: 856-866.
- Hernández-Lagana E, Rodríguez-Leal D, Lúa J, Vielle-Calzada JP (2016) A multigenic network of ARGONAUTE4 clade members controls early megaspore formation in *arabidopsis*. *Genetics* 204: 1045-1056.
- Hojsgaard D, Greilhuber J, Pellino M, Paun O, Sharbel TF, Hörandl E (2014) Emergence of apospory and bypass of meiosis via apomixis after sexual hybridisation and polyploidisation. *New Phytologist* 204: 1000-1012.
- Hojsgaard D, Schegg E, Valls JFM, Martínez EJ, Quarín CL (2008) Sexuality, apomixis, ploidy levels, and genomic relationships among four *Paspalum* species of the subgenus *Anachyris* (Poaceae). *Flora* 203: 535-547.
- Hojsgaard DH, 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*. *Theoretical and Applied Genetics* 123: 959-971.

-
- Hojsgaard DH, Martínez EJ, Quarín CL (2013) Competition between meiotic and apomictic pathways during ovule and seed development results in clonality. *New Phytologist* 197: 336-347.
- Hörandl E, Hojsgaard D (2012) The evolution of apomixis in angiosperms: A reappraisal. *Plant Biosystems* 146: 681-693.
- Jessup RW, Burson BL, Burow GB, Wang Y-W, Chang C, Li Z, Paterson AH, Hussey MA (2002) Disomic Inheritance, Suppressed Recombination, and Allelic Interactions Govern Apospory in Buffelgrass as Revealed by Genome Mapping. *Crop Science* 42: 1688.
- Johnstone R (2002) Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. *Nature reviews / Drug discovery* 1: 287-299.
- Johri BM, Rao PS (1984) Experimental Embryology. En *Embryology of Angiosperms*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. pp. 735-802
- Kao FI, Cheng YY, Chow TY, Chen HH, Liu SM, Cheng CH, Chung MC (2006) An integrated map of *Oryza sativa* L. chromosome 5. *Theoretical and Applied Genetics* 112: 891-902.
- Kellogg EA, Kubitzki K (2015) Flowering plants. *Monocots: Poaceae*. Springer International Publishing. 10, 978-3
- Khanday I, Skinner D, Yang B, Mercier R, Sundaresan V (2019) A male-expressed rice embryogenic trigger redirected for asexual propagation through seeds. *Nature* 565: 91-95.
- Klose RJ, Bird AP (2006) Genomic DNA methylation: The mark and its mediators. *Trends in Biochemical Sciences* 31: 89-97.
- Koltunow AM (1993) Apomixis: Embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. *Plant Cell* 5: 1425-1437.
- Koltunow AM, Bicknell RA, Chaudhury AM (1995) Apomixis: Molecular strategies for the generation of genetically identical seeds without fertilization. *Plant Physiology*. 108(4), 1345.
- Koltunow AM, Johnson SD, Bicknell RA (1998) Sexual and apomictic development in *Hieracium*. *Sexual Plant Reproduction* 11: 213-230.
- Koltunow AM, Grossniklaus U (2003) APOMIXIS: A Developmental Perspective. *Annual Review of Plant Biology*. 54(1), 547-574.
- Koltunow AMG, Johnson SD, Rodrigues JCM, Okada T, Hu Y, Tsuchiya T, Wilson S *et al.* (2011) Sexual reproduction is the default mode in apomictic *Hieracium* subgenus *Pilosella*, in which two dominant *loci* function to enable apomixis. *Plant Journal* 66: 890-902.
- Koltunow AMG, Ozias-Akins P, Siddiqi I (2013) Apomixis. En *Seed Genomics*, 83-110.
- Kosambi D (1944) The estimation of map distances from recombination values. *Ann. Eugen. Lond* 12: 172-175.

-
- Laird PW (2010) Principles and challenges of genome-wide DNA methylation analysis. *Nature Reviews Genetics* 11: 191-203.
- Lander ES, Green P, Abrahamson J, Barlow A, Daly MJ, Lincoln SE, Newberg LA, Newburg L (1987) MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1: 174-81.
- Laspina N V, Vega T, Seijo JG, González AM, Martelotto LG, Stein J, Podio M *et al.* (2008) Gene expression analysis at the onset of aposporous apomixis in *Paspalum notatum*. *Plant Molecular Biology* 67: 615-628.
- Law JA, Jacobsen SE (2010) Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nature Reviews Genetics* 11: 204-220.
- Leblanc O, Duenas M, Hernandez M, Bello S, Garcia V, Berthaud J, Savidan Y (1995) Chromosome doubling in *Tripsacum*: the production of artificial, sexual tetraploid plants. *Plant breeding* 114: 226-230.
- Leblanc O, Peel MD, Carman JG, Savidan Y (1995) Megasporogenesis and megametogenesis in several *Tripsacum* species (Poaceae). *American Journal of Botany* 82: 57-63.
- Leblanc O, Grimanelli D, Hernandez-Rodriguez M, Galindo PA, Soriano-Martinez AM, Perotti E (2009) Seed development and inheritance studies in apomictic maize- *Tripsacum* hybrids reveal barriers for the transfer of apomixis into sexual crops. *International Journal of Developmental Biology*. 53(4): 585-596.
- Li S-B, Xie Z-Z, Hu C-G, Zhang J-Z (2016) A Review of Auxin Response Factors (ARFs) in Plants. *Frontiers in Plant Science* 7: 47.
- Liu Z-WW, Wang RRC-C, Carman JG (1994) Hybrids and backcross progenies between wheat (*Triticum aestivum* L.) and apomictic Australian wheatgrass [*Elymus rectisetus* (Nees in Lehm.) A. Löve & Connor]: karyotypic and genomic analyses. *Theoretical and Applied Genetics* 89: 599-605.
- Lovell JT, Aliyu OM, Mau M, Schranz ME, Koch M, Kiefer C, Song BH *et al.* (2013) On the origin and evolution of apomixis in *Boechera*. *Plant Reproduction*. 26(4), 309-315.
- Lutts S, Ndikumana J, Louant BP (1994) Male and female sporogenesis and gametogenesis in apomictic *Brachiaria brizantha*, *Brachiaria decumbens* and F 1 hybrids with sexual colchicine induced tetraploid *Brachiaria ruziziensis*. *Euphytica* 78: 19-25.
- Marcón F, Martínez EJ, Rodríguez GR, Zilli AL, Brugnoli EA, Acuña CA (2019) Genetic distance and the relationship with heterosis and reproductive behavior in tetraploid bahiagrass hybrids. *Molecular Breeding*, 39(6): 89.
- Marconi G, Capomaccio S, Comino C, Acquadro A, Portis E, Porceddu A, Albertini E (2019) Methylation content sensitive enzyme ddRAD (MCSeEd): a reference-free, whole genome profiling system to address cytosine/adenine methylation changes. *Scientific Reports* 9: 14864.

-
- Marconi G, Pace R, Traini A, Raggi L, Lutts S, Chiusano M, Guiducci M *et al.* (2013) Use of MSAP Markers to Analyse the Effects of Salt Stress on DNA Methylation in Rapeseed (*Brassica napus* var. *oleifera*) Unver, T. (ed.). PLoS ONE 8: e75597.
- Marimuthu MPA, Jolivet S, Ravi M, Pereira L, Davda JN, Cromer L, Wang L *et al.* (2011) Synthetic clonal reproduction through seeds. *Science* 331: 876.
- Martelotto LG, Ortiz JPA, Stein J, Espinoza F, Quarín CL, Pessino SC (2005) A comprehensive analysis of gene expression alterations in a newly synthesized *Paspalum notatum* autotetraploid. *Plant Science* 169: 211-220.
- Martelotto LG, Ortiz JPA, Stein J, Espinoza F, Quarín CL, Pessino SC (2007) Genome rearrangements derived from autopolyploidization in *Paspalum* sp. *Plant Science* 172: 970-977.
- Martínez EJ, Hopp HE, Stein J, Ortiz JPA, Quarín CL (2003) Genetic characterization of apospory in tetraploid *Paspalum notatum* based on the identification of linked molecular markers. *Molecular Breeding* 12: 319-327.
- Martínez EJ, Urbani MH, Quarín CL, Ortiz JP (2001) Inheritance of apospory in bahiagrass, *Paspalum notatum*. *Hereditas* 135: 19-25.
- Martínez EJ, Urbani MH, Quarín CL, Ortiz JPA (2002) Inheritance of apospory in bahiagrass, *Paspalum notatum*. *Hereditas* 135: 19-25.
- Matzk F, Prodanovic S, Baumlein H, Schubert I, Bhumlein H, Schubert I (2005) The inheritance of apomixis in *Poa pratensis* confirms a five *locus* model with differences in gene expressivity and penetrance. *THE PLANT CELL* 17: 13-24.
- Matzke MA, Mosher RA (2014) RNA-directed DNA methylation: An epigenetic pathway of increasing complexity. *Nature Reviews Genetics* 15: 394-408.
- Maunakea AK, Nagarajan RP, Bilenky M, Ballinger TJ, Dsouza C, Fouse SD, Johnson BE *et al.* (2010) Conserved role of intragenic DNA methylation in regulating alternative promoters. *Nature* 466: 253-257.
- Mecchia MA, Ochogavia A, Pablo SJ, Laspina N, Felitti S, Martelotto LG, Spangenberg G *et al.* (2007) Genome polymorphisms and gene differential expression in a «back-and-forth» ploidy-altered series of weeping lovegrass (*Eragrostis curvula*). *J.Plant Physiol* 164: 1051-1061.
- Meier M, Zappacosta D, Selva JP, Pessino S, Echenique V (2011) Evaluation of different methods for assessing the reproductive mode of weeping lovegrass plants, *Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees. *Australian Journal of Botany* 59: 253-261.
- Meissner A, Gnirke A, Bell GW, Ramsahoye B, Lander ES, Jaenisch R (2005) Reduced representation bisulfite sequencing for comparative high-resolution DNA methylation analysis. *Nucleic Acids Research* 33: 5868-5877.
- Mézard C (2006) Meiotic recombination hotspots in plants. *Biochemical Society Transactions* 34: 531-534.

-
- Morton NE (1996) Logarithm of odds (lods) for linkage in complex inheritance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 3471-3476.
- Nakamura A, Longhi-Wagner H, Scatena V (2010) Anther and pollen development in some species of Poaceae (Poales). *Brazilian Journal of Biology* 70: 351-360.
- Naumova TN, Hayward MD, Wagenvoort M (1999) Apomixis and sexuality in diploid and tetraploid accessions of *Brachiaria decumbens*. *Sexual Plant Reproduction* 12: 43-52.
- Nicora E, Agrasar Z de R de, Nicola E, Agrasar Z de R de (1987) Los géneros de gramíneas de América Austral: Argentina, Chile, Uruguay y áreas limítrofes de Bolivia, Paraguay y Brasil. Buenos Aires: Hemisferio Sur.
- Nicotra AB, Atkin OK, Bonser SP, Davidson AM, Finnegan EJ, Mathesius U, Poot P *et al.* (2010) Plant phenotypic plasticity in a changing climate. *Trends in Plant Science* 15: 684-692.
- Nogler GA (1984a) Gametophytic apomixis. En: Johri BM (ed). *Embryology of angiosperms*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 475-518.
- Norrmann GA, Bovo OA, Quarín CL (1994) Post-zygotic seed abortion in sexual diploid × apomictic tetraploid intraspecific *Paspalum* crosses. *Australian Journal of Botany* 42: 449-456.
- Norrmann GA, Quarín CL, Burson BL (1989) Cytogenetics and reproductive behavior of different chromosome races in six *Paspalum* species. *Journal of Heredity* 80: 24-28.
- Noyes RD (2005) Inheritance of apomeiosis (diplospory) in fleabanes (*Erigeron*, Asteraceae). *Heredity* 94: 193-198.
- Noyes RD, Rieseberg LH (2000) Two independent *loci* control agamospermy (Apomixis) in the triploid flowering plant *Erigeron annuus*. *Genetics* 155: 379-390.
- Olmedo-Monfil V, Durán-Figueroa N, Arteaga-Vázquez M, Demesa-Arévalo E, Autran D, Grimanelli D, Slotkin RK *et al.* (2010) Control of female gamete formation by a small RNA pathway in *Arabidopsis*. *Nature* 464: 628-632.
- Ortiz JPA, Pessino SC, Bhat V, Hayward MD, Quarín CL (2001) A Genetic Linkage Map of Diploid *Paspalum notatum*. *Crop Science* 41: 823-830.
- Ortiz JPA, Quarín CL, Pessino SC, Acuña C, Martínez EJ, Espinoza F, Hojsgaard DH *et al.* (2013) Harnessing apomictic reproduction in grasses: What we have learned from *Paspalum*. *Annals of Botany* 112: 767-787.
- 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 a divergent *locus* that may have no allelic form in sexual genotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 5127-5132.
- Ozias-Akins P, van Dijk PJ (2007) Mendelian Genetics of Apomixis in Plants. *Annual Review of Genetics*. 41: 509-537.

-
- Pabón-Martínez YV (2011) MicroARNs: una visión molecular MicroRNA (miRNA): A molecular view. *Revista Salud de la Universidad Industrial de Santander* 43: 289:297.
- Pacini E, Jacquard C, Clément C (2011) Pollen vacuoles and their significance. *Planta* 234: 217-227.
- Peel MD, Carman JG, Leblanc O (1997) Megasporocyte callose in apomictic buffelgrass, Kentucky bluegrass, *Pennisetum squamulatum* Fresen, *Tripsacum* L., and weeping lovegrass. *Crop Science* 37: 724-732.
- Peel MD, Carman JG, Liu ZW, R R C W (1997) Meiotic anomalies in hybrids between wheat and apomictic *Elymus rectisetus* (Nees in Lehm.) A. Löve & Connor. *Crop Science* 37: 717:723.
- Pessino SC, Espinoza F, Martinez EJ, Ortiz JPA, Valle EM, 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.
- Pierce B (2012) *Genetics: A conceptual approach*. fourth edi. W. H. Freeman and Company (ed). New York, USA. 324.
- Podio M, Rodríguez MP, Felitti S, Stein J, Martínez EJ, Siena LA, Quarín CL *et al.* (2012) a. Sequence characterization, in silico mapping and cytosine methylation analysis of markers linked to apospory in *Paspalum notatum*. *Genetics and Molecular Biology* 35: 827-837.
- Podio M, Siena LA, Hojsgaard D, Stein J, Quarín CL, Ortiz JPA (2012) b. Evaluation of meiotic abnormalities and pollen viability in aposporous and sexual tetraploid *Paspalum notatum* (Poaceae). *Plant Systematics and Evolution* 298: 1-9.
- Podio M, Cáceres ME, Samoluk SS, Seijo JG, Pessino SC, Ortiz JPA, Pupilli F (2014) a. A methylation status analysis of the apomixis-specific region in *Paspalum* spp. suggests an epigenetic control of parthenogenesis. *Journal of Experimental Botany*. 65(22): 6411-6424
- Podio M, Felitti SA, Siena LA, Delgado L, Mancini M, Seijo JG, González AM *et al.* (2014) b. Characterization and expression analysis of SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE (SERK) genes in sexual and apomictic *Paspalum notatum*. *Plant Molecular Biology* 84: 479-495.
- 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.
- Porceddu A, Albertini E, Barcaccia G, Falistocco E, Falcinelli M (2002) Linkage mapping in apomictic and sexual Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.) genotypes using a two way pseudo-testcross strategy based on AFLP and SAMPL markers. *Theoretical and Applied Genetics* 104: 273-280.

-
- 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, Labombarda P, Cáceres ME, Quarín CL, Arcioni S (2001) The chromosome segment related to apomixis in *Paspalum simplex* is homoeologous to the telomeric region of the long arm of rice chromosome 12. *Molecular Breeding* 8: 53-61.
- Pupilli F, Martinez EJ, Busti A, Calderini O, Quarín CL, Arcioni S (2004) Comparative mapping reveals partial conservation of synteny at the apomixis *locus* in *Paspalum* spp. *Molecular Genetics and Genomics* 270: 539-548.
- Quadrana L, Colot V (2016) Plant transgenerational epigenetics. *Annual review of genetics* 50: 467-491.
- Quarín CL (1986) Seasonal changes in the incidence of apomixis of diploid, triploid, and tetraploid plants of *Paspalum cromoerhizon*. *Euphytica* 35: 515-522.
- Quarín CL (1992) The nature of apomixis and its origin in Panicoid grasses. *Apomixis Newsletter* 5: 8-15.
- Quarín CL (1999) Effect of pollen source and pollen ploidy on endosperm formation and seed set in pseudogamous apomictic *Paspalum notatum*. *Sexual Plant Reproduction* 11: 331-335.
- Quarín CL, Hanna WW (1980) Effect of three ploidy levels on meiosis and mode of reproduction in *Paspalum hexastachyum*. *Crop Science* 20: 69-75.
- Quarín CL, Hanna WW, Fernández A (1982) Genetic studies in diploid and tetraploid *Paspalum* species. *Journal of Heredity* 73: 254-256.
- Quarín CL, Burson BL, Burton GW (1984) Cytology of intra- and interspecific hybrids between two cytotypes of *Paspalum notatum* and *P. cromoerhizon*. *Botanical Gazette* 145: 420-426.
- Quarín CL, Lombardo EP (1986) Niveles de ploidía y distribución geográfica de *Paspalum quadrifarium* (Gramineae). *Mendeliana* 7: 101-107.
- Quarín CL, Norrmann GA (1987) Cytology and reproductive behavior of *Paspalum equitans*, *P. ionanthum*, and their hybrids with diploid and tetraploid cytotypes of *P. cromoerhizon*. *Botanical Gazette* 148: 386-391.
- Quarín CL, Norrmann GA, Urbani MH (1989) Polyploidization in aposporous *Paspalum* species. *Apomixis Newsl* 2: 44-46.
- Quarín CL, Burson BL (1991) Cytology of Sexual and Apomictic *Paspalum* Species. 56(2), 223-228.
- Quarín CL, Caponio I (1993) Cytology and reproduction of *Paspalum densum* and its genomic relationship with *p. intermedium* and *p. urvillei*. *Journal of Heredity* 84: 220-222.

