



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

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE GENES LOCALIZADOS EN EL *LOCUS*
RESPONSABLE DE LA APOMIXIS (ACL) EN *Paspalum notatum***

Ing. Agr. CELESTE ANTONELA AZZARO

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR EN CIENCIAS AGRARIAS

**DIRECTOR: Dr. JUAN PABLO A. ORTIZ
CO-DIRECTORA: Dra. LORENA A. SIENA**

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE GENES LOCALIZADOS EN EL *LOCUS*
RESPONSABLE DE LA APOMIXIS (ACL) EN *Paspalum notatum***

Celeste Antonela Azzaro
Ingeniera Agrónoma - UNR

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido previamente presentada para la obtención de otro título en ésta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario (UNR), durante el período comprendido entre el 1 de abril de 2015 y 30 de enero de 2020, bajo la dirección del Dr. Juan Pablo A. Ortiz y la co-dirección de la Dra. Lorena A. Siena.

Ing. Agr. Celeste A. Azzaro
Doctorando

Dr. Juan Pablo A. Ortiz
Director

Dra. Lorena A. Siena
Co- Directora

Defendida: de 2021

AGRADECIMIENTOS

Principalmente quiero agradecerle a mi Directo de tesis el Dr. Juan Pablo A. Ortiz por confiar en mi y darme la oportunidad para llevar acabo este trabajo, por su apoyo constante, su predisposición y paciencia tanto para la enseñanza como para la discusión de resultados, y sobre todo por su actitud positiva. También quiero agradecerle a mi Co-directora la Dra. Lorena Siena por el tiempo dedicado y el apoyo incondicional tanto en la parte experimental como en la discusión de cada resultado obtenido.

Agradezco al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por haberme otorgado la beca de posgrado por medio de la cual fue posible realizar mis estudios de doctorado. 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 todo el equipo del Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE), CONICET-UNNE, Corrientes por el aporte del material vegetal para la realización de este trabajo de Tesis y por la buena onda en cada encuentro.

Me gustaría agradecer a todo el grupo de trabajo del departamento de biociencias de la Universidad de Milán (UniMil), por brindarme un espacio en su laboratorio, por su colaboración y por el tiempo dedicado a discutir los experimentos.

A la Dra. Silvina Pessino por el acompañamiento y el apoyo de siempre tanto a nivel profesional como personal. A la Dra. Juliana Stein por el tiempo dedicado y su predisposición para enseñarme nuevas técnicas moleculares, y sobre todo por la buena energía de siempre. También quiero agradecerle a la Dra. Maricel Podio por el gran aporte en la parte bioinformática y por sus consejos. Al Dr. Olivier Leblanc por su predisposicion para intercambiar ideas y por su gran sentido del humor. A la Dra. Luciana Delgado por su apoyo incondicional.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Biología Molecular que me acompañaron incondicionalmente durante esta etapa: Alvaro, Mariano, Carolina, Albertina, Luisina, Valeria Palmieri, Valeria Perotti, Andrea, Lorena, Lucas y Daniel por su apoyo y amistad.

A mi familia, especialmente a mis padres Zulema y Carlos por enseñarme el valor del esfuerzo y la perseverancia, y sobre todo por su amor incondicional.

Finalmente quiero agradecerle a Juan Manuel, mi compañero de vida, por su contención, su comprensión y su paciencia durante el desarrollo de esta tesis.

A todos ustedes, sinceramente MUCHAS GRACIAS.

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

Artículos publicados en revistas:

- Azzaro C, Siena LA, Podio M, Stein J, Leblanc O, Pessino SC and Juan Pablo A. Ortiz. *PnIAA30* ortholog to the *OsIAA30* of rice is downregulated during *Paspalum notatum* apomictic development (manuscrito en preparación).
- Ortiz JPA, Leblanc O, Rohr C, Grisolia M, Siena LA, Podio M, Colono CM, Azzaro CA, Pessino SC (2019). Small RNA-seq reveals novel regulatory components for apomixis in *Paspalum notatum*. *BMC Genomics* 20 (1): 487.
- Mancini M, Permingeat H, Colono CM, Siena LA, Pupulli F, Azzaro CA, De Alencar Dusi DM, Campos Carneiro VT, Podio M, Seijo JG, González AM, Felitti SA, Ortiz JPA, Leblanc O, Pessino SC (2018). The MAP3K-Coding QUI-GON JINN (QGJ) gene is essential to the formation of unreduced embryo sacs in *Paspalum*. *Frontiers in Plant Science*, 9: 1547.

Presentaciones a Congresos y Reuniones Científicas:

- Azzaro CA, Siena LA, Podio M, Pessino SC, Ortiz JPA (2019). Temporal and spatial expression of the auxin induced protein IAA30 and its possible association with apomixis in *Paspalum notatum*. XVII Congreso Latinoamericano de Genética. Mendoza, Argentina. E-ISSN: 1852-6322.
- Pessino SC, Colono CM, Azzaro CA, Costantini E, Colombo L, Mendes M (2019). The role of mir160 and arf10 in the auxin-mediated plant reproduction control. XVII Congreso Latinoamericano de Genética. Mendoza, Argentina. E-ISSN: 1852-6322.
- Azzaro CA, Siena LA, Stein J, Pessino SC, Ortiz JPA (2018). Expression analysis of the auxin induced protein IAA30 and its possible association with apomixis in *Paspalum notatum*. XXII International Congress of Genetics (ICG). Foz de Iguazú, Brasil. ISBN: 978-85- 89109-06-2.
- Azzaro CA, Siena LA, Stein J, Pessino SC, Ortiz JPA (2017). Análisis de secuencias ortólogas al LOC_Os12g40770 (proteína con repeticiones anquirina) expresadas en el transcriptoma floral de genotipos apomícticos y sexuales de *Paspalum notatum*. XI Simposio Nacional de Biotecnología (RedBio Argentina). Bahía Blanca, Argentina. **(Este trabajo fue premiado con una mención en la categoría de Biotecnología vegetal).**

- Azzaro CA, Siena LA, Stein J, Pessino SC, Ortiz JPA (2016). Identificación de secuencias ortólogas a una proteína de arroz con repeticiones de anquirina (ANK) asociada a la apomixis en especies de *Paspalum*. I Reunión Transdisciplinaria en Ciencias Agropecuarias. Casilda, Santa Fe, Argentina. ISSN/ISBN: 978-987-4055- 04-0.

INDICE

ABREVIATURAS, SÍMBOLOS Y ANGLICISMOS	i
RESUMEN	iv
ABSTRACT	viii
I- INTRODUCCIÓN	1
I.1- El género <i>Paspalum</i>	1
I.1.1- <i>Paspalum notatum</i> (pasto horqueta “ <i>Bahiagrass</i> ”).....	2
I.2- Apomixis	7
I.2.1- Definición del termino	7
I.2.2- El proceso de reproducción sexual en las angiospermas.....	8
I.2.3- Distintos tipos de apomixis	10
I.2.4- La apomixis y su importancia en la agronomía.	13
I.3- Estudios genéticos y moleculares de la apomixis gametofítica.....	16
I.3.1- Identificación de genes asociados a componentes de la apomixis.....	18
I.3.2- Estudios de herencia de la apomixis en especies de <i>Paspalum</i>	22
I.3.3- Identificación del <i>locus</i> responsable de la apomixis en gramíneas	24
I.3.3.1- Estudios de mapeo comparativo y características del ACL en especies de <i>Paspalum</i>	25
I.4- Familia de genes con repeticiones Anquirina (<i>ANK</i>).....	29
I.5- Familia de genes de respuesta temprana a auxina (<i>Aux/IAA</i>)	34
I.6- Superfamilia de genes <i>AP2/ERF</i>	40
I.7- Análisis transcriptómicos y desarrollo de recursos ómicos en <i>Paspalum notatum</i>	44
I.7.1- Transcriptomas del desarrollo reproductivo apomítico y sexual	44
I.7.2- Avances sobre el borrador del genoma diploide	47
II- OBJETIVOS E HIPÓTESIS	49
II.1- Objetivo General	49
II.2- Objetivos Específicos	49

II.3- Hipótesis	50
III- MATERIALES Y MÉTODOS	51
III.1-Material vegetal.....	51
III.2- Aislamiento de ADN genómico.....	53
III.3- Clasificación de híbridos F ₁ por el modo reproductivo	54
III.3.1- Análisis de marcadores moleculares ligados a la apomixis.....	54
III.3.2- Observaciones citoembriológicas	56
III.4- Selección y obtención de secuencias de genes de arroz asociadas al ACL.....	57
III.5- Identificación de transcritos de <i>P. notatum</i> similares a los genes de arroz	57
III.6- Identificación de transcritos pertenecientes a las familias ANK-TPR, Aux/IAA y AP2/ERF de <i>P. notatum</i>	59
III.7- Aislamiento y análisis de cosegregación de fragmentos génicos de <i>P. notatum</i>	60
III.8- Mapeo físico de secuencias de <i>P. notatum</i>	62
III.9- Clonado y secuenciación de fragmentos génicos ligados al ACL <i>P. notatum</i>	63
III.10- Extracción de ARNm y síntesis de ADNc	63
III.11- Análisis de expresión relativa por PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR).....	65
III.12- Análisis de expresión por PCR semicuantitativa (RT-PCR).....	66
III.13- Experimentos de hibridación <i>in situ</i> de tejidos	67
IV- RESULTADOS	70
IV.1- Clasificación de híbridos F ₁ según el modo de reproducción	70
IV.1.1- Clasificación a través de marcadores moleculares	70
IV.1.2- Clasificación del modo reproductivo por citoembriología	72
IV.2- Análisis de genes con repeticiones <i>anquirina</i> (ANK) expresados durante el desarrollo reproductivo de <i>P. notatum</i>	77
IV.2.1- Obtención y análisis de transcritos similares a <i>OsANK-TPR</i> de arroz	77
IV.2.2- Identificación y estudios de filogenia de genes <i>ANK-TPR</i> expresados en <i>P. notatum</i>	81

IV.2.3- Aislamiento y análisis de cosegregación de secuencias génicas <i>ANK-TPR</i> de <i>P. notatum</i>	85
IV.2.3.1. Mapeo físico de <i>PnANK-TPR3</i> en el genoma (2x) de <i>P. notatum</i>	89
IV.2.4- Análisis de expresión de genes <i>PnANK-TPR</i> en tejido floral	91
IV.2.5- Identificación de posibles interactores de <i>OsANK-TPR</i>	97
IV.3- Análisis de genes de respuesta temprana a auxina <i>Aux/IAA</i> expresados durante el desarrollo reproductivo de <i>P. notatum</i>	99
IV.3.1- Obtención y análisis de transcriptos homólogos a <i>OsIAA30</i> de arroz	99
IV.3.2- Búsqueda de transcriptos similares al gen <i>OsIAA30</i> de arroz con expresión diferencial entre los transcriptomas sexual y apomíctico de <i>P. notatum</i>	104
IV.3.3- Identificación y estudios de filogenia de genes <i>Aux/IAA</i> expresados en <i>P. notatum</i>	105
IV.3.4- Aislamiento y análisis de cosegregación de secuencias génicas de <i>PnIAA30</i> de <i>P. notatum</i>	107
IV.3.4.1- Mapeo físico de <i>PnIAA30</i> en el genoma (2x) de <i>P. notatum</i>	115
IV.3.5- Análisis de expresión de genes <i>PnIAA30</i> en tejido floral	117
IV.3.6- Estudios de hibridación <i>in situ</i> de tejidos de <i>PnIAA30</i>	123
IV.3.7- Identificación de posibles proteínas interactoras de <i>OsIAA30</i>	128
IV.4- Análisis de genes pertenecientes a la familia <i>AP2/ERF</i> expresados durante el desarrollo reproductivo de <i>Paspalum notatum</i>	130
IV.4.1- Obtención y análisis de transcriptos homólogos a <i>OsAP2/ERF</i> de arroz	130
IV.4.2- Identificación y estudio general de genes <i>AP2/ERF</i> expresados en <i>P. notatum</i>	131
IV.4.2.1- Aislamiento y análisis de cosegregación de secuencias génicas <i>AP2</i> de <i>P. notatum</i>	134
IV.4.2.1.1- Análisis de expresión de genes <i>PnAP2-like</i> en tejido floral.....	139
IV.4.2.1.2- Identificación de posibles proteínas interactoras de <i>AtAP2-like</i>	141
IV.4.2.2- Búsqueda de transcriptos similares a genes <i>BBM</i> con expresión diferencial entre los transcriptomas sexual y apomíctico de <i>P. notatum</i>	142
IV.4.2.2.1- Aislamiento y análisis de cosegregación de secuencias génicas <i>BBM</i> de <i>P. notatum</i>	143

V- DISCUSIÓN	146
V.1- Caracterización de la población de mapeo tetraploide de <i>P. notatum</i>	146
V.2- Análisis de genes con repeticiones <i>Anquirina (ANK)</i> expresados durante el desarrollo reproductivo de <i>P. notatum</i>	147
V.3- Análisis de genes de respuesta temprana a auxina (<i>Aux/IAA</i>) expresados durante el desarrollo reproductivo de <i>P. notatum</i>	151
V.4- Análisis de genes pertenecientes a la familia <i>AP2/ERF</i> expresados durante el desarrollo reproductivo de <i>P. notatum</i>	157
VI- CONCLUSIONES	161
VII- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	164
VIII- ANEXO	189

ABREVIATURAS, SÍMBOLOS Y ANGLICISMOS

ac: aparato ooférico del saco embrionario.

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ácido desoxirribonucleico copia.

ADS: alelos en dosis simple.

AFLP: polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados.

AgNO₃: nitrato de plata.

ARN: ácido ribonucleico.

ARNasa: ribonucleasa

ARNm: ácido ribonucleico mensajero.

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

BSA: albúmina sérica bovina

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

ca: células antípodas del saco embrionario

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

CMM: célula madre de la megáspora.

CTAB: bromuro de cetiltrimetil amonio

DIC: contraste de interferencia diferencial

Dig-dUTP: desoxiuridin trifosfato-digoxigenina.

dNTPs: desoxinucléotidos trifosfato.

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

EDTA: ácido etilendiamino-tetracético

F₁: primera generación en un cruzamiento.

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

gr: gramos.

gr/l: gramos por litro.

H₂O_d: agua destilada.

HCl: ácido clorhídrico.

Kit: equipo comercial.

M: molar.

Mbp: mega pares de base (10⁶ pb).

mg: miligramo (10⁻³ g).

mg/l: miligramos por litro.

MgCl₂: cloruro de magnesio.

ml: mililitro (10⁻³ l).

mM: milimolar (10⁻³ M).

n: número cromosómico haploide de una especie.

np: núcleos polares del saco embrionario.

2n: número cromosómico diploide de una especie.

NaCl: cloruro de sodio.

NaOH: hidróxido de sodio.

ng: nanogramos (10⁻⁹ g).

nm: nanómetro (10^{-9} m).

°C: grados centígrados.

pb: pares de bases.

PCR: reacción en cadena de la ADN polimerasa.

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

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

SEA: saco embrionario apospórico.

SEM: saco embrionario meiótico.

rpm: revoluciones por minuto.

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

SDS: sulfato de dodecil sódico.

TAE: Tris-ácido acético-EDTA.

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

TBE: Tris-ácido bórico-EDTA.

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

U: unidad de actividad enzimática.

UV: ultravioleta.

V: voltios.

x: número cromosómico básico de una especie.

µg: microgramos (10^{-6} g).

µl: microlitro (10^{-6} l).

X²: prueba de bondad de ajuste Chi cuadrado

RESUMEN

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE GENES LOCALIZADOS EN EL *LOCUS* RESPONSABLE DE LA APOMIXIS (ACL) EN *Paspalum notatum*

Paspalum notatum Flüggé es una gramínea perenne rizomatosa ampliamente distribuida desde el centro-este de México e islas del Caribe hasta la Argentina. Las razas tetraploides se reproducen casi exclusivamente por apomixis de tipo apospórica. La apomixis en *P. notatum* está controlada por un *locus* simple dominante que presenta distorsión de la segregación y represión de la recombinación. El mismo se halla inserto en una región genómica de gran tamaño (apomixis controlling *locus*, ACL) que contiene secuencias codificantes, elementos repetitivos y metilación de citosinas consistentes con una región heterocromatinizada. Estudios de mapeo comparativo determinaron que un segmento de aproximadamente 5,8 cM del cromosoma 12 de arroz (comprendido entre los marcadores C1069 y C996) es sinténico al ACL en al menos cuatro especies del género *Paspalum*. Varias de las secuencias incluidas en este segmento muestran homologías con genes asociados a la señalización y el crecimiento (LOC_Os12g40770 - proteína con repeticiones de anquirina), el metabolismo de hormonas (LOC_Os12g40890 - proteína de la familia Aux/IAA de respuesta temprana a auxinas), y el desarrollo (LOC_Os12g41060 - proteína con dominio AP2). El objetivo general de este trabajo de tesis fue caracterizar las secuencias de *P. notatum* ortólogas a los genes localizados en el segmento de arroz sinténico al ACL, descritas anteriormente, dado que por su anotación funcional podrían participar en alguno de los mecanismos de la reproducción en la especie.

Una población de mapeo tipo F₁ segregante por el modo de reproducción, desarrollada a partir del cruzamiento de una planta tetraploide completamente sexual (Q4188) (progenitor femenino) y un individuo natural apomíctico obligado (Q4117) (dador de polen), fue extendida a 50 individuos totales y reclasificada. La clasificación por el modo de reproducción a través de técnicas citoembriológicas y moleculares mostró 11 individuos apomícticos y 39 sexuales (relación 3,5 sex: 1 apo). La detección de secuencias de *P. notatum* similares a los genes de interés se llevó adelante utilizando un transcriptoma del desarrollo reproductivo sexual y apomíctico de la especie. El análisis del ligamiento de las secuencias identificadas con el ACL fue realizado mediante análisis BSA y posteriormente análisis de cosegregación utilizando la población de mapeo disponible. Asimismo, se realizó un mapeo físico sobre un borrador del genoma del citotipo diploide de la especie recientemente desarrollado en nuestro laboratorio. En primer lugar, se caracterizó el gen LOC_Os12g40770 codificante para una proteína con repeticiones de anquirina de la subfamilia ANK-TPR. A partir de búsquedas BLAST fue posible identificar cuatro miembros pertenecientes a la subfamilia ANK-TPR expresados durante el

desarrollo reproductivo de *P. notatum*. Uno de estos, nombrado como PnANK-TPR3, presentó elevada homología con OsANK-TPR (codificada por LOC_Os12g40770). Los estudios de ligamiento no pudieron determinar la localización de *PnANK-TPR3* en el ACL. Sin embargo, el mapeo *in silico* de *PnANK-TPR3* sobre el borrador del genoma diploide de *P. notatum*, mostró que una secuencia altamente similar a esta última se posiciona en el *supercontig* utg001669l que contiene además una secuencia similar a la sonda heteróloga C1069, que mapea 100% ligada ACL en varias especies del género. Este resultado indica que *PnANK-TPR3* se localiza en el ACL. Estudios de expresión por PCR en tiempo real (qRT-PCR) en diferentes estadios del desarrollo reproductivo del genotipo Q4188 (sexual) y Q4117 (apomítico) mostraron que *PnANK-TPR3* se sobreexpresa significativamente en los estadios de meiosis y antesis durante el desarrollo reproductivo sexual, comparado con el apomítico. Los resultados para el estadio de meiosis fueron corroborados empleando seis individuos (tres sexuales y tres apomíticos) de la población F₁ (Q4188 x Q4117). Esto indica que *PnANK-TPR3* está regulado negativamente al momento de la meiosis en los individuos apospóricos analizados. Sumado a esto, *PnANK-TPR3* mostró muy bajos niveles de expresión en tejido somático (hoja y raíz). Por otro lado, se detectó una proteína quinesina como interactora directa de OsANK-TPR. Este tipo de proteínas juegan un papel fundamental en el control del ciclo celular. Los resultados obtenidos para *PnANK-TPR3* indican que podría formar parte de una cascada de señalización involucrada en la determinación del destino de las células de la nucela y su posible canalización hacia la gametogénesis.

Posteriormente, se caracterizó el gen relacionado al LOC_Os12g40890, codificante para una proteína miembro de la familia *Aux/IAA* de respuesta temprana a auxinas. A través de búsquedas BLAST se detectaron 22 miembros de dicha familia expresados durante el desarrollo reproductivo de *P. notatum*. Uno de estos miembros, renombrado como *PnIAA30*, mostró ser ortólogo a LOC_Os12g40890 (*OsIAA30*). Los análisis de ligamiento determinaron que una forma alélica de *PnIAA30* se encuentra genéticamente ligada al ACL a una distancia de recombinación aproximada de $r = 0,30$. Sumado a esto, el mapeo *in silico* de *PnIAA30* sobre el borrador del genoma diploide de *P. notatum*, mostró que una secuencia altamente similar a esta última se posiciona en el mismo *supercontig* (utg001669l) que las secuencias homólogas a *PnANK-TPR3* y a la sonda heteróloga C1069 100% ligada al ACL de *P. notatum*. Esos resultados marcan una evidencia consistente de que *PnIAA30* es el ortólogo de *OsIAA30*, está efectivamente localizado cerca del ACL y que su disposición génica, la de *PnANK-TPR3* y el marcador C1069 en esta región de *P. notatum*, es colineal con la región del cromosoma 12 de arroz. Por otra parte, los estudios de expresión por qRT-PCR para *PnIAA30* mostraron que los transcritos de este gen están significativamente más expresados durante el desarrollo sexual (Q4188) que el apomítico (Q4117) al momento de la antesis. Estos

resultados se repitieron en cinco individuos (tres sexuales y dos apomícticos) de la población F_1 (Q4188 x Q4117). Además, se observó que la expresión de *PnIAA30* se asocia negativamente con el grado de expresividad de la aposporía, lo cual está en línea con la teoría del surgimiento de la apomixis como una desregulación en la expresión de los genes involucrados en la vía canónica sexual. Por otro lado, mediante experimentos RT-PCR se determinó que *PnIAA30* presenta mayor expresión durante la embriogénesis en el genotipo sexual respecto del apomíctico. Este resultado sugiere que *PnIAA30* podría estar relacionado al control del desarrollo del embrión sexual. Experimentos de hibridación *in situ* de tejidos, mostraron una expresión contrastante entre el genotipo sexual y el apomíctico. *PnIAA30* parece estar activo en la CMM del genotipo apomíctico y se expresa fuertemente en la nucela de plantas sexuales. Esta expresión localizada, podría estar relacionada con una diferente regulación de los destinos celulares. En el estadio de antesis, los experimentos de hibridación *in situ* mostraron que *PnIAA30* se sobreexpresa en la nucela, núcleos polares y aparato oosférico del megagametófito del genotipo sexual comparado con el apomíctico, donde la actividad de *PnIAA30* es casi imperceptible. Estos últimos resultados señalan un posible rol de *PnIAA30* en la señalización involucrada en la partenogénesis. Sumado a eso la red de proteínas interactoras de *OsIAA30* determinó una relación directa con factores de transcripción ARFs (*Auxin Response Factors*) asociados a la megasporogénesis de arroz, al igual que *OsIAA30* ortólogo de *PnIAA30*.

Por otro lado, se identificaron mediante búsquedas BLASTP, nueve proteínas miembros de la superfamilia AP2/ERF expresadas durante el desarrollo reproductivo de *P. notatum*. Cuatro de estas con elevada homología a miembros representativos del grupo de proteínas BBM (BABY BOOM) pertenecientes al clado *euANT* y cinco homólogas a miembros del clado *euAP2* perteneciente a la familia AP2-like (APETALA2-LIKE). *PnAP2-like*, ortólogo putativo de *APL25* (*Oryza sativa*) y *SiAP2-like* (*Setaria itálica*), presenta un alelo específico del genotipo materno sexual que cosegrega ligado al modo reproductivo sexual. La identidad de los fragmentos de *PnAP2-like* amplificados sobre ADN genómico del genotipo sexual y apomíctico, arrojaron homología con una secuencia codificante *AP2-like* de *Setaria viridis*, y dos secuencias *TARGE OF EAT3* (*TOE3*) de *Setaria itálica* y *Panicum halli*. Los genes *TOE* son reguladores postranscripcionales y parecen jugar un rol importante en la identidad de los órganos florales, junto a *APETALA2* y *AGAMOUS*. *PnBBM-like*, mostró una representación posiblemente diferencial entre los transcriptomas de C4-4x (sexual) y Q4117 (apomíctico). El gen *PsASGR-BABYBOOM-like* fue asociado a la partenogénesis en *Pennisetum glaucum* (especie apospórica), por lo que podríamos pensar un posible rol de *PnBBM-like* en la partenogénesis de especies apospóricas como *Paspalum notatum*.

Los resultados obtenidos en esta Tesis permitieron detectar secuencias expresadas durante el desarrollo reproductivo de *P. notatum*, homólogas a genes correspondientes a la región del cromosoma 12 de arroz sinténica al ACL de la especie bajo estudio. Se detectaron los genes ortólogos de *P. notatum* y su localización en los genomas diploide y tetraploide. El mapeo *in silico* sobre el borrador del genoma diploide mostró una colinealidad entre las secuencias de *P. notatum* y de la región estudiada de arroz. Paralelamente, se pudo demostrar que tanto *PnANK-TPR3* como *PnIAA30* están regulados diferencialmente durante el desarrollo reproductivo sexual y apomítico. Por otro lado, se determinó que un alelo de *PnAP2-like* cosegrega con la sexualidad y que *PnBBM-like* se encuentra regulado diferencialmente según la base global del transcritto del desarrollo reproductivo de *P. notatum*. Estos resultados aportan evidencia de que los genes relacionados con la señalización y el crecimiento celular, el metabolismo de hormonas y el desarrollo, localizados en el ACL, presentan una alteración en sus patrones de expresión durante el desarrollo sexual y apomítico que probablemente derive de la estructura de dicha región genómica y se relacione con el cambio del modo reproductivo sexual al apomítico.

ABSTRACT**MOLECULAR CHARACTERIZATION OF GENES MAPPING AT THE *Paspalum notatum* APOSPORY-CONTROLLING LOCUS (ACL)**

Paspalum notatum Flüggé is a perennial rhizomatous grass distributed from Argentina to central Mexico and the Caribbean Island. The natural tetraploid cytotype reproduces by obligated aposporous apomixis. Apomixis in *P. notatum* is controlled by a single locus with distorted segregation ratio and suppression of recombination. This locus (*apomixis controlling locus*, ACL) is located in a large genomic region that includes coding sequences, repetitive elements, and cytosine methylation. Comparative mapping analysis identified a segment of approximately 5.8 cM of the rice chromosome 12 (between the C1069 and C996 markers) retained at the ACL of at least four species of the genus *Paspalum*. Several specific sequences from this rice segment show homology with genes associated with signaling and growth (LOC_Os12g40770 - protein with ankyrin repeats), hormone metabolism (LOC_Os12g40890 - Aux/IAA family), and development (LOC_Os12g41060 - protein with AP2 domain). The general objective of this work was to characterize *P. notatum* orthologous to those genes located in the rice segment syntenic to the ACL due to their functional annotation could be involved in some mechanisms controlling the reproduction mode of the species.

An F₁ mapping population segregating by the reproduction mode derived from a cross between a fully sexual tetraploid genotype (Q4188) and an obligate apomictic tetraploid pnat (Q4117) was classified according to the mode of reproduction. Thirty-nine plants were classified as sexual and 11 as apomictic (3,5:1 sexual: apomictic ratio) by molecular and cytoembryological analysis. The detection of *P. notatum* sequences similar to rice genes was carried out using transcriptomes of both sexual and apomictic reproductive developments of the species. Linkage analyses of the sequences with the ACL were performed by BSA analysis and cosegregation tests using the mapping population. Moreover, a physical mapping was carried out on a draft of the diploid genome of the species.

First, we characterized the LOC_Os12g40770, coding for a protein with ankyrin repeats belong to ANK-TPR subfamily. Using BLAST searches four members from ANK-TPR subfamily expressed during reproductive development were detected. One of them, called as PnANK-TPR3, shows high homology with OsANK-TPR (encoded by LOC_Os12g40770). Mapping assays using the F₁ population could not find a linkage of *PnANK-TPR3* to ACL. However, *in silico* mapping of *PnANK-TPR3* on the diploid genome showed a highly similar sequence positioned in the supercontig utg001669l, which also contains a sequence similar to the heterologous probe C1069, which maps 100% linked to the ACL in several species of the genus. This result indicates that *PnANK-TPR3* is localized at the ACL and is the ortholog of

OsANK-TPR. Expression analysis by qRT-PCR at different stages of the reproductive development of Q4188 (sexual) and Q4117 (apomictic) showed that *PnANK-TPR3* is significantly overexpressed at meiosis and anthesis in the sexual genotype, compared to the apomictic one. The results obtained at the meiosis stage were corroborated using six individuals (three sexual and three apomictic) from the F₁ population (Q4188 x Q4117). These results indicate that *PnANK-TPR3* is negatively regulated at meiosis of the apomictic plants. Besides, the expression levels of *PnANK-TPR3* in somatic tissues (leaf and root) were very low. Interestingly, a kinesin protein was detected to interact with whit OsANK-TPR. These proteins play an essential role in the control of the cell cycle. These results indicate that *PnANK-TPR3* could be part of a signaling cascade involved in determining the fate of the nucellar cells and their possible switch towards gametogenesis.

Subsequently, we characterized the LOC_Os12g40890 coding for a protein of the Aux/IAA family. Using BLAST searches, 22 members from the Aux/IAA family expressed during the reproductive development of *P. notatum* were detected. One of them, called as *PnIAA30*, shows orthology with *OsIAA30* (encoded by LOC_Os12g40770). Mapping assays using the F₁ population determined an allelic variant of *PnIAA30* is genetically linked to 30 cM of the ACL. Moreover, *in silico* mapping of *PnIAA30* on the diploid genome, showed a highly similar sequence to *PnIAA30* positioned in the supercontig utg001669l as well as sequences homologous to *PnANK-TPR3* and the heterologous probe C1069 100% linked to the ACL of *P. notatum*. These results support that *PnIAA30* is the ortholog of *OsIAA30* and it is located near the ACL. Also, the position of *PnIAA30*, *PnANK-TPR3*, and the marker C1069 in this region of *P. notatum* is collinear with the rice chromosome 12 region. On the other hand, expression analysis by qRT-PCR of *PnIAA30* showed significant differences at the anthesis stage between sexual and apomictic genotypes. These results were observed also in five plants (three sexual and two apomictic) of the F₁ population (Q4188 x Q4117). Moreover, we detected a negative correlation between *PnIAA30* expression levels and the degree of expressiveness of the apospory, which would support the theory that apomixis results from the deregulation of the sexual developmental program. Besides, using RT-PCR analysis we detected high expression of *PnIAA30* during embryogenesis of the sexual genotype respect apomictic one. This result suggests *PnIAA30* could be related to the control of sexual embryo development. *In situ* hybridization of *PnIAA30*, showed a contrasting expression between the apomictic and sexual plants. The sense transcripts of *PnIAA30* appears to be active in the CMM of the apomictic genotype and is strongly expressed in the nucellus of the sexual one. These results could be related to different regulation of cell fate surrounding the MMC. *In situ* hybridization with *PnIAA30* at anthesis showed overexpression in the nucella, polar nuclei, and egg apparatus in the sexual megagametophyte compared to the apomictic one, where the

activity of *PnIAA30* is almost imperceptible. These results indicate a possible role of *PnIAA30* in signaling during the parthenogenesis. In addition, we identified a direct relationship between *OsIAA30* (ortholog of *PnIAA30*) and ARFs (Auxin Response Factors) transcription factors during the rice megasporogenesis.

On the other hand, we identified nine members from the *AP2/ERF* superfamily expressed during reproductive development of *P. notatum*. Four of these transcripts showed high homology with representative members of the *BBM* protein coding group (*BABY BOOM*) belonging to the euANT clade. The remaining five, showed homologies to members of the clade euAP2 belonging to the *AP2-like (APETALA2-Like)* family. One of them called as *PnAP2-like*, putative orthologous of *APL25 (Oryza sativa)* and *SiAP2-like (Setaria italica)*, presents a specific allele only present in the maternal sexual genotype that cosegregates linked to the sexual reproductive mode. The identity of the *PnAP2-like* fragments amplified from genomic DNA of the sexual and apomictic genotype showed homology with an *AP2-like* coding sequence from *Setaria viridis*, and with two *TARGE OF EAT3 (TOE3)* sequences from *Setaria italica* and *Panicum halli*. *TOE* genes are post-transcriptional regulators and appear to play an important role in the identity of floral organs along with *APETALA2* and *AGAMOUS* genes. On the other hand, *PnBBM-like* showed a possibly differential representation between the C4-4x (sexual) and Q4117 (apomictic) transcriptomes. *PsASGR-BABYBOOM-like* gene was associated with parthenogenesis in *Pennisetum glaucum* (an aposporous species), so we could think of a possible role of *PnBBM-like* in the parthenogenesis of *Paspalum notatum*.

The results obtained in this work allowed to detect sequences expressed during reproductive development of *P. notatum* that are homologous to genes located to the segment of the rice chromosome 12 syntenic to the ACL of the species. We detected the orthologous genes of *P. notatum* and their location on the diploid and tetraploid genomes. *In silico* mapping on the draft diploid genome showed conserved collinearity between the *P. notatum* and rice sequences of the region. At the same time, it could be shown that both *PnANK-TPR3* and *PnIAA30* are differentially regulated during sexual and apomictic reproductive development. On the other hand, it was determined that an allele of *PnAP2-like* cosegregates with sexuality, while *PnBBM-like* is differentially regulated between sexual and apomictic reproductive development of *P. notatum*. These results provide evidence that the genes associated with signaling and growth, hormone metabolism, and development located at the ACL present altered expression patterns between sexual and apomictic developments. This alteration probably derives from the structure of the ACL genomic region and is related to the switch from sexual to apomictic reproductive mode.

I- INTRODUCCIÓN

I.1- El género *Paspalum*

Paspalum es un extenso género americano perteneciente a la familia Poáceas (subfamilia *Panicoideas*, tribu *Paniceas*) compuesto por alrededor de 330 especies mayormente distribuidas en regiones tropicales y subtropicales a templadas de América (Zuloaga y Morrone, 2005; Morrone et al., 2012). Son plantas anuales o perennes, cespitosas, estoloníferas o rizomatosas, con lígulas membranosas. Las láminas pueden ser lanceoladas o lineares y de pilosidad variable. Las inflorescencias están formadas por uno o más racimos espiciformes, unilaterales con espiguillas solitarias o de a pares. Las espiguillas son orbiculares a ovoides, dorso-ventralmente comprimidas, plano a cóncava convexas, con dos flores, la inferior estéril y la superior hermafrodita. La lema es tan larga como la flor y usualmente con los márgenes enrollados sobre la palea. Las flores contienen 3 estambres y 2 estigmas plumosos y los cariopses son parcialmente esféricos (Zuloaga y Morrone, 2005). El género ocupa 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 (Ortiz et al., 2013). El centro de origen del género es Sudamérica tropical (Chase, 1929; 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 y Uruguay (Zuloaga y Morrone, 2005). Varias especies, como por ejemplo *P. atratum* Swallen, *P. dilatatum* Poir., *P. guenoarum* Arechav., *P. notatum* Függé y *P. urvillei* Steud., son excelentes forrajeras en las regiones tropicales y subtropicales de Brasil, este de Bolivia, Paraguay y noreste de Argentina (Burton, 1974; Zuloaga y Morrone, 2005). En la actualidad se dispone de cultivares tetraploides apomícticos de *P. atratum* (cv. Cambá-FCA) y *P. guenoarum* (cv. Chané-FCA) que tienen una amplia aceptación entre los productores de la región subtropical de nuestro país. Asimismo, se cuenta con variedades apomícticas de *P. dilatatum* y *P. plicatulum* en Argentina, Brasil, Paraguay, Estados Unidos, Uruguay y Tailandia. Se dispone además de un cultivar híbrido apomíctico de *P. notatum* (cv. Boyero-FCA UNNE) (Acuña et al., 2011).

La mayoría de las especies son poliploides (75%) y varias de ellas forman complejos multiploides (Quarin, 1992). Las razas poliploides incluyen desde triploides (3x) (Quarin y Lombardo, 1986) hasta excepcionalmente 16x en *Paspalum floridanum* Michx. (Burton, 1940). Se considera que aproximadamente la mitad de los poliploides son tetraploides (Quarin, 1992). Los complejos multiploides se componen principalmente por citotipos diploides

autoincompatibles de reproducción sexual y poliploides (en su mayoría tetraploides) apomícticos autofértiles (Ortiz et al., 2013). La poliploidía y la apomixis son variables definitorias de la gran diversidad que presenta el género (Acuña et al., 2019). Asimismo, la amplia distribución geográfica que ocupa está relacionada con las diversas estrategias reproductivas (reproducción sexual, auto- y alogamia, reproducción clonal por apomixis y propagación vegetativa) y los niveles de ploidía encontrados en las especies (Quarin, 1992).

El género *Paspalum* es un sistema biológico atractivo para estudiar la apomixis debido a que presenta especies utilizadas para identificar los genes asociados al carácter, que son a su vez importantes forrajeras (Ortiz et al., 2013). En las últimas cinco décadas, se ha generado una gran cantidad de información en muchas especies del género que incluyen (1) determinaciones de su número de cromosomas y modo de reproducción; (2) mapas de ligamiento genético y la localización de la región genómica responsable de la apomixis; (3) identificación y análisis de genes candidatos; y (4) sistemas de cultivo *in vitro* y transformación genética para estudios funcionales. El género presenta además una característica poco frecuente como es la existencia de especies con razas apomícticas y sexuales al mismo nivel de ploidía que pueden cruzarse para generar híbridos con características agronómicas sobresalientes y reproducción apomíctica. Existen además bancos de germoplasma de *Paspalum* en Argentina, Brasil y Estados Unidos (Acuña et al., 2019).

I.1.1- *Paspalum notatum* (pasto horqueta “*Bahiagrass*”)

Paspalum notatum Flüggé, comúnmente llamado pasto horqueta o pasto bahía, es una especie perenne rizomatosa ampliamente distribuida desde el centro-este de México e islas del Caribe hasta la Argentina (Ortiz et al., 1997). La especie presenta dos biotipos, la variedad común (pasto horqueta) (Figura 1), que se caracteriza por poseer hojas anchas, rizomas gruesos con entrenudos cortos y propagación lenta, y la variedad Pensacola (*P. notatum* var. *saurae* Parodi) que es más alta, con láminas foliares más estrechas, rizomas delgados, se propaga rápidamente y posee mayor tolerancia al frío (Gates et al., 2004). La especie forma además un complejo multiploide, constituido por los citotipos: diploide ($2n=2x=20$), triploide ($2n=3x=30$), tetraploide ($2n=4x=40$) y pentaploide ($2n=5x=50$) (Burton, 1946; Saura, 1948; Gould, 1966; Urbani et al., 2017). La forma común corresponde al citotipo tetraploide, siendo los triploides y pentaploides muy poco frecuentes. La variedad Pensacola, (citotipo diploide), fue introducida accidentalmente en el Sudeste de los Estados Unidos, alrededor del año 1926, y actualmente es una de las principales especies forrajeras de los estados del Golfo de Florida (Burton, 1967; Gates et al., 2004).

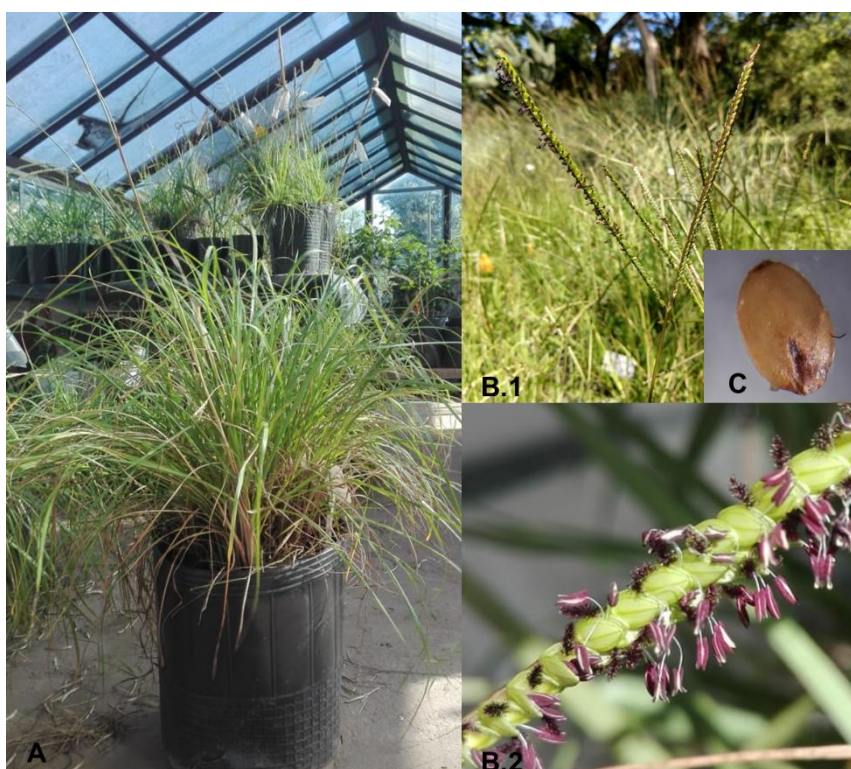


Figura 1. *Pasaplum notatum* Flügge. **A)** Planta adulta de la accesión Q4188 (tetraploide sexual) cultivada en el invernadero de la Facultad de Ciencias Agrarias de la UNR. **B.1)** Espiga en antesis de una planta apomítica de la accesión Q4117. **B.2)** Detalle de un grupo de espiquillas al momento de la antesis de la accesión Q4117, en donde se observan las anteras y estigmas de color púrpura. **C)** cariopse maduro.

El citotipo diploide es sexual y autoincompatible, mientras que los poliploides (3x, 4x y 5x) son apomíticos pseudogamos y autoincompatibles (Quarin, 1992; Tischler y Burson, 1995). Hasta el momento no se han encontrado poliploides completamente sexuales en la naturaleza, pero se han obtenido varios individuos tetraploides 100% sexuales a partir de la duplicación del número de cromosomas de diploides por tratamientos con colchicina (Figura 1A) (Forbes y Burton, 1961; Ortiz et al., 1997; Quarin et al., 2001, 2003). Si bien la forma diploide ha sido mejorada en los Estados Unidos por metodologías clásicas, sólo unos pocos biotipos de la forma común han sido domesticados y cultivadas en forma extensiva hasta el presente, debido a su modo de reproducción apomítico. El mejoramiento de estas razas estuvo restringido a la selección de biotipos superiores de las poblaciones naturales. Entre los cultivares tradicionales se encuentran “Common”, “Paraguay”, “Paraguay 22”, “Argentine” y “Wilmington”, que son utilizados desde principios y mediados del siglo XX principalmente en el sur de los Estados Unidos de América (Gates et al., 2004). En Argentina, la Universidad Nacional del Nordeste y el Instituto de Botánica del Nordeste (CONICET) de Corrientes,

mantiene un programa de mejoramiento de la especie desde hace más de 15 años. En el mismo, híbridos tetraploides son generados mediante la utilización de tetraploides sexuales (obtenidos artificialmente), utilizados como progenitores femeninos en cruzamientos controlados con razas apomícticas naturales. El proceso de hibridación es seguido por la identificación de los híbridos apomícticos mediante el uso de marcadores moleculares ligados a la apomixis, observaciones de sacos embrionarios y/o a partir de citometría de flujo en semillas. Los materiales son seleccionados por la capacidad de crecimiento estacional, en particular durante los meses más fríos, la producción de semillas, la resistencia al frío, el valor nutritivo y la extensión del período reproductivo (Acuña et al., 2014). Como resultado de este programa se logró recientemente la inscripción del cultivar híbrido apomíctico “Boyero-FCA” (Figura 2) (Urbani et al., 2017). El comportamiento agronómico de este cultivar en la región sur de la Provincia de Santa Fe, está siendo evaluado en el Campo Experimental José F. Villarino de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Rosario (Anibalini V., Tesis de Maestría, FCA-UNR). Recientemente, el programa ha incrementado la base genética del germoplasma sexual mediante la creación de una población tetraploide sexual sintética que permite un mayor número de cruzamientos compatibles con individuos apomícticos naturales dadores de polen y por lo tanto la generación de nuevas líneas apomícticas para el plan de mejoramiento (Zilli et al., 2018).



Figura 2. Parcela experimental del cultivar apomíctico de *P. notatum* Boyero FCA, establecida en el Campo Experimental J. F. Villarino en febrero de 2017.

La forma de apomixis presente en las razas tetraploides es la de tipo apospórica pseudógama (Burton, 1948; Bashaw et al., 1970). La polinización es esencial para la formación de semillas porque el endosperma se desarrolla solo después de la fertilización de

los núcleos polares. Una característica sobresaliente de esta especie es que el endosperma puede formarse con polen de distintas ploidías e incluso derivado de especies relacionadas como *P. cromyorrhizon* (Quarin, 1999). La formación de sacos embrionarios apospóricos se inicia conjuntamente con la reproducción sexual, a partir de la diferenciación de la célula madre de la megáspora (CMM). Al momento de la meiosis de las células madre de los granos de polen en las anteras, se observa la diferenciación de la arquespora en el primordio del óvulo (Figura 3a y b). A partir de este momento, una o más células de la nucela, cercanas a la CMM, se diferencian como iniciales de la aposporía (AI) (Figura 3c). Normalmente estas células presentan una forma alargada y un núcleo denso (Figura 3c). Posteriormente, tres o las cuatro esporas derivadas de la meiosis de la CMM degeneran, y las iniciales de la aposporía (IA) se desarrollan para formar un megagametofito no reducido. En caso de que la megáspora funcional (n) desarrolle en un saco embrionario, al momento de la antesis los sacos meióticos son del tipo *Poligonum*, es decir, cuentan con el aparato oosférico (célula huevo y dos sinérgidas), una célula central binucleada y un grupo de antípodas (Figura 3d). Por su parte, los sacos embrionarios apospóricos maduros presentan una célula huevo acompañada de una o dos sinérgidas en el extremo micropilar y dos núcleos polares en la célula central (Figura 3d) (Laspina et al., 2008; Ortiz et al., 2013). Una característica particular de este tipo de sacos embrionarios es la ausencia de células antipodales en el extremo chalazal (saco embrionario apospórico de tipo *Paspalum*) y frecuentemente la presencia de dos o más sacos en el mismo óvulo (Ortiz et al., 2013). En algunos casos, es posible observar sacos embrionarios apospóricos junto con sacos embrionarios meióticos en el mismo óvulo (Martínez et al., 2001; Ortiz et al., 2013). La formación de las semillas apomícticas se completa con el desarrollo del embrión ($2n$) por partenogénesis (sin fecundación) y la formación del endosperma luego de la fertilización de los núcleos polares (Quarin, 1999).

P. notatum constituye un sistema único para el estudio molecular de la apomixis y su uso en el mejoramiento (Ortiz et al., 2013). Al presente, se cuenta con materiales tetraploides apomícticos obligados y apomícticos facultativos con diferente grado de sexualidad perfectamente caracterizados, así como varios individuos experimentales completamente sexuales (Quarin et al., 2003; Espinoza et al., 2006; Acuña et al., 2007). Se han generado numerosos híbridos a partir de cruzamientos experimentales, varios de los cuales presentan características agronómicas sobresalientes (Acuña et al., 2009, 2011; Zilli et al., 2015). Se dispone de una población sintética tetraploide sexual que es un excelente material para uso en el mejoramiento (Zilli et al., 2015). La especie cuenta además con mapas de ligamiento genético a los niveles diploide (Ortiz et al., 2001) y tetraploide (Stein et al., 2007), y de numerosos marcadores moleculares completamente ligados al *locus* responsable de la apomixis (Martínez et al., 2003; Stein et al., 2004, 2007; Podio et al., 2012a). Estudios

citogenéticos y de inmunolocalización indicaron que las razas tetraploides apomícticas presentan irregularidades meióticas que se transmiten a la descendencia apomíctica (Podio et al., 2012b) y que la región genómica asociada al carácter se encuentra en un segmento cromosómico heterocromático, con alto grado de metilación de citosinas, y que parece haber evolucionado como un cromosoma sexual (Podio et al., 2014a). La disponibilidad de estos materiales, sumado a los recursos biotecnológicos, genéticos y moleculares generados en los últimos años han convertido a la especie en un modelo natural para determinar las vías claves que participan del proceso de apomixis en las gramíneas, determinar la estructura y evolución de los genomas de especies apomícticas y comprender el funcionamiento y evolución de los complejos multiploides. Se destacan, además las siguientes características: *i*) posee un genoma de tamaño reducido (valor C = 1,2 pg) (Galdeano et al., 2017); *ii*) sexualidad y apomixis coexisten al mismo nivel de ploidía; *iii*) la especie es perenne y produce una gran cantidad de semillas y *iv*) se dispone de técnicas de transformación genética para la realización de estudios funcionales (Ortiz et al., 2013; Mancini et al., 2014).