-
- Quarín CL, Valls JFM, Urbani MH (1997) Cytological and reproductive behaviour of *Paspalum atratum*, a promising forage grass for the tropics. *Tropical Grasslands* 31: 114-116.
- Quarin CL, Norrmann GA, Espinoza F (1998) Evidence for autopoloidy in apomictic *Paspalum rufum*. *Hereditas* 129: 119-124.
- Quarin CL, Espinoza F, Martinez EJ, Pessino SC, Bovo OA (2001) A rise of ploidy level induces the expression of apomixis in *Paspalum notatum*. *Sexual Plant Reproduction* 13: 243-249.
- Quarín CL, Urbani MH, Blount AR, Martinez EJ, Hack CM, Burton GW, Quesenberry KH (2003) Registration of Q4188 and Q4205, Sexual Tetraploid Germplasm Lines of Bahiagrass. *Crop Science* 43: 745.
- Ramu P, Kassahun B, Senthilvel S, Kumar CA, Jayashree B, Folkertsma RT, Reddy LA *et al.* (2009) Exploiting rice-sorghum synteny for targeted development of EST-SSRs to enrich the sorghum genetic linkage map. *Theoretical and Applied Genetics* 119: 1193-1204.
- Rebozzio RN, Sartor ME, Quarin CL, Espinoza F (2011) Residual sexuality and its seasonal variation in natural apomictic *Paspalum notatum* accessions. *Biologia Plantarum* 55: 391-395.
- Reiser L, Fischer RL (1993) The Ovule and the Embryo Sac. *The Plant Cell*, 5(10): 1291.
- Roche D, Cong P, Chen Z, Hanna WW, Gustine DL, Sherwood RT, Ozias-Akins P (1999) Short Communication: An apospory-specific genomic region is conserved between Buffelgrass (*Cenchrus ciliaris* L.) and Pennisetum squamulatum Fresen. *Plant J.* 19: 203-208.
- Roche D, Hanna WW, Ozias-Akins P (2001) Is supernumerary chromatin involved in gametophytic apomixis of polyploid plants? *Sexual Plant Reproduction*. 13(6): 343-349.
- Rodrigues JCM, Koltunow AMG (2005) EPIGENETIC ASPECTS OF SEXUAL AND ASEXUAL SEED DEVELOPMENT. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Artigo em periódico indexado (ALICE).
- Rodriguez MP, Cervigni GDL, Quarin CL, Ortiz JPA (2012) Frequencies and variation in cytosine methylation patterns in diploid and tetraploid cytotypes of *Paspalum notatum*. *Biologia Plantarum* 56: 276-282.
- Russell SD (1992) Double Fertilization. *International Review of Cytology* 140: 357-388.
- Sajo MG, Longhi-Wagner HM, Rudall PJ (2008) Reproductive morphology of the early-divergent grass *Streptochaeta* and its bearing on the homologies of the grass spikelet. *Plant Systematics and Evolution* 275: 245-255.
- Salon PR, Earle ED (1998) Chromosome doubling and mode of reproduction of induced tetraploids of eastern gamagrass (*Tripsacum dactyloides* L.). *Plant Cell Reports* 17: 881-885.
- Sartor ME, Espinoza F, Quarin CL (2009) Mode of Reproduction of Colchicine-Induced Tetraploids. *Crop Science* 49: 1270-1276.

-
- Sartor ME, Quarin CL, Urbani MH, Espinoza F (2011) Ploidy levels and reproductive behaviour in natural populations of five *Paspalum* species. *Plant Systematics and Evolution* 293(1-4): 31-41.
- Savidan Y (1982) Nature et heredite de l'apomixie chez *Panicum maximum*. *Jacq. Trav. et Docum. ORSTOM* 153: 161.
- Savidan Y (1989) Another working hypothesis for the control of parthenogenesis in *Panicum maximum*: the egg cell wall completion hypothesis. *Newslet.* 1, 47-51.
- Savidan Y (2000) Apomixis: genetics and breeding. *Plant breeding reviews* 18: 13-86.
- Saze H, Mittelsten SO, Paszkowski J (2003) Maintenance of CpG methylation is essential for epigenetic inheritance during plant gametogenesis. *Nat.Genet.* 34: 65-69.
- Schallau A, Arzenton F, Johnston AJ, Hähnel U, Koszegi D, Blattner FR, Altschmied L *et al.* (2010) Identification and genetic analysis of the *AOSPORY* locus in *Hypericum perforatum* L. *Plant Journal.* 62(5): 773-784.
- Schild DR, Card DC, Adams RH, Jezkova T, Reyes-Velasco J, Proctor FN, Spencer CL *et al.* (2015) Incipient speciation with biased gene flow between two lineages of the Western Diamondback Rattlesnake (*Crotalus atrox*). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 83: 213-223.
- Schinkel CCF, Kirchheimer B, Dellinger AS, Klatt S, Winkler M, Dullinger S, Hörandl E (2016) Correlations of polyploidy and apomixis with elevation and associated environmental gradients in an alpine plant. *AoB Plants* 8.
- Schmidt A, Schmid MW, Grossniklaus U (2015) Plant germline formation: common concepts and developmental flexibility in sexual and asexual reproduction. *Development* 142: 229-241.
- 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.
- Schranz ME, Dobes C, Koch MA, Mitchell-Olds T (2005) Sexual reproduction, hybridization, apomixis, and polyploidization in the genus *Boechera* (Brassicaceae). *American Journal of Botany* 92: 1797-1810.
- Sharbel TF, Voigt ML, Corral JM, Thiel T, Varshney A, Kumlehn J, Vogel H, Rotter B (2009) Molecular signatures of apomictic and sexual ovules in the *Boechera holboellii* complex. *Plant J.* 58: 870-882.
- Sharbel TF, Voigt ML, Corral JM, Galla G, Kumlehn J, Klukas C, Schreiber F *et al.* (2010) Apomictic and sexual ovules of *Boechera* display heterochronic global gene expression patterns. *Plant Cell.* 22(3): 655-671.
- Sharma R, Geeta R, Bhat V (2014) Asynchronous male/female gametophyte development in facultative apomictic plants of *Cenchrus ciliaris* (Poaceae). *South African Journal of Botany* 91: 19-31.

-
- Siena LA, Sartor ME, Espinoza F, Quarin CL, Ortiz JPA (2008) Genetic and embryological evidences of apomixis at the diploid level in *Paspalum rufum* support recurrent auto-polyploidization in the species. *Sexual Plant Reproduction* 21: 205-215.
- Siena LA, Ortiz JPA, Leblanc O, Pessino S (2014) PnTgs1-like expression during reproductive development supports a role for RNA methyltransferases in the aposporous pathway. *BMC plant biology* 14: 297.
- Siena LA, Ortiz JPA, Calderini O, Paolocci F, Cáceres ME, Kaushal P, Grisan S *et al.* (2016) An apomixis-linked ORC3-like pseudogene is associated with silencing of its functional homolog in apomictic *Paspalum simplex*. *Journal of Experimental Botany* 67: 1965-1978.
- Simioni C, Borges Do Valle C (2009) Chromosome duplication in *Brachiaria* (A. Rich.) Stapf allows intraspecific crosses Melhoramento de *Brachiaria* visando à diversificação e sustentabilidade de pastagens no Brasil Central View project *Brachiaria* spp. breeding and cultivar development aiming. 9(4).
- Singh M, Goel S, Meeley RB, Dantec C, Parrinello H, Michaud C, Leblanc O, Grimanelli D (2011) Production of viable gametes without meiosis in maize deficient for an ARGONAUTE protein. *Plant Cell* 23: 443-458.
- Smith J (1841) XXXII. Notice of a Plant which produces perfect Seeds without any apparent Action of Pollen. *Transactions of the Linnean Society of London* 18: 509-512.
- Soltis DE, Albert VA, Leebens-Mack J, Bell CD, Paterson AH, Zheng C, Sankoff D *et al.* (2009) Polyploidy and angiosperm diversification. *American Journal of Botany* 96: 336-348.
- Sorrells ME (1992) Development and Application of RFLPs in Polyploids. *Crop Science* 32: 1086.
- Spillane C, Curtis MD, Grossniklaus U (2004) Apomixis technology development - Virgin births in farmers' fields? *Nature Biotechnology*. 22(6): 687.
- Stein J, Quarin CL, Martínez EJ, Pessino SC, Ortiz JPA, Martínez EJ, Pessino SC, Ortiz JPA (2004) Tetraploid races of *Paspalum notatum* show polysomic inheritance and preferential chromosome pairing around the apospory-controlling *locus* 85. *Theor.Appl.Genet.* 109: 186-191.
- Stein J, Pessino SC, Martínez EJ, Rodríguez MP, Siena LA, Quarin CL, Ortiz JPA (2007) A genetic map of tetraploid *Paspalum notatum* Flüggé (bahiagrass) based on single-dose molecular markers. *Molecular Breeding* 20: 153-166.
- Tanksley SD (1993) MAPPING POL YGENES. *Annual Reviews Inc.* 27: 205-233.
- Turner BM (2000) Histone acetylation and an epigenetic code. *BioEssays* 22: 836-845.
- Van Dijk P, Van Damme J (2000) Apomixis technology and the paradox of sex. *Trends in Plant Science*. 5(2), 81-84.
- Van Dijk P (2009) Apomixis: Basics for Non-botanists. En *Lost Sex. The Evolutionary Biology of Parthenogenesis*, pp. 47-62. Springer Netherlands, Dordrecht.

-
- Van Dijk PJ, Bakx-Schotman JMT (2004) Formation of unreduced megaspores (diplospory) in apomictic dandelions (*Taraxacum officinale*, s.l.) is controlled by a sex-specific dominant *locus*. *Genetics* 166: 483-492.
- Van Ooijen JW (2006) JoinMap 4. Software for the calculation of genetic linkage maps in experimental populations. Kyazma. B.v., Wageningen, Netherlands.
- Vielle Calzada JP, Crane CF, Stelly DM (1996) Apomixis: The asexual revolution. *Science*. 274, 1322-1323.
- Waddington CH (1942) Canalization of development and the inheritance of acquired characters. *Nature* 150: 563-565.
- Wang ZM, Devos KM, Liu CJ, Wang RQ, Gale MD (1998) Construction of RFLP-based maps of foxtail millet, *Setaria italica* (L.) P. Beauv. *Theoretical and Applied Genetics* 96: 31-36.
- Weihmüller E, Beltrán C, Sartor M, Espinoza F, Spampinato C, Pessino SC (2014) Genetic response of *Paspalum plicatum* to genome duplication. *Genetica* 142: 227-234.
- Williams WM, Williamson ML, Real D (2011) *Paspalum*. En *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources: Millets and Grasses*, pp. 197-216. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Worthington M, Heffelfinger C, Bernal D, Quintero C, Zapata YP, Perez JG, De Vega J *et al.* (2016) A parthenogenesis gene candidate and evidence for segmental allopolyploidy in apomictic *Brachiaria decumbens*. *Genetics* 203: 1117-1132.
- Wu KK, Burnquist W, Sorrells ME, Tew TL, Moore PH, Tanksley SD (1992) The detection and estimation of linkage in polyploids using single-dose restriction fragments. *Theoretical and Applied Genetics* 83: 294-300.
- Xu GW, Magill CW, Schertz KF, Hart GE (1994) A RFLP linkage map of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Theoretical and Applied Genetics* 89: 139-145.
- Yadav CB, Anuj, Kumar S, Gupta MG, Bhat V (2012) Genetic linkage maps of the chromosomal regions associated with apomictic and sexual modes of reproduction in *Cenchrus ciliaris*. *Molecular Breeding* 30: 239-250.
- Yadegari R, Drews GN (2004) Female Gametophyte Development. *The Plant Cell* 16: S133-S141.
- Yudakova OI, Shakina TN (2007) Specific features of early embryogenesis in apomictic *Poa pratensis* L. *Ontogenez* 38: 5-11.
- Zappacosta D, Gallardo J, Carballo J, Meier M, Rodrigo JM, Gallo CA, Selva JP *et al.* (2019) A High-Density Linkage Map of the Forage Grass *Eragrostis curvula* and Localization of the Diplospory *Locus*. *Frontiers in plant science* 10: 918.
- Zappacosta DC, Ochogavía AC, Rodrigo JM, Romero JR, Meier MS, Garbus I, Pessino SC, Echenique VC (2014) Increased apomixis expression concurrent with genetic and epigenetic variation in a newly synthesized *Eragrostis curvula* polyploid. *Scientific reports* 4: 4423.

-
- Zemach A, McDaniel IE, Silva P, Zilberman D (2010) Genome-wide evolutionary analysis of eukaryotic DNA methylation. *Science* 328: 916-919.
- Zhang M, Kimatu JN, Xu K, Liu B (2010) DNA cytosine methylation in plant development. *J.Genet.Genomics* 37: 1-12.
- Zhu J-K (2009) Active DNA Demethylation Mediated by DNA Glycosylases. *Annual Review of Genetics* 43: 143-166.
- Zilberman D, Gehring M, Tran RK, Ballinger T, Henikoff S (2007) Genome-wide analysis of *Arabidopsis thaliana* DNA methylation uncovers an interdependence between methylation and transcription. *Nature Genetics* 39: 61-69.
- Ziller MJ, Hansen KD, Meissner A, Aryee MJ (2015) Coverage recommendations for methylation analysis by whole-genome bisulfite sequencing. *Nature Methods* 12: 230-232.
- Zilli AL, Brugnoli EA, Marcón F, Billa MB, Rios EF, Martínez EJ, Acuña CA. (2015) Heterosis and Expressivity of Apospory in Tetraploid Bahiagrass Hybrids. *Crop Science* 55: 1189-1201.
- Zuloaga FO, Morrone O (2005) Revisión de las especies de *Paspalum* para América del Sur austral (Argentina, Bolivia, sur del Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay). *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*.

VII- ANEXO

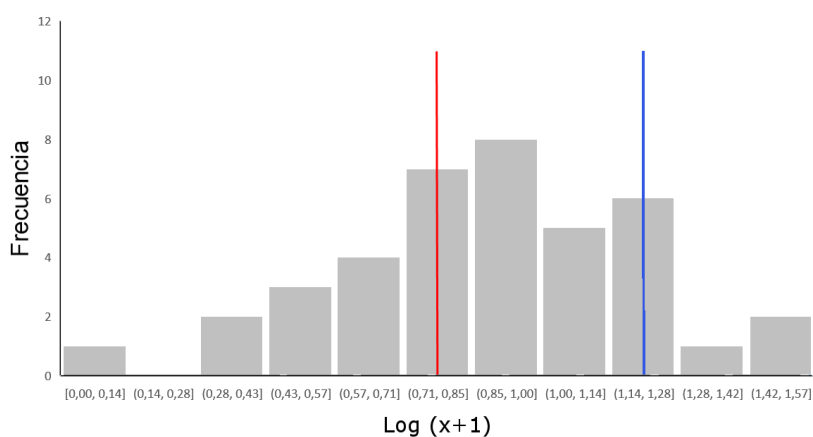


Figura A1. Histograma de frecuencia de la variable: $\text{Log}(\%SEA + 1)$, de la población F_{1-1} medida en Corrientes, proveniente del cruzamiento entre los genotipos R6#45 (línea vertical roja) y el R5#49 (línea vertical azul) de *Paspalum rufum*.

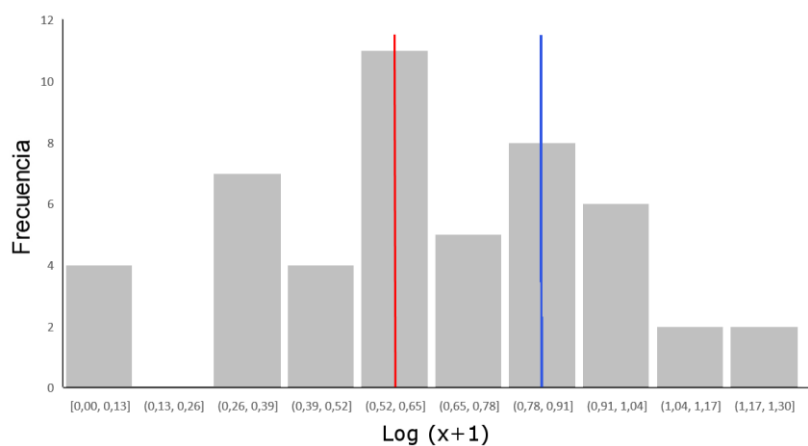


Figura A2. Histograma de frecuencia de la variable: $\text{Log}(\%SEA + 1)$, de la población F_{1-2} medida en Zavalla, proveniente del cruzamiento entre los genotipos R6#45 (línea vertical roja) y el R5#49 (línea vertical azul) de *Paspalum rufum*.