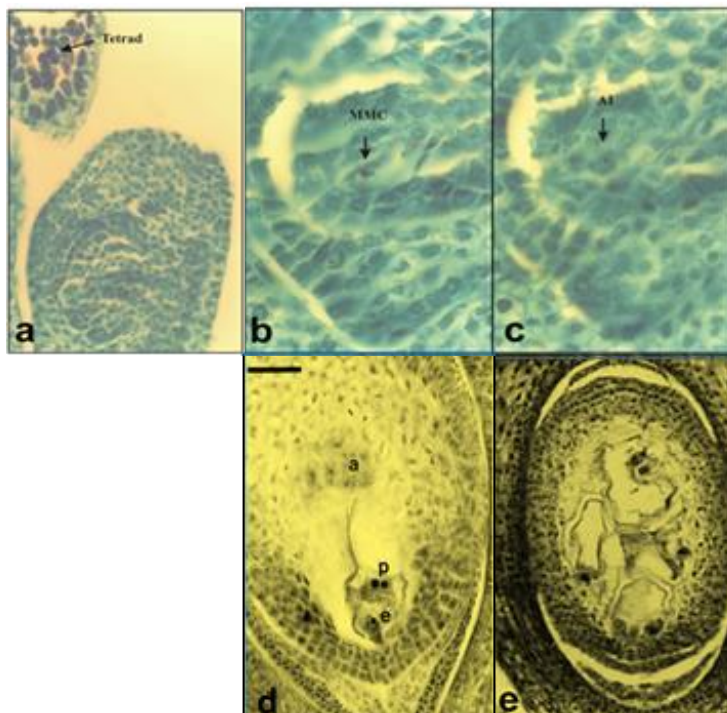


Figura 3. Desarrollo de sacos embrionarios meióticos y apospóricos en *Paspalum notatum*: **a:** etapas iniciales del desarrollo de la antera y primordio del ovario. En las anteras se observan meiocitos en estado de tétrada y en el ovario la diferenciación de la MMC. **b:** primordio de ovario en donde se observa una MMC. **c:** plano adyacente del mismo ovario mostrado en **a**, en donde se observa una célula inicial de la aposporía (AI). **c** y **d:** sacos embrionarios meiótico y aposórico al momento de la antesis, respectivamente. **a-c:** tomado de Laspina et al., (2008); **d-e:** adaptado de Ortiz et al., (1997) y Pessino y Ortiz, (2015).

I.2- Apomixis

I.2.1- Definición del termino

La palabra apomixis define en su sentido estricto a una forma natural de reproducción asexual por semillas que conduce a la generación de progenies genéticamente idénticas a la planta madre (Nogler, 1984). El término deriva del griego “apo” que significa falta o ausencia y “mixis” (unión o mezcla). En este sentido la palabra apomixis hace referencia a la falta de unión de gametas femeninas y masculinas que ocurre en la reproducción sexual. Los primeros estudios del carácter en las plantas superiores son atribuidos a la observación de una planta femenina de la especie *Alchornea ilicifolia* (syn. *Caelebogyne ilicifolia*) (diclino dioica) proveniente de Australia, la cual continuó formando semillas luego de crecer en forma aislada en los jardines botánicos de los Kew Garden, en Londres, Inglaterra (Asker y Jerling, 1992). Esta observación puso al carácter de manifiesto sin que existiese una explicación para la época. Paradójicamente, los primeros experimentos con especies apomícticas fueron realizados de forma involuntaria por el propio Gregor Mendel en 1868. Mendel analizó los patrones de la descendencia de cruzamientos entre plantas, aparentemente homocigotas (“true breeding”), de *Hieracium auricula* L y no encontró uniformidad en la progenie F₁, en total contradicción con su primera ley. Por otro lado, al contrario de lo esperado por su segunda ley, no observó variación en la generación F₂ (Nogler, 1984; Koltunow et al., 2011a). Mendel atribuyó estos resultados a fallas en la polinización y a una supuesta alta tasa de autopolinización (Asker y Jerling, 1992). Hoy se conoce que *H. auricula* L. se reproduce por apomixis de tipo apospórica con desarrollo autónomo del endosperma (Koltunow et al., 2011b).

La apomixis ha sido observada en al menos 400 especies de plantas que abarcan 35 familias, siendo común en las *Gramineae*, *Compositae*, *Rosaceae* y *Rutaceae* (Nogler et al., 1984; Hanna y Bashaw, 1987). Este tipo de reproducción posee numerosas características en común con la reproducción sexual por lo cual se considera que habría surgido por una desregulación de la vía normal del desarrollo debido a la acción de componentes genéticos y/o epigenéticos (Grimanelli et al., 2003; Koltunow y Grossniklaus, 2003). Históricamente, para comprender los mecanismos relacionados con esta forma de reproducción se la ha comparado con el proceso sexual de las angiospermas. A continuación, se describen los principales aspectos biológicos y embriológicos de ambos tipos de reproducción.

I.2.2- El proceso de reproducción sexual en las angiospermas

El proceso de desarrollo sexual en las angiospermas implica una alternancia cíclica de generaciones entre un estado esporofítico o diploide multicelular ($2n$) representado por las células somáticas de la planta, y un estado gametofítico o haploide (n) representado por los granos de polen y el saco embrionario (Crang et al., 2018). Durante el proceso de floración tiene lugar el desarrollo de la generación gametofítica. En el mismo, ocurre la meiosis de las células madres del polen y de la megáspora, en las anteras y ovarios, respectivamente. La meiosis posibilita la reducción del contenido de ADN a la mitad y la recombinación del material genético entre los cromosomas homólogos. Posteriormente a partir de los meiocitos del polen (n) y la/s megáspora/s funcional/es (n) en los ovarios, se desarrollan por mitosis la generación gametofítica masculina y femenina, representada por los granos de polen maduros en las anteras y el gametofito femenino o saco embrionario en los ovarios, respectivamente (Asker y Jerling, 1992; Crang et al., 2018).

El desarrollo del megagametofito femenino consta de dos fases, la megaesporogénesis que involucra la formación y maduración de los productos de la meiosis, y la megagametogénesis que incluye la división mitótica de los productos de la meiosis hasta la celularización y diferenciación del saco embrionario meiótico (SEM) (o megagametofito). El proceso comienza en el ovario cuando una célula de la nucela, denominada célula arqueosporial o célula madre de la megáspora (CMM), se alarga y divide por meiosis para formar cuatro megásporas haploides (n). Por lo general, las tres megásporas del extremo micropilar degeneran dejando solamente una megáspora funcional, a partir de la cual comienza la megagametogénesis. En algunos casos la formación de la pared celular luego de la segunda división meiótica es arrestada, por lo cual se forma una díada de células, con 2 núcleos haploides cada una. La degeneración de una de las células de la díada resulta en la formación de una megáspora funcional binucleada. En otros casos, no hay formación de paredes celulares durante la meiosis y la célula tetra-nucleada es el punto de partida para la megagametogénesis. Dependiendo entonces del patrón de formación de las paredes celulares en la meiosis, la megaesporogénesis se clasifica en: monospórica, bispórica o tetraspórica, respectivamente (Huang y Russell, 1992; Willemse y Van Went, 1984). Aproximadamente en el 80% de los casos conocidos, los sacos embrionarios se desarrollan siguiendo la vía monospórica. Estos tipos de microgametogénesis son seguidos por diferentes formas de megagametogénesis, caracterizadas por diferentes números de mitosis lo cual conlleva a diversos tipos de sacos embrionarios (Willemse y Van Went, 1984). En el caso más común, a partir de una megaesporogénesis monospórica, son necesarias tres divisiones mitóticas, la migración nuclear dentro del cenocito y la citocinesis para generar un saco embrionario maduro, formado por 8 núcleos haploides (n) contenidos en siete células: la

ovocélula, dos sinérgidas, una célula central binucleada y tres antípodas conocido como del tipo *Polygonum* (Reiser y Fischer, 1993). Los sacos embrionarios de tipo *Polygonum* son los más abundantes en las especies examinadas, incluido *Arabidopsis* y maíz. En las gramíneas en particular, los sacos embrionarios presentan el aparato oosférico formado por la ovocélula, rodeada por dos sinérgidas en el extremo micropilar, sitio por donde ingresa el tubo polínico en el momento de la fecundación. Las células antipodales puede sufrir varias divisiones lo cual resulta en la formación de una masa de antípodas que puede variar de seis o siete hasta varias decenas (Reiser y Fischer, 1993). En las especies del género *Paspalum* el desarrollo sexual incluye una megasporogénesis monospórica y la megagametogénesis típica para la formación de sacos embrionarios de tipo *Polygonum* generalmente con una masa de antípodas (Ortiz et al., 2013).

El proceso de formación de gametas masculinas en las anteras se divide en dos etapas. La microsporogénesis, durante la cual las células madres de las micrósporas, diferenciadas a partir del tapetum de la antera, se dividen por meiosis para formar cuatro micrósporas haploides (n). Posteriormente, en la microgametogénesis, cada micróspora se divide por mitosis para formar un grano de polen, conteniendo una célula vegetativa y otra generativa. La célula más grande, la célula vegetativa, contiene un núcleo central y citoplasma con una buena proporción de orgánulos como mitocondrias, plastidios, aparato de golgi y ribosomas, así como gránulos de almidón, gotas de lípidos y proteínas almacenadas dentro de las vesículas de membrana del retículo endoplásmico. La célula generativa generalmente está limitada por una membrana plasmática y está ubicada completamente dentro del citoplasma de la célula vegetativa, generalmente está marcadamente alargada y contiene muy pocos orgánulos citoplasmáticos. En la mayoría de los casos, la célula generativa se divide por mitosis para formar dos núcleos espermáticos dentro del tubo polínico poco después de interactuar con en el estigma. En las gramíneas esta división es prematura, debido a que la célula generativa migra hacia la región central del polen, acercándose al núcleo de células vegetativas y luego se divide por mitosis, originando un grano de polen trinucleado (Willemse y Van Went, 1984).

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 a través de una de las sinérgidas y uno de ellos se fusiona con la ovocélula (n) para dar origen al cigoto ($2n$) con una relación genómica materna (m) 1: paterna 1 (p), a partir del cual desarrollará el embrión y posteriormente el nuevo esporófito (Brink y Cooper, 1940; Russell, 1992). El otro gameto masculino se fusiona con los núcleos polares para originar el

endosperma triploide ($2n + n$) con una relación genómica 2m: 1p, que tiene como función nutrir al embrión durante su desarrollo. En cereales como el maíz, la relación genómica 2m: 1p es crítica para la viabilidad del endosperma (Koltunow y Grossniklaus, 2003). En las gramíneas, las antípodas proliferan después de la fertilización, mientras que degeneran antes o durante la fertilización en otras especies. Finalmente, los tejidos que rodean el gametofito femenino fertilizado se desarrollan en la cubierta de la semilla (Drews y Koltunow, 2011). Un esquema simplificado de este proceso se muestra en la Figura 4a.

I.2.3- Distintos tipos de apomixis

La formación de semillas por apomixis combina al menos tres alteraciones en el desarrollo sexual normal de las angiospermas: *i*) la falta de meiosis (apomeiosis) en la generación de la célula huevo, *ii*) la falta de fertilización de la célula huevo y el desarrollo de un embrión por partenogénesis y *iii*) el desarrollo autónomo del embrión (apomixis autógena) o luego de la fertilización de los núcleos polares no reducidos (apomixis pseudógama), lo cual conlleva frecuentemente a una desviación en el balance genómico 2m:1p. (Koltunow y Grossniklaus, 2003).

La apomixis puede cursar por dos vías diferentes: la *esporofítica*, también llamada embrionía adventicia, o la *gametofítica*. En la primera, los embriones surgen directamente de células somáticas de la nucela o de los tegumentos del óvulo, conocidas como iniciales del embrión (IE). Estas células forman embriones de forma globular que solo pueden desarrollarse hasta la madurez si se fertiliza el saco embrionario meiótico, ya que comparten el mismo endosperma que el embrión sexual para nutrirse (Figura 4b). En este tipo de apomixis pueden producirse semillas con embriones múltiples y generalmente el embrión formado en el saco embrionario sexual finaliza su desarrollo y germina junto con el embrión somático (Hand y Koltunow, 2014). La apomixis esporofítica está por lo tanto frecuentemente asociada a la poliembrionía y es comúnmente observada en mango y *Citrus* (Hand y Koltunow, 2014).

En la apomixis de tipo *gametofítica*, se forman sacos embrionarios (gametofitos femeninos) a partir de células no reducidas ($2n$) (Hand y Koltunow, 2014). De acuerdo con el origen del saco embrionario y del embrión, la apomixis gametofítica se subdivide en dos grupos: En la apomixis *diplospórica*, el saco embrionario no reducido se forma a partir de la propia célula madre de la megáspora (CMM) (Figura 4c). En este caso la CMM puede entrar directamente en mitosis (tipo *Antennaria*), sin previa reducción del contenido genómico, o sufrir una falla en la meiosis, en la cual no se observa la formación de quiasmas en la profase

I y metafase I, por lo cual se reconstituye el núcleo $2n$ (Tipo *Taraxacum*). En ambos casos, tres sucesivas divisiones mitóticas forman el saco embrionario completo (Koltunow et al., 2013). 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). 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 *Boechera* (Corral et al., 2013). En la apomixis *apospórica* uno o más gametofitos femeninos no reducidos se forman a partir de células nucleares, que rodean a la legítima CMM, directamente por mitosis (Figura 4c). A estas células se las denomina iniciales de la aposporía (IA). En este caso, hay diferentes tipos de desarrollo que conllevan a la formación de sacos embrionarios que pueden contar con un número variable de núcleos no reducidos. A diferencia de la diplosporía, en las plantas apospóricas coexisten el proceso sexual y el apomíctico en el mismo individuo y en ocasiones en el mismo óvulo (Crane, 2001).

Debido a que la apomixis gametofítica concierne fundamentalmente a procesos que se desarrollan en el óvulo, el estudio del carácter se basa en la comparación con la reproducción sexual. Actualmente se considera que la apomixis ha evolucionado como un sistema alternativo a la sexualidad a través de la reformulación de los programas de desarrollo del ovario (Grimanelli et al., 2001). Asimismo, se especula que la vía apomíctica no funciona completamente en forma independiente de la vía sexual, por lo tanto, los genes que la controlan podrían no ser genes nuevos sino genes que exhiben una regulación alterada a la que presentan en los genotipos sexuales (Ozias-Akins y van Dijk, 2007). Recientemente, se ha postulado un punto de vista adicional donde se considera que la apomixis y sexualidad podrían ser polifenismos ancestrales y que ambos fenismos reproductivos involucran componentes comunes. Los polifenismos se definen como diferentes fenotipos o funciones que pueden presentarse en un organismo, en respuesta al ambiente. Los fenismos son codificados por diferentes combinaciones de genes del mismo genoma. Señales metabólicas inducidas por el ambiente activan controles superiores que permiten el cambio de un fenismo a otro, a partir de la reprogramación de la expresión de genes (Albertini et al., 2019). La división celular y la formación de esporas es un ejemplo de polifenismo antiguo que se da en procariontes. La división de las células procariontes se sucede rápidamente ante condiciones metabólicas favorables, en cambio cuando se presenta un estrés, es decir condiciones desfavorables, se induce el fenismo de producción de esporas resistentes (McKenney et al., 2013; Shimkets, 2013). La sexualidad (formación de esporas haploides, diferenciación de gametas y singamia) evolucionó durante la eucariogénesis, desde los procesos procariontes de recombinación y producción de esporas. Los tres componentes principales de la apomixis (apomeiosis, partenogénesis y desarrollo del endosperma de forma autónoma o pseudógama)

podieron haber evolucionado simultáneamente como “inovaciones mitóticas” del fenismo de división procariota (Carman, 2007; 2011). De acuerdo a esto, la apomixis y la sexualidad serían caracteres polifénicos ancestrales, sugiriendo de esta manera que los componentes de la apomixis serían más antiguos que los de la sexualidad (Tashiro et al., 2017). Actualmente la apomixis no se manifiesta en eucariotas sexuales obligados, por lo que esta nueva hipótesis sugiere un posible silenciamiento primitivo del cambio (switch) entre apomixis y sexualidad y/o la pérdida de la capacidad para producir apomixis (Albertini et al., 2019).

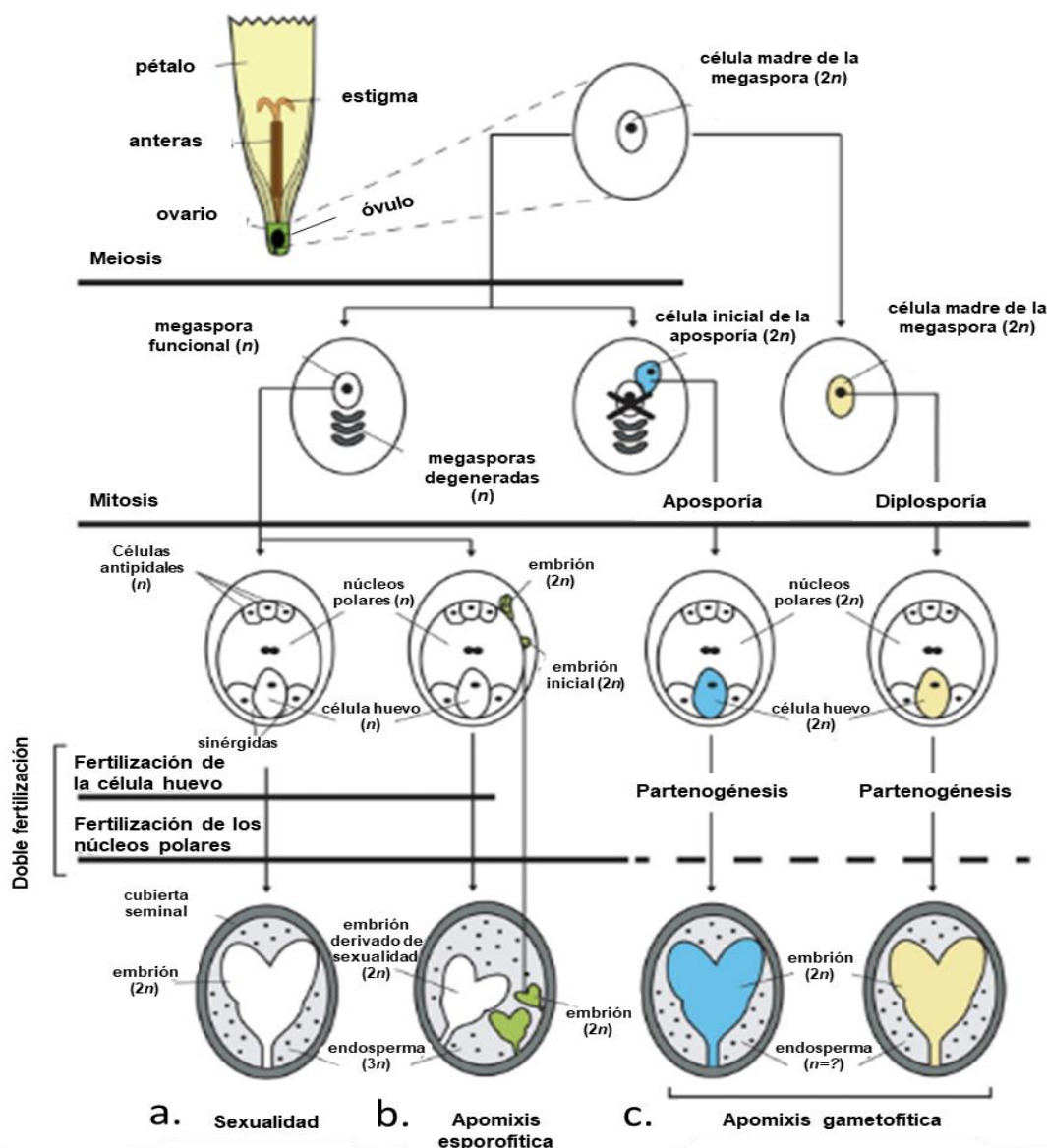


Figura 4. Esquema de las vías de desarrollo reproductivo sexual y apomícticas en las angiospermas, **a)** eventos de formación de semilla sexual, **b)** eventos de apomixis esporofítica, **c)** eventos de apomixis gametofítica (diplospórica y apospórica) (adaptado de Hand y Koltunow, 2014).

I.2.4- La apomixis y su importancia en la agronomía.

Estudios prospectivos recientes indican que para el año 2050, la producción actual de alimentos deberá incrementarse al doble a fin de hacer frente a las demandas derivadas del crecimiento poblacional y el ingreso per cápita de los habitantes (Tester y Landrige, 2010). Este aumento en los niveles de producción, deberá hacerse teniendo en cuenta la sustentabilidad del sistema, el cuidado del medio ambiente y el proceso de cambio climático. El escenario previsto implica la necesidad de implementar cambios sustanciales en los métodos de cultivo, en la utilización de recursos y en los programas de mejoramiento (Tilman et al., 2011). Una de las alternativas que se plantean para incrementar la producción agrícola, es el uso masivo de la heterosis, que en algunas especies autógamas (como arroz y trigo) puede generar más del 50% de aumento en los rendimientos (Tester y Landrige, 2010). Las estrategias propuestas para alcanzar este objetivo incluyen la búsqueda de fuentes de macho esterilidad y/o la utilización de OGMs androestériles. Sin embargo, una alternativa superadora es lograr que los híbridos se reproduzcan asexualmente por apomixis (Pennisi, 2010).

La utilización de la apomixis en los cultivos mayores tendría un enorme impacto tanto en los países desarrollados como en los países en vía de desarrollo (Vielle Calzada et al., 1996; Pupilli y Barcaccia, 2012). Los principales beneficios de la transferencia y utilización de esta tecnología en especies de interés comercial incluyen, *i*) la fijación de combinaciones híbridas y su multiplicación por semillas, *ii*) la reducción del costo en la producción de semillas híbridas adaptadas a diferentes nichos ecológicos, *iii*) la propagación por semillas de especies que se reproducen de forma vegetativa, lo cual terminaría con el uso de técnicas como el cultivo de tejidos que demanda mano de obra intensiva, *iv*) la eliminación de problemas fitosanitarios relacionados con la transmisión de virus en los cultivos que se propagan de manera vegetativa y *v*) la mitigación del escape de transgenes de los OGM en cultivos con apomixis autónoma (Van Dijk y Van Damme, 2000; Spillane et al., 2004; Barcaccia y Albertini, 2013). Estos beneficios hacen que la idea de transferir la apomixis a especies de gran cultivo sea un objetivo buscado por muchos equipos de investigación a nivel internacional. Sin embargo, la transferencia y utilización del carácter en especies naturalmente sexuales requiere aún generar conocimiento básico sobre los genes claves del proceso y sus mecanismos de control.

En la última década se han realizado avances muy importantes en la elucidación de las vías que gobiernan la apomixis (Pupilli y Barcaccia, 2012). A lo largo de estos años se han planteado diferentes estrategias para lograr la desregulación de la reproducción sexual de plantas cultivadas con la consiguiente producción de semilla clonal por apomixis. Tradicionalmente, las primeras estrategias incluyeron la introgresión de componentes de la

apomixis desde parientes apomícticos cercanos por metodologías de cruzamientos convencionales y la incorporación de genes claves de la vía apomíctica (identificados en especies apomícticas naturales) y/o la modificación de genes de la vía sexual a través de ingeniería genética (Spillane et al., 2004).

La estrategia de introgresión consiste en el cruzamiento entre la planta cultivable sexual, con especies apomícticas filogenéticamente cercanas, seguida por retrocruzas a favor de la especie cultivada (parental recurrente) de manera de recuperar el genoma de interés, más los determinantes de la apomixis (Savidan, 2000). Si bien este sistema ha sido llevado adelante con éxito en varias especies de importancia y con numerosos genes de interés agronómico, en el caso de la apomixis existen una serie de barreras que dificultan su aplicación como, por ejemplo, la escasez de especies apomícticas cercanas, efectos epigenéticos y diferentes niveles de ploidía entre la planta dadora y receptora. Los primeros experimentos dirigidos a introducir la apomixis a través de cruzas fueron realizados por D.F. Petrov, cuyo sistema se basaba en cruzamientos interespecíficos entre maíces tetraploides y *Tripsacum dactiloydes* (una especie apomíctica diplospórica) (Petrov et al., 1979). Posteriormente otros grupos de investigación obtuvieron híbridos interespecíficos de maíz-*Tripsacum* que se reproducen por apomixis (Kidinger et al., 1996; Savidan, 2000). Sin embargo, como los híbridos obtenidos luego de una serie de retrocruzas son altamente estériles, el progreso en la recuperación del genoma de maíz está fuertemente asociado con la posibilidad de generar al menos algunos individuos con sacos embrionarios meióticos. Una dificultad adicional consiste en la obligación estricta de la relación genómica 2m: 1p necesaria para desarrollar el endosperma en maíz, que impide la formación de semilla en los híbridos (Savidan, 2000). De la misma manera, un programa iniciado a finales de los años 70' intentó transferir la apomixis al mijo (*Pennisetum glaucum*, sexual) a partir de *Pennisetum squamulatum* (una especie apomíctica de tipo apospórica) (Hanna et al., 1993). A partir de la generación de grandes poblaciones segregantes fue posible detectar individuos parcialmente macho-fértiles en las retrocruzas, lo cual permitió progresar hasta la generación de BC7. Estas plantas son muy similares al mijo, pero producen un número bajo de semillas viables, probablemente debido a problemas asociados con el desarrollo del endosperma (Morgan, 1998). Otro ejemplo de este método es el intento de transferencia de la apomixis desde *Elymus rectisetus* a *Triticum aestivum* (trigo) (Liu et al., 1994)

Con respecto a las estrategias para incorporar la apomixis a cultivos sexuales a través de métodos de ingeniería genética se destacan dos sistemas complementarios: a) la búsqueda de mutantes de especies sexuales que recrean componentes del fenotipo apomíctico (como por ejemplo, la formación de gametos femeninos no reducidos, el desarrollo

partenogénético del embrión y/o el desarrollo autónomo del endosperma) y b) la identificación de genes asociados físicamente o funcionalmente con el carácter en especies apomícticas naturales (Barcaccia y Albertini, 2013). La combinación de ambas estrategias ha generado una lista importante de genes que pueden utilizarse como herramientas para recrear componentes del proceso (Fei et al., 2019).

El primer sistema se basa en que la desregulación de la expresión de genes claves del desarrollo sexual podría permitir la síntesis *de novo* de componentes de la apomixis (Spillane et al., 2004). Estudios de mutantes en *Arabidopsis thaliana* han permitido identificar genes que participan en diferentes componentes del proceso reproductivo (Hand y Koltunow, 2014; Fei et al., 2019). Trabajos recientes han posibilitado recrear el fenotipo apomíctico en *Arabidopsis* combinando líneas MiMe (que cambian la división meiótica por la mitótica) (d'Erfurth et al., 2009) con líneas GEM (que permiten eliminar el genoma paterno luego de la fecundación) (Marimuthu et al., 2011). Asimismo, se logró sintetizar líneas de arroz que generan semillas clonales a partir de la combinación de mutantes MiMe con una línea transgénica que expresa el gen *BABY BOOM* (*OsBBM*), un activador de la partenogénesis (Khanday et al., 2019) y mediante la edición génica simultánea de los genes *OSD1*, *PAIR1*, *REC8* y *MTL*, responsables de la meiosis, el apareamiento de los cromosomas homólogos, la recombinación y la inducción de haploides, respectivamente (Wang et al., 2019). Recientemente, se obtuvo una línea de arroz denominada AOP (*Apomictic Offspring Producer*) capaz de producir descendencia apomíctica, a partir de la edición génica (con la técnica de CRISPER/Cas) de los genes *OsOSD1*, *OsREC8* y *OsSPO11-1* (para recrear el fenotipo MiMe) y el gen *OsSPO11* para inducir la partenogénesis (Xie et al., 2019). Este trabajo prueba que varios genes diferentes pueden ser modificados para obtener el fenotipo apomíctico y la utilización de uno u otro dependerá de la eficiencia final que demuestre cada uno para generar semillas clonales (Xie et al., 2019). Aunque hasta el momento estas tecnologías presentan una capacidad reducida para la formación de semillas y el mecanismo inducido no es estrictamente la apomixis, prueban definitivamente que es posible recrear un sistema de reproducción asexual vía semillas en cultivos mayores. El segundo sistema, ha logrado indentificar varios genes candidatos que controlan puntos clave del proceso. Los avances más destacados se desarrollan en el punto siguiente. Sin embargo, aún no es posible comprender en su totalidad el fenómeno de apomixis y alcanzar la eficiencia reproductiva que exhiben las especies apomícticas naturales ni disponer de un sistema para transferir el carácter en forma rutinaria.

I.3- Estudios genéticos y moleculares de la apomixis gametofítica

A excepción de algunos géneros de gramíneas subtropicales, las fresas, frutillas y el mango, la apomixis no está presente en especies de gran cultivo, aunque si se ha observado en parientes cercanos al trigo y maíz (Spillane et al., 2004). Esto implica que los estudios genéticos del carácter deban realizarse en especies silvestres altamente heterocigotas, poliploides y poco caracterizadas genéticamente (Catanach et al., 2006). Aunque la apomixis en angiospermas es un sistema reproductivo heredable, su base genética es compleja, lo cual no ha permitido aún comprender en su totalidad la regulación al nivel molecular (Grimanelli, 2012; Brukhin y Baskar, 2019). Tradicionalmente los análisis citoembriológicos de las plantas madres y las pruebas de progenies han sido las metodologías más usadas para determinar el modo de reproducción (sexual o apomítico) en especies apomíticas (Marshall y Brown, 1974).

Estudios genéticos en especies apospóricas como *Ranunculus auricomus* (Nogler, 1984), *Panicum máximum* (Savidan, 1982), *Pennisetum squamulatum* (Ozias-Akins et al., 1998), *Brachiaria brizantha* (Pessino et al., 1998), *Paspalum simplex* (Labombarda et al., 2002), *P. notatum* (Martínez et al., 2001) y diplospóricas, *Tripsacum dactyloides* (Grimanelli et al., 1998) y *Eragrostis curvula* (Zappacosta et al., 2019), evidenciaron consistentemente que los componentes de la apomixis están controlados por un *locus* simple, dominante, que en la mayoría de ellos está localizado en una región con baja frecuencia de recombinación (Hand y Koltunow et al., 2014). Por otra parte, 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 están controlados por factores que segregan de forma independiente. Particularmente, en *Hieracium praealtum* se demostró que la apomixis está controlada por dos *loci* independientes: *Loss Of Apomeiosis* (LOA) y *Loss Of Parthenogenesis* (LOP). Mientras que LOA es necesario para la apomeiosis y la supresión de todas las megásporas derivadas de sexualidad (meiosis), la actividad gametofítica de LOP es necesaria para el desarrollo autónomo tanto del embrión como del endosperma (Catanach et al., 2006; Koltunow et al., 2011). Recientemente, se ha determinado que el desarrollo autónomo del endosperma en *Hieracium/Pilosella* y *Taraxacum* está controlado por un tercer *locus* independiente (AutE) (Ogawa et al., 2013; Van Dijk et al., 2003). Sin embargo, incluso en estos casos, uno de los *loci* puede estar en una región de recombinación reducida, por ejemplo, el controlador de la partenogénesis en *Taraxacum* (Van Dijk, 2009). Teniendo en cuenta el conocimiento generado hasta la fecha, al menos tres genes mayores controlarían la expresión completa del carácter incluyendo la apomeiosis, la partenogénesis del embrión y el desarrollo del endosperma en forma autónoma o luego de la

fertilización de los núcleos polares no reducidos (Albertini et al., 2010; Conner et al., 2017). De acuerdo a este modelo, las diferencias en la expresividad de cada componente del carácter, así como, las interacciones entre ellos, serían los responsables de la herencia y la amplia variación en la manifestación del carácter incluso dentro de la misma especie (Matzk et al., 2005).

La disponibilidad de poblaciones segregantes por el modo de reproducción permitió la identificación de marcadores moleculares ligados a la apomixis en varias especies de gramíneas como, por ejemplo: híbridos de maíz-*Tripsacum* (Leblanc et al., 1995, Kindiger et al., 1996), *Pennisetum* (Ozias-Akins et al., 1993, 1998) y *Brachiaria* (Pessino et al., 1998; 1999). También, se encontraron marcadores de RAPD y AFLP fuertemente ligados al carácter en *P. notatum* (Martínez et al., 2003; Stein et al., 2004b, 2007) y *Panicum máximum* (Ebina et al., 2005). Asimismo, los marcadores moleculares han sido utilizados para la realización de análisis de progenies y estudios del tipo de herencia en *Poa pratensis* (Huff y Bara 1993, Mazzucato et al., 1995), *P. notatum* (Ortiz et al., 1997; Stein et al., 2004a; Rebozzio et al., 2012) y *P. simplex* (Pupilli et al., 2001; Hojsgaard et al., 2011). Estas herramientas permiten seguir el carácter de una forma sencilla en las progenies e identificar la región genómica asociada al carácter (Rebozzio et al., 2012).

En los últimos años, a partir del mapeo genético y físico en *P. squamulatum* (Akiyama et al., 2004), *Hieracium spp* (Okada et al., 2011) y *P. simplex* (Calderini et al., 2006) se ha logrado reducir la ubicación genómica de los *loci* involucrados en el carácter a unos pocos cientos de kilobases. Recientemente, desde una genoteca en BACs (cromosomas artificiales de bacterias) se aisló una de las secuencias que mapea físicamente en la región genómica específica de la aposporia (ASGR) de *P. squamulatum*, la cual corresponde al gen *PsASGR-BBML* (*Apospory-Specific Genomic Region-BabyBooM-Like*) (Conner et al., 2008, 2015). *BBM* (*BABY BOOM*) y *BBM-like* (*BABY BOOM-like*) son genes pertenecientes a una familia de factores de transcripción de la familia APETALA2 (AP2) con implicancia en la embriogénesis somática (Conner y Ozias-Akins, 2017). La expresión ectópica de un miembro de la familia *BBM* en *Arabidopsis* condujo a la formación de embriones somáticos en los cotiledones (Boutillier et al., 2002). *PsASGR-BBML* codifica para un factor de transcripción miembro del clado *BBM-like* de la familia APETALA2/ETHYLENE RESPONSE FACTOR (AP2/ERF) de dominios de unión a ADN. Existen evidencias de que *ASGR-BBML* juega un rol importante en la partenogénesis ya que se observó este fenómeno sumado al desarrollo de embrión haploide en plantas transgénicas de mijo perla, transformadas con el transgen *PsASGR-BBML* bajo el control de su promotor y terminador nativo (Conner et al., 2008, 2015). La expresión de

PsASGR-BBML también induce la partenogénesis en arroz y maíz (Conner y Ozias-Akins, 2017; Khanday et al., 2019).

Otros genes candidatos identificados a través de experimentos genéticos son: el gen *HpARI* (*ARIADNE7*) en *Hypericum* (Schallau et al., 2010) y *PsORC3a* (*ORIGIN RECOGNITION COMPLEX*) en *P. simplex* (Siena et al., 2016). *HpARI* controlaría la aposporía, mientras que *PsORC3a* es un *pseudogen* que presenta una baja expresión en genotipos sexuales y se considera un factor genético adicional requerido para la pseudogamia de genotipos apomícticos de *Paspalum*, que presentan una adaptación para tolerar la relación genómica 4m: 1p en el endosperma para formar semillas viables (Siena et al., 2016).

Estos estudios abren la posibilidad de identificar otros genes que controlan la apomixis mediante enfoques equivalentes (Grossniklaus, 2017). A pesar de estos avances, dadas las características genéticas y estructurales de los *loci* controladores de la apomixis, la identificación de los genes clave por medio de técnicas de genética directa han sido dificultosos. Debido a esto, los estudios transcriptómicos han tenido gran relevancia en la identificación de genes asociados al carácter (Ortiz et al., 2013).

I.3.1- Identificación de genes asociados a componentes de la apomixis

La consideración de la apomixis como una desregulación en la expresión de los genes involucrados en la vía canónica sexual y no como resultado de un nuevo mecanismo molecular, es una de las teorías que ha tomado mayor relevancia en la última década (Koltunow y Grossniklaus, 2003). En esta idea se acepta que la sexualidad y la apomixis siguen vías similares durante el desarrollo del embrión y la semilla. Se cree que en las primeras etapas de la reproducción, donde se determina si la formación del saco embrionario funcional se desarrollará a partir de la meiosis de la CMM o por mitosis de una célula no reducida, se produce la activación, modulación o silenciamiento de genes específicos (Pupilli y Barcaccia, 2012). Numerosos estudios basados en la detección de transcritos de ARNm expresados diferencialmente durante el desarrollo reproductivo sexual y apomíctico fueron realizados en especies monocotiledóneas como *P. notatum* (Pessino et al., 2001; Laspina et al., 2008; Podio et al., 2014; Ortiz et al., 2017), *Pennisetum ciliare* (Singh et al., 2007), *Pennisetum squamulatum* (Vielle-Calzada et al., 1996), *Brachiaria* spp. (Leblanc et al., 1997; Dusi, 2001; Rodrigues et al., 2003; Duarte Silveira et al., 2012), *Panicum maximum* (Chen et al., 1999; Yamada-Akiyama et al., 2009), *Poa pratensis* (Albertini et al., 2004, 2005), *P. simplex* (Polegri et al., 2010; Siena et al., 2016) y *Eragrostis curvula* (Cervigni et al., 2008, Selva et al., 2012, 2017), así como en dicotiledóneas como, *Hieracium* (Guerin et al., 2000) y

Boechera (Sharbel et al., 2009). Este tipo de análisis presenta la dificultad de que los materiales utilizados en las comparaciones no constituyen líneas isogénicas que permitan simplificar la búsqueda de genes candidatos, sino que son genotipos naturales (o experimentales) altamente heterocigotas. (Pessino et al., 1999). A pesar de esto, se encontraron resultados coincidentes en diferentes especies apomícticas con respecto a transcritos diferenciales, pudiendo de esta manera acotar el número de genes relevantes y así realizar estudios detallados de su localización física en el genoma, niveles de expresión y la localización de los transcritos en los diferentes estadios del desarrollo reproductivo. Entre la lista pueden citarse a los genes *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR LIKE KINASE* (*SERK*) y *APOSTAR* (Albertini et al., 2004, 2005). *SERK* cumple un rol fundamental en el desarrollo del saco embrionario de *Poa pratensis* (Albertini et al., 2005) y presenta expresión diferencial a nivel espacial en ovarios de genotipos sexuales y apomícticos de *P. notatum* (Podio et al., 2014). *APOSTAR* contiene un dominio START de unión a lípidos y se cree que jugaría un rol importante en la meiosis y en la degeneración de las megásporas no funcionales (Albertini et al., 2005). En *Poa pratensis* *APOSTAR1* se encontró sobre-expresado en individuos sexuales en comparación con apomícticos (Albertini et al., 2005). La expresión del ortólogo de *APOSTAR2* en sacos embrionarios maduros y embriones en desarrollo de *Arabidopsis* y el fenotipo de los dobles mutantes *APOSTAR1/APOSTAR2* sugiere que este gen tiene un rol importante en el desarrollo del embrión y de la semilla (Barcaccia y Albertini, 2013). En *Boechera holbeii*, se ha identificado un candidato asociado a la apomeiosis femenina y masculina identificado *APOLLO* (el gen *APOMixis Linked LOcus*) que se encuentra sobreexpresado en los óvulos apomícticos en comparación a los sexuales (Corral et al., 2013; Mau et al., 2015) y el gen *UPGRADE2* (*UPG2*) que se sobreexpresa en las anteras de plantas apomícticas (Mau et al., 2013). *APOLLO* codifica para una exonucleasa siempre en estado heterocigota en las plantas apomícticas que posee un polimorfismo de 20 nucleótidos en la región no traducida de 5' (Corral et al., 2013). *UPG2* codifica para ARNm largo no codificante que se asocia a la formación de polen no reducido (Mau et al., 2013). Asimismo, al comparar los perfiles transcripcionales de ovarios de *Boechera nucelli* conteniendo CMM o AI se identificó un homólogo al gen *GRETCHEN HAGEN3.6* (*GH3.6*) de *Arabidopsis*, consistentemente más expresado en ovarios apomícticos que en sexuales (Zühl et al., 2019). Las proteínas de la familia GH3 están asociadas a la modulación de la respuesta de auxina. *GH3* se identificó además sobreexpresado en sacos embrionarios de *Hieracium praealtum* conteniendo AIs, lo cual sugiere un rol importante en la megasporogénesis apomíctica (Juranic et al., 2018).

En el caso particular de *P. notatum* se han realizado varios análisis transcriptómicos para identificar genes asociados a la apomixis en la especie. En un trabajo inicial, se

compararon los transcritos expresados en ovarios de genotipos sexuales y apomícticos al momento de la antesis utilizando la metodología de *differential display* (Pessino et al., 2001). Uno de los fragmentos diferenciales (ARP1), sobreexpresado en flores apomícticas y en progenies apomícticas F₁, codifica un péptido de 35 aminoácidos que lleva el dominio KSP. El dominio KSP está presente en las proteínas de la familia de las kinesinas y proporciona un sitio de fosforilación para las cdc2-quinasas que juegan un papel fundamental en el control del ciclo celular y el desarrollo del endosperma (Vanstraelen et al., 2006; Nowack et al., 2005). Una búsqueda reciente de DELTA-BLAST en la base de datos de NCBI con ARP1 mostró una ID del 66% (valor e^{-08}) con la proteína motora KIN-14P del maíz (ID de secuencia: PWZ37989.1) (Ortiz et al., comunicación personal). En otro estudio, otros 65 transcritos con expresión diferencial entre genotipos apomícticos y sexuales fueron detectados en el estado de meiosis (Laspina et al., 2008). Varios de ellos mapearon *in silicio* a una región genómica en el cromosoma 2 de arroz que anteriormente se asoció con la aposporia (Pessino et al., 1998; Pupilli et al., 2004). Por otro lado, el transcripto N2, que mapea a 20 cM de la ACL, mostró una gran similitud con el gen *LORELEY*, asociado a la entrega de gametos masculinos a la célula huevo en *Arabidopsis* (Felitti et al., 2011). Asimismo, el fragmento N69 resultó similar a una S-adenosil-L-metionina metiltransferasa. La extensión de este transcripto reveló una alta homología con un gen trimetilguanosina sintasa (*TGS1*), específico de plantas. El gen de *Paspalum*, *PnTgs1-like*, resultó expresado diferencialmente en ovarios sexuales en comparación con los apomícticos (Siena et al., 2014). Plantas sexuales de *P. notatum* transformadas con un vector conteniendo el antisentido de *TGS1* bajo un promotor constitutivo mostraron ovarios con formación de múltiples sacos embrionarios al igual que sucede naturalmente en las plantas apomícticas (Colono et al., 2019). Por su parte el fragmento N46 mostró similitud con un miembro de la familia *YODA*. La secuencia extendida, renombrada como *QUI-GON JINN (QGJ)*, se expresa en niveles elevados en la nucela de las plantas apomícticas, y su inhibición por medio de ARNi resultó en tasas significativamente reducidas de formación de saco embrionario apospóricos (Mancini et al., 2018).

Por otro lado, se realizó una comparación general de los transcritos expresados a las tres y 24 h después de la polinización de los sacos de embriones meióticos y apospóricos utilizando diferentes fuentes de polen empleando la técnica de cDNA-AFLP (Felitti et al., 2015; Depetris et al., 2018). En estos trabajos se identificaron más de 100 fragmentos expresados diferencialmente cuando se emplearon plantas apomícticas como progenitores femeninos y en donde la relación materno-paterna prevista en el endospermo difirió de 2m: 1p. En general, los transcritos expresados diferencialmente mostraron similitudes con genes asociados a procesos como la transcripción, la transducción de señales (incluida la proteína quinasa tipo lectina y la proteína quinasa alfa CK2 alfa 1), crecimiento/división celular, destino y

almacenamiento de proteínas, regulación de la expresión génica. Además, varias secuencias diferenciales al inicio del desarrollo del endospermo mostraron una gran similitud con las proteínas expresadas en respuesta a los cambios en los niveles de ATP extracelular (Felliti et al., 2015).

Otro de los enfoques radica en la identificación y caracterización molecular de mutantes para genes implicados en vías clave de la sexualidad como la formación de la célula madre de la megáspora (CMM), la embriogénesis y/o la formación del endosperma. En *Arabidopsis*, se han detectado los mutantes *dyad/switch* que muestran un fenotipo similar a la diplosporía. En estos mutantes, células adyacentes a la CMM cambian su destino celular e inician la gametogénesis. Si bien, estos mutantes tienen una alta esterilidad, producen en muy baja frecuencia descendencia triploide, indicando la funcionalidad de los sacos embrionarios derivados de células somáticas (Ravi et al., 2008). En maíz, los mutantes *ameiotic1*, un ortólogo de *SWITCH*, muestran que la CMM se divide por mitosis en lugar de meiosis (Pawlowski et al., 2009).

Una de las hipótesis más aceptadas acerca del surgimiento de las células iniciales de la aposporía a partir de células nucleares es la existencia de un mecanismo inhibitorio que solo permitiría a una célula diferenciarse en CMM en el desarrollo sexual. Mutantes por inserción de arroz para el gen *MULTIPLE SPOROCTYTE 1 (MSP1)* mostraron un número excesivo de esporocitos masculinos y femeninos. *MSP1* codifica para una proteína del tipo quinasa con repeticiones ricas en leucina (LRR-RLK). La función de este gen en arroz es suprimir la esporogénesis en las células circundantes e inhibir la formación de la pared de anteras (Nonomura et al., 2015).

Por otro lado, varios estudios respaldan la hipótesis de que las vías de metilación de ADN dependientes de ARN actúan en el control del desarrollo reproductivo de plantas y que podrían regular la diferenciación entre apomixis y sexualidad (Grimanelli, 2012). En *Arabidopsis* y *Tripsacum* se han descrito dos mutantes *ago9* y *ago104*, que dan origen a un mayor número de células arquesporales en el óvulo, indicando que estarían involucradas en el cambio de destino de células somáticas a células arquesporales. *AGO104* y *AGO9* pertenecen a la familia Argonauta (Olmedo-Monfil et al., 2010, Singh et al., 2011). Asimismo, los mutantes de maíz con pérdida de función de *dmt102* y *dmt103*, dos DNA metiltransferasas implicadas en la regulación del estado de la cromatina, presentan fenotipos con características similares a los mutantes *ago9* y también a la apomixis, con aumento en el número de sacos embrionarios meióticos y presencia de gametas no reducidas (García-Aguilar et al., 2010). La actividad de pequeños ARN ha sido estudiada en diversas especies apomícticas naturales, como *Eragrostis curvula* (Garbus et al., 2019), *P. notatum* (Podio et al., 2014; Ortiz et al., 2019)

y *Boechea* (Amiteye et al., 2011, 2013) por su posible participación en el control de la apomixis. En *P. notatum* ARN pequeños expresados diferencialmente en ovarios de plantas apomícticas y sexuales sugieren una participación en la regulación de la meiosis, control del ciclo celular, regulación transcripcional y señalización de hormonas (Ortiz et al., 2019). También en *Boechea* se identificaron ARN pequeños (miR156/157) con actividad diferencial entre óvulos sexuales y apomícticos, el cual es relevante en la regulación del factor de transcripción *SPL11* (*SQUAMOSA PROTEIN BINDING PROTIEN LIKE 11*) (*SPL11*) (Amiteye et al., 2011).

I.3.2- Estudios de herencia de la apomixis en especies de *Paspalum*

Estudios de herencia de la apomixis en especies del género *Paspalum* fueron realizados en *P. simplex* (Pupilli et al., 1997), *P. notatum* (Martínez et al., 2001; Acuña et al., 2011) y *P. guenoarum* (Aguilera et al., 2011, 2015). Los análisis genéticos en estas especies, en las cuales la apomixis se expresa al nivel tetraploide, fueron impracticables hasta la disponibilidad de individuos completamente sexuales del mismo nivel de ploidía. Por esta razón la generación artificial de éstos materiales fue de vital importancia para la determinación de la transmisión del carácter en las poblaciones segregantes (Ortiz et al., 2013).

El primer estudio del control de la apomixis en *Paspalum* fue llevado a cabo por Burton y Forbes, (1960). Estos autores propusieron que el carácter apomixis en *P. notatum* estaría controlado por unos pocos genes recesivos con influencia de factores modificadores. Estos resultados fueron obtenidos a partir de cruzamientos intraespecíficos entre plantas tetraploides supuestamente sexuales obtenidas a partir de la duplicación cromosómica de diploides y apomícticas naturales. Sin embargo, la clasificación del modo reproductivo del progenitor femenino y de los individuos derivados de las cruces se realizó mediante observaciones visuales de la uniformidad de las progenies F_2 . Probablemente, este método de evaluación no resultó efectivo para la clasificación, debido a que el modelo propuesto no pudo ser corroborado (Gates et al., 2004). Posteriormente, hacia finales de la década del 90 se generaron experimentalmente nuevos individuos completamente sexuales de *P. notatum* (Ortiz et al., 1997) y *P. simplex* (Cáceres et al., 1999) y luego de *P. plicatulum* (Sartor et al., 2009). En el primer caso identificaron una planta tetraploide completamente sexual denominada experimentalmente F_{131} , este individuo fue obtenido a partir de un cruzamiento entre una planta tetraploide altamente sexual denominada Q3664 (o SWSB), por un dador de polen apomíctico (Q3853). F_{131} mostró un 100% de sacos embrionarios de tipo meiótico y la generación de progenies exclusivamente por sexualidad (Ortiz et al., 1997). Esta planta fue posteriormente registrada en el banco de germoplasma del IBONE, bajo el código Q4188

(Quarin et al., 2003). En el caso de *P. simplex*, se obtuvieron dos individuos tetraploides completamente sexuales (denominados d1 and d2) mediante el tratamiento de semillas diploides sexuales con colchicina (Cáceres et al., 1999). En experimentos similares Sartor et al., (2009) obtuvieron dos individuos tetraploides completamente sexuales (4c-4x y 7d-4x) de *P. plicatum*. Estos primeros individuos tetraploides sexuales fueron empleados como punto de partida para la generación de poblaciones segregantes por el modo de reproducción y la determinación de la herencia del carácter, para iniciar programas de mejoramiento y realizar estudios moleculares.