Tabla A1. Comparación de los parámetros de crecimiento del ovario a través de diferentes estadios de desarrollo sexual femenino en individuos diploides y tetraploides.

| Parámetro de crecimiento | Nivel de ploidía | Célula madre de la megáspora (I) | | | Meiosis (II) | | | Megáspora Funcional (III) | | | Mitosis I (IV) | | | Mitosis II - Celularización (V) | | | Antesis (VI) | | |
|--------------------------|------------------|----------------------------------|---|----|---------------------|---|----|---------------------------|----|----|---------------------|----|----|---------------------------------|----|----|----------------------|---|----|
| | | Media ± D.E. | | n | Media ± D.E. | | n | Media ± D.E. | | n | Media ± D.E. | | n | Media ± D.E. | | n | Media ± D.E. | | n |
| Ancho del lóculo | 2x | 74,72 ± 11,08 | a | 21 | 81,42 ± 10,68 | a | 23 | 102,52 ± 12,72 | b | 59 | 108,95 ± 11,62 | b | 47 | 121,26 ± 15,8 | c | 87 | 177,89 ± 17,3 | d | 29 |
| | 4x | 87,15 ± 10,64* | a | 60 | 99,23 ± 8,14* | b | 44 | 111,92 ± 11,5* | c | 75 | 124,37 ± 12,47* | d | 21 | 137,64 ± 14,8* | de | 22 | 204,73 ± 12,15* | e | 30 |
| Longitud del lóculo | 2x | 143,3 ± 18,01 | a | 21 | 169,73 ± 21,98 | a | 23 | 195,03 ± 22,19 | b | 59 | 209,83 ± 22,43 | c | 48 | 233,78 ± 27,44 | d | 87 | 413,67 ± 30,39 | e | 29 |
| | 4x | 182,74 ± 13,77* | a | 60 | 207,8 ± 14,83* | b | 44 | 239,96 ± 18,57* | c | 75 | 256,32 ± 15,72* | cd | 21 | 273,19 ± 31,39* | d | 22 | 513,82 ± 31,36* | e | 30 |
| Perímetro del lóculo | 2x | 357,94 ± 36,44 | a | 21 | 408,75 ± 51,77 | a | 21 | 477,82 ± 46,67 | b | 57 | 513,8 ± 40,73 | c | 48 | 569,92 ± 56,42 | d | 85 | 963,14 ± 67,49 | e | 29 |
| | 4x | 440,69 ± 36,26* | a | 60 | 503,65 ± 34,28* | b | 44 | 580,3 ± 48,82* | c | 75 | 619,16 ± 34,51* | cd | 21 | 688,96 ± 72,6* | de | 20 | 1159,27 ± 137,39* | e | 30 |
| Area del lóculo | 2x | 8245,09 ± 1497,6 | a | 21 | 10294,37 ± 2433,77 | a | 21 | 14734,99 ± 2638,75 | b | 57 | 16966,92 ± 2197,52 | c | 48 | 21171,43 ± 4047,29 | d | 85 | 55755,61 ± 8026,9 | e | 29 |
| | 4x | 12099,85 ± 2191,45* | a | 60 | 16057,63 ± 2390,02* | b | 44 | 21523,71 ± 3333,8* | c | 75 | 24531,52 ± 2680,56* | cd | 21 | 29815,19 ± 5432,52* | de | 22 | 80311,87 ± 14899,33* | e | 30 |
| Ancho del ovario | 2x | 150,84 ± 13,64 | a | 21 | 160,23 ± 16,18 | a | 23 | 186,04 ± 14,91 | b | 59 | 193,42 ± 12,16 | b | 47 | 210,65 ± 16,04 | c | 86 | 279,6 ± 15,17 | d | 29 |
| | 4x | 184,55 ± 15,63* | a | 57 | 203,17 ± 15,38* | b | 41 | 223,68 ± 17,56* | c | 75 | 232,98 ± 15,97* | cd | 20 | 250,32 ± 10,92* | de | 20 | 320,81 ± 10,72* | e | 28 |
| Longitud del ovario | 2x | 279,92 ± 24,33 | a | 20 | 302,34 ± 31,15 | a | 23 | 329,25 ± 31,84 | b | 59 | 342,32 ± 31 | b | 48 | 366,58 ± 29,26 | c | 86 | 628,23 ± 30,44 | d | 29 |
| | 4x | 348,44 ± 27,28* | a | 38 | 387,99 ± 28,72* | b | 40 | 415,29 ± 25,29* | c | 73 | 432,99 ± 21,96* | c | 16 | 459,65 ± 46,66* | cd | 8 | 707,03 ± 30,36* | d | 29 |
| Perímetro del ovario | 2x | 729,46 ± 48,58 | a | 21 | 791,18 ± 70,66 | a | 21 | 854,51 ± 73,35 | b | 57 | 893,93 ± 72,8 | b | 47 | 957,37 ± 69,98 | c | 86 | 1597,01 ± 163,54 | d | 29 |
| | 4x | 928,97 ± 79,17* | a | 42 | 1020,96 ± 99,18* | b | 40 | 1145,37 ± 141,06* | bc | 68 | 1220,25 ± 107,66* | bc | 15 | 1128,95 ± 64,32* | c | 4 | 1934,46 ± 246,77* | d | 29 |
| Area del ovario | 2x | 33899,92 ± 4304,9 | a | 21 | 39843,5 ± 7206,57 | a | 23 | 48666,84 ± 6947,41 | b | 57 | 53119,89 ± 6833,11 | c | 47 | 61369,55 ± 8566,78 | d | 86 | 140738,95 ± 12984,32 | e | 29 |
| | 4x | 54444,75 ± 7592,43* | a | 42 | 63652,57 ± 8630,64* | b | 40 | 75663 ± 10141,25* | c | 68 | 84793,28 ± 9418,84* | c | 15 | 85453,6 ± 5955,69* | cd | 7 | 179929,37 ± 8529,79* | d | 29 |
| Longitud del integumento | 2x | 78,6 ± 18,19 | a | 21 | 109,67 ± 20,09 | a | 21 | 157,12 ± 25,83 | b | 48 | 179,06 ± 19,22 | c | 48 | 227,14 ± 34,61 | d | 86 | 513,22 ± 49,24 | e | 29 |
| | 4x | 122,77 ± 19,34* | a | 60 | 162,14 ± 22,89* | b | 43 | 213,08 ± 25,47* | c | 74 | 241,13 ± 22,74* | cd | 20 | 276,12 ± 29,41* | de | 22 | 633,92 ± 41,06* | e | 30 |
| Ancho de la epidermis | 2x | 10,31 ± 2,84 | a | 21 | 12,05 ± 2,33 | a | 22 | 14,74 ± 2,79 | b | 52 | 16,65 ± 2,99 | bc | 48 | 15,47 ± 2,87 | c | 87 | 24,62 ± 3,98 | d | 29 |
| | 4x | 16,67 ± 3,33* | a | 60 | 22,24 ± 3,4* | b | 42 | 28,09 ± 3,26* | c | 73 | 28,88 ± 2,96* | c | 20 | 27,35 ± 2,62* | c | 21 | 38,79 ± 5,03* | d | 30 |
| Apertura de la micrópila | 2x | 52,66 ± 12,3 | a | 21 | 42,32 ± 6,29 | a | 20 | 38,17 ± 8,3 | b | 49 | 38,36 ± 6,88 | b | 46 | 30,26 ± 9,26 | c | 86 | 2,91 ± 1,8 | c | 29 |
| | 4x | 34,66 ± 7,49* | a | 59 | 28 ± 10,06* | b | 41 | 17,53 ± 7,77* | c | 72 | 9,11 ± 5,22* | c | 18 | 7,18 ± 4,45* | c | 22 | 4,4 ± 2,3* | d | 30 |
| Ángulo de rotación | 2x | 73,09 ± 0,03 | a | 21 | 55,52 ± 9,71 | a | 22 | 43,25 ± 7,87 | b | 45 | 37,12 ± 6,58 | c | 46 | 28,99 ± 6,74 | d | 79 | 4,03 ± 2,06 | e | 29 |
| | 4x | 58,51 ± 6,82* | a | 58 | 47,44 ± 6,57* | b | 44 | 39,32 ± 4,98* | c | 73 | 34,51 ± 4,15 | cd | 20 | 32,49 ± 4,87* | d | 22 | 3,87 ± 2 | e | 30 |

* Diferencias estadísticamente significativas entre individuos diploides y tetraploides.
Las diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre estadios de desarrollo reproductivo.

Tabla A2. Comparación de los parámetros de crecimiento independientes del tamaño del ovario (IT) a través de diferentes estadios de desarrollo sexual femenino en individuos diploides y tetraploides.

| Parámetro de crecimiento | Nivel de ploidía | Célula madre de la megáspora (I) | | | Meiosis (II) | | | Megáspora Funcional (III) | | | Mitosis I (IV) | | | Mitosis II - Celularización (V) | | | Antesis (VI) | | |
|---|------------------|----------------------------------|---|----|---------------|---|----|---------------------------|---|----|----------------|----|----|---------------------------------|----|----|--------------|---|----|
| | | Media ± D.E. | | n | Media ± D.E. | | n | Media ± D.E. | | n | Media ± D.E. | | n | Media ± D.E. | | n | Media ± D.E. | | n |
| Ancho del lóculo | 2x | 0,42 ± 0,06 | a | 21 | 0,46 ± 0,06 | a | 23 | 0,58 ± 0,07 | b | 59 | 0,61 ± 0,07 | b | 47 | 0,68 ± 0,09 | c | 87 | 1 ± 0,1 | d | 29 |
| | 4x | 0,43 ± 0,05 | a | 60 | 0,48 ± 0,04* | b | 44 | 0,55 ± 0,06* | c | 75 | 0,61 ± 0,06 | d | 21 | 0,67 ± 0,07 | de | 22 | 1 ± 0,06 | e | 30 |
| Longitud del lóculo | 2x | 0,35 ± 0,04 | a | 21 | 0,41 ± 0,05 | a | 23 | 0,47 ± 0,04 | b | 59 | 0,51 ± 0,05 | c | 48 | 0,57 ± 0,07 | d | 87 | 1 ± 0,07 | e | 29 |
| | 4x | 0,36 ± 0,03 | a | 60 | 0,4 ± 0,03 | b | 44 | 0,47 ± 0,04 | c | 75 | 0,5 ± 0,03 | cd | 21 | 0,53 ± 0,06* | d | 22 | 1 ± 0,06 | d | 30 |
| Perímetro del lóculo | 2x | 0,37 ± 0,04 | a | 21 | 0,46 ± 0,06 | a | 21 | 0,5 ± 0,05 | b | 57 | 0,53 ± 0,04 | c | 48 | 0,59 ± 0,06 | d | 85 | 1 ± 0,07 | e | 29 |
| | 4x | 0,38 ± 0,04 | a | 60 | 0,43 ± 0,03 | b | 44 | 0,5 ± 0,04 | c | 75 | 0,53 ± 0,03 | cd | 21 | 0,59 ± 0,06 | de | 20 | 1 ± 0,12 | e | 30 |
| Area del lóculo | 2x | 0,15 ± 0,03 | a | 21 | 0,18 ± 0,04 | a | 21 | 0,26 ± 0,05 | b | 57 | 0,3 ± 0,04 | c | 48 | 0,38 ± 0,07 | d | 85 | 1 ± 0,14 | e | 29 |
| | 4x | 0,15 ± 0,03 | a | 60 | 0,2 ± 0,03 | b | 44 | 0,27 ± 0,04 | c | 75 | 0,3 ± 0,03 | cd | 21 | 0,37 ± 0,07 | de | 22 | 1 ± 0,19 | e | 30 |
| Ancho del ovario | 2x | 0,54 ± 0,05 | a | 21 | 0,57 ± 0,06 | a | 23 | 0,67 ± 0,05 | b | 59 | 0,69 ± 0,04 | b | 47 | 0,75 ± 0,06 | c | 86 | 1 ± 0,05 | d | 29 |
| | 4x | 0,58 ± 0,05* | a | 57 | 0,63 ± 0,05* | b | 41 | 0,7 ± 0,05* | c | 75 | 0,73 ± 0,05* | cd | 20 | 0,78 ± 0,03* | de | 20 | 1 ± 0,03 | e | 28 |
| Longitud del ovario | 2x | 0,45 ± 0,04 | a | 20 | 0,48 ± 0,05 | a | 23 | 0,52 ± 0,05 | b | 59 | 0,54 ± 0,05 | b | 48 | 0,58 ± 0,05 | c | 86 | 1 ± 0,05 | d | 29 |
| | 4x | 0,49 ± 0,04* | a | 38 | 0,55 ± 0,04* | b | 40 | 0,59 ± 0,04* | c | 73 | 0,61 ± 0,03* | c | 16 | 0,65 ± 0,07* | cd | 8 | 1 ± 0,04 | d | 29 |
| Perímetro del ovario | 2x | 0,37 ± 0,04 | a | 21 | 0,46 ± 0,06 | a | 21 | 0,5 ± 0,05 | b | 57 | 0,53 ± 0,04 | c | 48 | 0,59 ± 0,06 | d | 85 | 1 ± 0,07 | e | 29 |
| | 4x | 0,38 ± 0,04 | a | 60 | 0,43 ± 0,03 | b | 44 | 0,5 ± 0,04 | c | 75 | 0,53 ± 0,03 | cd | 21 | 0,59 ± 0,06 | de | 20 | 1 ± 0,12 | e | 30 |
| Area del ovario | 2x | 0,24 ± 0,04 | a | 21 | 0,28 ± 0,05 | a | 23 | 0,35 ± 0,05 | b | 57 | 0,38 ± 0,05 | c | 47 | 0,44 ± 0,06 | d | 86 | 1 ± 0,09 | e | 29 |
| | 4x | 0,3 ± 0,04* | a | 42 | 0,35 ± 0,05* | b | 40 | 0,42 ± 0,06* | c | 68 | 0,47 ± 0,05* | c | 15 | 0,47 ± 0,03 | cd | 7 | 1 ± 0,05 | d | 29 |
| Longitud del integumento/perímetro del lóculo | 2x | 0,22 ± 0,05 | a | 21 | 0,26 ± 0,03 | a | 17 | 0,33 ± 0,03 | b | 48 | 0,35 ± 0,02 | b | 48 | 0,4 ± 0,05 | c | 84 | 0,53 ± 0,02 | d | 29 |
| | 4x | 0,28 ± 0,03* | a | 60 | 0,32 ± 0,03* | b | 43 | 0,37 ± 0,02* | c | 74 | 0,39 ± 0,02* | cd | 20 | 0,4 ± 0,03 | d | 20 | 0,54 ± 0,02 | e | 30 |
| Ancho de la epidermis | 2x | 0,42 ± 1,59 | a | 21 | 0,49 ± 0,09 | a | 22 | 0,6 ± 0,11 | b | 52 | 0,68 ± 0,12 | bc | 48 | 0,63 ± 0,12 | c | 87 | 1 ± 0,16 | d | 29 |
| | 4x | 0,43 ± 0,12 | a | 60 | 0,57 ± 0,09 | b | 44 | 0,72 ± 0,08* | c | 73 | 0,73 ± 0,08* | c | 20 | 0,71 ± 0,07* | c | 21 | 1 ± 0,13 | d | 30 |
| Apertura de la micrópila/longitud del lóculo | 2x | 14,97 ± 0,03 | a | 21 | 10,28 ± 1,73 | a | 19 | 8,13 ± 2,12 | b | 49 | 7,53 ± 1,52 | b | 46 | 5,4 ± 1,86 | c | 85 | 0,3 ± 0,18 | c | 29 |
| | 4x | 8,54 ± 1,59* | a | 31 | 5,65 ± 2,13* | b | 40 | 3,09 ± 1,48* | c | 72 | 1,47 ± 0,87* | d | 18 | 1,06 ± 0,66* | de | 20 | 0,36 ± 0,18* | e | 28 |
| Ángulo de rotación | 2x | 73,09 ± 0,03 | a | 21 | 55,52 ± 9,71 | a | 22 | 43,25 ± 7,87 | b | 45 | 37,12 ± 6,58 | c | 46 | 28,99 ± 6,74 | d | 79 | 4,03 ± 2,06 | e | 29 |
| | 4x | 58,51 ± 6,82* | a | 58 | 47,44 ± 6,57* | b | 44 | 39,32 ± 4,98* | c | 73 | 34,51 ± 4,15 | cd | 20 | 32,49 ± 4,87* | d | 22 | 3,87 ± 2 | e | 30 |

* Diferencias estadísticamente significativas entre individuos diploides y tetraploides.

Las diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre estadios de desarrollo reproductivo.

Tabla 3. Anotaciones funcionales de BLASTn para caracterizar las secuencias diferencialmente metiladas.

| Bibliotecas | Contig | Accesión de NCBI | Descripción | %ident | Cob. | e-value |
|-------------|--------------|------------------|---|--------|------|----------|
| Pre_CG | E846_L143 | NC_039464.1 | Paspalum ionanthum chloroplast, complete genome | 100 | 100 | 3,20E-67 |
| Pre_CG | E41585_L143 | XM_004973334.3 | PREDICTED: Setaria italica protein SODIUM POTASSIUM ROOT DEFECTIVE 3 (LOC101786238), transcript variant X1, mRNA | 98,765 | 57 | 4,35E-31 |
| Pre_CG | E55726_L143 | XM_021455837.1 | PREDICTED: Sorghum bicolor amino-acid permease BAT1 homolog (LOC8062307), transcript variant X2, mRNA | 92,222 | 63 | 4,38E-26 |
| Pre_CG | E72564_L143 | XM_004970525.2 | PREDICTED: Setaria italica uncharacterized LOC101779230 (LOC101779230), mRNA | 94,624 | 65 | 4,35E-31 |
| Pre_CG | E107150_L143 | AP014526.1 | Hevea brasiliensis mitochondrial DNA, complete genome | 81,579 | 99 | 1,23E-21 |
| Pre_CG | E111674_L143 | XM_008681082.3 | PREDICTED: Zea mays type I inositol polyphosphate 5-phosphatase 5 (LOC103654251), mRNA | 94,915 | 83 | 2,56E-43 |
| Pre_CG | E112949_L143 | XM_002454138.2 | PREDICTED: Sorghum bicolor uncharacterized LOC8072483 (LOC8072483), mRNA | 90,083 | 84 | 2,01E-34 |
| Pre_CG | E114313_L143 | XM_021450581.1 | PREDICTED: Sorghum bicolor 50S ribosomal protein L5, chloroplastic (LOC110431438), mRNA | 93,333 | 94 | 3,29E-47 |
| Pre_CG | E121328_L143 | XM_020544235.2 | PREDICTED: Zea mays uncharacterized LOC103638805 (LOC103638805), transcript variant X1, mRNA | 96,053 | 53 | 5,67E-25 |
| Pre_CG | E124354_L143 | XM_021457717.1 | PREDICTED: Sorghum bicolor myb-related protein 305 (LOC8069773), mRNA | 98 | 35 | 7,44E-14 |
| Pre_CG | E131104_L143 | XM_022827763.1 | PREDICTED: Setaria italica NAC domain-containing protein 100 (LOC101777361), mRNA | 93,976 | 58 | 1,58E-25 |
| Pre_CG | E133530_L143 | XM_004976348.3 | PREDICTED: Setaria italica uncharacterized membrane protein At1g16860 (LOC101785042), mRNA | 96,25 | 56 | 3,39E-27 |
| Pre_CG | E134188_L143 | NC_039464.1 | Paspalum ionanthum chloroplast, complete genome | 100 | 52 | 7,28E-29 |
| Pre_CG | E160363_L143 | XM_025958704.1 | PREDICTED: Panicum hallii probable L-type lectin-domain containing receptor kinase S.5 (LOC112891760), transcript variant X2, mRNA | 92,308 | 100 | 7,08E-49 |
| Pre_CG | E164141_L143 | XM_004968841.4 | PREDICTED: Setaria italica myb-related protein Hv33 (LOC101761118), transcript variant X2, mRNA | 97,959 | 69 | 7,18E-39 |
| Pre_CG | E188110_L143 | XM_025949831.1 | PREDICTED: Panicum hallii autophagy-related protein 18h-like (LOC112884447), mRNA | 92,537 | 92 | 7,13E-44 |
| Pre_CG | E211417_L143 | XM_025958384.1 | PREDICTED: Panicum hallii transcription factor PCF5-like (LOC112891502), transcript variant X2, mRNA | 89,928 | 97 | 1,19E-41 |
| Pre_CG | E215471_L143 | XM_002467994.2 | PREDICTED: Sorghum bicolor protein trichome birefringence-like 3 (LOC8081433), mRNA | 92,473 | 65 | 9,42E-28 |
| Pre_CG | E222993_L143 | XM_012849153.1 | PREDICTED: Setaria italica proline-rich receptor-like protein kinase PERK5 (LOC105915195), mRNA | 96,262 | 75 | 1,54E-40 |
| Pre_CG | E229027_L143 | XM_010229024.2 | PREDICTED: Brachypodium distachyon uncharacterized LOC104581454 (LOC104581454), transcript variant X2, mRNA | 90,196 | 71 | 3,39E-27 |
| Pre_CG | E230420_L143 | XR_003226416.1 | PREDICTED: Panicum hallii CRM-domain containing factor CFM3, chloroplastic/mitochondrial-like (LOC112880654), transcript variant X4, misc_RNA | 92,908 | 99 | 1,97E-49 |
| Pre_CG | E241346_L143 | XM_004978419.3 | PREDICTED: Setaria italica transcription factor MYB30 (LOC101769036), mRNA | 86,26 | 88 | 1,22E-26 |

| | | | | | | |
|--------------------|---------------|-------------------------|--|---------------|-------------|----------------|
| Pre_CG | E283155_L143 | LC107874.1 | Saccharum officinarum mitochondrial chromosome 1 DNA, complete genome, cultivar: Khon Kaen 3 | 100 | 100 | 3,20E-67 |
| Pre_CG | E309010_L143 | XM_002445567.2 | PREDICTED: Sorghum bicolor uncharacterized LOC8080653 (LOC8080653), mRNA | 90,909 | 92 | 4,29E-41 |
| Pre_CG | E360458_L143 | AF466646.1 | Zea mays putative transposase (Z195D10.1) gene, partial cds; glycyl-tRNA synthetase (Z195D10.2), ornithine carbamoyltransferase (Z195D10.3), putative gag protein (Z195D10.5), (Z195D10.17), putative retrotransposon protein (Z195D10.18) | 84,783 | 94 | 9,42E-28 |
| Pre_CG | E384059_L143 | XM_022828304.1 | PREDICTED: Setaria italica uncharacterized LOC101766720 (LOC101766720), transcript variant X3, mRNA | 82,979 | 97 | 5,67E-25 |
| Pre_CG | E442306_L143 | LC107874.1 | Saccharum officinarum mitochondrial chromosome 1 DNA, complete genome, cultivar: Khon Kaen 3 | 93,706 | 100 | 1,52E-50 |
| Pre_CG | E443865_L143 | EU365401.1 | Bambusa oldhamii mitochondrion, complete genome | 91,429 | 98 | 1,98E-44 |
| Pre_CG | E512329_L143 | EU956798.1 | Zea mays clone 1574307 mRNA sequence | 85,915 | 99 | 2,60E-33 |
| Pre_CG | E597469_L143 | XM_004954496.1 | PREDICTED: Setaria italica transcriptional regulator SUPERMAN (LOC101772605), mRNA | 89,855 | 48 | 2,67E-13 |
| Pre_CG | E729260_L143 | XM_025968632.1 | PREDICTED: Panicum hallii probable indole-3-pyruvate monooxygenase YUCCA5 (LOC112899960), mRNA | 93,846 | 91 | 1,18E-46 |
| Pre_CG | E816260_L143 | AC231882.1 | Oryza minuta clone OM__Ba0091G05, complete sequence | 83,696 | 62 | 3,46E-12 |
| Pre_CG | E922264_L143 | XM_002459585.2 | PREDICTED: Sorghum bicolor IAA-amino acid hydrolase ILR1-like 7 (LOC8054425), transcript variant X2, mRNA | 92 | 52 | 7,38E-19 |
| Bibliotecas | Contig | Accesión de NCBI | Descripción | %ident | Cob. | e-value |
| Pre_CHG | E93669_L143 | MH176159.1 | Phoenix dactylifera isolate K2 cultivar Khanezi mitochondrion, complete genome | 100 | 100 | 3,20E-67 |
| Pre_CHG | E183974_L143 | FP092920.1 | Phyllostachys edulis cDNA clone: bphyf058h14, full insert sequence | 97,203 | 100 | 1,50E-60 |
| Pre_CHG | E86639_L143 | XM_010236550.3 | PREDICTED: Brachypodium distachyon DNA ligase 1 (LOC100843366), transcript variant X4, mRNA | 98,519 | 94 | 1,94E-59 |
| Pre_CHG | E118640_L143 | XM_002452023.2 | PREDICTED: Sorghum bicolor indole-3-glycerol phosphate synthase, chloroplastic (LOC8084507), mRNA | 96,454 | 99 | 9,03E-58 |
| Pre_CHG | E199549_L143 | XM_021456706.1 | PREDICTED: Sorghum bicolor protein GFS12 (LOC8075296), mRNA | 96,454 | 99 | 9,03E-58 |
| Pre_CHG | E29684_L143 | XM_004958305.3 | PREDICTED: Setaria italica calmodulin-binding transcription activator 3 (LOC101785318), mRNA | 95,804 | 100 | 3,25E-57 |
| Pre_CHG | E91863_L143 | XM_021455096.1 | PREDICTED: Sorghum bicolor suppressor of mec-8 and unc-52 protein homolog 1 (LOC110433291), mRNA | 95,804 | 100 | 3,25E-57 |
| Pre_CHG | E128148_L143 | XM_020546571.2 | PREDICTED: Zea mays uncharacterized LOC103641258 (LOC103641258), transcript variant X16, mRNA | 95,804 | 100 | 3,25E-57 |
| Pre_CHG | E130856_L143 | XM_012842881.3 | PREDICTED: Setaria italica zinc finger BED domain-containing protein RICESLEEPER 2 (LOC105913619), transcript variant X3, mRNA | 95,804 | 100 | 3,25E-57 |
| Pre_CHG | E75959_L143 | XM_021462874.1 | PREDICTED: Sorghum bicolor uncharacterized LOC110436273 (LOC110436273), transcript variant X3, mRNA | 95,105 | 100 | 1,51E-55 |
| Pre_CHG | E133070_L143 | XM_002462867.2 | PREDICTED: Sorghum bicolor pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase DEAH7 (LOC8077485), mRNA | 95,105 | 100 | 1,51E-55 |
| Pre_CHG | E214870_L143 | XM_025968577.1 | PREDICTED: Panicum hallii hydroxycinnamoyltransferase 1 (LOC112899919), mRNA | 95,105 | 100 | 1,51E-55 |

| | | | | | | |
|---------|--------------|----------------|--|--------|-----|----------|
| Pre_CHG | E64444_L143 | XM_021458322.1 | PREDICTED: Sorghum bicolor ribose-phosphate pyrophosphokinase 4 (LOC8071787), transcript variant X3, mRNA | 95,035 | 99 | 1,95E-54 |
| Pre_CHG | E216648_L143 | XM_002436810.2 | PREDICTED: Sorghum bicolor protein NSP-INTERACTING KINASE 1 (LOC8062096), mRNA | 95,035 | 99 | 1,95E-54 |
| Pre_CHG | E102989_L143 | NM_001361447.1 | Zea mays uncharacterized LOC100381565 (LOC100381565), mRNA | 94,406 | 100 | 7,03E-54 |
| Pre_CHG | E130762_L143 | XM_004971223.4 | PREDICTED: Setaria italica villin-2 (LOC101780713), mRNA | 94,406 | 100 | 7,03E-54 |
| Pre_CHG | E159954_L143 | XM_025950421.1 | PREDICTED: Panicum hallii protein RRC1-like (LOC112884514), transcript variant X8, mRNA | 94,406 | 100 | 7,03E-54 |
| Pre_CHG | E223308_L143 | XM_022824617.1 | PREDICTED: Setaria italica mediator of RNA polymerase II transcription subunit 14 (LOC101773308), transcript variant X3, mRNA | 94,406 | 100 | 7,03E-54 |
| Pre_CHG | E170620_L143 | XM_025938230.1 | PREDICTED: Panicum hallii triacylglycerol lipase SDP1-like (LOC112874731), mRNA | 94,366 | 99 | 2,53E-53 |
| Pre_CHG | E173968_L143 | JX541458.1 | Paspalum vaginatum clone StvSingle_HKZDOCN02C2B3P microsatellite sequence | 94,406 | 99 | 2,53E-53 |
| Pre_CHG | E116906_L143 | XM_002465312.2 | PREDICTED: Sorghum bicolor 30S ribosomal protein S1, chloroplastic (LOC8081054), mRNA | 94,286 | 98 | 3,27E-52 |
| Pre_CHG | E166488_L143 | XM_002438282.2 | PREDICTED: Sorghum bicolor UPF0061 protein AZOSEA38000 (LOC8078256), mRNA | 94,286 | 98 | 3,27E-52 |
| Pre_CHG | E166572_L143 | NM_001351042.1 | Zea mays FACT complex subunit SSRP1-B (LOC103630072), mRNA | 94,891 | 96 | 3,27E-52 |
| Pre_CHG | E212098_L143 | XM_025955826.1 | PREDICTED: Panicum hallii chaperone protein DnaJ-like (LOC112889267), transcript variant X2, mRNA | 93,706 | 100 | 3,27E-52 |
| Pre_CHG | E230729_L143 | XM_025942246.1 | PREDICTED: Panicum hallii endoribonuclease Dicer homolog 1 (LOC112877871), transcript variant X2, mRNA | 93,706 | 100 | 3,27E-52 |
| Pre_CHG | E105656_L143 | XM_021452328.1 | PREDICTED: Sorghum bicolor protein MAIN-LIKE 1 (LOC8080728), transcript variant X2, mRNA | 93,617 | 99 | 4,23E-51 |
| Pre_CHG | E143767_L143 | XM_021447598.1 | PREDICTED: Sorghum bicolor phospholipase D zeta 1 (LOC8061909), transcript variant X3, mRNA | 95,455 | 92 | 4,23E-51 |
| Pre_CHG | E303628_L143 | XM_012842908.3 | PREDICTED: Setaria italica LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase FEI 1 (LOC101771743), transcript variant X3, mRNA | 96,825 | 88 | 4,23E-51 |
| Pre_CHG | E66845_L143 | XM_025964567.1 | PREDICTED: Panicum hallii uncharacterized LOC112896551 (LOC112896551), mRNA | 95,42 | 92 | 1,52E-50 |
| Pre_CHG | E96951_L143 | XM_004973096.4 | PREDICTED: Setaria italica UDP-glucose 6-dehydrogenase 4 (LOC101780186), mRNA | 93,007 | 100 | 1,52E-50 |
| Pre_CHG | E115555_L143 | XM_008651821.2 | PREDICTED: Zea mays pentatricopeptide repeat-containing protein At5g39680 (LOC103630757), transcript variant X3, mRNA | 93,007 | 100 | 1,52E-50 |
| Pre_CHG | E147682_L143 | XM_025940134.1 | PREDICTED: Panicum hallii E3 ubiquitin-protein ligase BIG BROTHER (LOC112876094), transcript variant X2, mRNA | 93,007 | 100 | 1,52E-50 |
| Pre_CHG | E230108_L143 | XR_002452316.1 | PREDICTED: Sorghum bicolor protein FAR1-RELATED SEQUENCE 5-like (LOC110434681), transcript variant X5, misc_RNA | 95,42 | 92 | 1,52E-50 |
| Pre_CHG | E36523_L143 | XM_004971029.3 | PREDICTED: Setaria italica exocyst complex component EXO70B1 (LOC101768567), mRNA | 93,525 | 97 | 5,47E-50 |
| Pre_CHG | E189792_L143 | XM_002458730.2 | PREDICTED: Sorghum bicolor probable anion transporter 3, chloroplastic (LOC8058919), mRNA | 92,958 | 99 | 5,47E-50 |
| Pre_CHG | E89361_L143 | NM_001154498.2 | Zea mays glycoside transferase, six-hairpin, subgroup (LOC100281579), mRNA | 92,361 | 100 | 7,08E-49 |
| Pre_CHG | E100932_L143 | KX082756.1 | Miscanthus lutarioriparius glycosyltransferase 43C (GT43C) gene, complete cds | 92,857 | 98 | 7,08E-49 |
| Pre_CHG | E163461_L143 | XM_004951859.2 | PREDICTED: Setaria italica nuclear pore complex protein NUP160 (LOC101783803), mRNA | 92,308 | 100 | 7,08E-49 |
| Pre_CHG | E228032_L143 | FP094507.1 | Phyllostachys edulis cDNA clone: bphyst033c22, full insert sequence | 92,857 | 98 | 7,08E-49 |

| | | | | | | |
|--------------------|---------------|-------------------------|--|---------------|-------------|----------------|
| Pre_CHG | E84438_L143 | XM_025959175.1 | PREDICTED: Panicum hallii protein kinase and PP2C-like domain-containing protein (LOC112892098), mRNA | 97,458 | 83 | 2,55E-48 |
| Bibliotecas | Contig | Accesión de NCBI | Descripción | %ident | Cob. | e-value |
| Pre_CHH | E500987_L143 | NC_039464.1 | Paspalum ionanthum chloroplast, complete genome | 100 | 100 | 3,20E-67 |
| Pre_CHH | E520236_L143 | NC_039464.1 | Paspalum ionanthum chloroplast, complete genome | 100 | 100 | 3,20E-67 |
| Pre_CHH | E555990_L143 | NC_039464.1 | Paspalum ionanthum chloroplast, complete genome | 100 | 100 | 3,20E-67 |
| Pre_CHH | E433884_L143 | DQ984517.1 | Tripsacum dactyloides cultivar Pete mitochondrion, complete genome | 99,301 | 100 | 1,49E-65 |
| Pre_CHH | E612414_L143 | KF852800.1 | Paspalum regnellii voucher Honfi 130 external transcribed spacer, partial sequence | 98,601 | 100 | 6,93E-64 |
| Pre_CHH | E409155_L143 | XM_004962505.3 | PREDICTED: Setaria italica E3 ubiquitin-protein ligase UPL1 (LOC101778904), transcript variant X2, mRNA | 97,902 | 100 | 3,22E-62 |
| Pre_CHH | E464786_L143 | XM_004958305.3 | PREDICTED: Setaria italica calmodulin-binding transcription activator 3 (LOC101785318), mRNA | 97,902 | 100 | 3,22E-62 |
| Pre_CHH | E479163_L143 | XM_002456957.2 | PREDICTED: Sorghum bicolor ABC transporter D family member 1 (LOC8074123), mRNA | 97,902 | 100 | 3,22E-62 |
| Pre_CHH | E544631_L143 | KF852815.1 | Paspalum rufum voucher Quarin 3756 external transcribed spacer, partial sequence | 97,902 | 100 | 3,22E-62 |
| Pre_CHH | E621790_L143 | XM_025967882.1 | PREDICTED: Panicum hallii importin beta-like SAD2 (LOC112899421), transcript variant X3, mRNA | 97,902 | 100 | 3,22E-62 |
| Pre_CHH | E591739_L143 | XM_004953853.4 | PREDICTED: Setaria italica 40S ribosomal protein S8 (LOC101766685), mRNA | 97,887 | 99 | 1,16E-61 |
| Pre_CHH | E392334_L143 | XM_012844348.2 | PREDICTED: Setaria italica translation initiation factor eIF-2B subunit delta (LOC101771067), mRNA | 97,203 | 100 | 1,50E-60 |
| Pre_CHH | E484362_L143 | XM_021450622.1 | PREDICTED: Sorghum bicolor non-lysosomal glucosylceramidase (LOC8155699), transcript variant X3, mRNA | 97,203 | 100 | 1,50E-60 |
| Pre_CHH | E491106_L143 | XM_002457691.2 | PREDICTED: Sorghum bicolor cation transporter HKT8 (LOC8078183), mRNA | 97,203 | 100 | 1,50E-60 |
| Pre_CHH | E506132_L143 | KT989678.1 | Zea mays centromere 10 B73 genomic sequence | 97,203 | 100 | 1,50E-60 |
| Pre_CHH | E536214_L143 | KX268100.1 | Paspalum vaginatum splicing factor U2AF (U2AF) mRNA, complete cds | 97,203 | 100 | 1,50E-60 |
| Pre_CHH | E567392_L143 | NM_001155391.1 | Zea mays aspartate carbamoyltransferase 1 (LOC100282482), mRNA<->Zea mays clone 230773 aspartate carbamoyltransferase 1 mRNA, complete cds | 97,203 | 100 | 1,50E-60 |
| Pre_CHH | E645529_L143 | XM_004958298.4 | PREDICTED: Setaria italica phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase 2, chloroplastic (LOC101783045), mRNA | 97,203 | 100 | 1,50E-60 |
| Pre_CHH | E655834_L143 | XM_021460309.1 | PREDICTED: Sorghum bicolor uncharacterized LOC8064510 (LOC8064510), transcript variant X2, mRNA | 97,203 | 100 | 1,50E-60 |
| Pre_CHH | E673048_L143 | CP018166.1 | Oryza sativa Indica Group cultivar Shuhui498 chromosome 10 sequence | 97,203 | 100 | 1,50E-60 |
| Pre_CHH | E740887_L143 | XM_008645465.3 | PREDICTED: Zea mays Pairing protein meu13-like (pco101674a), transcript variant X1, mRNA | 97,203 | 100 | 1,50E-60 |
| Pre_CHH | E331240_L143 | XM_021452604.1 | PREDICTED: Sorghum bicolor uncharacterized LOC110432361 (LOC110432361), transcript variant X2, mRNA | 97,842 | 97 | 5,39E-60 |
| Pre_CHH | E504666_L143 | AC243228.1 | Panicum virgatum clone PV_ABa011-D10, complete sequence | 97,203 | 99 | 5,39E-60 |
| Pre_CHH | E632135_L143 | XM_025944072.1 | PREDICTED: Panicum hallii tRNA (cytosine(34)-C(5))-methyltransferase (LOC112879702), transcript variant X2, mRNA | 97,163 | 99 | 1,94E-59 |