En *P. notatum* Martínez et al., (2001), realizaron diversos cruzamientos entre el genotipo sexual Q4188 y un individuo de la accesión apomítica Q4117 y retrocruzas entre progenies sexuales y apomíticas. Los análisis de segregación permitieron determinar que la aposporía se comporta como un carácter simple dominante (Aaaa), que se trasmite a la progenie de manera no-mendeliana debido a una distorsión de la segregación a favor de la sexualidad. Los autores propusieron que este comportamiento esté probablemente asociado a un efecto pleiotrópico letal con penetrancia incompleta o a un factor letal parcial ligado a las gametas masculinas (Martínez et al., 2001). En estudios posteriores, se obtuvieron resultados similares en cuanto al exceso de progenies sexuales que se manifiesta en una distorsión de la segregación del carácter (Stein et al., 2004; Acuña et al., 2011). Asimismo, se determinó que la aposporía puede estar relacionada con reordenamientos cromosómicos (inversiones o translocaciones) y anomalías meióticas que podrían causar cierto grado de letalidad a los productos de la meiosis que llevan el *locus* de la aposporía, así como también supresión de la recombinación (Stein et al., 2004; Podio et al., 2012b). En el caso de *P. simplex*, se utilizó una población de mapeo generada a partir del cruzamiento entre un individuo tetraploide sexual (d2) con un apomítico natural. El análisis genético mostró que la apomixis está bajo el control de un solo alelo dominante con distorsión de la segregación a favor de la sexualidad y que la región genómica asociada está relacionada con un segmento telomérico del brazo largo del cromosoma 12 del arroz (Pupilli et al., 2001). Por su parte, en especies del grupo Plicátula, la herencia y expresividad de la apomixis fue analizada mediante cruzamientos inter-específicos entre un clon sexual (4PT) de un tetraploide inducido por colchicina de *P. plicatum* (c4-4x) y una planta apomítica de *P. guenoarum* (GR19). Se obtuvieron poblaciones F₁, F₂ y tres poblaciones de retrocruzamiento (BCs). El modo reproductivo de las plantas experimentales fue determinado por citometría de flujo de semillas y observaciones citoembriológicas. Los análisis determinaron que apomixis es transmitida por el polen de *P. guenoarum* como un factor dominante mendeliano simple (Aaaa), mientras que la sexualidad requiere una condición recesiva nulipleja (aaaa) para el/los factores determinantes del carácter (Aguilera et al., 2015).

I.3.3- Identificación del *locus* responsable de la apomixis en gramíneas

El uso de marcadores moleculares, entre otras técnicas de biología molecular han generado una cantidad considerable de información acerca de las bases moleculares que controlan la apomixis y la localización del *locus* asociado al carácter en especies de gramíneas. Marcadores moleculares ligados a la aposporía fueron detectados en *Pennisetum* (Ozias-Akins et al. 1993, 1998), *Cenchrus* (Gustine et al., 1997, Roche et al., 2001, Jessup et al., 2002), *Brachiaria* (Pessino et al., 1997, 1998) y *Paspalum* spp. (Pupilli et al., 2001, Martínez et al., 2003; Stein et al., 2007; Rebozzio et al., 2010). Los mismos han sido utilizados para la identificación la región genómica específica que gobierna al carácter a partir de estudios de mapeo comparativo (Pupilli et al., 2001, 2004) y/o mediante experimentos de FISH como por ejemplo en *Pennisetum squamulatum* y *Cenchrus ciliaris* (Akiyama et al., 2004; Goel et al., 2003), *P. simplex* (Podio et al., 2014) y *P. notatum* (Podio et al., 2013).

Los resultados obtenidos en varias especies apuntan al hecho de que la aposporía está controlada por un *locus* único que podría comprender un grupo de genes ligados que funcionan como una sola unidad genética y que se transmiten juntos a causa de una supresión en la recombinación (Grimanelli et al., 1998, Grossniklaus et al., 2001, Ozias-Akins et al., 2003, Pupilli et al., 2004, Stein et al., 2004, 2007). Estos resultados en los patrones de segregación son coincidentes con lo observado en varias especies apomícticas como *P. simplex* (Pupilli et al., 2001), *Pennisetum squamulatum*, *Tripsacum dactyloides* y *Brachiaria decumbens* (Grossniklaus et al., 2001) lo que podría constituir una característica común de la región genómica que controla el carácter en estas especies. En *Pennisetum* Ozias-Akins et al., 1998 encontraron 12 marcadores moleculares (11 SCARs y 1 STS) que segregaron estrictamente ligados con la apomixis, detectando una región hemicingota con supresión de la recombinación, presente solo en los individuos apomícticos, denominada como Región Genómica Específica de la Aposporía (*apospory specific genomic región* - ASGR). Posteriormente, se demostró que varios de estos marcadores mostraban el mismo comportamiento en *Chenchrus ciliaris* (Roche et al., 1999). En *P. notatum* el *Locus* Responsable de la Apomixis (*apomixis controlling locus* ACL) fue localizado en un grupo de ligamiento de aproximadamente 25 cM donde se asignaron 25 marcadores moleculares (RADP, RFLP y AFLP), 15 de los cuales cosegregaron estrictamente con el carácter (Stein et al., 2007). Considerando el contenido de ADN del genoma haploide (c-value= 0,575pg) determinado a través de citometría de flujo en citotipos diploides (Jarret et al., 1995) y el número de marcadores mapeando en el ACL, este bloque podría tener alrededor de 36 Mpb (Stein et al., 2007). Esta región genómica muestra una marcada supresión de la recombinación y apareamiento preferencial de cromosomas (Martínez et al., 2003, Stein et al., 2004). Las causas de la ausencia de recombinación son discutidas, una de las hipótesis

se refiere a su localización física cercana a regiones heterocromáticas como por ejemplo áreas pericentroméricas o periteloméricas (Ozias-Akins et al., 1998; Pupilli et al., 2001). En *P. notatum* estudios citogenéticos realizados en la microesporogénesis de un genotipo sexual de (Q4188) y uno apomítico (Q4117) detectaron en este último, bivalentes rezagados luego de la metafase I y presencia de puentes de cromatina. Estas anomalías meióticas solo se observaron en el genotipo apomítico (Q4117) y se atribuyen a reordenamientos genéticos de uno de los cromosomas que podrían corresponder a una inversión paracéntrica situada cerca del centrómero (Stein et al., 2004, Podio et al., 2012).

Con respecto a la localización física de la región que controla la apomixis, Goel et al., (2003) fueron los primeros en intentar localizarla en *Pennisetum squamulatum* y *Cenchrus ciliaris*. Los resultados de este análisis permitieron concluir que existe un único cromosoma conteniendo al *locus* responsable de la aposporia que está ausente en los genotipos sexuales. Sin embargo, *P. squamulatum* podría presentar secuencias homólogas en otro cromosoma (Akiyama et al., 2004). Por otro lado, se determinó que el ASGR de estas especies se encuentra en regiones cercano a zonas ricas en heterocromatina (Akiyama et al., 2004). En *P. simplex* se aisló un clon de BAC (346H10) que posee secuencias 100 % ligadas a la aposporia. Hibridaciones FISH con dicho clon (346H10) determinaron que el ACL se halla en una región no pericentromérica (Calderini et al., 2006). Asimismo, en *P. notatum* experimentos de hibridación FISH utilizando el mismo BAC sobre meiocitos de los genotipos Q4117 (apomítico) determinaron que el ACL se encuentra localizado en la región distal de un cromosoma próximo a regiones heterocromáticas el cual segrega a un único polo en anafase I (Podio et al., 2014). Por otro lado, las hibridaciones del genotipo sexual (Q4188) no mostraron señales de hibridación significativas, por lo cual se sugiere que es un *locus* hemigota de la región analizada (Podio et al., 2014).

I.3.3.1- Estudios de mapeo comparativo y características del ACL en especies de *Paspalum*

Numerosos trabajos coinciden con el hecho de que la reproducción apomítica en *Paspalum* está controlada por un único *locus* dominante que cuando está presente confiere casi el 100 % de la aposporia, un grado variable de partenogénesis y la capacidad de formar endosperma con una relación de genoma materno:paterno de 4:1 (Cáceres et al., 2001; Martínez et al., 2001, 2003; Pupilli et al., 2004; Stein et al., 2004). Es probable que estos tres componentes de la apomixis sean heredados como un bloque conjunto, ya que hasta el momento no se han documentado eventos de recombinación en estos caracteres (Ortiz et al., 2013). Debido a estas características genéticas sumadas al gran tamaño de la región asociada

(ACL) y a la carencia de un genoma de referencia, la utilización de estrategias de genética directa para la identificación de los genes que controlan el carácter son de difícil implementación y de resultado incierto. Por esto, una alternativa es intentar abordar el tema por estudios de mapeo comparativo y análisis de expresión de genes relacionados.

La genética comparativa hace referencia a la comparación estructural y funcional entre genomas con el fin de estimar similitudes y diferencias entre las organizaciones biológicas (Gale y Devos, 1998). La investigación en genética comparativa tiene varios objetivos: 1) comparar la organización de genomas relacionados e inferir los procesos básicos de la evolución de los genomas, 2) transferir información de especies modelo a organismos relacionados menos caracterizados, y 3) integrar información sobre la ubicación y expresión de genes entre especies (Sorrells et al., 2003). Los análisis de genética comparativa han mostrado la existencia de conservación en el contenido (sintenia) y orden génico (colinealidad) en los genomas de diferentes especies de plantas y animales.

En gramíneas, los primeros análisis comparativos de genomas se realizaron a través de la utilización de sondas RFLP y empleando como referencia el genoma de arroz, debido a que posee un tamaño relativamente pequeño (aproximadamente 400Mb) en comparación con otras especies de gramíneas como maíz (2.400Mb) (Devos y Gale, 1997). En estos estudios los términos colinearidad y sintenia hacen referencia a la conservación del orden de genes/*locus* en un segmento cromosómico y a la presencia de regiones cromosómicas conservadas que derivan de un antecesor común, respectivamente (Devos y Gale, 1997). El término "sintenia" está siendo últimamente reemplazado por "ortología" para referirnos a segmentos cromosómicos o *loci* génicos conservados en distintas especies provenientes de un mismo ancestro común (Passarge et al., 1999). A pesar de la gran diferencia en el nivel de ploidía, el número de cromosomas y el contenido de ADN (valor C), estos trabajos reconocieron que los genomas de gramíneas mantienen un alto grado de macro-sintenia y colinealidad (Gale y Devos, 1998), y posteriormente se demostró también un nivel moderadamente alto de micro-sintenia (conservación a nivel de genes) (Tarchini et al., 2000; Keller y Feuillet, 2000). Estudios de mapeo genético en trigo, maíz, arroz y otras especies de gramíneas con sondas de ADN comunes han revelado una conservación notable del contenido y el orden de los genes por más de 60 millones de años después de la diferenciación de las *Poaceae*. (Devos y Gale, 1998). Asimismo, Paterson et al., (1996) predijeron que entre el 43% y 58% de la extensión cromosomal permaneció colineal a lo largo del período evolutivo que separa las monocotiledóneas de las dicotiledóneas. Análisis posteriores determinaron que la colinearidad presente en grandes segmentos cromosomales no necesariamente se mantiene al nivel de secuencias (microcolinearidad) (Li y Gill, 2002).

Estudios de mapeo comparativo mediante la utilización de sondas de RFLP de arroz permitieron conocer las relaciones sinténicas entre segmentos cromosómicos de éste y el *locus* responsable de la apomixis en varias especies de *Paspalum* (Figura 5). Además, se determinó que existe una estrecha relación del ACL entre varias especies del género (Ortiz et al., 2013). Utilizando sondas heterólogas Pupilli et al., (2001) identificó un conjunto de marcadores posicionados en la región distal del brazo largo del cromosoma 12 de arroz, que segregaron estrictamente con la apomixis en *P. simplex*, lo mismo fue observado en *P. malacophyllum* (Hojsgaard et al., 2011). Resultados similares se obtuvieron en *P. notatum*, donde se detectó, además, *sintenia* del ACL con el cromosoma 2 de arroz y los cromosomas 3 y 5 de maíz (Martínez et al., 2003; Pupilli et al., 2004; Podio et al., 2012a). Los resultados del análisis de las secuencias derivadas de marcadores (RAPD, AFLP y RFLP) completamente ligados al ACL mostraron similitud con transposones y retrotransposones, así como con secuencias de copia simple codificantes y no codificantes. Entre estas últimas se detectaron secuencias asociadas: a proteínas hipotéticas, una proteína ribosomal, una proteína con dominio KH y con una peptidil-prolil cis-trans isomerasa. Posteriormente, la extensión de uno de los marcadores por caminata cromosomal permitió la identificación de una secuencia similar a una metiltransferasa de tipo MT-A70 (N6-adenosine-methyltransferase MT-A70-like protein) (Podio et al., 2012a).

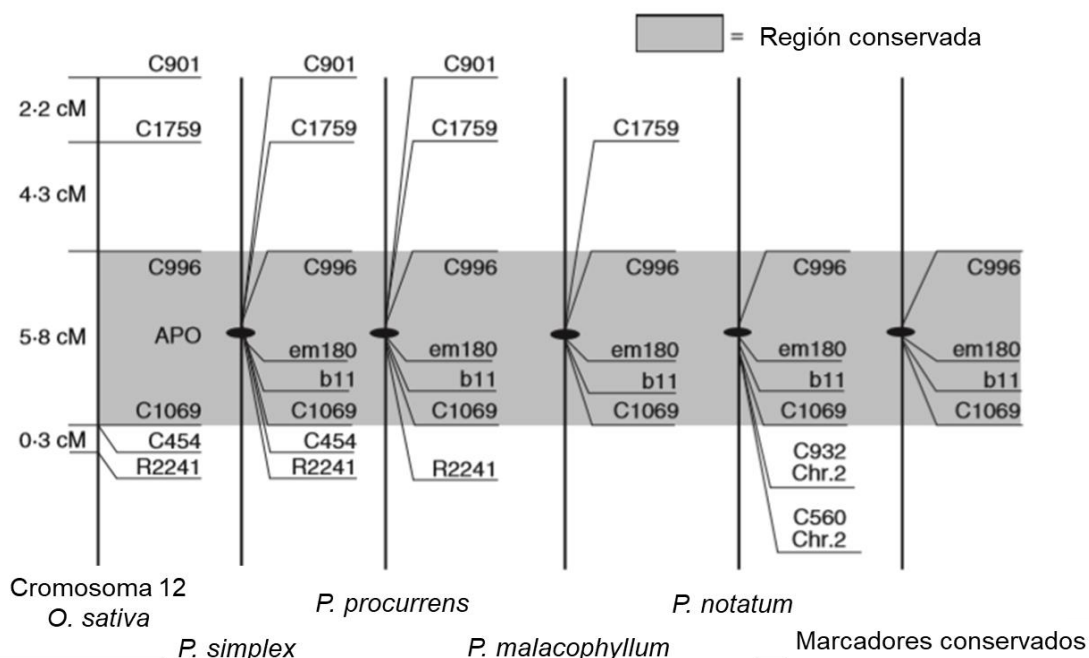


Figura 5. Mapeo comparativo de la región asociada a la apomixis en cuatro especies de *Paspalum*, y su relación con un fragmento homeólogo del cromosoma 12 de arroz. Los marcadores incluidos en el área resaltada están conservados y vinculados a la apomixis en las cuatro especies de *Paspalum* consideradas (tomado de Ortiz et al., 2013).

Se ha determinado que la organización estructural del bloque cromosómico que lleva los genes de la apomixis incluye la acumulación de elementos transponibles, elementos repetitivos y pseudogenes (Pupilli y Barcaccia, 2012). La determinación de la estructura genética del ACL podría proporcionar información clave sobre los genes que regulan componentes de la apomixis. En *P. squamulatum* (Akiyama et al., 2004), *C. ciliaris* (Conner et al., 2008) y *P. simplex* (Calderini et al., 2006, 2011) esta tarea se ha intentado a través de secuenciación de clones de BAC que contienen marcadores moleculares completamente ligados a la aposporía. A partir de una genoteca de BAC de *P. simplex* se aisló el clon 346H10 que contiene secuencias 100 % ligadas a la aposporía en la especie, el 10 % de las cuales son no codificantes, 13 % están relacionadas con transposones y retrotransposones, y el 4 % tienen una elevada homología con genes conocidos (Calderini et al., 2006). Dos sectores codificantes resultaron homólogos a los dominios EXS y PKD (dominio de proteína quinasa) (Calderini et al., 2006). Un análisis comparativo con las bases de datos de arroz mostró que los mismos eran similares a genes de *Oryza sativa* que se localizaban en la región distal del brazo largo del cromosoma 12, junto a secuencias de marcadores de RFLP (C1069, C454, R2241), que ya han sido informados como 100% ligados a la aposporía en diferentes especies de *Paspalum* (Pupilli et al., 2004; Hojsgaard et al., 2011). *P. simplex*, *P. malacophyllum* y *P. procurrens* comparten al menos un fragmento ligado a la apomixis representado por las sondas *PsEXS* (R2241), C1069, C996A y R1759, que abarcan una región cromosómica de 13 cM (1.675 kb) en arroz. Esta región se reduce en *P. notatum* a un segmento de 5,8 cM en la que solo dos marcadores de los mencionados anteriormente (C996A y C1069) se encuentran conservados lo cual restringe la región del mapa genético de arroz que a una distancia física de alrededor de 1.062 kb. Esta región genómica de *Paspalum* (delimitada por los dos marcadores C1069 y C996) probablemente incluya determinantes genéticos clave de la reproducción apomíctica. Este enfoque de mapeo comparativo es conceptualmente similar al mapeo por delección (*deletion mapping*) empleado por Catanach et al., (2006) en *Hieracium*. En el caso de *Paspalum spp.* supone que las delecciones espontáneas ocurridas durante la especiación podrían haber descartado los genes que no son imprescindibles para la reproducción apomíctica. Este tipo de análisis contribuyó a reducir el tamaño del ACL, vinculado a la apomixis en varias especies. El análisis de las secuencias génicas presentes en este segmento de arroz mostró genes con anotaciones posiblemente relacionadas al modo de reproducción. Entre ellas se encuentran: i) el **LOC_Os12g40890** (proteína inducida por auxinas), ii) el **LOC_Os12g41060** (proteína con dominio AP2), iii) el **LOC_Os12g42160** (cinesina) y iv) **LOC_Os12g40770** (anquirina-1) (Hojsgaard et al., 2011), v) el **LOC_Os02g52290.1** (una peptidil-prolil cis-trans isomerasa (PPIasas) de tipo FKBP; vi) el **LOC_Os12g40560.1** (una proteína con dominio KH) y vii) **LOC_Os02g45110.1** (una N6-adenosina metiltransferasa del tipo MT-A70) (Podio et al., 2012). Dadas éstas anotaciones y

con el objetivo de profundizar los estudios derivados del mapeo comparativo, en esta tesis se estudiaron los posibles genes ortólogos (de *P. notatum*) correspondientes a la anquirina-1, la proteína inducida por auxinas y a la proteína con dominio AP2. Las principales características de las familias génicas que incluyen a estos miembros se describen a continuación.

I.4- Familia de genes con repeticiones Anquirina (ANK)

Como fue descrito previamente, los estudios de mapeo comparativo del ACL en varias especies de *Paspalum* determinaron que uno de los genes predichos (LOC_Os12g40770) localizados en el segmento del cromosoma 12 del arroz, ubicado entre los marcadores C1069 y C996 (sinténico al ACL), codifica para una proteína con repeticiones anquirina (Ankyrin-1) (Hojsgaard et al., 2011). De acuerdo al atlas de expresión del *Rice Genome Annotation Project* (<http://rice.plantbiology.msu.edu/index.shtml>), este gen muestra un pico de expresión en tejidos reproductivos de arroz. Además, es de destacar que una proteína con repeticiones ANK fue asociada a la apomixis en estudios de expresión realizados con cDNA-AFLPs en *Poa pratensis* (Albertini et al., 2004). Estos autores encontraron que uno (EST #60) de los 179 fragmentos expresados diferencialmente entre flores apomícticas y sexuales, mostró un 71% de identidad (e-value = $7e^{-7}$) con una proteína quinasa de *Arabidopsis* con repeticiones de anquirina del tipo RING finger (ANK-RF); 81% (e-value = $3e^{-9}$) con un EST expresado en pistilos apomícticos de *Pennisetum ciliare* (Jessup et al., 2003) y 88% (e-value $7e^{-69}$) con un EST expresado en embriones de *Hordeum vulgare* un día después de la polinización (Albertini et al., 2004). Estudios de expresión del EST #60 en distintos momentos del desarrollo floral de *P. pratensis* mostraron un pico de expresión en el estadio de premeiosis, luego de lo cual disminuye (en postmeiosis y antesis) en ambos genotipos, pero con mayores niveles en las flores apomícticas (Albertini et al., 2004). La extensión de este fragmento por experimentos de 5' y 3' RACE permitieron obtener una secuencia de 2.501 nt (que incluye 300 nt del 5' UTR y un ORF de 1.845 nt que codifica para una proteína de 614 aminoácidos y 356 nt del 3' UTR) (Genbank AJ810709). El análisis de BLAST de esta secuencia determinó la presencia de un dominio DUF248 que se encuentra en muchas enzimas del tipo metiltransferasas (Albertini et al., 2004). La proteína predicha muestra una alta homología con proteínas de la familia S-adenosil-L-metionina (SAM o AdoMet) -metil transferasa de *Arabidopsis* (AT1G26850, AT4G18030, AT4G1040, AT1G33170, AT2G45750, AT2G43200 y otras) y arroz (Os02t0675700-01 Os03t0379100, Os09t0415700, Os10t0569300, Os11t0601600 y otras). Las enzimas del tipo SAM-metiltransferasas, utilizan al donante SAM como cofactor para metilar proteínas, moléculas pequeñas, lípidos y ácidos nucleicos (Roje, 2006). Todas las SAM-MTasas contienen un

dominio de unión a SAM estructuralmente conservado y participan de prácticamente todos aspectos del metabolismo y desarrollo de las plantas (Moffatt y Weretilnyk, 2001).

Las proteínas con repeticiones anquirinas corresponden a una de las mayores superfamilias de proteínas conocidas en todas las especies, incluidas las plantas (Vo et al., 2015). Las proteínas con repeticiones de anquirinas fueron descritas inicialmente por Breenden y Nasmyth, (1987), como secuencias de 33 aminoácidos repetidas en tándem presentes en dos genes (*Swi6* y *Cdc102*) reguladores del ciclo celular de levadura. Repeticiones semejantes también fueron observadas en la proteína de señalización NOTCH3 de *Drosophila melanogaster*. Posteriormente, se describieron 24 copias de esta misma repetición en una proteína humana denominada ANQUIRINA, relacionada con el citoesqueleto, a partir de la cual se le dio nombre a la repetición (ANK) (Lux et al., 1990). Este dominio proteico es uno de los más comunes debido a que se encuentra ampliamente distribuido en una gran variedad de organismos que van desde los virus al humano (Sedgwick y Smerdon, 1999). El hecho de que este motivo esté conservado en organismos tan distantes evolutivamente indica que cumplen un papel importante en procesos basales del metabolismo (Sedgwick y Smerdon, 1999). Las repeticiones en tándem se encuentran generalmente de cuatro a seis veces, aunque la cantidad puede variar desde una a 30 (Mosavi et al., 2004). La estructura tridimensional de las proteínas con dominio ANK consta de dos hélices- α antiparalelas conectadas por una serie de motivos β -hairpin invertidos. Un análisis de la conservación de los aminoácidos reveló que el consenso de residuos es esencial como determinante estructural del motivo ANK y que los aminoácidos no conservados, usualmente ubicado en la región β -horquilla/bucle y α -helix, son responsables del reconocimiento de la interacción con otras proteínas (Vo et al., 2015). El plegamiento de las repeticiones ANK juega un rol importante para la variedad de funciones que cumple (Chakrabarty y Parekh, 2014). Además, se ha demostrado que una sola repetición ANK no es capaz de plegarse si no forma una interface con otra repetición, por lo que la unidad mínima para su funcionamiento es de dos repeticiones (Zhang y Peng, 2000). Se sabe que las repeticiones ANK median en las interacciones proteína-proteína (Michaely y Bennett, 1992; Li et al., 2006) y además actúan como chaperonas moleculares (Shen et al., 2010). Al parecer los genes ANK están conservados a nivel estructural más que a nivel funcional (Bork, 1993).

Las proteínas ANK reportadas en plantas se clasifican en 13 subfamilias basadas en diferentes dominios acompañantes, identificados a través de numerosos estudios de estructura de genoma y perfiles de expresión de genes (Vo et al., 2015). Dado que el dominio ANK por sí mismo no tiene actividad enzimática o función específica, su cooperación con dominios adicionales es crucial en la determinación de la función distintiva de las proteínas

que las llevan (Vo et al., 2015). En las plantas, este tipo de proteínas está generalmente involucrada en procesos fisiológicos y del desarrollo como: la señalización y el crecimiento (Yuan et al., 2013), la diferenciación de plástidos (Garcion et al., 2006), la embriogénesis (Albert et al., 1999), la biogénesis de cloroplastos (Bae et al., 2008), la formación de grana (Cui et al., 2011), la morfogénesis foliar (Ha et al., 2004), la germinación del polen y el crecimiento polarizado del tubo polínico (Huang et al., 2006). Asimismo, proteínas con repeticiones ANK fueron asociadas al desarrollo floral en arroz (Huang et al., 2009). Además, se ha observado que estas proteínas juegan un papel importante en respuesta a estreses bióticos y abióticos como, la tolerancia a la sequía (Sakamoto et al., 2013), la regulación mediada por ABA de los niveles de las especies reactivas del oxígeno producidas bajo estrés salino (Sakamoto et al., 2008), y varias enfermedades de plantas (Lu et al., 2005), incluidas las generadas por hongos (Mou et al., 2013).