| | | | | | | |
|--------------------|---------------|-------------------------|--|---------------|-------------|----------------|
| Pre_CHH | E343380_L143 | XM_021465476.1 | PREDICTED: Sorghum bicolor monocopper oxidase-like protein SKU5 (LOC8067849), mRNA | 97,81 | 96 | 6,98E-59 |
| Pre_CHH | E418887_L143 | BT018375.2 | Zea mays clone EL01N0307A05.d mRNA sequence | 96,503 | 100 | 6,98E-59 |
| Pre_CHH | E464695_L143 | XM_021459013.1 | PREDICTED: Sorghum bicolor uncharacterized LOC8066194 (LOC8066194), transcript variant X2, mRNA | 97,143 | 98 | 6,98E-59 |
| Pre_CHH | E467711_L143 | XM_025936612.1 | PREDICTED: Panicum hallii methyl-CpG-binding domain-containing protein 9 (LOC112873586), transcript variant X3, mRNA | 96,503 | 100 | 6,98E-59 |
| Pre_CHH | E517153_L143 | XM_025947074.1 | PREDICTED: Panicum hallii auxin transport protein BIG (LOC112882089), transcript variant X2, mRNA | 96,503 | 100 | 6,98E-59 |
| Pre_CHH | E519698_L143 | XM_002463500.2 | PREDICTED: Sorghum bicolor polycopene isomerase 1, chloroplastic (LOC8080169), mRNA | 96,503 | 100 | 6,98E-59 |
| Pre_CHH | E549896_L143 | NM_001322813.1 | Zea mays ABC transporter B family member 19-like (LOC103642112), mRNA | 96,503 | 100 | 6,98E-59 |
| Pre_CHH | E621915_L143 | XM_025950964.1 | PREDICTED: Panicum hallii glutathione S-transferase T3-like (LOC112885321), mRNA | 96,503 | 100 | 6,98E-59 |
| Pre_CHH | E679636_L143 | LC107874.1 | Saccharum officinarum mitochondrial chromosome 1 DNA, complete genome, cultivar: Khon Kaen 3 | 96,503 | 100 | 6,98E-59 |
| Pre_CHH | E512404_L143 | XM_008650838.2 | PREDICTED: Zea mays stromal processing peptidase, chloroplastic (LOC103629721), transcript variant X2, mRNA | 96,454 | 99 | 9,03E-58 |
| Pre_CHH | E603668_L143 | XM_025958662.1 | PREDICTED: Panicum hallii probable phosphoinositide phosphatase SAC9 (LOC112891723), transcript variant X2, mRNA | 96,454 | 99 | 9,03E-58 |
| Pre_CHH | E630317_L143 | XM_021453723.1 | PREDICTED: Sorghum bicolor E3 ubiquitin-protein ligase At1g63170 (LOC8054551), transcript variant X5, mRNA | 96,454 | 99 | 9,03E-58 |
| Pre_CHH | E636526_L143 | XM_002461582.2 | PREDICTED: Sorghum bicolor DDT domain-containing protein DDR4 (LOC8063671), mRNA | 97,101 | 97 | 9,03E-58 |
| Pre_CHH | E344418_L143 | JX541618.1 | Paspalum vaginatum clone StvSingle_HKZDOCN02E0U7F microsatellite sequence | 95,804 | 100 | 3,25E-57 |
| Pre_CHH | E420002_L143 | XM_025949955.1 | PREDICTED: Panicum hallii uncharacterized LOC112884548 (LOC112884548), mRNA | 95,804 | 100 | 3,25E-57 |
| Pre_CHH | E456923_L143 | XM_025939714.1 | PREDICTED: Panicum hallii probable histone acetyltransferase HAC-like 1 (LOC112875739), transcript variant X3, mRNA | 95,804 | 100 | 3,25E-57 |
| Bibliotecas | Contig | Accesión de NCBI | Descripción | %ident | Cob. | e-value |
| Pre_CG | E30369_L143 | NC_039464.1 | Paspalum ionanthum chloroplast, complete genome | 100 | 100 | 3,20E-67 |
| Pre_CG | E37346_L143 | NC_039974.2 | Pseudostellaria okamotoi chloroplast, complete genome | 100 | 100 | 3,20E-67 |
| Pre_CG | E38525_L143 | NC_039464.1 | Paspalum ionanthum chloroplast, complete genome | 100 | 100 | 3,20E-67 |
| Pre_CG | E42731_L143 | NC_039449.1 | Paspalum virgatum chloroplast, complete genome | 100 | 100 | 3,20E-67 |
| Pre_CG | E49178_L143 | MH181200.1 | Andropogon brachystachyus isolate TK381 chloroplast, complete genome | 100 | 100 | 3,20E-67 |
| Pre_CG | E51866_L143 | MH051716.1 | Triticum aestivum cultivar Chinese Spring mitochondrion, complete genome | 100 | 100 | 3,20E-67 |
| Pre_CG | E66803_L143 | NC_039464.1 | Paspalum ionanthum chloroplast, complete genome | 100 | 100 | 3,20E-67 |
| Pre_CG | E67160_L143 | KY018916.1 | Zea mays isolate SM10 mitochondrion sequence | 100 | 100 | 3,20E-67 |
| Pre_CG | E75823_L143 | NC_039464.1 | Paspalum ionanthum chloroplast, complete genome | 100 | 100 | 3,20E-67 |
| Pre_CG | E76914_L143 | NC_039464.1 | Paspalum ionanthum chloroplast, complete genome | 100 | 100 | 3,20E-67 |

| | | | | | | |
|--------|--------------|----------------|---|--------|-----|----------|
| Pre_CG | E101134_L143 | NC_039464.1 | Paspalum ionanthum chloroplast, complete genome | 100 | 100 | 3,20E-67 |
| Pre_CG | E122674_L143 | CP027775.1 | Clostridium botulinum strain MFBjulcb1 chromosome, complete genome | 100 | 100 | 3,20E-67 |
| Pre_CG | E141277_L143 | CP029344.1 | Hydrogenophaga sp. NH-16 chromosome | 100 | 100 | 3,20E-67 |
| Pre_CG | E142155_L143 | NC_039463.1 | Paspalum inaequivalve chloroplast, complete genome | 100 | 100 | 3,20E-67 |
| Pre_CG | E167283_L143 | MH176159.1 | Phoenix dactylifera isolate K2 cultivar Khanezi mitochondrion, complete genome | 100 | 100 | 3,20E-67 |
| Pre_CG | E168409_L143 | NC_039463.1 | Paspalum inaequivalve chloroplast, complete genome | 100 | 100 | 3,20E-67 |
| Pre_CG | E211468_L143 | NC_039464.1 | Paspalum ionanthum chloroplast, complete genome | 100 | 100 | 3,20E-67 |
| Pre_CG | E215547_L143 | NC_040131.1 | Bothriochloa decipiens isolate TK086 chloroplast, complete genome | 100 | 100 | 3,20E-67 |
| Pre_CG | E237619_L143 | NC_039464.1 | Paspalum ionanthum chloroplast, complete genome | 100 | 100 | 3,20E-67 |
| Pre_CG | E250239_L143 | DQ490951.2 | Zea mays subsp. mays genotype CMS-S mitochondrion, complete genome | 100 | 100 | 3,20E-67 |
| Pre_CG | E256503_L143 | KX792500.2 | Nassella trichotoma chloroplast, complete genome | 100 | 100 | 3,20E-67 |
| Pre_CG | E399086_L143 | DQ645537.1 | Zea luxurians mitochondrion, complete genome | 100 | 100 | 3,20E-67 |
| Pre_CG | E612420_L143 | NC_039464.1 | Paspalum ionanthum chloroplast, complete genome | 100 | 100 | 3,20E-67 |
| Pre_CG | E169186_L143 | NC_039450.1 | Paraneurachne muelleri chloroplast, complete genome | 100 | 99 | 1,15E-66 |
| Pre_CG | E243014_L143 | LC107874.1 | Saccharum officinarum mitochondrial chromosome 1 DNA, complete genome, cultivar: Khon Kaen 3 | 100 | 99 | 4,14E-66 |
| Pre_CG | E553_L143 | CP029344.1 | Hydrogenophaga sp. NH-16 chromosome | 99,301 | 100 | 1,49E-65 |
| Pre_CG | E28088_L143 | JN120789.1 | Ferrocalamus rimosivaginus mitochondrion, partial genome | 99,301 | 100 | 1,49E-65 |
| Pre_CG | E44635_L143 | AY941122.1 | Paspalum rufum psbA-trnH intergenic spacer, partial sequence; and rpl19 gene, complete cds; chloroplast | 99,301 | 100 | 1,49E-65 |
| Pre_CG | E322949_L143 | XM_004970677.2 | PREDICTED: Setaria italica 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 2 (LOC101769773), mRNA | 99,301 | 100 | 1,49E-65 |
| Pre_CG | E98564_L143 | NC_039464.1 | Paspalum ionanthum chloroplast, complete genome | 100 | 98 | 1,49E-65 |
| Pre_CG | E14426_L143 | JN120789.1 | Ferrocalamus rimosivaginus mitochondrion, partial genome | 99,296 | 99 | 5,36E-65 |
| Pre_CG | E182938_L143 | XM_002468163.2 | PREDICTED: Sorghum bicolor glutamate decarboxylase 1 (LOC8085236), mRNA | 99,296 | 99 | 5,36E-65 |
| Pre_CG | E190261_L143 | XM_002463822.2 | PREDICTED: Sorghum bicolor oligopeptide transporter 3 (LOC8086239), mRNA | 99,296 | 99 | 5,36E-65 |
| Pre_CG | E116684_L143 | MF964221.1 | Steinchisma laxum voucher GB20-2012 chloroplast, complete genome | 99,301 | 100 | 5,36E-65 |
| Pre_CG | E132797_L143 | JN120789.1 | Ferrocalamus rimosivaginus mitochondrion, partial genome | 99,291 | 99 | 1,93E-64 |
| Pre_CG | E4596_L143 | NC_039464.1 | Paspalum ionanthum chloroplast, complete genome | 98,601 | 100 | 6,93E-64 |
| Pre_CG | E42025_L143 | MH051716.1 | Triticum aestivum cultivar Chinese Spring mitochondrion, complete genome | 98,601 | 100 | 6,93E-64 |
| Pre_CG | E100462_L143 | XM_004965390.3 | PREDICTED: Setaria italica eukaryotic translation initiation factor 1A (LOC101765402), mRNA | 98,601 | 100 | 6,93E-64 |
| Pre_CG | E126362_L143 | NC_039448.1 | Paspalum pubiflorum chloroplast, complete genome | 98,601 | 100 | 6,93E-64 |

| Pre_CG | E135271_L143 | DQ984518.1 | Sorghum bicolor mitochondrion, complete genome | 98,601 | 100 | 6,93E-64 |
|-------------|--------------|------------------|---|--------|------|----------|
| Bibliotecas | Contig | Accesión de NCBI | Descripción | %ident | Cob. | e-value |
| Pre_CHG | E18226_L143 | KX268095.1 | Paspalum vaginatum alpha-tubulin (TUB) mRNA, complete cds | 100 | 100 | 3,20E-67 |
| Pre_CHG | E46496_L143 | NC_039464.1 | Paspalum ionanthum chloroplast, complete genome | 100 | 100 | 3,20E-67 |
| Pre_CHG | E89090_L143 | NC_039460.1 | Paspalum minus chloroplast, complete genome | 100 | 100 | 3,20E-67 |
| Pre_CHG | E139626_L143 | KY018916.1 | Zea mays isolate SM10 mitochondrion sequence | 100 | 99 | 1,15E-66 |
| Pre_CHG | E37141_L143 | XM_025955105.1 | PREDICTED: Panicum hallii kinesin-like protein KIN-14L (LOC112888783), mRNA | 99,301 | 100 | 1,49E-65 |
| Pre_CHG | E46519_L143 | MH051716.1 | Triticum aestivum cultivar Chinese Spring mitochondrion, complete genome | 99,301 | 100 | 1,49E-65 |
| Pre_CHG | E78940_L143 | MF563377.1 | Hiladaea pallens voucher GB06-2014 chloroplast, complete genome | 99,301 | 100 | 1,49E-65 |
| Pre_CHG | E117594_L143 | XM_004968624.3 | PREDICTED: Setaria italica neutral/alkaline invertase 1, mitochondrial (LOC101764755), mRNA | 99,301 | 100 | 1,49E-65 |
| Pre_CHG | E123207_L143 | LC107874.1 | Saccharum officinarum mitochondrial chromosome 1 DNA, complete genome, cultivar: Khon Kaen 3 | 99,301 | 100 | 1,49E-65 |
| Pre_CHG | E142124_L143 | JN120789.1 | Ferrocalamus rimosivaginus mitochondrion, partial genome | 99,301 | 100 | 1,49E-65 |
| Pre_CHG | E106032_L143 | BT060804.1 | Zea mays full-length cDNA clone ZM_BFb0052009 mRNA, complete cds | 99,291 | 99 | 1,93E-64 |
| Pre_CHG | E54300_L143 | XM_025944858.1 | PREDICTED: Panicum hallii transcription factor TGA2.1-like (LOC112880305), mRNA | 98,601 | 100 | 6,93E-64 |
| Pre_CHG | E64495_L143 | KF184946.1 | Saccharum hybrid cultivar R570 clone BAC 166F02 complete sequence | 98,601 | 100 | 6,93E-64 |
| Pre_CHG | E96558_L143 | NC_039464.1 | Paspalum ionanthum chloroplast, complete genome | 98,601 | 100 | 6,93E-64 |
| Pre_CHG | E120869_L143 | XM_008671244.2 | PREDICTED: Zea mays starch branching enzyme 3 (LOC542342), mRNA | 99,286 | 98 | 6,93E-64 |
| Pre_CHG | E51348_L143 | XM_025970073.1 | PREDICTED: Panicum hallii nucleoporin NSP1 (LOC112901214), transcript variant X3, mRNA | 99,281 | 97 | 2,49E-63 |
| Pre_CHG | E200408_L143 | CP018157.1 | Oryza sativa Indica Group cultivar Shuhui498 chromosome 1 sequence | 98,582 | 99 | 8,96E-63 |
| Pre_CHG | E21173_L143 | BT018749.1 | Zea mays clone EL01N0522F06.d mRNA sequence | 97,902 | 100 | 3,22E-62 |
| Pre_CHG | E22576_L143 | XM_021446730.1 | PREDICTED: Sorghum bicolor carbon catabolite repressor protein 4 homolog 1-like (LOC110429948), transcript variant X3, mRNA | 97,902 | 100 | 3,22E-62 |
| Pre_CHG | E51720_L143 | XM_004984955.3 | PREDICTED: Setaria italica brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 2 (LOC101767857), mRNA | 97,902 | 100 | 3,22E-62 |
| Pre_CHG | E58832_L143 | XM_021465471.1 | PREDICTED: Sorghum bicolor biotin synthase (LOC110437152), mRNA | 97,902 | 100 | 3,22E-62 |
| Pre_CHG | E76102_L143 | XM_002440535.2 | PREDICTED: Sorghum bicolor DNA repair helicase XPD (LOC8075957), mRNA | 97,902 | 100 | 3,22E-62 |
| Pre_CHG | E78465_L143 | NC_039464.1 | Paspalum ionanthum chloroplast, complete genome | 98,571 | 98 | 3,22E-62 |
| Pre_CHG | E88361_L143 | XM_004976076.4 | PREDICTED: Setaria italica trafficking protein particle complex II-specific subunit 120 homolog (LOC101784645), mRNA | 97,902 | 100 | 3,22E-62 |
| Pre_CHG | E95470_L143 | XM_025966560.1 | PREDICTED: Panicum hallii cellulose synthase-like protein D3 (LOC112898182), mRNA | 97,902 | 100 | 3,22E-62 |
| Pre_CHG | E97155_L143 | XM_021454325.1 | PREDICTED: Sorghum bicolor valine--tRNA ligase, chloroplastic/mitochondrial 2 (LOC8081158), transcript variant X2, mRNA | 98,571 | 98 | 3,22E-62 |

| | | | | | | |
|--------------------|---------------|-------------------------|---|---------------|-------------|----------------|
| Pre_CHG | E108709_L143 | XM_021456050.1 | PREDICTED: Sorghum bicolor ABC transporter D family member 2, chloroplastic (LOC8081398), transcript variant X4, mRNA | 97,902 | 100 | 3,22E-62 |
| Pre_CHG | E115615_L143 | XM_025959393.1 | PREDICTED: Panicum hallii tubulin beta-4 chain (LOC112892253), mRNA | 97,902 | 100 | 3,22E-62 |
| Pre_CHG | E130132_L143 | XM_008648034.2 | PREDICTED: Zea mays uncharacterized LOC100384351 (LOC100384351), transcript variant X1, mRNA | 97,902 | 100 | 3,22E-62 |
| Pre_CHG | E130481_L143 | KX268097.1 | Paspalum vaginatum F-box/Kelch-repeat protein mRNA, complete cds | 97,902 | 100 | 3,22E-62 |
| Pre_CHG | E131049_L143 | XM_021457731.1 | PREDICTED: Sorghum bicolor transcription factor GAMYB (LOC8082420), mRNA | 97,902 | 100 | 3,22E-62 |
| Pre_CHG | E137441_L143 | XM_025946264.1 | PREDICTED: Panicum hallii transcription factor TGA2.1 (LOC112881525), transcript variant X4, mRNA | 97,902 | 100 | 3,22E-62 |
| Pre_CHG | E157412_L143 | KT203455.1 | Paspalum vaginatum clone SpCT3 hypothetical protein mRNA, complete cds | 97,902 | 100 | 3,22E-62 |
| Pre_CHG | E117811_L143 | XM_025968062.1 | PREDICTED: Panicum hallii probable protein phosphatase 2C 39 (LOC112899556), mRNA | 97,887 | 99 | 1,16E-61 |
| Pre_CHG | E150432_L143 | XM_021454130.1 | PREDICTED: Sorghum bicolor phosphatidylinositol N-acetylglucosaminyltransferase subunit A (LOC8084598), transcript variant X4, mRNA | 97,887 | 99 | 1,16E-61 |
| Pre_CHG | E9695_L143 | XM_004963735.2 | PREDICTED: Setaria italica probable glycosyltransferase STELLO2 (LOC101755121), partial mRNA | 97,872 | 99 | 4,17E-61 |
| Pre_CHG | E67433_L143 | XM_004970404.2 | PREDICTED: Setaria italica probable serine/threonine-protein kinase dyrk1 (LOC101764617), mRNA | 97,872 | 99 | 4,17E-61 |
| Pre_CHG | E11245_L143 | XM_002449419.2 | PREDICTED: Sorghum bicolor serine hydroxymethyltransferase 4 (LOC8075758), mRNA | 97,203 | 100 | 1,50E-60 |
| Pre_CHG | E15424_L143 | XM_004983965.2 | PREDICTED: Setaria italica COBRA-like protein 5 (LOC101758510), mRNA | 97,203 | 100 | 1,50E-60 |
| Pre_CHG | E25431_L143 | XM_025938877.1 | PREDICTED: Panicum hallii probable methyltransferase PMT2 (LOC112875145), transcript variant X2, mRNA | 97,203 | 100 | 1,50E-60 |
| Bibliotecas | Contig | Accesión de NCBI | Descripción | %ident | Cob. | e-value |
| Pre_CHH | E398568_L143 | NC_039464.1 | Paspalum ionanthum chloroplast, complete genome | 100 | 100 | 3,20E-67 |
| Pre_CHH | E338916_L143 | XM_026022112.1 | PREDICTED: Oryza sativa Japonica Group ribosomal protein S3, mitochondrial-like (LOC112937435), mRNA | 99,301 | 100 | 1,49E-65 |
| Pre_CHH | E329947_L143 | NM_001150764.2 | Zea mays pco118161 (pco118161), mRNA | 97,902 | 100 | 3,22E-62 |
| Pre_CHH | E422867_L143 | XM_012844348.2 | PREDICTED: Setaria italica translation initiation factor eIF-2B subunit delta (LOC101771067), mRNA | 97,203 | 100 | 1,50E-60 |
| Pre_CHH | E599454_L143 | JN120789.1 | Ferrocalamus rimosivaginus mitochondrion, partial genome | 96,622 | 100 | 5,39E-60 |
| Pre_CHH | E275678_L143 | KT989678.1 | Zea mays centromere 10 B73 genomic sequence | 96,503 | 100 | 6,98E-59 |
| Pre_CHH | E384030_L143 | CP018159.1 | Oryza sativa Indica Group cultivar Shuhui498 chromosome 3 sequence | 95,804 | 100 | 3,25E-57 |
| Pre_CHH | E251547_L143 | NM_001157735.1 | Zea mays palmitoyltransferase ZDHC9 (LOC100284840), mRNA<->Zea mays clone 336522 palmitoyltransferase ZDHC9 mRNA, complete cds | 95,105 | 100 | 1,51E-55 |
| Pre_CHH | E273930_L143 | XM_021455692.1 | PREDICTED: Sorghum bicolor acyltransferase-like protein At1g54570, chloroplastic (LOC8086356), mRNA | 95,105 | 100 | 1,51E-55 |

| | | | | | | |
|---------|--------------|----------------|--|--------|-----|----------|
| Pre_CHH | E429103_L143 | XR_002269391.2 | PREDICTED: Zea mays Serine/threonine-protein phosphatase (pco069598), transcript variant X1, misc_RNA | 96,35 | 96 | 1,51E-55 |
| Pre_CHH | E315119_L143 | XM_025967339.1 | PREDICTED: Panicum hallii uncharacterized protein At2g24330-like (LOC112899005), mRNA | 95,07 | 99 | 5,43E-55 |
| Pre_CHH | E317118_L143 | XM_025956590.1 | PREDICTED: Panicum hallii FT-interacting protein 1-like (LOC112889817), mRNA | 95,07 | 99 | 5,43E-55 |
| Pre_CHH | E1413_L143 | XM_021464496.1 | PREDICTED: Sorghum bicolor 3-dehydroquinase synthase homolog (LOC8082118), transcript variant X2, mRNA | 94,406 | 100 | 7,03E-54 |
| Pre_CHH | E291387_L143 | XM_025962638.1 | PREDICTED: Panicum hallii uncharacterized LOC112894820 (LOC112894820), transcript variant X2, mRNA | 94,444 | 100 | 7,03E-54 |
| Pre_CHH | E429105_L143 | XM_021450240.1 | PREDICTED: Sorghum bicolor cytochrome P450 704C1 (LOC8069052), transcript variant X2, mRNA | 94,406 | 100 | 7,03E-54 |
| Pre_CHH | E426185_L143 | XM_004967560.4 | PREDICTED: Setaria italica ABC transporter B family member 21 (LOC101783382), transcript variant X2, mRNA | 94,366 | 99 | 2,53E-53 |
| Pre_CHH | E293541_L143 | XM_002442526.2 | PREDICTED: Sorghum bicolor putative pentatricopeptide repeat-containing protein At3g25970 (LOC8086105), mRNA | 93,706 | 100 | 3,27E-52 |
| Pre_CHH | E451970_L143 | XM_025947653.1 | PREDICTED: Panicum hallii alanine aminotransferase 2-like (LOC112882573), transcript variant X2, mRNA | 93,706 | 100 | 3,27E-52 |
| Pre_CHH | E467691_L143 | KU685405.1 | Saccharum officinarum clone LA110E11, complete sequence | 93,706 | 100 | 3,27E-52 |
| Pre_CHH | E371200_L143 | CP018164.1 | Oryza sativa Indica Group cultivar Shuhui498 chromosome 8 sequence | 94,245 | 97 | 1,18E-51 |
| Pre_CHH | E383415_L143 | XM_025939716.1 | PREDICTED: Panicum hallii PHD finger protein MALE MEIOCYTE DEATH 1-like (LOC112875748), transcript variant X4, mRNA | 93,662 | 99 | 1,18E-51 |
| Pre_CHH | E457196_L143 | KU685405.1 | Saccharum officinarum clone LA110E11, complete sequence | 93,706 | 100 | 1,18E-51 |
| Pre_CHH | E198499_L143 | XM_025958256.1 | PREDICTED: Panicum hallii ABC transporter B family member 4-like (LOC112891409), mRNA | 93,007 | 100 | 1,52E-50 |
| Pre_CHH | E329722_L143 | XM_022823081.1 | PREDICTED: Setaria italica putative pentatricopeptide repeat-containing protein At1g77010, mitochondrial (LOC101758509), transcript variant X7, mRNA | 93,007 | 100 | 1,52E-50 |
| Pre_CHH | E331895_L143 | XM_025970415.1 | PREDICTED: Panicum hallii TATA box-binding protein-associated factor RNA polymerase I subunit B-like (LOC112901486), transcript variant X5, mRNA | 93,007 | 100 | 1,52E-50 |
| Pre_CHH | E344455_L143 | XM_002437316.2 | PREDICTED: Sorghum bicolor RNA polymerase II C-terminal domain phosphatase-like 4 (LOC8069340), transcript variant X2, mRNA | 93,007 | 100 | 1,52E-50 |
| Pre_CHH | E351134_L143 | XM_025939298.1 | PREDICTED: Panicum hallii protein phosphatase 2C 32 (LOC112875443), mRNA | 93,007 | 100 | 1,52E-50 |
| Pre_CHH | E3575_L143 | KR611539.1 | Paspalum plicatum clone Pp-UNICAMP05 microsatellite sequence | 93,007 | 100 | 5,47E-50 |
| Pre_CHH | E338197_L143 | AY664415.1 | Zea mays cultivar B73 locus 9009, complete sequence | 94,118 | 95 | 5,47E-50 |
| Pre_CHH | E442776_L143 | XM_025950193.1 | PREDICTED: Panicum hallii probable alpha,alpha-trehalose-phosphate synthase [UDP-forming] 7 (LOC112884705), mRNA | 92,958 | 99 | 5,47E-50 |
| Pre_CHH | E522452_L143 | XM_002455260.2 | PREDICTED: Sorghum bicolor rust resistance kinase Lr10 (LOC8070442), transcript variant X1, mRNA | 92,908 | 99 | 1,97E-49 |
| Pre_CHH | E178420_L143 | JX541618.1 | Paspalum vaginatum clone StvSingle_HKZDOCN02E0U7F microsatellite sequence | 92,308 | 100 | 7,08E-49 |

| | | | | | | |
|---------|--------------|----------------|---|--------|-----|----------|
| Pre_CHH | E250349_L143 | XM_025964203.1 | PREDICTED: Panicum hallii protein Brevis radix-like 1 (LOC112896277), mRNA | 92,308 | 100 | 7,08E-49 |
| Pre_CHH | E345931_L143 | XM_002468058.2 | PREDICTED: Sorghum bicolor uncharacterized LOC8084938 (LOC8084938), mRNA | 92,308 | 100 | 7,08E-49 |
| Pre_CHH | E354333_L143 | XR_002450627.1 | PREDICTED: Sorghum bicolor CCR4-NOT transcription complex subunit 1 (LOC8058085), transcript variant X4, misc_RNA | 96 | 87 | 7,08E-49 |
| Pre_CHH | E178356_L143 | JX541618.1 | Paspalum vaginatum clone StvSingle_HKZDOCN02E0U7F microsatellite sequence | 92,254 | 99 | 2,55E-48 |
| Pre_CHH | E303780_L143 | XM_004952938.3 | PREDICTED: Setaria italica intracellular protein transport protein USO1 (LOC101782050), mRNA | 92,254 | 99 | 2,55E-48 |
| Pre_CHH | E319182_L143 | XM_002452961.2 | PREDICTED: Sorghum bicolor quinone oxidoreductase PIG3 (LOC8056412), mRNA | 95,935 | 86 | 9,16E-48 |
| Pre_CHH | E456525_L143 | JQ887160.1 | Zea mays isolate 5003 clone 1 GRMZM5G835772-like gene, partial sequence | 95,238 | 88 | 9,16E-48 |
| Pre_CHH | E282225_L143 | XM_025959215.1 | PREDICTED: Panicum hallii delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase 2 (LOC112892130), mRNA | 93,893 | 92 | 3,29E-47 |

* Se representaron las primeras 40 anotaciones con menor e-value de cada tratamiento.

Tabla 4. Anotaciones funcionales para secuencias con más de un contexto de metilación en el estadio de premeiosis.

| Accesión de NCBI | Contexto | Estadio | Contig | Descripción |
|------------------|----------|------------|--------------|--|
| NC_039464.1 | CG CHH | Premeiosis | E846_L143 | Paspalum ionanthum chloroplast, complete genome |
| XM_004973334.3 | CG CHH | Premeiosis | E41585_L143 | PREDICTED: Setaria italica protein SODIUM POTASSIUM ROOT DEFECTIVE 3 (LOC101786238), transcript variant X1, mRNA |
| LC107874.1 | CG CHH | Premeiosis | E283155_L143 | Saccharum officinarum mitochondrial chromosome 1 DNA, complete genome, cultivar: Khon Kaen 3 |
| KY965816.2 | CHG CHH | Premeiosis | E3062_L143 | Lasthenia californica chloroplast, partial genome |
| XM_004958305.3 | CHG CHH | Premeiosis | E29684_L143 | PREDICTED: Setaria italica calmodulin-binding transcription activator 3 (LOC101785318), mRNA |
| KT895861.1 | CHG CHH | Premeiosis | E42017_L143 | Gossypium raimondii isolate Gr291 retrotransposon Ty3, complete sequence |
| XM_013494305.1 | CHG CHH | Premeiosis | E70812_L143 | Eimeria mitis hypothetical protein, conserved partial mRNA |
| CP018160.1 | CHG CHH | Premeiosis | E74776_L143 | Oryza sativa Indica Group cultivar Shuhui498 chromosome 4 sequence |
| AF466201.1 | CHG CHH | Premeiosis | E76968_L143 | Sorghum bicolor clone SBTXS_0032H17 putative cytochrome P450-like protein. |
| MF737029.1 | CHG CHH | Premeiosis | E82443_L143 | Saccharum hybrid cultivar SP80-3280 isolate Shy3280Sca024 genomic sequence |
| XM_025960568.1 | CHG CHH | Premeiosis | E89056_L143 | PREDICTED: Panicum hallii protein decapping 5-like (LOC112893316), transcript variant X2, mRNA |
| XM_025967916.1 | CHG CHH | Premeiosis | E90139_L143 | PREDICTED: Panicum hallii acetyl-CoA carboxylase 2-like (LOC112899438), transcript variant X2, mRNA |
| EU946985.1 | CHG CHH | Premeiosis | E93307_L143 | Zea mays clone 325757 mRNA sequence |
| CP018164.1 | CHG CHH | Premeiosis | E104813_L143 | Oryza sativa Indica Group cultivar Shuhui498 chromosome 8 sequence |
| MH883760.1 | CHG CHH | Premeiosis | E109763_L143 | Human gammaherpesvirus 4 isolate ebv14, partial genome |
| CP018163.1 | CHG CHH | Premeiosis | E121558_L143 | Oryza sativa Indica Group cultivar Shuhui498 chromosome 7 sequence |
| CP018159.1 | CHG CHH | Premeiosis | E136374_L143 | Oryza sativa Indica Group cultivar Shuhui498 chromosome 3 sequence |
| LN591006.1 | CHG CHH | Premeiosis | E156443_L143 | Cyprinus carpio genome assembly common carp genome ,scaffold 000001124 |

| | | | | |
|----------------|---------|------------|--------------|--|
| NM_001359659.1 | CHG CHH | Premeiosis | E176437_L143 | Zea mays Beta-galactosidase 1 (LOC100272556), mRNA |
| XM_022826624.1 | CHG CHH | Premeiosis | E232896_L143 | PREDICTED: Setaria italica uncharacterized LOC101784485 (LOC101784485), mRNA |
| KF184939.1 | CHG CHH | Premeiosis | E239920_L143 | Saccharum hybrid cultivar R570 clone BAC 014N06 complete sequence |
| XM_012842908.3 | CHG CHH | Premeiosis | E303628_L143 | PREDICTED: Setaria italica LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase FEI 1 (LOC101771743), transcript variant X3, mRNA |

Tabla 5. Anotaciones funcionales para secuencias con más de un contexto de metilación en el estadio de postmeiosis.

| Accesión de NCBI | Contexto | Estadio | Contig | Descripción |
|------------------|----------|-------------|--------------|--|
| CP018157.1 | CG CHG | Postmeiosis | E19551_L143 | Oryza sativa Indica Group cultivar Shuhui498 chromosome 1 sequence |
| XM_025968565.1 | CG CHG | Postmeiosis | E123751_L143 | PREDICTED: Panicum hallii zinc finger CCCH domain-containing protein 24 (LOC112899907), mRNA |
| XM_025956360.1 | CG CHG | Postmeiosis | E39859_L143 | PREDICTED: Panicum hallii probable potassium transporter 13 (LOC112889630), mRNA |
| KR014666.1 | CG CHG | Postmeiosis | E168337_L143 | Zea mays cultivar RP4Htn1 hypothetical proteins, DUF630 domain protein, putative zinc finger protein, esterase/lipase/thioesterase, wall-associated receptor-like kinase 2 (WAK-RLK2), wall-associated receptor-like protein (WAK-RLP1), wall-associated receptor-like kinase 1 (WAK-RLK1), putative reticulon protein, cytidyltransferase domain protein, and hypothetical proteins genes, complete cds |
| CP018165.1 | CG CHG | Postmeiosis | E34328_L143 | Oryza sativa Indica Group cultivar Shuhui498 chromosome 9 sequence |
| CP018166.1 | CG CHG | Postmeiosis | E84669_L143 | Oryza sativa Indica Group cultivar Shuhui498 chromosome 10 sequence |
| KF184852.1 | CG CHG | Postmeiosis | E140477_L143 | Saccharum hybrid cultivar R570 clone BAC 020L15 complete sequence |
| XM_022825638.1 | CG CHG | Postmeiosis | E42353_L143 | PREDICTED: Setaria italica DNA-directed RNA polymerase I subunit 1 (LOC101753676), mRNA |
| XM_025948946.1 | CG CHG | Postmeiosis | E166887_L143 | PREDICTED: Panicum hallii thaumatin-like protein 1 (LOC112883613), transcript variant X3, mRNA |
| HG531802.1 | CG CHG | Postmeiosis | E86451_L143 | Saccharum hybrid cultivar R570_BAC clone Sh242M02 |
| XM_012848394.3 | CG CHG | Postmeiosis | E131664_L143 | PREDICTED: Setaria italica wall-associated receptor kinase 5 (LOC101786429), transcript variant X2, mRNA |
| AC225944.3 | CG CHG | Postmeiosis | E104900_L143 | Zea mays BAC clone CH201-127G5 from chromosome 10, complete sequence |
| MF737060.1 | CG CHG | Postmeiosis | E148872_L143 | Saccharum hybrid cultivar SP80-3280 isolate Shy3280Sca055 genomic sequence |
| JQ887208.1 | CG CHG | Postmeiosis | E54684_L143 | Zea mays isolate 5003 clone 1 GRMZM2G408242-like gene, partial sequence |
| XM_004953016.3 | CG CHG | Postmeiosis | E46142_L143 | PREDICTED: Setaria italica hydroxycinnamoyltransferase 2 (LOC101780573), mRNA |
| KF184733.1 | CG CHG | Postmeiosis | E52859_L143 | Saccharum hybrid cultivar R570 clone BAC 116M17 complete sequence |
| XM_008681639.2 | CG CHG | Postmeiosis | E33689_L143 | PREDICTED: Zea mays ABC transporter G family member 39 (LOC103654816), mRNA |
| XM_002437111.2 | CG CHG | Postmeiosis | E165496_L143 | PREDICTED: Sorghum bicolor GDSL esterase/lipase At1g29670 (LOC8061980), mRNA |
| XM_023300627.1 | CG CHG | Postmeiosis | E14828_L143 | PREDICTED: Zea mays serine carboxypeptidase-like 28 (LOC103632868), mRNA |