La disponibilidad de datos genómicos junto con el desarrollo de los análisis bioinformáticos ha llevado a investigar exhaustivamente la familia de genes *ANK* en plantas como, *Arabidopsis* (Becerra et al., 2004), arroz (Huang et al., 2009), maíz (Jiang et al., 2013), tomate (*Solanum lycopersicum*) (Yuan et al., 2013), *Physcomitrella patens* (Mahmood y Tamanna et al., 2016) y soja (Zhang et al., 2016). El número de genes, el número de repeticiones y las asociaciones con diferentes dominios varían considerablemente entre especies (Tabla 1).

En arroz, Huang et al., (2009) observaron que el número de genes *OsANK* dispuestos en tándem era mucho mayor que el de aquellos involucrados en los eventos de duplicación de segmentos cromosómicos. Por lo tanto, sugieren que las *OsANK* representan una gran familia génica que evoluciona rápidamente. Además, postulan que las duplicaciones en tándem de regiones cromosómicas podrían haber jugado un papel clave en la expansión de esta familia de genes. Este fenómeno también se observó en algunas otras familias de genes de arroz como la familia F-box (Jain et al., 2007). Curiosamente, se encontró que en arroz la mayoría de los genes duplicados en tándem pertenecen a las subfamilias ANK-M, ANK-TM y ANK-TPR, lo que explica la gran cantidad de miembros pertenecientes a estas tres subfamilias, especialmente a la subfamilia ANK-TPR. Dado que los miembros de ANK-TPR (22 miembros) en arroz son mucho más que los presentes en la misma subfamilia de *Arabidopsis* (solo un miembro), maíz (dos miembros) y tomate (cuatro miembros), se supone que ANK-TPR en arroz podría haber sufrido múltiples eventos de duplicación para ganar miembros durante el proceso de evolución (Huang et al., 2009).

Tabla 1. Características y distribución de las subfamilias ANK en cuatro especies de plantas* (tomado de Vo et al., 2015).

Subfamilias **	Descripción	Arroz	Maíz	<i>Arabidopsis</i>	Tomate
ANK-M	Proteínas ANK solo con repetición anquirina	73	30	18	26
ANK-TM	Proteínas ANK transmembrana	37	15	40	25
ANK-TPR	Proteínas ANK con repetición TPR o PPR	22	2	1	4
ANK-RF	Proteínas ANK con un dominio <i>RING finger</i>	9	9	5	7
ANK-ZF	Proteínas ANK con un dominio <i>zinc finger</i>	7	3	6	8
ANK-BTB	Proteínas ANK con un dominio BTB	6	2	7	7
ANK-IQ	Proteínas ANK con un motivo de unión calmodulin	4	1	4	7
ANK-PK	Proteínas ANK con actividad quinasa	4	4	7	9
ANK-BPA	Proteínas ANK con dominio ARF <i>GTPasa-activating</i>	3	2	4	4
ANK-IT	Proteínas ANK con un proteína canal de K ⁺	0	0	6	7
ANK-GPCR	Proteínas ANK con un dominio <i>GPCR-chaperone1</i>	0	0	0	4
ANK-MS	Proteínas ANK con un dominio <i>motile-sperm</i>	1	0	0	4
ANK-O	Proteínas ANK con otros dominios	9	3	7	15
Número total de genes		175	71	105	130

*Esta información fue extraída de arroz (Huang et al., 2009), maíz (Jiang et al., 2013), *Arabidopsis* (Becerra et al., 2004) y tomate (Yuan et al., 2013).

**TM, dominio *transmembrane*; TPR, *tetratricopeptide repeats*; RF, dominio *RING finger* domain; ZF, dominio *zinc finger*; BTB, dominio BTB/POZ; IQ, dominio *calmodulin-binding*; PK, dominio S_TKc o Pkinase-Tyr; BPA, dominios BAR, PH, y ArfGAP; IT (*ion trans*), dominio *transmembrane, cyclic nucleotide-binding* y KHA; GPCR, dominio *GPCR-chaperone1*; MS, dominio *motile-sperm*; O, otros dominios.

En plantas, las primeras caracterizaciones moleculares y funcionales de genes codificantes para proteínas con repeticiones anquirina (ANK) fueron realizadas en *Arabidopsis*. La primera proteína ANK reportada en la especie fue AKR, la cual es regulada por la luz y juega un rol importante en la diferenciación celular y el desarrollo (Zhang et al., 1992). Además, se observó que la sobreexpresión del ARN sentido o antisentido del gen *AKR* produce un fenotipo clorótico y que *AKR2A* forma parte de la biogénesis de la proteína de la envoltura externa de cloroplastos (Bae et al., 2008). *BOP1* es otro de los genes ANK presente en *Arabidopsis*, esencial para la morfogénesis de hoja (Ha et al., 2004). EMB506 es una proteína crucial para la embriogénesis de *Arabidopsis*, la misma contiene cinco repeticiones anquirina ubicadas en tándem en la mitad del extremo C-terminal (Albert et al., 1999). Estudios posteriores demostraron que EMB506 interacciona, a través de los dominios ANK, con la proteína AKRP codificada por *AKR*. Ambas proteínas EMB506 y AKRP son esenciales en la diferenciación plástica, relacionado con la diferenciación celular, morfogénesis y organogénesis durante el ciclo de vida de la planta (Garcion et al., 2006). *TIP1* es un gen ANK presente en *Arabidopsis*, codificante para una proteína S-acil transferasa que afecta el crecimiento celular durante toda la vida de la planta (Hemsley et al., 2005). Yu et al., (2010) informaron que la proteína ANK6 con repeticiones anquirina es esencial para la fertilización,

específicamente en el reconocimiento de gametas en *Arabidopsis*. Se observaron niveles altos de expresión de *ANK6* (At5g61230) en gametófitos masculinos y femeninos antes y durante la fertilización. Además, la pérdida de función de *ANK6* resulta en letalidad embrionaria. *ANK6* se localiza en la mitocondria donde interactúa con *SIG5*, un factor de transcripción previamente reportado como esencial para la fertilidad (Yu et al., 2010).

Por otra parte, en *Lilium longiflorum* *LIANK* (gen *ANK*) es fundamental para germinación del polen y el crecimiento del tubo polínico. Se observó que la sobre-expresión de *LIANK* causa un crecimiento anormal del tubo polínico, mientras que el silenciamiento de este gen mostró una disminución del crecimiento polarizado del extremo del tubo polínico (Huang et al., 2006). *MjXB3* (*E3 UBIQUITIN LIGASE*) es un gen que codifica para una proteína con repeticiones ANK de la subfamilia ANK-RF asociado al desarrollo floral de *Mirabilis jalapa* y *Petunia corollas*. Los niveles de expresión de este gen fueron muy elevados en pétalos de flores senescentes de *Mirabilis jalapa*. Resultados similares se observaron en *Petunia corollas* cuando el silenciamiento de *MjXB3* produjo una extensión de dos días en la vida de las flores (Xu et al., 2007).

En arroz, análisis preliminar con mutantes de ADN-T revelaron que dos genes *ANK* de arroz, pertenecientes a la subfamilia ANK-TPR, similares a *AtTPR10* de *Arabidopsis* (Prasad et al., 2010; Paeng et al., 2020), mostraron fenotipos letales (Jeon et al., 2000). Estos resultados sugieren un papel crucial de estos genes en el crecimiento y desarrollo del arroz (Vo et al., 2015). Asimismo, seis genes *ANK* de arroz pertenecientes a la misma subfamilia (ANK-TPR) presentaron niveles elevados de expresión en tejidos reproductivos comparado con tejidos vegetativos. Cinco de estos mostraron la mayor expresión en panículas en desarrollo y el sexto tuvo niveles de expresión elevados en panícula y endosperma (Huang et al., 2009). Vale destacar que la mayoría de las proteínas que contienen motivos TPR están asociadas con complejos multiproteicos, y existe amplia evidencia que indica que los motivos TPR son importantes para el funcionamiento de los complejos de chaperonas, ciclo celular, transcripción y transporte de proteínas. El motivo TPR puede representar una antigua unidad de interacción proteína-proteína que ha sido reclutado por diferentes proteínas y adaptado para funciones específicas (Blatch y Lässle, 1999).

Estos antecedentes justifican el estudio de las secuencias ortólogas al *locus* LOC_Os12g40770 presentes en genotipos sexuales y apomícticos tanto al nivel genómico como transcriptómico, a fin de determinar si proteínas de este tipo tienen relación con el modo reproductivo.

I.5- Familia de genes de respuesta temprana a auxina (*Aux/IAA*)

El ácido indol acético (IAA) es una fitohormona de la familia de las auxinas que regula varios procesos del crecimiento y desarrollo de las plantas que incluyen entre otros la dominancia apical, la respuesta gravitrópica, la embriogénesis y organogénesis, la diferenciación vascular, la iniciación del eje radicular y raíces laterales, y el alargamiento del brote (De Smet y Jürgens, 2007; Ljung, 2013). Los cambios espaciales y temporales en los niveles de auxinas desencadenan la reprogramación de genes que se activan en respuesta a ésta hormona en tejidos específicos y que requieren de la acción de los denominados “genes de respuesta temprana”. Estos últimos son los mediadores entre los niveles intracelulares de auxina y los genes blanco (que se activan en respuesta al cambio de la concentración de la fitohormona). Entre las principales familias de genes que intervienen en la respuesta temprana se encuentran los codificantes para proteínas *AUX/IAA* (*AUXIN/INDOLEACETIC ACID PROTEINS*), FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN DE RESPUESTA A AUXINA (*ARFs*, *AUXIN RESPONSE FACTORS*), la ÁCIDO CARBOXÍLICO 1-AMINOCLICLOPROPANO SINTASA (*ACS*), la GLUTATHIONE-S-TRANSFERASE (*GH2/4-like*) y las GRETCHEN HAGEN 3 (*GH3*). Participan también los ARN pequeños regulados por auxina (*SAUR*, *small auxin up RNA*) (Abel y Theologis, 1996; Guilfoyle et al., 1998; Goldental-Cohen et al., 2017).

Los miembros de la familia *Aux/IAA* han sido identificados como genes codificantes para proteínas nucleares de vida corta que desempeñan un papel crucial en la represión de los genes *ARFs* (Abel et al., 1994; Dreher et al., 2006). Las proteínas *Aux/IAA* comparten cuatro motivos conservados: el dominio I, presenta un consenso de repetición de leucinas (LXLXLX), que es responsable de la represión de sus genes blanco y del reclutamiento del correpresor TOPLESS (TPL) (Tiwari et al., 2004; Szemenyei et al., 2008). El dominio II, contiene la secuencia consenso GWPPV, denominado “*degron*” que le confiere inestabilidad a la proteína y provoca la degradación rápida de las *Aux/IAA* al interactuar con las proteínas F-box TIR1/AFB (Dharmasiri y Estelle, 2004; Tiwari et al., 2004). Mutaciones puntuales o deleciones en esta secuencia puede aumentar la estabilidad de éstas proteínas y por lo tanto genera nuevos fenotipos insensibles al aumento de los niveles de auxinas (Von Behrens et al., 2011; Ludwig-Müller, 2014). Los dominios C-terminal III y IV son regiones de dimerización involucradas en la homo y heterodimerización con proteínas *Aux/IAA* y/o con los factores de respuesta a auxina (*ARFs*), respectivamente (Guilfoyle, 2015). Los dominios III y IV comparten homología con el dominio de dimerización C-terminal (CTD) de las proteínas *ARF* (Kin et al., 1997; Guilfoyle y Hagen, 2012; Korasick et al., 2015). En general, las variaciones en estos dominios pueden contribuir a las diversas funciones en las vías de señalización de auxinas, lo cual facilita aún más los roles múltiples desempeñados por las *Aux/IAA* en respuesta a cambios en el ambiente (Luo et al., 2018). Además, las proteínas *Aux/IAA* poseen dos señales

de localización nuclear (NLS), una posicionada entre el dominio I y II, y la otra sobre este último (Abel et al., 1994; Wu et al., 2012).

Un avance importante para la comprensión de la señalización de auxinas fue el descubrimiento de la familia de receptores de auxina TIR1/AFB (Dharmasiri y Estelle, 2004; Kepinski y Leyser, 2005). Las proteínas F-box TIR1/AFB forman parte del complejo proteico ubiquitina ligasa SCF^{TIR1} junto a otras tres subunidades (ASK1, CUL1 y RBX) y son las encargadas de censar los niveles de auxina en el núcleo. TIR1/AFB se unen a la auxina (IAA), formando un complejo co-represor junto con las proteínas represoras Aux/IAA, actuando así, como reguladores negativos de la señalización de auxina. A niveles bajos de auxina, las proteínas Aux/IAA con el co-represor TOPLESS (TPL) se unen a las proteínas ARFs, reprimiendo la expresión de sus genes blanco (Szemenyei et al., 2008; Ito et al., 2016) (Figura 6). Por el contrario, altos niveles de IAA promueven la formación del complejo co-receptor (TIR1/AFB)-IAA-(Aux/IAA), lo cual desencadena la ubiquitinación de las proteínas Aux/IAA y su consiguiente degradación de las mismas vía proteosoma 26S (Tan et al., 2007; Parry et al., 2009; Weijers y Wagner, 2016). De esta manera los ARFs quedan libres para unirse a los promotores de genes que contengan los elementos de respuesta a auxinas (*Auxin-response element*) (AuxRE) (TGTCTC), para activar o reprimir la transcripción (Weijers et al., 2005; Li et al., 2016). Un esquema de este mecanismo se muestra en la Figura 6.

Las diferentes combinaciones de proteínas TIR1/AFB-Aux/IAA generalmente tienen afinidades distintas de unión a la auxina, y los niveles de auxina varían en los distintos tejidos y fases del desarrollo, lo cual resulta en efectos distintos de detección de la hormona y su respuesta (Parry et al., 2009; Calderón Villalobos et al., 2012; Lavy y Estelle, 2016; Trenner et al., 2017). De esta manera, el cambio dinámico temporal y espacial en los niveles de auxina puede finalmente ser transformado en la señalización de reprogramación génica, regulando así, de manera precisa los procesos de crecimiento y desarrollo de las plantas (Luo et al., 2018).

Por otro lado, se ha descrito una vía alternativa de señalización de auxina independiente de la vía de degradación de las Aux/IAA por el proteosoma, que actúa a través de un supuesto receptor de auxina ABP1 (AUXIN BINDING PROTEIN), que se encuentra tanto en el retículo endoplasmático como en la pared celular. Se ha sugerido que esta vía juega un papel importante durante la división y el alargamiento celular (Effendi y Scherer, 2011) (Figura 6). Se ha demostrado que esta vía de señalización es importante para el relajamiento de la pared celular, la regulación de la endocitosis y el reordenamiento del citoesqueleto durante la expansión celular (Robert et al., 2010; Xu et al., 2010)

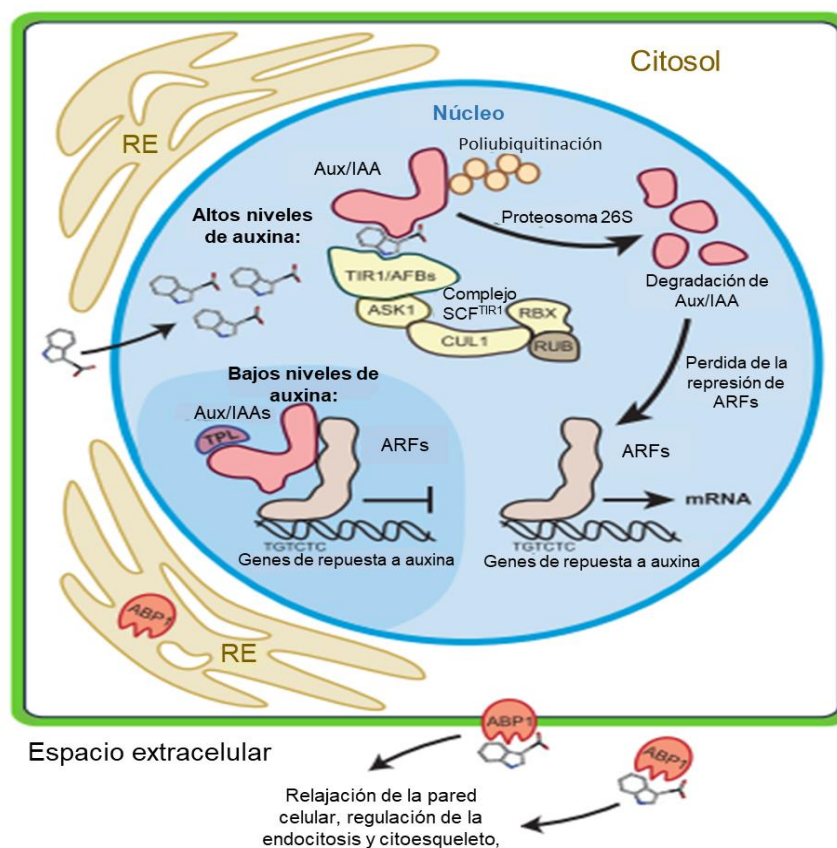


Figura 6. Componentes claves en la percepción y señalización de auxinas. En el núcleo, IAA se une a sus receptores, las proteínas F-box (TIR1/AFBs) y la proteína Aux/IAA. TIR1/AFB y Aux/IAA funcionan como co-receptores para IAA, uniéndose a esta con alta afinidad. Cuando los niveles de IAA son bajos (fondo azul oscuro), las proteínas Aux/IAA forman heterodímeros con los factores de respuesta a auxina (ARFs) para reprimir la transcripción génica. La proteína TPL funciona como un co-represor transcripcional para Aux/IAA. Cuando los niveles de IAA son altos, la unión de IAA a sus co-receptores dirige a las proteínas Aux/IAA para su degradación por el proteosoma 26S, lo cual lleva a la desrepresión de los ARF y la consiguiente expresión de genes de respuesta a auxina. Las proteínas ABP1 se cree que también funcionan como receptores IAA, mediando respuestas rápidas de auxina como, relajamiento de la pared celular, reordenamiento del citoesqueleto y regulación de la endocitosis, lo cual lleva a la expansión celular. (Modificado de Ljung, 2013)

Los primeros genes *Aux/IAA* (*PS-IAA4/5* y *PS-IAA6*) fueron aislados de *Pisum sativum* L. (Theologis et al., 1985; Oeller et al., 1993). Posteriormente, basándose en análisis de homología, se aislaron 14 genes *Aux/IAA* de *Arabidopsis* (Abel et al., 1995). Con el advenimiento de la secuenciación del genoma, se identificaron numerosos genes de la familia *Aux/IAA* en 30 especies de plantas, incluidos 29 genes de *Arabidopsis* (Liscum y Reed, 2002), 31 de *Oryza sativa* (Jain et al., 2006), 34 de *Zea mays* (Ludwig et al., 2013), 26 de *Sorghum bicolor* (Wang et al., 2010), 26 de *Citrus* (Xie et al., 2015), 26 de *Eucalyptus grandis* (Yu et al., 2015), 26 de *Solanum lycopersicum* (Audran-Delalande et al., 2012), 26 de *Solanum tuberosum* (Wu et al., 2012), 26 de *Vitis vinifera* (Çakir et al., 2013) y 35 de *Populus trichocarpa* (Kalluri et al., 2007). Curiosamente, se observó que una gran proporción de genes

Aux/IAA se generaron a partir de eventos de duplicación génica durante el proceso de evolución, así como también por duplicaciones segmentarias, en tándem o ambas (Singh y Jain, 2015; Wu et al., 2017). Por ejemplo, en *Arabidopsis* las proteínas IAA3, IAA14 e IAA18 actúan de forma redundante en el control de la formación de raíces laterales al interactuar con dos proteínas ARF (ARF7 y ARF19) (Guseman et al., 2015). Comparado con las plantas superiores, en las plantas inferiores se identificaron muy pocos genes *Aux/IAA* como por ejemplo ninguno en *Chlamydomonas reinhardtii*, 1 en *Marchantia polymorpha*, 3 en *Physcomitrella patens* y 9 en *Selaginella moellendorffii* (Wu et al., 2017; Bowman et al., 2017; Kato et al., 2017). De este modo, la extensión en la cantidad de miembros de la familia *Aux/IAA* en las plantas terrestres han creado una redundancia funcional que podría estar asociada a funciones nuevas para adaptarse a los cambios ambientales (Singh et al., 2017)

En varios estudios se comprobó que las proteínas AUX/IAA además de interactuar con los componentes de señalización de auxinas, potencialmente interaccionan con otros factores de transcripción y proteínas de señalización (Wang y Estelle et al., 2014). Un estudio reciente mostró que una proteína *Aux/IAA* de girasol (HaIAA27) se une a un factor de transcripción de choque térmico HaHSFA9. Además, se demostró que HaIAA27 regula la longevidad de las semillas reprimiendo la actividad de HaHSFA9 (Carranco et al., 2010). También, se observó que un factor de remodelación de la cromatina denominado PICKLE (PKL) es esencial para la represión de la actividad ARF7/19 mediada por IAA17, y para el inicio del crecimiento de las raíces lateral (Fukaki et al., 2006). En *Arabidopsis* se ha demostrado que *IAA3* es blanco de dos proteínas histonas acetiltransferasas, como LAX2 (LIKE AUXIN RESISTANT 2) y GCN5 (GENERAL CONTROL NONDEREPRESSIBLE 5). Esto indica que los genes *Aux/IAA* también podrían estar regulados por modificaciones epigenéticas (Yamamuro et al., 2016; Benhamed et al., 2006).

Por otro lado, las modificaciones postranscripcionales también juegan un rol importante en la regulación de las proteínas *Aux/IAA*. Recientemente, se ha demostrado que una gran cantidad de microARN (miARN) tienen como blanco regulador a genes *Aux/IAA*, pero la información sobre la regulación postranscripcional de las proteínas *Aux/IAA* mediada por miARN todavía es limitada (Lavy y Estelle, 2016; Campos-Rivero et al., 2017). El primer miARN encontrado como controlador de un gen *Aux/IAA* en *Arabidopsis*, es el miARN (*miR847*), que actúa sobre el ARNm de *IAA28* para inducir su degradación, de manera tal que opera como regulador positivo de las auxinas durante el desarrollo de órganos laterales (Wang y Guo, 2015). Vale destacar que también existen evidencias sobre la regulación postranscripcional de los transcritos de ARF, mediada por miARN y ARN pequeños de interferencia *transacting* (ta-siARN). Por ejemplo, en *Arabidopsis* se encontró que los genes

ARF6 y *ARF8* son blancos de miR167, *ARF10*, *ARF16* y *ARF17* de miR160, y *ARF2*, *ARF3* y *ARF4* son *targets* de TAS3 ta-siRNAs (Rhoades et al., 2002; Williams et al., 2005; Guilfoyle y Hagen, 2007; Li et al., 2015).

Dado su rol biológico como represor de los genes de respuesta a auxinas, las mutaciones en las proteínas Aux/IAA confieren fenotipos que se caracterizan por una capacidad reducida de respuesta a auxinas. A pesar de que hay 29 proteínas Aux/IAA en *Arabidopsis* con cierta redundancia funcional, los mutantes en estas proteínas conducen a defectos en diversos procesos de desarrollo, como por ejemplo la embriogénesis, el inicio y elongación de la raíz lateral, el crecimiento de hipocótilo, el tropismos, el desarrollo de órganos florales (Liscum y Reed, 2002; Wang et al., 2013). Una mutación en el dominio II de *IAA8* (lo cual reduce la interacción con los factores de degradación), resultó en fenotipos con órganos florales anormales (pétalos y estambres cortos, y estigmas curvos) y bajos niveles de ácido jasmónico, el cual está controlado por interacciones con los ARF6 y AFR8. Estos resultados sugieren que *IAA8* participaría en el desarrollo de órganos florales (Tabata et al., 2010; Wang et al., 2013). Por su parte, *IAA12* está asociado al inicio del meristema de la raíz durante la embriogénesis temprana al interactuar con la proteína ARF5, esta última tiene una función temprana en el establecimiento de patrones vasculares y morfológicos en el desarrollo embrionario y post-embrionario (Hamann et al., 2002; Hardtke et al., 1998). Las mutantes *iaa16-1* (At3g04730) mostraron rosetas más pequeñas, pelos radiculares más cortos, menos raíces laterales y filamentos de anteras más cortos en comparación con la línea *wild type*. Además, las mutantes *iaa16* homocigotas fueron incapaces de producir descendencia indicando que este gen puede estar asociado a alguna de las etapas de la gametogénesis o embriogénesis (Rinaldi et al., 2012). El gen *IAA18* se expresa en el dominio apical de los embriones en etapa globular, en el meristemo apical del brote y en el dominio adaxial de los cotiledones de embriones en etapa de corazón. Estudios complementarios de ganancia de función demostraron que *IAA18* desempeña un rol importante en el patrón apical embrionario reprimiendo la actividad de ARF5 y de otros ARFs (Ploense et al., 2009). Un estudio recientes realizado en arroz detectó la expresión de genes *Aux/IAAs* y *ARFs* durante los estadios de célula arqueosporial y de célula madre de la megáspora durante megasporogenesis, por lo que se cree que cumplen un rol importante en dicho porceso (Zhao et al., 2020).

Además de *Arabidopsis*, se ha avanzado significativamente en la comprensión de la función de los genes *Aux/IAA* en otras especies, como tomate y arroz (Mazzucato et al., 2015; Wang et al., 2017). En *Solanum lycopersicum* *SilAA9* controla múltiples procesos mediados por señalización de auxina, como la dominancia apical, la morfogénesis de las hojas, el desarrollo de los órganos florales, y el cuajado y desarrollo de los frutos. Mutaciones en *SilAA9*

produjeron frutos partenocárpicos y anomalías en la forma de la hoja (Mazzucato et al., 2015; Koenig et al., 2009). Recientemente, se observaron resultados similares en la mutante *Sliaa9-crispr*, obtenida a través del sistema CRISPR/Cas9, la misma también presentó partenocarpia y hojas anormales (Ueta et al., 2017). Las plantas *SilAA27 RNAi* mostraron modificación en la anatomía de los órganos reproductivos y una reducción de los niveles de expresión de genes involucrados en la síntesis de clorofila (Bassa et al., 2012). En el caso de los miembros de la familia de genes *Aux/IAA* en arroz, *OsIAA23* es esencial para el mantenimiento postembrionario del centro quiescente por señalización de auxina (Ni et al., 2011). Mutantes de *OsIAA23* originadas por el sistema CRISPR/Cas9 mostraron un marcado enanismo, problemas para en el desarrollo de raíces lateral e infertilidad (Jiang et al., 2019).

De acuerdo a lo descrito en la introducción, un gen que codifica para una proteína del tipo AUX/IAA (LOC_Os12g40890), se encuentra presente en el segmento del cromosoma 12 de arroz que muestra una alta sintonía con el ACL de *P. notatum* (Hojgaard et al., 2011). La desregulación de un gen específico de la vía de señalización de auxinas en el ACL podría jugar un papel importante en los procesos del desarrollo, característicos de la reproducción apomíctica, como por ejemplo, el cambio del destino celular de las células nucleares que se convierten en iniciales de la aposporía y posteriormente ingresan a la gametogénesis, en el desarrollo partenogenético del embrión y/o en el desarrollo del endosperma con un balance genómico materno:paterno que se desvía de la relación 2m:1p. Asimismo, recientemente se ha demostrado que la regulación mediada por sRNA de las vías de auxinas y el control de genes ARFs son fundamentales para promover la apomixis en *P. notatum* (Ortiz et al., 2019). Es importante destacar que se detectó una correlación relevante entre varios genes expresados diferencialmente durante el desarrollo reproductivo de *P. simplex* (Polegri et al., 2010) y *P. notatum* (Laspina et al., 2008) y genes diferencialmente expresados por efecto de la autoploidización en *P. notatum* (Martelotto et al., 2005), relacionados con el metabolismo de auxinas. Entre ellos, *P. simplex* B4/122-1 and *P. notatum* DDT13682x corresponden a proteínas del tipo F-box y *P. simplex* D4/153-8 y *P. notatum* DDT32844x1 a enzimas de ubiquitinación (Ortiz et al., 2013). Estos antecedentes, justifican el estudio de los genes de la familia *Aux/IAA* en plantas apomícticas y sexuales a fin de determinar si existe una relación directa con el modo de reproducción.

I.6- Superfamilia de genes *AP2/ERF*

La superfamilia de proteínas *AP2/ERF* (*APETALA2/ETHYLENE RESPONSIVE ELEMENT BINDING FACTOR*), también conocida como *AP2/EREBP* (*APETALA2/ETHYLENE RESPONSE ELEMENT-BINDING PROTEIN*) agrupa a factores de transcripción importantes en el desarrollo vegetal y es una de las familias más extensas del reino vegetal (Kim et al., 2006). Los miembros de esta superfamilia desempeñan una gran variedad de funciones a lo largo del ciclo de vida de las plantas que incluyen desde regulaciones claves en procesos del crecimiento y desarrollo, como la determinación de la identidad de los órganos florales, la maduración de los frutos, el control de la identidad de las células epidérmicas de las hojas y mecanismos utilizados para responder a estreses bióticos y abióticos (Riechmann y Meyerowitz, 1998). Se demostró que genes *AP2/ERF* también participan en respuesta a señales de auxinas, citocininas, ácido abscísico y jasmonato (Gu et al., 2017). Los miembros de esta familia se caracterizan por su dominio *AP2/ERF* de unión al ADN que consta de alrededor de 60 a 70 aminoácidos conservados (Jofuku et al., 1994; Ohme-Takagi y Shinshi, 1995). Los genes *AP2/ERF* se caracterizan por presentar uno o dos dominios *AP2/ERF*, que consisten en una lámina- β antiparalela de tres cadenas y una hélice- α (Allen et al., 1998). El dominio *AP2* se identificó por primera vez como un motivo repetido dentro de la proteína *APETALA2* de *Arabidopsis thaliana* que participa en el desarrollo floral (Jofuku et al., 1994). El dominio *ERF* se identificó como un motivo conservado presente en cuatro proteínas de unión al ADN del tabaco, denominadas *EREBP1*, 2, 3, y 4 (*ethylene-responsive element-binding proteins 1, 2, 3, y 4*) (Ohme-Takagi y Shinshi, 1995). Aunque los dominios *AP2/ERF* están altamente conservados, las secuencias N-terminal y C-terminal de las proteínas de esta familia son diferentes y contienen motivos específicos (Kim et al., 2006).

A partir de la secuenciación masiva de los genomas vegetales, la superfamilia *AP2/ERF* se ha caracterizado con éxito en varias especies de plantas, como *Arabidopsis* (147 miembros) (Dietz et al., 2010), soja (98) (Zhang et al., 2008), tomate (85) (Sharma et al., 2010), arroz (165) (Sharoni et al., 2011), papa (155) (Bouaziz et al., 2015) y *Brachypodium distachyon* (149) (Chen et al., 2016). En *Arabidopsis*, los 147 genes *AP2/ERF* se dividen en cuatro familias: *AP2-like* (*APETALA2-like*), *DREB* (*Dehydration- Responsive Element Binding proteins*), *ERF-like* (*Ethylene Responsive Factors*) y *RAV* (*Related to ABI3/VP1*) (Feng et al., 2005). A su vez, la familia *AP2-like* se divide en dos clados que contienen a los dos genes más conocidos de esta familia, *AP2* (clado eu*AP2*) y *ANT* (*AINTEGUMENTA*) (clado *ANT*) (Bowman et al., 1991; Elliott et al., 1996; Klucher et al., 1996). El clado *ANT* se subdivide en los subclados basal*ANT* y eudicot*ANT* (eu*ANT*) que contienen motivos específicos euANT1–4 (Kim et al., 2006). El subclado eu*ANT* incluye los subgrupos *PLT* (*PLETHORA*),

AINTEGUMENTA-like, *AINTEGUMENTA-like1*, *AINTEGUMENTA-like5* y *BBM-like* (Horstman et al., 2014).

Se ha demostrado que el gen *AP2* (eu*AP2*) juega un papel importante en procesos del desarrollo como el mantenimiento de las células madre en las áreas meristemáticas (Würschum et al., 2006), el desarrollo de óvulos y semillas (Jofuku et al., 1994, 2005; Leon-Kloosterziel et al., 1994; Modrusan et al., 1994; Ohto et al., 2005) y en la especificidad de la identidad del meristema floral (Shannon y Meeks-Wagner, 1993; Okamura et al., 1997). Además, el gen *AP2* forma parte del modelo floral inicialmente denominado ABC, formulado por Coen y Meyerowitz (1991), posteriormente modificado a ABCDE (Colombo et al., 1995; Haughn y Somerville, 1988; Pelaz et al., 2000). En dicho modelo, los cuatro verticilos florales (sépalos, pétalos, estambres y carpelos), están controlados por la expresión diferencial de una serie de genes homeóticos (genes reguladores que dirigen la posición y el desarrollo de segmentos o estructuras corporales). De este modo se definieron cinco grupos de genes (A, B, C, D y E) con funciones moleculares determinadas (Sharma et al., 2020). Los genes de clase A (*AP1*, *SQUA* y *AP2*) controlan el desarrollo de los sépalos en el verticilo 1. Los genes de clase A se superponen con los genes de clase B (*PI* y *AP3*) para promover la formación de pétalos en el verticilo 2. Los genes de Clase B y C (*AG*) están implicados en la formación de estambres en el verticilo 3, mientras que los genes de Clase C por sí solos promueven el desarrollo del gineceo en el verticilo 4. Para sostener la estructura floral, los genes de la Clase A (*AP2*) y Clase C (*AG*) actúan de manera antagónica recíproca. Por lo tanto, la transcripción de genes *AP2* y *AG* está restringida espacialmente por los dos primeros y los dos últimos verticilos, respectivamente (Sharma et al., 2020)

AP2 es uno de los genes del desarrollo conocido de mayor relevancia en las últimas décadas por regular la diferenciación de meristemas y tejidos de órganos florales. (Bowman et al., 1989; 1993; Huala y Sussex 1992; Irish y Sussex 1990; Komaki et al., 1988; Kunst et al., 1989; Schultz y Haughn 1993; Shannon y Meeks-Wagner 1993). Se ha demostrado que la pérdida de función de *AP2* distorsiona completamente la estructura de la flor (Bowman et al., 1989).

El clado eu*AP2* de la familia *AP2-like* de *Arabidopsis*, además de incluir al gen *AP2* incluye a los genes *TARGET OF EAT1 (TOE1)*, *TOE2*, *TOE3*, *SCHLAFMUTZE (SMZ)*, y *SCHNARCHZAPFEN (SNZ)*. Los miembros de este grupo se caracterizan por presentar un sitio de unión al micro miRNA172 (Kim et al., 2006; Shigyo et al., 2006) que, junto con otros miembros de la familia, regula postranscripcional la expresión de estos genes (Aukerman y Sakai 2003; Chen, 2004; Lauter et al., 2005). En *Arabidopsis*, el miRNA172 regula a *AP2* mediante la inhibición transduccional, a pesar de compartir con estos una complementariedad

de bases casi perfecta (Chen, 2004; Mlotshwa et al., 2006; Teotia y Tang, 2015). La acumulación de miARN172 causa un defecto en la identidad de los órganos florales, similar a lo observado en las mutantes *ap2* con pérdida de función. (Chen, 2004; Teotia y Tang, 2015). Niveles altos de ARNm de la mutante *ap2*, con una interrupción en el apareamiento de bases con miR172, resultaron en defectos severos de los patrones florales. Por lo tanto, miRNA172 probablemente actúe en la especificidad del destino celular como un represor traduccional de *APETALA2* durante el desarrollo floral de *Arabidopsis*. (Chen, 2004; Teotia y Tang, 2015). Por otro lado, plantas transgénicas de *Arabidopsis* que sobreexpresaron un gen *TOE3* (rTOE3-ox) “resistente” a miR172, mostraron flores indeterminadas, con numerosos estambres y órganos carpeloides (Jung et al., 2014). El gen *SNB* (*SUPERNUMERARY BRACT*) perteneciente a la familia *AP2-like* de arroz es blanco del miR172b. La sobreexpresión de miR172b retrasó la transición del meristema de espiguilla a meristema floral, y produjo defectos en el desarrollo floral y de semillas, incluyendo cambios en el número y la identidad de órganos florales, baja fertilidad y menor peso de semilla (Zhu et al., 2011). *Glossy15* (*AP2-like*) es un gen presente en maíz, caracterizado por su importancia en el mantenimiento de la etapa juvenil de las plantas. El transcripto de este gen presenta la secuencia “blanco” para miR172, lo cual sugiere que miR172 podría regular negativamente a *gl15* para promover el desarrollo vegetativo en plantas adultas de maíz (Lauter et al., 2005).

El clado *ANT* de *Arabidopsis* está integrado por 12 genes, entre estos se encuentra el gen *AINTEGUMENTA* que desempeña una amplia variedad de funciones en el desarrollo floral, principalmente a través de la promoción del crecimiento de los órganos florales. Mutantes para este gen mostraron una disminución en el número, tamaño y en la estructura de todos los órganos florales (Kunst et al., 1989; Elliott et al., 1996; Klucher et al., 1996). También se requiere para la iniciación del integumento del óvulo, la formación del megagametofito (Elliott et al., 1996; Klucher et al., 1996) y para la fusión de los márgenes del gineceo (Liu et al., 2000). Los 11 genes restantes del clado *ANT*, posiblemente presenten redundancia funcional que podrían enmascarar la función A (en el modelo ABC). Siete de estos genes se denominan *AINTEGUMENTA-like* (*AIL*) (Nole-Wilson et al., 2005) y pertenecen junto con el gen *ANT*, al subclado *euANT* propuesto por Kim et al., (2006). Todos los genes *AIL* han sido caracterizados, y parecerían jugar un papel importante en procesos de desarrollo que involucran a la proliferación celular, similar a lo postulado para el gen *ANT* (Krizek, 1999; Mizukami y Fischer, 2000). *PLETHORA1* y *PLETHORA2* (*PLT1* y *PLT2*) son genes similares con función redundante que se requieren en el meristema apical de la raíz para la especificación y mantenimiento de la identidad de células madres (Aida et al., 2004), similar al rol que desempeña *AP2* en el meristema del brote (Würschum et al., 2006). La sobreexpresión de *AINTEGUMENTA-like5* mostró un aumento de tamaño de órganos florales

como resultado del aumento de la proliferación celular (Nole-Wilson et al., 2005), resultados similares fueron observados con la sobreexpresión del gen *ANT* (Krizek, 1999). Los genes del clado *ANT*, también han sido estudiadas en otras especies. Hay disponibilidad de datos de expresión de dos genes, *NtANTL* de *Nicotiana tabacum* (Rieu et al., 2005) y *PtANTL1* de *Pinus thunbergii* (Shigyo y Ito, 2004), que parecen ser ortólogos de *ANT* (Kim et al., 2006). Ambos genes se expresan fuertemente en las estructuras reproductivas femeninas y en hojas, al igual que *ANT*. *PtANTL1* también se expresa débilmente en conos masculinos (Rieu et al., 2005; Shigyo y Ito, 2004). En manzana dos genes *MdANT1* y *MdANT2* ortólogos de *ANT*, regularían la proliferación celular durante el crecimiento del fruto (Dash y Malladi, 2012).

Otros de los genes que forman parte del subclado eu*ANT* son los denominados *BABY BOOM* (*BBM*). Estos genes están involucrados en la regulación de la totipotencia de células vegetales, la proliferación celular, la formación de brotes, la inducción de embriogénesis somática, el desarrollo, la promoción de la apogamia y la estimulación de la transformación (Boutillier et al., 2002; Passarinho et al., 2008; Heidmann et al., 2011; Lowe et al., 2016; Horstman et al., 2017). Además, *BBM* se expresa de manera preferencial y activa una ruta de transducción de señales que conduce a la inducción de células somáticas diferenciadas y la formación de embriones somáticos (Boutillier et al., 2002). El gen *BBM* se aisló por primera vez en *Brassica napus* como un marcador de células embrionarias en cultivo de tejido derivado de microsporas (Boutillier et al., 2002). El rol del gen *BBM* ha sido relacionado con la embriogénesis de plantas en muchas especies de plantas como *Arabidopsis thaliana* (Boutillier et al. 2002), *Brassica napus* (Boutillier et al., 2002), *Glycine max* L. (Ouakfaoui et al., 2010), *Capsicum annuum* L. (Irikova et al., 2012) y *Zea mays* (Salvo et al., 2014). La expresión ectópica de *BBM* en *Arabidopsis* y *Brassica* condujo a la formación espontánea de embriones somáticos y estructuras similares a cotiledones en las semillas. Además, indujo fenotipos pleiotrópicos adicionales, incluyendo crecimiento neoplásico, regeneración de explantos sin hormonas exógenas y alteraciones en la morfología de hojas y flores. El patrón de expresión de *BBM* en el desarrollo de semillas combinado con el fenotipo de sobreexpresión de *BBM* sugiere un papel importante de este gen en la promoción de la proliferación celular y la morfogénesis durante la embriogénesis (Boutillier et al., 2002). Recientemente, Horstman et al., (2017) demostraron que el gen *BBM* funciona como regulador principal para la totipotencia de células vegetales. *BBM* interacciona con *LEC1/2* (*LEAFY COTYLEDON*), *FUSCA3* (*FUS3*) y *ABSCISIC ACID INSENSITIVE* (*ABI3*). Estos resultados también sugirieron que *LEC2* y *ABI3* son reguladores positivos de la embriogénesis mediada por *BBM*, mientras que *LEC1* y *FUS3* son esenciales para la embriogénesis somática. La inducción de la embriogénesis somática mediada por *BBM* es un mecanismo dependiente de la dosis y el contexto. Dosis

altas de *BBM* inducen la embriogénesis somática, mientras que dosis más bajas inducen la organogénesis (Horstman et al., 2017).

Como se describió previamente, el gen LOC_Os12g41060 presente en la región del cromosoma 12 de arroz, sinténica al ACL de *Paspalum notatum* codifica para una proteína de la superfamilia *AP2/ERF*. Dada su función en la diferenciación de los órganos florales y en la embriogénesis, variaciones en la expresión y/o regulación de el/los gen/es ortólogos de *P. notatum*, podrían estar asociados a algún proceso clave del desarrollo apomíctico. Un estudio realizado por Conner et al., (2015) en *Pennisetum glaucum* (una especie de reproducción apomíctica), demostró que el gen *PsASGR-BABYBOOM-like*, (localizado en la región genómica asociada a la apomixis en la especie) se expresa en óvulos antes de la fertilización e induce partenogénesis. Además, la expresión ectópica de este gen en plantas sexuales induce a la generación de progenies haploides (Conner et al., 2015). La regulación negativa de la expresión de *PsASGR-BBML* en plantas transgénicas apomícticas F1 resultó en un menor número de embriones partenogenéticos y una reducción en el número de células embrionarias en comparación con los controles. Estos resultados indican un rol clave de *PsASGR-BBML* en la partenogénesis (Conner et al., 2015). Recientemente, la utilización de un gen *BBM-like* posibilitó la generación de semillas clonales en arroz a partir de la combinación de mutantes *MiMe* (mitosis por meiosis) con una línea transgénica que expresa el gen *BABYBOOM1* de la propia especie (Khanday et al., 2019).

I.7- Análisis transcriptómicos y desarrollo de recursos ómicos en *Paspalum notatum*

I.7.1- Transcriptomas del desarrollo reproductivo apomíctico y sexual

Paspalum notatum es una especie arquetípica para el estudio de la apomixis, además de constituir una forrajera de importancia para las regiones tropicales y subtropicales de Sudamérica y utilizarse para el mejoramiento genético, es una de las especies del género mejor caracterizadas en cuanto a sus características citogenéticas, citoembriológicas, reproductivas y moleculares. Presenta además razas apomícticas y sexuales que pueden cruzarse fácilmente y generar descendencia fértil (Ortiz et al., 2013). Como se ha descrito anteriormente, la apomixis en la especie está controlada por un *locus* simple (ACL) que presenta distorsión de la segregación, restricción de la recombinación, apareamiento preferencial de cromosomas y probablemente un estado hemigótico (Martínez et al., 2001; Martínez et al., 2003; Stein et al., 2004; Podio et al., 2012). Asimismo, posee una alta proporción de secuencias repetitivas, metilación de citosinas y características de heterocromatina (Podio M, Tesis doctoral 2012; Podio et al., 2012). De acuerdo a estimaciones

basadas en el mapeo genético, este segmento puede extenderse por más de 35 Mbp y por lo tanto contener cientos de genes (Stein et al., 2007; Ortiz et al., 2013). Por otro lado, la restricción en la recombinación pudo haber favorecido a la acumulación de mutaciones, que no son descartadas en la meiosis. Este tipo organización estructural puede tener varias consecuencias sobre la estructura, expresión y función de los genes que se encuentran en el área. En *P. simplex*, varios genes ligados a la apomixis se expresan de manera constitutiva durante el desarrollo reproductivo, mientras que sus homólogos sexuales se encuentran temporal y espacialmente regulados (Polegri et al., 2010; Siena et al., 2016; Galla et al., 2019). Esta es una característica común de los genes organizados en estructuras similares a operones (*operon-like*), que se definen como un conjunto de dos o más genes no homólogos relacionados funcionalmente que comparten una vecindad genómica cercana (Nützmán et al., 2018). Los operones en las plantas parecen originarse por eventos de duplicación seguido de neofuncionalización (Chu et al., 2011). Esta estructura del ACL dificulta la identificación de los genes clave del proceso por metodologías de genómica directa por lo cual los análisis transcriptómicos tienen gran importancia.

Desde el inicio de la presente década se han llevado a cabo varios estudios transcriptómicos en la especie tendientes a identificar genes asociados a la Apomixis. En el apartado 1.3.1 de este trabajo, "Identificación de genes asociados a componentes de la apomixis", se detalla y demuestra la importancia del aporte de las metodologías transcriptómicas para la identificación de secuencias asociadas a la apomixis y a la sexualidad en el sistema *Paspalum*.

Recientemente, con el objetivo de obtener un catálogo detallado de los transcritos expresados durante el desarrollo reproductivo sexual y apomítico, se desarrolló un transcriptoma floral de referencia mediante la utilización de metodologías de secuenciación de tercera generación (Ortiz et al., 2017). A partir de ARNm de flores sexuales y apomíticos en diferentes estadios de desarrollo (premeiosis, meiosis, postmeiosis y anthesis), se obtuvo el primer transcriptoma de referencia del desarrollo reproductivo sexual y apomítico de *P. notatum*, mediante la tecnología de secuenciación de lectura larga 454/Roche FLX (Ortiz et al., 2017). El mismo comprende tres bases de datos: *i*) base sexual (generada por el ensamblado de las lecturas obtenidas en el genotipo sexual C4-4x), *ii*) base apomítica (generada a partir del ensamblado de las lecturas derivadas del genotipo apomítico) y *iii*) base global (derivada del ensamblado conjunto de las lecturas de ambos individuos). La base global, que presenta una cobertura de alrededor del 90 % de los transcritos de plantas de acuerdo a la estimación por el programa BUSCO (Seppey et al., 2019) contiene más de 67.000 isotigs (transcritos), correspondientes a 48.842 isogrupos (genes) (Ortiz et al., 2017). Este transcriptoma permitió tanto la recuperación de los alelos/parálogos de 23 candidatos

previamente asociados con la apomixis, así como la determinación sus variantes (Ortiz et al., 2017). Por otra parte, se identificaron 3.732 genes que mostraron una expresión diferencial entre los genotipos, 2.066 sobreexpresados durante el desarrollo apomítico y 1.666 sobreexpresados en la planta sexual. Estos resultados sugieren que numerosos genes poco expresados o silenciados durante la reproducción sexual se activan durante la transcripción en óvulos de plantas apomíticas (Ortiz et al., 2017). Además, se identificaron varias redes de coexpresión e interacción proteína-proteína asociadas con la apomixis (Ortiz et al., 2017). La identificación de tales redes es esencial para una futura caracterización de las rutas moleculares involucradas en la apomixis. Los análisis ontológicos (realizados mediante el sistema de Gene Ontology GO) de un conjunto de transcritos diferenciales indicaron que las principales vías moleculares alteradas durante el desarrollo apomítico corresponden a: respuestas de estrés biótico y abiótico, crecimiento, desarrollo, muerte celular y senescencia (Ortiz et al., 2017). La búsqueda de posibles redes moleculares alteradas durante la apomixis utilizando el sistema PLANEX (<http://planex.plantbioinformatics.org/co-expression-search>) con los 200 primeros transcritos diferenciales mostró redes moleculares relacionadas con: transporte de iones, procesos metabólicos de ribonucleótidos, biogénesis y ensamblado de complejos de proteínas, catabolismo de monosacáridos, traducción, expresión génica, proteólisis, transporte de proteínas, replicación de ADN y la regulación de la actividad de RAS, entre otros (Ortiz et al., 2017). Hay que considerar que estos resultados corresponden a todas las etapas del desarrollo reproductivo juntas (premeiosis, meiosis, postmeiosis y antesis). Además, las muestras biológicas utilizadas fueron flores enteras (espiguillas), compuestas por raquis, glumas, lemma, pálea, ovario y anteras, por lo tanto, todo el conjunto de transcritos caracterizadas en este estudio derivan de una variedad de tipos de células, como células somáticas y células reproductivas masculinas y femeninas, desde premeiosis hasta la antesis (Ortiz et al., 2017). Si bien las bibliotecas de referencia 454 son útiles para identificar las secuencias de un número considerable de genes candidatos, su uso como herramienta para revelar la expresión diferencial es limitado, ya que las representaciones diferenciales podrían enmascarse para algunos genes por la heterocronía de la expresión entre las muestras sexuales y apomíticas, y/o la restricción de la expresión diferencial a una determinada etapa del desarrollo y/o células individuales. En consecuencia, la especificidad espacial y temporal de la expresión de los transcritos debe evaluarse mediante el uso de experimentos adicionales basados en experimentos de qRT-PCR, hibridación *in situ* de tejidos y la expresión de marcadores específicos dirigidos por promotores específico de células o tejidos (Ortiz et al., 2017).