| | | | | |
|----------------|--------|-------------|--------------|--|
| XM_004953384.3 | CG CHG | Postmeiosis | E89570_L143 | PREDICTED: <i>Setaria italica</i> SPX domain-containing membrane protein Os02g45520 (LOC101754776), transcript variant X4, mRNA |
| AF466200.2 | CG CHG | Postmeiosis | E43393_L143 | <i>Sorghum bicolor</i> putative protein kinase gene, partial cds; putative Cf-2, fertilization-independent endosperm proteins, hypothetical protein, putative non-LTR retroelement reverse transcriptase |
| XM_004960498.3 | CG CHG | Postmeiosis | E63487_L143 | PREDICTED: <i>Setaria italica</i> PH, RCC1 and FYVE domains-containing protein 1 (LOC101786547), mRNA |
| BT018749.1 | CG CHG | Postmeiosis | E21173_L143 | <i>Zea mays</i> clone EL01N0522F06.d mRNA sequence |
| XM_020343014.1 | CG CHG | Postmeiosis | E115218_L143 | PREDICTED: <i>Aegilops tauschii</i> subsp. <i>tauschii</i> pentatricopeptide repeat-containing protein At4g01990, mitochondrial-like (LOC109784420), mRNA |
| JX541690.1 | CG CHG | Postmeiosis | E109686_L143 | <i>Paspalum vaginatum</i> clone StvSingle_HKZDOCN02DSIXO microsatellite sequence |
| XM_025939313.1 | CG CHG | Postmeiosis | E177842_L143 | PREDICTED: <i>Panicum hallii</i> glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase GAPB, chloroplastic (LOC112875455), mRNA |
| XM_025938877.1 | CG CHG | Postmeiosis | E25431_L143 | PREDICTED: <i>Panicum hallii</i> probable methyltransferase PMT2 (LOC112875145), transcript variant X2, mRNA |
| XM_004967594.2 | CG CHG | Postmeiosis | E35944_L143 | PREDICTED: <i>Setaria italica</i> cinnamoyl-CoA reductase 1 (LOC101761894), mRNA |
| MF737045.1 | CG CHG | Postmeiosis | E110825_L143 | <i>Saccharum hybrid</i> cultivar SP80-3280 isolate Shy3280Sca040 genomic sequence |
| XM_025950466.1 | CG CHG | Postmeiosis | E20572_L143 | PREDICTED: <i>Panicum hallii</i> heat shock 70 kDa protein 15-like (LOC112884857), mRNA |
| XM_025940656.1 | CG CHG | Postmeiosis | E71617_L143 | PREDICTED: <i>Panicum hallii</i> organic cation/carnitine transporter 7-like (LOC112876528), transcript variant X2, mRNA |
| XM_002448617.2 | CG CHG | Postmeiosis | E114752_L143 | PREDICTED: <i>Sorghum bicolor</i> probable sulfate transporter 3.3 (LOC8068494), mRNA |
| XM_014804893.2 | CG CHG | Postmeiosis | E109181_L143 | PREDICTED: <i>Setaria italica</i> auxin response factor 11 (LOC101781038), transcript variant X2, mRNA |
| AC190571.5 | CG CHG | Postmeiosis | E75533_L143 | <i>Zea mays</i> BAC clone CH201-151G9 from chromosome 5, complete sequence |
| AC120496.2 | CG CHG | Postmeiosis | E88585_L143 | Genomic sequence for <i>Sorghum bicolor</i> , clone SBBBc0267M07, complete sequence |
| XM_004966162.3 | CG CHG | Postmeiosis | E41411_L143 | PREDICTED: <i>Setaria italica</i> glutamate receptor 3.4 (LOC101770289), mRNA |
| XM_008645912.3 | CG CHG | Postmeiosis | E62860_L143 | PREDICTED: <i>Zea mays</i> uncharacterized LOC100383981 (LOC100383981), transcript variant X1, mRNA |
| XM_025958039.1 | CG CHG | Postmeiosis | E8267_L143 | PREDICTED: <i>Panicum hallii</i> WAT1-related protein At3g30340-like (LOC112891107), mRNA |
| KX904877.1 | CG CHG | Postmeiosis | E1565_L143 | <i>Fargesia denudata</i> chloroplast, complete genome |
| XM_025961220.1 | CG CHG | Postmeiosis | E40963_L143 | PREDICTED: <i>Panicum hallii</i> eukaryotic translation initiation factor 3 subunit D-like (LOC112893752), mRNA |
| CP018160.1 | CG CHG | Postmeiosis | E9848_L143 | <i>Oryza sativa</i> Indica Group cultivar Shuhui498 chromosome 4 sequence |
| XM_021452031.1 | CG CHG | Postmeiosis | E42931_L143 | PREDICTED: <i>Sorghum bicolor</i> serine/threonine-protein kinase HT1 (LOC110432053), mRNA |
| XM_004952157.4 | CG CHG | Postmeiosis | E113127_L143 | PREDICTED: <i>Setaria italica</i> cytochrome c-type biogenesis CcmH-like mitochondrial protein (LOC101761395), transcript variant X6, mRNA |
| XM_004983965.2 | CG CHG | Postmeiosis | E15424_L143 | PREDICTED: <i>Setaria italica</i> COBRA-like protein 5 (LOC101758510), mRNA |
| XM_025963370.1 | CG CHG | Postmeiosis | E23053_L143 | PREDICTED: <i>Panicum hallii</i> WAT1-related protein At1g09380 (LOC112895420), mRNA |
| XM_004975860.2 | CG CHG | Postmeiosis | E312057_L143 | PREDICTED: <i>Setaria italica</i> cytochrome P450 724B1 (LOC101768860), mRNA |

| | | | | |
|----------------|---------|-------------|--------------|--|
| XM_025959337.1 | CG CHG | Postmeiosis | E50210_L143 | PREDICTED: Panicum hallii 2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase (LOC112892205), mRNA |
| XM_021463229.1 | CG CHG | Postmeiosis | E157123_L143 | PREDICTED: Sorghum bicolor uncharacterized LOC110436349 (LOC110436349), transcript variant X4, mRNA |
| MH051716.1 | CG CHG | Postmeiosis | E46519_L143 | Triticum aestivum cultivar Chinese Spring mitochondrion, complete genome |
| KF184828.1 | CG CHG | Postmeiosis | E65357_L143 | Saccharum hybrid cultivar R570 clone BAC 022K23 complete sequence |
| KX608911.1 | CG CHG | Postmeiosis | E54204_L143 | Saccharum hybrid cultivar R570 Scramblase family protein (Sh239D06_g0020) gene, complete cds; retrotransposons LTR Gypsy |
| KY018916.1 | CG CHG | Postmeiosis | E48744_L143 | Zea mays isolate SM10 mitochondrion sequence |
| NM_001368031.1 | CG CHG | Postmeiosis | E91967_L143 | Zea mays uncharacterized LOC100281570 (LOC100281570), mRNA |
| AC243254.2 | CG CHG | Postmeiosis | E17600_L143 | Panicum virgatum clone PV_ABa094-K10, complete sequence |
| XM_004985355.4 | CG CHG | Postmeiosis | E32390_L143 | PREDICTED: Setaria italica protein DETOXIFICATION 27 (LOC101786721), mRNA |
| XM_025941220.1 | CG CHG | Postmeiosis | E14545_L143 | PREDICTED: Panicum hallii terpene synthase 2, chloroplastic-like (LOC112877011), transcript variant X2, mRNA |
| KT203455.1 | CG CHG | Postmeiosis | E157412_L143 | Paspalum vaginatum clone SpCT3 hypothetical protein mRNA, complete cds |
| MG429050.1 | CG CHG | Postmeiosis | E133253_L143 | Oryza coarctata mitochondrion, complete genome |
| KU685412.1 | CG CHG | Postmeiosis | E87801_L143 | Saccharum spontaneum clone SES23E05, complete sequence |
| AC208340.4 | CG CHG | Postmeiosis | E20968_L143 | Zea mays BAC clone CH201-53J11 from chromosome 5, complete sequence |
| CP018161.1 | CG CHG | Postmeiosis | E16932_L143 | Oryza sativa Indica Group cultivar Shuhui498 chromosome 5 sequence |
| XM_025938902.1 | CG CHG | Postmeiosis | E147267_L143 | PREDICTED: Panicum hallii ACT domain-containing protein ACR3 (LOC112875139), transcript variant X5, mRNA |
| XM_021458571.1 | CG CHG | Postmeiosis | E47510_L143 | PREDICTED: Sorghum bicolor translation factor GUF1 homolog, chloroplastic (LOC8074653), mRNA |
| XM_025961543.1 | CG CHG | Postmeiosis | E95427_L143 | PREDICTED: Panicum hallii putative transcription factor bHLH041 (LOC112893992), mRNA |
| XM_025939568.1 | CG CHG | Postmeiosis | E124917_L143 | PREDICTED: Panicum hallii homeobox-leucine zipper protein HOX1-like (LOC112875642), mRNA |
| NC_036827.2 | CG CHG | Postmeiosis | E140045_L143 | Zoysia japonica plastid, complete genome |
| AP014968.1 | CG CHG | Postmeiosis | E191825_L143 | Oryza sativa Japonica Group DNA, chromosome 12, cultivar: Nipponbare, complete sequence |
| KT989678.1 | CG CHH | Postmeiosis | E136247_L143 | Zea mays centromere 10 B73 genomic sequence |
| EU365401.1 | CG CHH | Postmeiosis | E473465_L143 | Bambusa oldhamii mitochondrion, complete genome |
| XM_004975602.2 | CG CHH | Postmeiosis | E513605_L143 | PREDICTED: Setaria italica amino-acid permease BAT1 homolog (LOC101770769), mRNA |
| KM110922.1 | CG CHH | Postmeiosis | E285769_L143 | Axonopus compressus clone Ac088 microsatellite sequence |
| CP018164.1 | CHG CHH | Postmeiosis | E371200_L143 | Oryza sativa Indica Group cultivar Shuhui498 chromosome 8 sequence |
| LN591006.1 | CHG CHH | Postmeiosis | E186513_L143 | Cyprinus carpio genome assembly common carp genome ,scaffold 000001124 |
| XM_025962232.1 | CHG CHH | Postmeiosis | E253566_L143 | PREDICTED: Panicum hallii zinc finger CCCH domain-containing protein 19-like (LOC112894498), mRNA |
| XM_004955112.2 | CHG CHH | Postmeiosis | E475328_L143 | PREDICTED: Setaria italica WAT1-related protein At3g45870 (LOC10177089), mRNA |
| AC211313.4 | CHG CHH | Postmeiosis | E171464_L143 | Zea mays BAC clone CH201-9J2 from chromosome 5, complete sequence |

| | | | | |
|----------------|------------|-------------|--------------|--|
| XM_025963148.1 | CHG CHH | Postmeiosis | E119086_L143 | PREDICTED: Panicum hallii forkhead box protein B2-like (LOC112895216), mRNA |
| XM_002457896.2 | CHG CHH | Postmeiosis | E283950_L143 | PREDICTED: Sorghum bicolor probable RNA-dependent RNA polymerase SHL2 (LOC8075421), mRNA |
| XM_002440402.2 | CHG CHH | Postmeiosis | E304335_L143 | PREDICTED: Sorghum bicolor pumilio homolog 1 (LOC8067314), mRNA |
| XM_004952938.3 | CHG CHH | Postmeiosis | E303780_L143 | PREDICTED: Setaria italica intracellular protein transport protein USO1 (LOC101782050), mRNA |
| XM_002457591.2 | CHG CHH | Postmeiosis | E447037_L143 | PREDICTED: Sorghum bicolor NEDD8-activating enzyme E1 catalytic subunit (LOC8074525), mRNA |
| XM_020539490.2 | CHG CHH | Postmeiosis | E310617_L143 | PREDICTED: Zea mays villin-1 (LOC103630029), transcript variant X2, mRNA |
| XM_025958256.1 | CHG CHH | Postmeiosis | E198499_L143 | PREDICTED: Panicum hallii ABC transporter B family member 4-like (LOC112891409), mRNA |
| XM_025940215.1 | CHG CHH | Postmeiosis | E268385_L143 | PREDICTED: Panicum hallii inositol-3-phosphate synthase (LOC112876166), mRNA |
| CP018167.1 | CG CHG CHH | Postmeiosis | E148803_L143 | Oryza sativa Indica Group cultivar Shuhui498 chromosome 11 sequence |
| JN120789.1 | CG CHG CHH | Postmeiosis | E599454_L143 | Ferrocalamus rimosivaginus mitochondrion, partial genome |
| CP018162.1 | CG CHG CHH | Postmeiosis | E338204_L143 | Oryza sativa Indica Group cultivar Shuhui498 chromosome 6 sequence |
| MH883760.1 | CG CHG CHH | Postmeiosis | E15625_L143 | Human gammaherpesvirus 4 isolate ebv14, partial genome |
| CP018159.1 | CG CHG CHH | Postmeiosis | E284664_L143 | Oryza sativa Indica Group cultivar Shuhui498 chromosome 3 sequence |
| NC_039464.1 | CG CHG CHH | Postmeiosis | E398568_L143 | Paspalum ionanthum chloroplast, complete genome |
| LC107874.1 | CG CHG CHH | Postmeiosis | E357384_L143 | Saccharum officinarum mitochondrial chromosome 1 DNA, complete genome, cultivar: Khon Kaen 3 |
| CP018168.1 | CG CHG CHH | Postmeiosis | E201547_L143 | Oryza sativa Indica Group cultivar Shuhui498 chromosome 12 sequence |

Tabla 6. Anotaciones funcionales para secuencias de interés específicas para el estadio de premeiosis.

| Accesión de NCBI | Contexto | Estadio | Contig | Descripción |
|------------------|----------|------------|--------------|--|
| XM_002467994.2 | CG | Premeiosis | E215471_L143 | PREDICTED: Sorghum bicolor protein trichome birefringence-like 3 (LOC8081433), mRNA |
| XM_004968841.4 | CG | Premeiosis | E164141_L143 | PREDICTED: Setaria italica myb-related protein Hv33 (LOC101761118), transcript variant X2, mRNA |
| XM_004978419.3 | CG | Premeiosis | E241346_L143 | PREDICTED: Setaria italica transcription factor MYB30 (LOC101769036), mRNA |
| XM_022827763.1 | CG | Premeiosis | E131104_L143 | PREDICTED: Setaria italica NAC domain-containing protein 100 (LOC101777361), mRNA |
| XM_025958384.1 | CG | Premeiosis | E211417_L143 | PREDICTED: Panicum hallii transcription factor PCF5-like (LOC112891502), transcript variant X2, mRNA |
| XM_002439160.2 | CHG | Premeiosis | E132760_L143 | PREDICTED: Sorghum bicolor E3 SUMO-protein ligase SIZ1 (LOC8071254), transcript variant X4, mRNA |
| XM_012842881.3 | CHG | Premeiosis | E130856_L143 | PREDICTED: Setaria italica zinc finger BED domain-containing protein RICESLEEPER 2 (LOC105913619), transcript variant X3, mRNA |
| XM_012842908.3 | CHG | Premeiosis | E303628_L143 | PREDICTED: Setaria italica LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase FEI 1 (LOC101771743), transcript variant X3, mRNA |
| XM_025937739.1 | CHG | Premeiosis | E51003_L143 | PREDICTED: Panicum hallii DNA-directed RNA polymerase I subunit 2 (LOC112874426), transcript variant X1, mRNA |
| XM_025940134.1 | CHG | Premeiosis | E147682_L143 | PREDICTED: Panicum hallii E3 ubiquitin-protein ligase BIG BROTHER (LOC112876094), transcript variant X2, mRNA |
| XM_025960568.1 | CHG | Premeiosis | E89056_L143 | PREDICTED: Panicum hallii protein decapping 5-like (LOC112893316), transcript variant X2, mRNA |

| | | | | |
|----------------|-----|------------|--------------|---|
| XR_002453431.1 | CHG | Premeiosis | E120610_L143 | PREDICTED: Sorghum bicolor exocyst complex component SEC3A (LOC8071811), transcript variant X4, misc_RNA |
| AJ313531.1 | CHH | Premeiosis | E519873_L143 | Zea mays mRNA for replication licensing factor MCM7 homologue (MCM7 gene) |
| FJ572063.1 | CHH | Premeiosis | E675964_L143 | Paspalum notatum microsatellite PN03_F2 sequence |
| HM004531.1 | CHH | Premeiosis | E643902_L143 | Zea mays auxin response factor 16 (ARF16) gene, complete cds |
| HM744752.1 | CHH | Premeiosis | E496561_L143 | Paspalum notatum clone G44 methylation-sensitive amplification polymorphism marker genomic sequence |
| JX540917.1 | CHH | Premeiosis | E388361_L143 | Paspalum vaginatum clone StvSingle_HKZDOCN01A26OY microsatellite sequence |
| KF852800.1 | CHH | Premeiosis | E612414_L143 | Paspalum regnellii voucher Honfi 130 external transcribed spacer, partial sequence |
| KF852815.1 | CHH | Premeiosis | E544631_L143 | Paspalum rufum voucher Quarin 3756 external transcribed spacer, partial sequence |
| KR611550.1 | CHH | Premeiosis | E527631_L143 | Paspalum plicatum clone Pp-UNICAMP16 microsatellite sequence |
| KT203473.1 | CHH | Premeiosis | E507591_L143 | Paspalum vaginatum clone Sp16 hypothetical protein mRNA, partial cds |
| KX268100.1 | CHH | Premeiosis | E536214_L143 | Paspalum vaginatum splicing factor U2AF (U2AF) mRNA, complete cds |
| KX900513.1 | CHH | Premeiosis | E355576_L143 | Paspalum notatum N13 lncRNA, partial sequence |
| NM_001361333.1 | CHH | Premeiosis | E370800_L143 | Zea mays Pre-rRNA-processing protein esf1 (LOC100278378), mRNA |
| XM_002437616.2 | CHH | Premeiosis | E556499_L143 | PREDICTED: Sorghum bicolor protein MEI2-like 2 (LOC8065359), mRNA |
| XM_002442114.2 | CHH | Premeiosis | E515054_L143 | PREDICTED: Sorghum bicolor cell division cycle 5-like protein (LOC8063283), mRNA |
| XM_002445764.2 | CHH | Premeiosis | E740018_L143 | PREDICTED: Sorghum bicolor protein NUCLEAR FUSION DEFECTIVE 4 (LOC8060606), mRNA |
| XM_004955764.2 | CHH | Premeiosis | E400263_L143 | PREDICTED: Setaria italica histone-lysine N-methyltransferase, H3 lysine-9 specific SUVH1 (LOC101769814), mRNA |
| XM_004958137.3 | CHH | Premeiosis | E414819_L143 | PREDICTED: Setaria italica zinc finger SWIM domain-containing protein 7 (LOC101753746), mRNA |
| XM_004958487.3 | CHH | Premeiosis | E366403_L143 | PREDICTED: Setaria italica methyltransferase-like protein 13 (LOC101757639), transcript variant X1, mRNA |
| XM_004964776.3 | CHH | Premeiosis | E484147_L143 | PREDICTED: Setaria italica trafficking protein particle complex subunit 4 (LOC101780800), mRNA |
| XM_004970707.4 | CHH | Premeiosis | E577819_L143 | PREDICTED: Setaria italica mitotic spindle checkpoint protein MAD1 (LOC101781507), mRNA |
| XM_004982602.4 | CHH | Premeiosis | E565078_L143 | PREDICTED: Setaria italica chaperone protein dnaJ 13 (LOC101784432), mRNA |
| XM_008657475.3 | CHH | Premeiosis | E555772_L143 | PREDICTED: Zea mays protein ALWAYS EARLY 2 (LOC103634898), transcript variant X2, mRNA |
| XM_008676474.3 | CHH | Premeiosis | E616313_L143 | PREDICTED: Zea mays AP2-like ethylene-responsive transcription factor BBM2 (LOC103650883), mRNA |
| XM_008678926.3 | CHH | Premeiosis | E625176_L143 | PREDICTED: Zea mays putative jumonji-like transcription factor family protein (LOC100280238), transcript variant X3, mRNA |
| XM_010230806.3 | CHH | Premeiosis | E656543_L143 | PREDICTED: Brachypodium distachyon AP2-like ethylene-responsive transcription factor AIL1 (LOC100840768), mRNA |
| XM_012844002.3 | CHH | Premeiosis | E570395_L143 | PREDICTED: Setaria italica protein HUA2-LIKE 2 (LOC101753599), transcript variant X4, mRNA |
| XM_012845648.2 | CHH | Premeiosis | E432223_L143 | PREDICTED: Setaria italica ARF guanine-nucleotide exchange factor GNOM-like (LOC101778261), mRNA |
| XM_012848685.2 | CHH | Premeiosis | E623552_L143 | PREDICTED: Setaria italica ribosomal RNA small subunit methyltransferase I (LOC101781068), transcript variant X2, mRNA |
| XM_020545715.2 | CHH | Premeiosis | E565414_L143 | PREDICTED: Zea mays Increased DNA methylation 1 (LOC103642225), transcript variant X3, mRNA |
| XM_021448547.1 | CHH | Premeiosis | E466743_L143 | PREDICTED: Sorghum bicolor chromatin structure-remodeling complex protein SYD (LOC8061515), transcript variant X6, mRNA |
| XM_021457529.1 | CHH | Premeiosis | E716014_L143 | PREDICTED: Sorghum bicolor cell division cycle protein 27 homolog B (LOC8078673), transcript variant X6, mRNA |
| XM_022825570.1 | CHH | Premeiosis | E553794_L143 | PREDICTED: Setaria italica probable DNA helicase MCM8 (LOC101769172), transcript variant X3, mRNA |
| XM_024461783.1 | CHH | Premeiosis | E184857_L143 | PREDICTED: Brachypodium distachyon DNA-directed RNA polymerase III subunit 2 (LOC100839519), transcript variant X2, mRNA |

| | | | | |
|----------------|-----|------------|--------------|--|
| XM_025936612.1 | CHH | Premeiosis | E467711_L143 | PREDICTED: Panicum hallii methyl-CpG-binding domain-containing protein 9 (LOC112873586), transcript variant X3, mRNA |
| XM_025940777.1 | CHH | Premeiosis | E544409_L143 | PREDICTED: Panicum hallii probable WRKY transcription factor 19 (LOC112876624), transcript variant X2, mRNA |
| XM_025947074.1 | CHH | Premeiosis | E517153_L143 | PREDICTED: Panicum hallii auxin transport protein BIG (LOC112882089), transcript variant X2, mRNA |
| XM_025949352.1 | CHH | Premeiosis | E525630_L143 | PREDICTED: Panicum hallii LRR receptor kinase SERK2 (LOC112884039), mRNA |
| XM_025953177.1 | CHH | Premeiosis | E447565_L143 | PREDICTED: Panicum hallii auxin response factor 7-like (LOC112887077), transcript variant X3, mRNA |
| XM_025957825.1 | CHH | Premeiosis | E501211_L143 | PREDICTED: Panicum hallii sister chromatid cohesion protein PDS5 homolog B (LOC112890939), transcript variant X2, mRNA |
| XM_025961300.1 | CHH | Premeiosis | E484925_L143 | PREDICTED: Panicum hallii kinesin-like protein KIN-13A (LOC112893801), mRNA |
| XM_025963785.1 | CHH | Premeiosis | E368744_L143 | PREDICTED: Panicum hallii protein CROWDED NUCLEI 4-like (LOC112895795), transcript variant X2, mRNA |
| XM_025963795.1 | CHH | Premeiosis | E622135_L143 | PREDICTED: Panicum hallii late embryogenesis abundant protein 14-like (LOC112895804), mRNA |
| XM_025966966.1 | CHH | Premeiosis | E544729_L143 | PREDICTED: Panicum hallii protein ROOT INITIATION DEFECTIVE 3-like (LOC112898612), transcript variant X2, mRNA |
| XM_025968696.1 | CHH | Premeiosis | E656474_L143 | PREDICTED: Panicum hallii cell division cycle 20.2, cofactor of APC complex-like (LOC112900001), mRNA |
| XM_025971681.1 | CHH | Premeiosis | E185371_L143 | PREDICTED: Panicum hallii armadillo repeat-containing protein 8 (LOC112902562), mRNA |
| XR_002678132.1 | CHH | Premeiosis | E749745_L143 | PREDICTED: Setaria italica BRCA1-associated protein (LOC101777195), transcript variant X2, misc_RNA |

Tabla 7. Anotaciones funcionales para secuencias de interés específicas para el estadio de postmeiosis.

| Accesión de NCBI | Contexto | Estadio | Contig | Descripción |
|------------------|----------|-------------|--------------|---|
| KU640199.1 | CG | Postmeiosis | E78308_L143 | Miscanthus lutarioriparius SERK2 mRNA, complete cds |
| GQ870170.1 | CG | Postmeiosis | E250185_L143 | Paspalum notatum internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence |
| AY941122.1 | CG | Postmeiosis | E44635_L143 | Paspalum rufum psbA-trnH intergenic spacer, partial sequence; and rpl19 gene, complete cds; chloroplast |
| KF852923.1 | CG | Postmeiosis | E775279_L143 | Paspalum rufum voucher Quarin 3756 NADH dehydrogenase subunit F (ndhF) gene, partial cds; chloroplast |
| XM_025954285.1 | CG | Postmeiosis | E207393_L143 | PREDICTED: Panicum hallii auxin-responsive protein IAA18-like (LOC112887979), transcript variant X3, mRNA |
| XM_025936545.1 | CG | Postmeiosis | E263210_L143 | PREDICTED: Panicum hallii cell cycle checkpoint control protein RAD9B (LOC112873551), transcript variant X2, mRNA |
| XM_025949079.1 | CG | Postmeiosis | E154139_L143 | PREDICTED: Panicum hallii LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase ERECTA (LOC112883833), transcript variant X2, mRNA |
| XM_025937734.1 | CG | Postmeiosis | E137457_L143 | PREDICTED: Panicum hallii methyl-CpG-binding domain-containing protein 11-like (LOC112874421), transcript variant X2, mRNA |
| XM_025972260.1 | CG | Postmeiosis | E324539_L143 | PREDICTED: Panicum hallii probable methyltransferase PMT2 (LOC112903053), mRNA |
| XM_025948973.1 | CG | Postmeiosis | E51941_L143 | PREDICTED: Panicum hallii protein ACCELERATED CELL DEATH 6-like (LOC112883634), transcript variant X2, mRNA |
| XM_025957108.1 | CG | Postmeiosis | E266692_L143 | PREDICTED: Panicum hallii protein MOTHER of FT and TFL1 homolog 1 (LOC112890208), mRNA |
| XM_025947576.1 | CG | Postmeiosis | E131674_L143 | PREDICTED: Panicum hallii SPX domain-containing membrane protein OsI_32082-like (LOC112882500), mRNA |
| XM_025939940.1 | CG | Postmeiosis | E96704_L143 | PREDICTED: Panicum hallii transcription factor JUNGBRUNNEN 1-like (LOC112875930), mRNA |
| XM_004977878.1 | CG | Postmeiosis | E36933_L143 | PREDICTED: Setaria italica protein FLOWERING LOCUS T (LOC101763334), mRNA |

| | | | | |
|----------------|-----|-------------|--------------|---|
| XM_004957424.3 | CG | Postmeiosis | E474031_L143 | PREDICTED: <i>Setaria italica</i> protein NUCLEAR FUSION DEFECTIVE 4 (LOC101778324), mRNA |
| XM_002462730.2 | CG | Postmeiosis | E49300_L143 | PREDICTED: <i>Sorghum bicolor</i> auxin-responsive protein SAUR36 (LOC8063341), mRNA |
| XM_021459114.1 | CG | Postmeiosis | E248918_L143 | PREDICTED: <i>Sorghum bicolor</i> homeobox-leucine zipper protein HOX16-like (LOC110434634), transcript variant X2, mRNA |
| XM_021447620.1 | CG | Postmeiosis | E72678_L143 | PREDICTED: <i>Sorghum bicolor</i> squamosa promoter-binding-like protein 9 (LOC8085123), transcript variant X2, mRNA |
| XM_008653860.3 | CG | Postmeiosis | E143665_L143 | PREDICTED: <i>Zea mays</i> protein tesmin/TSO1-like CXC 3 (LOC103632001), mRNA |
| LM609001.1 | CG | Postmeiosis | E178079_L143 | TPA: <i>Sorghum bicolor</i> microRNA sbi-MIR166f precursor |
| AY260164.1 | CG | Postmeiosis | E177326_L143 | <i>Zea mays</i> KNOTTED1 (kn1) gene, complete cds |
| J01238.1 | CHG | Postmeiosis | E131645_L143 | Maize actin 1 gene (MAc1), complete cds |
| MH150946.1 | CHG | Postmeiosis | E92517_L143 | <i>Paspalum notatum</i> dehydration-responsive element-binding protein 2A (DREB2A) mRNA, complete cds |
| KC792581.1 | CHG | Postmeiosis | E327861_L143 | <i>Paspalum notatum</i> somatic embryogenesis receptor kinase 1 (SERK1) gene, partial cds |
| LN832403.1 | CHG | Postmeiosis | E48636_L143 | <i>Paspalum simplex</i> mRNA for ORC3b protein |
| XM_010230806.3 | CHG | Postmeiosis | E68463_L143 | PREDICTED: <i>Brachypodium distachyon</i> AP2-like ethylene-responsive transcription factor AIL1 (LOC100840768), mRNA |
| XM_025941049.1 | CHG | Postmeiosis | E155294_L143 | PREDICTED: <i>Panicum hallii</i> AP2-like ethylene-responsive transcription factor AIL5 (LOC112876868), mRNA |
| XM_025969945.1 | CHG | Postmeiosis | E93682_L143 | PREDICTED: <i>Panicum hallii</i> BRCA1-associated RING domain protein 1-like (LOC112901111), transcript variant X2, mRNA |
| XM_025955668.1 | CHG | Postmeiosis | E55284_L143 | PREDICTED: <i>Panicum hallii</i> F-box/WD-40 repeat-containing protein At5g21040-like (LOC112889179), transcript variant X5, mRNA |
| XM_025949492.1 | CHG | Postmeiosis | E119008_L143 | PREDICTED: <i>Panicum hallii</i> GATA transcription factor 12-like (LOC112884142), mRNA |
| XM_025948310.1 | CHG | Postmeiosis | E150041_L143 | PREDICTED: <i>Panicum hallii</i> histone-lysine N-methyltransferase SUV5 (LOC112883071), transcript variant X3, mRNA |
| XM_025939937.1 | CHG | Postmeiosis | E98809_L143 | PREDICTED: <i>Panicum hallii</i> homocysteine S-methyltransferase 1 (LOC112875927), transcript variant X2, mRNA |
| XR_003229933.1 | CHG | Postmeiosis | E155082_L143 | PREDICTED: <i>Panicum hallii</i> increased DNA methylation 1-like (LOC112898836), transcript variant X3, misc_RNA |
| XM_025953279.1 | CHG | Postmeiosis | E114883_L143 | PREDICTED: <i>Panicum hallii</i> pre-rRNA-processing protein TSR1 homolog (LOC112887171), mRNA |
| XM_025951557.1 | CHG | Postmeiosis | E154991_L143 | PREDICTED: <i>Panicum hallii</i> protein BONZAI 3 (LOC112885872), transcript variant X2, mRNA |
| XM_025939401.1 | CHG | Postmeiosis | E12050_L143 | PREDICTED: <i>Panicum hallii</i> protein CHROMATIN REMODELING 20 (LOC112875522), transcript variant X4, mRNA |
| XM_025960965.1 | CHG | Postmeiosis | E154147_L143 | PREDICTED: <i>Panicum hallii</i> protein SUPPRESSOR OF K(+) TRANSPORT GROWTH DEFECT 1 (LOC112893564), mRNA |
| XM_025937527.1 | CHG | Postmeiosis | E137805_L143 | PREDICTED: <i>Panicum hallii</i> squamosa promoter-binding-like protein 6 (LOC112874289), mRNA |
| XM_025960755.1 | CHG | Postmeiosis | E101635_L143 | PREDICTED: <i>Panicum hallii</i> zinc finger BED domain-containing protein RICESLEEPER 2-like (LOC112893429), transcript variant X4, mRNA |
| XM_022823176.1 | CHG | Postmeiosis | E59290_L143 | PREDICTED: <i>Setaria italica</i> ABSCISIC ACID-INSENSITIVE 5-like protein 2 (LOC101766653), transcript variant X2, mRNA |
| XM_004953281.3 | CHG | Postmeiosis | E87820_L143 | PREDICTED: <i>Setaria italica</i> anaphase-promoting complex subunit 8 (LOC101783408), mRNA |
| XM_004968840.4 | CHG | Postmeiosis | E124034_L143 | PREDICTED: <i>Setaria italica</i> DNA replication licensing factor MCM4 (LOC101760715), mRNA |
| XM_022828283.1 | CHG | Postmeiosis | E85837_L143 | PREDICTED: <i>Setaria italica</i> DNA-directed RNA polymerases IV and V subunit 2 (LOC101755487), transcript variant X2, mRNA |
| XM_004960295.2 | CHG | Postmeiosis | E639_L143 | PREDICTED: <i>Setaria italica</i> E3 SUMO-protein ligase SIZ1 (LOC101773204), transcript variant X5, mRNA |
| XM_012844708.3 | CHG | Postmeiosis | E73464_L143 | PREDICTED: <i>Setaria italica</i> histone-lysine N-methyltransferase, H3 lysine-9 specific SUVH4 (LOC101762014), mRNA |

| | | | | |
|----------------|-----|-------------|--------------|--|
| XM_004967710.4 | CHG | Postmeiosis | E19311_L143 | PREDICTED: Setaria italica pre-mRNA-splicing factor SPF27 homolog (LOC101774483), partial mRNA |
| XM_004956283.2 | CHG | Postmeiosis | E44280_L143 | PREDICTED: Setaria italica protein argonaute 16 (LOC101786512), transcript variant X2, mRNA |
| XM_022823211.1 | CHG | Postmeiosis | E17822_L143 | PREDICTED: Setaria italica protein OPAQUE1 (LOC101756880), transcript variant X5, mRNA |
| XM_002448669.2 | CHG | Postmeiosis | E139232_L143 | PREDICTED: Sorghum bicolor cell division protein FtsZ homolog 1, chloroplastic (LOC8082560), mRNA |
| XM_021452407.1 | CHG | Postmeiosis | E41355_L143 | PREDICTED: Sorghum bicolor chromatin assembly factor 1 subunit FSM (LOC8057271), mRNA |
| XM_002462120.2 | CHG | Postmeiosis | E138790_L143 | PREDICTED: Sorghum bicolor histone-lysine N-methyltransferase ASHH3 (LOC8064682), mRNA |
| XM_002451131.2 | CHG | Postmeiosis | E238670_L143 | PREDICTED: Sorghum bicolor OBERON-like protein (LOC8079153), transcript variant X3, mRNA |
| XM_002437533.2 | CHG | Postmeiosis | E16893_L143 | PREDICTED: Sorghum bicolor pre-mRNA-splicing factor syf2 (LOC8065609), mRNA |
| XM_002459415.2 | CHG | Postmeiosis | E57443_L143 | PREDICTED: Sorghum bicolor probable histone H2A.5 (LOC8075027), mRNA |
| XM_021447082.1 | CHG | Postmeiosis | E108545_L143 | PREDICTED: Sorghum bicolor protein ABERRANT POLLEN TRANSMISSION 1 (LOC8082285), transcript variant X1, mRNA |
| XM_021461380.1 | CHG | Postmeiosis | E54476_L143 | PREDICTED: Sorghum bicolor protein ANTI-SILENCING 1 (LOC8067616), transcript variant X2, mRNA |
| XM_021452316.1 | CHG | Postmeiosis | E164753_L143 | PREDICTED: Sorghum bicolor protein FEZ (LOC8070620), mRNA |
| XM_021449230.1 | CHG | Postmeiosis | E215936_L143 | PREDICTED: Sorghum bicolor protein FREE1 (LOC8069206), transcript variant X2, mRNA |
| XM_002437902.2 | CHG | Postmeiosis | E117026_L143 | PREDICTED: Sorghum bicolor protein NUCLEAR FUSION DEFECTIVE 4 (LOC8076194), mRNA |
| XM_021457128.1 | CHG | Postmeiosis | E52950_L143 | PREDICTED: Sorghum bicolor protein PIN-LIKES 6 (LOC8055297), transcript variant X3, mRNA |
| XM_021456725.1 | CHG | Postmeiosis | E72391_L143 | PREDICTED: Sorghum bicolor protein ROOT HAIR DEFECTIVE 3 (LOC8078209), transcript variant X2, mRNA |
| XM_002456495.2 | CHG | Postmeiosis | E60620_L143 | PREDICTED: Sorghum bicolor WUSCHEL-related homeobox 8 (LOC8055301), mRNA |
| XM_008660946.2 | CHG | Postmeiosis | E80600_L143 | PREDICTED: Zea mays auxin response factor 16 (LOC103637942), transcript variant X2, mRNA |
| XR_002263496.2 | CHG | Postmeiosis | E115088_L143 | PREDICTED: Zea mays SUPPRESSOR OF ABI3-5 (LOC103632288), transcript variant X8, misc_RNA |
| NM_001157432.1 | CHG | Postmeiosis | E105751_L143 | Zea mays anther-specific proline-rich protein APG (LOC100284537), mRNA<->Zea mays clone 324001 anther-specific proline-rich protein APG mRNA, complete cds |
| XM_025939716.1 | CHH | Postmeiosis | E383415_L143 | PREDICTED: Panicum hallii PHD finger protein MALE MEIOCYTE DEATH 1-like (LOC112875748), transcript variant X4, mRNA |
| XM_022827887.1 | CHH | Postmeiosis | E329404_L143 | PREDICTED: Setaria italica WUSCHEL-related homeobox 10 (LOC101765074), mRNA |
| XM_002466229.2 | CHH | Postmeiosis | E253651_L143 | PREDICTED: Sorghum bicolor protein argonaute MEL1 (LOC8081234), mRNA |
| XM_008653413.3 | CHH | Postmeiosis | E431472_L143 | PREDICTED: Zea mays Protein GAMETE EXPRESSED 1 (LOC100382002), transcript variant X2, mRNA |