Recientemente, De Oliveira et al., (2020) realizaron un análisis transcriptómico global de expresión génica en tejido foliar de *P. notatum* empleando la tecnología Illumina (lecturas

cortas) en genotipos 2x sexuales, 4x sexuales y 4x apomícticos. La base de datos contiene 114.306 transcritos de referencia, de los cuales 1.612 mostraron alta similitud con secuencias genómicas de las regiones sinténicas al ACL en los cromosomas 2 (1.356) y 12 (256) de arroz (De Oliveira et al., 2020). Cuarenta de estos transcritos fueron identificados como específicos del grupo de genotipos apomíctico; nueve fueron específicos del grupo 2x sexuales y seis específicos de las muestras 4x sexuales. Además, análisis de expresión diferencial permitieron detectar 16 transcritos asociados al ACL diferencialmente expresados entre 2x sexuales y 4x apomícticos; 20 transcritos diferencialmente expresados entre 4x apomícticos y 4x sexuales; y 17 entre 2x sexuales y 4x sexuales (De Oliveira et al., 2020). Los análisis de ontología génica (GO) con un conjunto de 536 transcritos mostraron entre las principales clases, procesos biológicos, funciones moleculares y componentes celulares (De Oliveira et al., 2020). Entre los procesos biológicos identificados, se detectaron genes previamente relacionados con la reproducción de plantas que incluyen, la generación de gametos masculinos (GO: 0048232), la segregación de cromátidas hermanas (GO: 0000819), meiosis I (GO: 0007127), la regulación de la citocinesis (GO: 0032465), la citocinesis mitótica (GO: 0000281), el ensamblado del huso (GO: 0051225) y la organización mitótica del huso (GO: 0007052). También, se identificaron procesos epigenéticos como, la metilación de macromoléculas (GO: 0043414), la fosforilación de histona-serina (GO: 0035404), la regulación de la actividad de la proteína fosfatasa tipo 2A (GO: 0034047), y la regulación negativa de la actividad MAP quinasa (GO: 0043407) (De Oliveira et al., 2020). Análisis de BLASTn en las que se utilizaron como consulta secuencias de *P. notatum* previamente asociadas a la apomixis (Pessino et al., 2001; Felitti et al., 2014; Podio et al., 2014; Siena et al., 2014, 2016), revelaron que el transcriptoma foliar contiene genes previamente reportados como claves para el desarrollo reproductivo apomíctico. Entre estos se encuentra una de las secuencias detectada por Pessino et al., (2001), expresada durante el desarrollo temprano del megagametofito en plantas apomícticas de *P. notatum*, similar a una proteína kinesina. Sumado a este, se encontraron transcritos diferencialmente expresados que alinearon con las secuencias caracterizado por Podio et al., (2014), correspondiente al gen *Somatic Embryogenesis Receptor-Like Kinase (SERK)*. Además, dos transcritos fueron similares a la secuencia de *PsORC3* identificada en *P. simplex* (Siena et al., 2014, 2016).

I.7.2- Avances sobre el borrador del genoma diploide

P. notatum comparte características con las llamadas especies “huérfanas” (Tadele y Bartels, 2019), se designa de esta manera a aquellas especies de importancia para los países en desarrollo que despiertan poco interés en la comunidad científica internacional (Tadele y

Bartels, 2019). La investigación en estas especies se realiza principalmente en instituciones públicas y con financiamiento propio de los países en desarrollo (Tadele y Bartels, 2019). El sistema *Paspalum* incluye numerosas especies de importancia agronómica, de las cuales sólo algunas han sido estudiadas exhaustivamente (Ortiz et al., 2013). En los últimos años, como parte de las actividades desarrolladas por nuestro grupo de trabajo en proyectos nacionales e internacionales se inició la generación de datos genómicos para reconstruir el genoma de *P. notatum* y obtener la secuencia completa del ACL. Es de destacar que aparte de tres clones de BAC específicos del ACL de *P. simplex* (Galla et al., 2019), no existe aún una caracterización molecular detallada de esta región genómica en ninguna especie del género. En 2017, bajo el marco del proyecto PROCROP - "Harnessing Plant Reproduction for Crop Improvement" (MSCA-RISE-2014: Marie Skłodowska-Curie Research and Innovation Staff Exchange - RISE) realizado en colaboración con laboratorios de Francia (Dr. Olivier Leblanc, IRD, Montpellier) e Italia (Prof. Emidio Albertini, Universidad de Perugia y Prof. Lucía Colombo, Universidad de Milán), se generaron secuencias genómicas y un ensamblado preliminar del genoma de *P. notatum*. Dadas las características intrínsecas de los genomas de las especies apomícticas (alta heterocigosis y poliploidía) la estrategia diseñada fue la de generar un borrador al nivel diploide, para luego utilizarlo como referencia en la reconstrucción y ensamblado del genoma tetraploide (en el cual se expresa la apomixis). El genotipo utilizado para la secuenciación, denominado #R1, deriva de una población diploide natural localizada en la región de Cayastá, Santa Fe. La caracterización citoembriológica de este individuo mostró que posee cierta capacidad para desarrollar sacos embrionarios de tipo apospóricos junto con los sacos sexuales (Quarin et al., 2001). Los datos genómicos se obtuvieron a partir de lecturas largas generadas con la tecnología *Oxford Nanopore* (cobertura ~40x) conjuntamente con secuencias de lecturas cortas obtenidas por la tecnología *Illumina* (Ortiz JPA, comunicación personal). Hasta el momento se dispone de aproximadamente 80 Gb de secuencias genómicas de alta calidad (Q score > 30, largo = 150 pb) generados por la tecnología *Illumina HiSeq-1.500 paired-end* (cobertura de aproximadamente 100x) y 38,4 Gb de lecturas largas (Q score > 7,0, N50 18.709 pb) obtenidas por el sistema *Oxford Nanopore* con una cobertura genómica de 48x. El ensamblado de las lecturas obtenidas se generó empleando el programa *Miniasm* (Li, 2016). El mismo cubre unos 822 Mb y cuenta 3.843 *scaffolds* de un largo promedio de 214,03 kpb y un N50 de 299,7 kpb. Cuando dicho ensamblado se empleó como referencia, permitió el mapeo de más del 90% de las secuencias apareadas (*pair-end*) obtenidas por el sistema *Illumina* y alcanzó una cobertura mayor al 75% de acuerdo al programa *BUSCO* (Ortiz et al., comunicación personal). Dicho genoma es un recurso genómico muy importante para el análisis en profundidad de conjuntos de datos transcriptómicos ya disponibles (ARNm, ARNs) y para estudios comparativos para determinar la naturaleza, la evolución y el papel funcional del ACL (Ortiz et al., comunicación personal)

II- OBJETIVOS E HIPÓTESIS

II.1- Objetivo General

El objetivo general del proyecto de tesis es caracterizar al nivel molecular un grupo de genes asociados al *locus* responsable de la apomixis (ACL) de *Paspalum notatum* que por su anotación funcional podrían participar en alguno de los mecanismos centrales de la reproducción en la especie.

II.2- Objetivos Específicos

1) Identificar los transcritos homólogos a las secuencias génicas de arroz correspondientes a: LOC_Os12g40770 (codificante para anquirina-1), LOC_Os12g40890 (codificante para una proteína Aux/IAA de respuesta temprana a auxina) y LOC_Os12g41060 (codificante para una proteína con dominio AP2) expresados en el transcriptoma del desarrollo reproductivo de genotipos sexuales y apomícticos de *P. notatum*.

2) Caracterizar los alelos y/o parálogos de estos genes en genotipos apomícticos y sexuales y determinar si presentan ligamiento genético con el ACL.

3) Analizar los patrones de expresión de los transcritos relevantes en tejidos reproductivos por medio de experimentos de qRT-PCR y/o hibridación *in situ* de tejidos y determinar su relación con el modo reproductivo.

4) Determinar la localización física de los genes bajo estudio en el borrador del genoma de *P. notatum*.

II.3- Hipótesis

Hipótesis 1: Secuencias similares a los genes de arroz localizados en el segmento del cromosoma 12, comprendido entre los marcadores C996 y C1069, codificantes para la anquirina-1, una proteína Aux/IAA y una proteína con dominio AP2, se expresan durante desarrollo reproductivo de *Paspalum notatum*.

Hipótesis 2: Genes de *P. notatum* ortólogos a la anquirina-1, proteína Aux/IAA y proteína con dominio AP2, se localizan físicamente en el ACL y mantienen un alto grado de colinealidad en referencia a disposición en arroz

Hipótesis 3: La expresión en tejidos reproductivos de variantes alélicas asociadas al ACL de los genes ortólogos a anquirina-1, una proteína Aux/IAA y una proteína con dominio AP2, difieren en el tiempo y/o localización entre plantas apomícticas y sexuales.

III- MATERIALES Y MÉTODOS

III.1-Material vegetal

Los experimentos que se describen en esta tesis se realizaron utilizando material vegetal de *Paspalum notatum* Flüggé, desarrollado y mantenido en el banco de germoplasma del género *Paspalum* perteneciente al Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE), CONICET-UNNE, Corrientes y al Instituto de Investigaciones en Ciencias Agrarias de Rosario (IICAR), CONICET-UNR. Como material de partida se utilizaron individuos tetraploides ($2n = 4x = 40$), correspondientes a la variedad común de la especie (pasto horqueta), cuyo número de cromosomas y modo de reproducción fueron determinados previamente (Tabla 2). Asimismo, se obtuvieron nuevos híbridos que se describen más adelante (Tabla 2). Como individuos tetraploides completamente sexuales se emplearon los genotipos: Q4188 y C4-4x. Brevemente, Q4188 fue obtenido experimentalmente a partir del cruzamiento entre los genotipos Q3664 x Q3853 (Quarin et al., 2003). El parental Q3664 (SWSB), es una planta tetraploide apomítica facultativa con alto grado de sexualidad (Ortiz et al., 1997). Este individuo fue inicialmente obtenido en la Estación Experimental de Tifton, Georgia, USA por el Dr. Glen Burton mediante el cruzamiento entre una planta tetraploide sexual (PT-2), inducida por tratamiento con colchicina de un diploide (*P. notatum* var. *Saurae*) y un tetraploide apomítico de estigmas blancos (WSB) (Burton y Forbes 1961). Luego de varias generaciones de polinización abierta se obtuvo este individuo (Q3664) que posee estigmas blancos (Quarin et al., 1984). El análisis citoembriológico de Q3664 mostró que posee un 70% de ovarios con sacos embrionarios meióticos y alrededor del 30 % de ovarios con sacos apospóricos (Quarin et al., 2004). En 1979, Q3664 fue cedido a la Facultad de Ciencias Agrarias de la UNNE y mantenido por rizomas hasta la fecha. Dado su alto grado de sexualidad y la coloración blanca de los estigmas (color recesivo vs el púrpura) este individuo fue empleado en numerosos cruzamientos experimentales. La accesión Q3853 es un tetraploide apomítico nativo del Sur de Brasil (Quarin et al., 2003). El genotipo C4-4x es un autotetraploide obtenido experimentalmente por Quarin et al., (2001) mediante duplicación cromosómica, por tratamiento con colchicina, de callos inducidos *in vitro* a partir de inflorescencias jóvenes de un diploide (sexual) natural de la especie (Tabla 2). Como individuos apomíticos se utilizaron los siguientes materiales: Q4117: accesión apomítica con elevado grado de apomixis originaria de una población natural del estado de Rio Grande do Sul, Brasil (Ortiz et al., 1997) y tres genotipos: J7, J11 y J40 con diferente grado de expresividad de la aposporia (J7 100 %, J40 56 % y J11 3 %) obtenidos de manera experimental por el Dr. Carlos Acuña en la

Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Nordeste (FCA-UNNE), Corrientes, a partir de cruzamientos entre el genotipo tetraploide totalmente sexual Q4205, utilizado como parental femenino, y el genotipo tetraploide apomíctico Q4064, utilizado como dador de polen. El progenitor femenino Q4205 fue seleccionado de una progenie resultante de la autofecundación de Q3664 (Quarin et al., 2003). El progenitor masculino Q4064 es un tetraploide apomíctico natural colectado en Saladas, Corriente, Argentina (Espinoza et al., 2006) (Tabla 2).

Para los estudios de mapeo genético se utilizaron 16 individuos remanentes de una población F_1 segregante por el modo de reproducción desarrollada por Stein et al., (2007), obtenida a partir del cruzamiento entre Q4188 x Q4117. Esta población original fue extendida a 50 individuos totales durante esta tesis, a partir de semillas derivadas del mismo cruzamiento obtenidas en 2016 por el Dr. Camilo Quarin (IBONE-UNNE). Para inducir la germinación, las semillas fueron escarificadas mediante una incubación de 15 min en un Erlenmeyer de 20 ml conteniendo 4 ml de ácido sulfúrico 98% seguido de tres lavados de 5 min con H_2O (previa extracción del ácido bajo campana). La germinación se realizó en placas de Petri de vidrio colocando 20 semillas por placa previamente acondicionadas con una base de algodón embebida en H_2O sobre la que se colocó papel de filtro. Las placas se colocaron en una cámara con temperatura controlada a 28°C con 12 horas de luz durante 14-30 días. Las plántulas obtenidas se colocaron en vasos individuales conteniendo sustrato (turba, perlita y compost) y se mantuvieron en invernadero durante aproximadamente 30 días. Cuando las plántulas alcanzaron al menos 15 cm de altura fueron trasplantadas a macetas de 20 litros con tierra y mantenidas en condiciones naturales junto a la población restante en el predio del Instituto de Investigaciones de Ciencias Agrarias de Rosario. En la tabla 2 se resumen el origen y modo de reproducción de los materiales utilizados en el trabajo de tesis.

Tabla 2. Identificación, origen y modo de reproducción de los genotipos de *P. notatum* utilizados.

Genotipo	Origen	Modo de Reproducción	Referencia
C4-4x	autotetraploide generado experimentalmente por tratamientos con colchicina de un diploide	Sexual	Quarin et al., 2001
Q4188	híbrido experimental (Q3664 x Q3853)	Sexual	Quarin et al., 2003
Q4117	accesión natural colectada en Rio Grande do Sul, Brasil	Apomixis	Ortiz et al., 1997
J7		Apomixis	
J11	híbridos experimentales (4205 x 4064)	Apomixis	Acuña C., comunicación personal
J40		Apomixis	
11 Híbridos F₁¹	híbridos experimentales (Q4188 x Q4117)	Apomixis	Stein et al., 2007; esta tesis
39 Híbridos F₁²		Sexual	

¹Híbridos F₁ apomícticos: JS 9, 40, 71, 123, 130, 135, 136, 143, 145, 147, 150.

²Híbridos F₁ sexuales: JS 7, 8, 32, 34, 36, 56, 57, 58, 70, 77,83, 96, 98, 117, 118, 119, 120, 124, 128, 129, 131, 132, 134, 138, 139, 140, 144, 146, 148, 149, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159.

III.2- Aislamiento de ADN genómico

La extracción de ADN genómico de las plantas experimentales se realizó según la técnica descrita por Shagai-Marroof et al., (1984) con las siguientes modificaciones: se congelaron en N₂ líquido aproximadamente 3 g de tejido de hoja fresco. Luego se disgregó el material mecánicamente empleando un mortero hasta obtener un polvo fino. Cada muestra fue transferida a un tubo de polipropileno de 15 ml conteniendo 9 ml de buffer de extracción (Tris-HCL 100 Mm pH 7,5; NaCl 700 mM; EDTA 50 mM pH 8,0; CTAB 2 % p/v y β-mercaptoetanol 140 mM) e incubada a 65°C durante 1 hora agitando cada 10 min. Se agregaron 10 ml de cloroformo, se mezcló durante 10 min, se centrifugó a 5.000 g por 10 min y se recuperó la fase acuosa. Luego de una segunda purificación con cloroformo, se agregó un volumen de isopropanol frío a la fase acuosa obtenida (para precipitar el ADN) y se incubó a -20 °C por 16 h. El ovillo del precipitado de ADN fue colectado con una varilla de vidrio, lavado 20 min en una solución de etanol 76 %, acetato de sodio 0,2 M, secado al aire, transferido a un tubo Eppendorf de 1,5 ml y resuspendido en 700 µl de buffer TE (Tris-HCl 10 Mm; EDTA 1 mM; pH 8,0). Cada muestra de ADN fue incubada con 5 µl de ARNasa (4 mg/ml) a 37°C durante 1 hora y posteriormente reprecipitada con 5% v/v de NaCl 5 M y un volumen de isopropanol frío. Las muestras fueron centrifugadas a 10.000 rpm por 20 min y luego de

descartar el sobrenadante, lavadas con etanol al 70% y secadas a temperatura ambiente. El precipitado final de ADN fue disuelto en 250 μ l de H₂O_d estéril.

La concentración del ADN extraído se determinó por espectrofotometría a 260 nm y la pureza de la extracción se estimó empleando la relación de absorbancia a 260/280 nm. La integridad de las muestras se determinó por electroforesis en geles de agarosa al 1 % p/v teñidos con SYBR® Safe stains (Promega Cat.# S-33102) en una proporción SYBR Safe: TAE 1X de 1:10.000 (v/v). Las electroforesis se realizaron en una cuba Mupid®-One (Ref. MU-0041-) conteniendo solución reguladora TAE 1X durante 1 hora a 50 V. Las imágenes se tomaron con el sistema Molecular Imager® Gel Doc™ XR System utilizando la opción SYBR® Safe.

III.3- Clasificación de híbridos F₁ por el modo reproductivo

A fin de contar con el material vegetal adecuado para la realización de los estudios genéticos y moleculares de transcritos y secuencias génicas asociadas al carácter apomixis, los genotipos parentales Q4118 y Q4117 y los híbridos experimentales (F₁s) fueron reclasificados en cuanto a su modo de reproducción (sexual o apomítico) mediante la utilización de técnicas moleculares y citoembriológicas. Descartando de esta manera posibles contaminaciones del material vegetal. En primer lugar, se realizó una clasificación en base a la amplificación de dos marcadores moleculares 100 % ligados al carácter apomixis detectados previamente en la especie (Rebozzio et al., 2012, Spoto et al., 2016). Posteriormente se realizaron observaciones citoembriológicas de la morfología de los sacos embrionarios a partir del clarificado de ovarios en estadio de anthesis (Young et al., 1979).

III.3.1- Análisis de marcadores moleculares ligados a la apomixis

Como marcadores moleculares indicativos de la presencia del *locus* responsable de la apomixis (ACL) se utilizaron los marcadores de PCR: *SPNA2*, desarrollado por Rebozzio et al., (2012) a partir de un marcador AFLP (E36M37c) 100 % ligado al ACL en *P. notatum* y *PPIAPO* obtenido por Spoto et al., (2016) a partir de un marcador de RFLP derivado de un clon de ADNc del cromosoma 2 de arroz (C932) que mapea completamente ligado al ACL en al menos 4 especies del género *Paspalum* (Pupilli et al., 2004). El clon de arroz C932 codifica para una proteína PPIasa del tipo FKBP (Podio et al., 2012). Los marcadores *SPNA2* y *PPIAPO* generan bandas de amplificación de 114 pb y 500 pb, respectivamente, específicas de los individuos con modo de reproducción apomítica. Los cebadores utilizados para las

reacciones de amplificación se muestran en la Tabla 3. Las reacciones de amplificación fueron realizadas en un volumen final de 25 μ l conteniendo 100 ng de ADN, 0,2 μ M de cada cebador, solución reguladora 1X (INBIO Highway), $MgCl_2$ 1,5 mM, dNTPs 0,2 mM cada uno y 1U de Taq polimerasa (INBIO Highway). Las condiciones de reacción para *SPNA2* incluyeron una etapa inicial de 2 min a 94°C, seguido de siete ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 62°C y 1 min a 72 °C disminuyendo la temperatura de apareamiento 1 °C por ciclo, seguido por 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 55°C y 1 min a 72°C, e incubación final a 72°C durante 5 min (Rebozzio et al., 2012). Los productos de amplificación fueron suplementados con 5 μ l de buffer de siembra (formamida 95% p/v, NaOH 10 mM y azul de bromofenol 2 mg/ml), desnaturalizados a 96° C por 5 min y sembrados en geles desnaturalizantes de poli(acrilamida) al 6% (acrilamida: bisacrilamida 19:1, TBE 0,5X, urea 7,5 M). La electroforesis se realizó empleando un equipo de secuenciación Gibco-BRL modelo S2, USA a 60 W por 2:30 h (1 h sin las muestras y 1:30 h con las muestras) usando como soluciones reguladoras TBE 0,5X y 1X pH 8,0 en los reservorios superior e inferior, respectivamente (Rebozzio et al., 2012). Los geles se revelaron con nitrato de plata siguiendo el protocolo descrito por el “*DNA Silver Staining System*” (Promega). Brevemente, el gel se incubó 20 min en solución fijadora (ácido acético glacial 10% v/v), seguido de 3 lavados en H_2O de 2 min cada uno e incubación en solución de tinción ($AgNO_3$ 1 g/l, formaldehído 0,1% v/v) por 30 min. Luego de un lavado de 10 s en H_2O y se reveló con solución de revelado (carbonato de sodio 30 g/l, formaldehído 0,1% v/v, tiosulfato de sodio 2 mg/l) pre-enfriada hasta la detección de las bandas. La reacción fue detenida con el agregado de la solución fijadora (ácido acético glacial 10% v/v).

Las condiciones de amplificación del marcador *PPIAPO* consistieron en una etapa inicial de desnaturalización de 5 min. a 94 °C, seguida de 35 ciclos de 30 s a 94° C, 1 min a 59 °C, 2 min a 72 °C. Los productos de amplificación fueron suplementados con 5 μ l de buffer de siembra (sacarosa 40%, azul de bromofenol 0,25 % p/v) y resueltos en geles de agarosa al 3 % p/v en solución reguladora TAE 1X (Tris base, acetato de sodio y EDTA) y teñidos con el fluoróforo SYBR® Safe stains (Promega Cat.# S-33102) en una proporción 1:10.000 (v/v). La electroforesis se realizó en una cuba Mupid®-One (Ref. MU-0041-) conteniendo solución reguladora TAE 1X durante 3 horas a 55 V. Las imágenes se tomaron con el sistema Molecular Imager® Gel Doc™ XR System utilizando la opción SYBR® Safe.

Tabla 3. Cebadores utilizados para la amplificación de los marcadores indicativos del modo de reproducción apomixis *SPNA2* y *PPIAPO*.

Cebadores	Secuencia (5'-3')
SPNAF	CAATTCACCAAGTCAGTCAA
SPNAR	TATTCACCCAAGTCTAACG
PPIAPOF1	CCGGTCGCAGTCAACAGAA
PPIAPOR1	TTTCTGGACAGATCACCGATCC

III.3.2- Observaciones citoembriológicas

Se colectaron inflorescencias en el estadio de antesis de todos los individuos pertenecientes a la población F_1 segregante, incluido sus progenitores (Q4188 y Q4117) y se fijaron en FAA (etanol 70%, formaldehído y ácido acético glacial, en relación 18:1:1) en tubos de polipropileno de 15 ml por al menos 24-48 h y se los conservó en etanol 70% a 4°C. Se disectaron entre 30 a 100 ovarios por planta bajo lupa y se transfirieron a tubos Eppendorf con etanol 70% durante al menos 24 horas. El clarificado del material se realizó siguiendo el protocolo descrito por Young et al., (1979). Brevemente, los ovarios aislados se incubaron en agua oxigenada al 3% por 2 horas. Posteriormente, se les realizó una deshidratación con una serie de etanol (50%, 70%, 95% y dos pasos de etanol 100%, de 30 min cada una). Luego se realizó la clarificación del tejido empleando una serie de salicilato de metilo/etanol (v/v) (1:1, 3:1, 5,6:1; 1:0 durante al menos 30 minutos en cada paso). Luego de 16 h en salicilato de metilo al 100 % los ovarios se montaron en portaobjetos formando filas de a 10 ovarios y se observaron con un Microscopio Leica DM2500 equipado con el sistema de contraste de interferencia diferencial (DIC).

La clasificación del modo reproductivo se realizó de acuerdo a la morfología de los sacos embrionarios descrita por Martínez et al., (2001), que permite diferenciar los gametofitos de origen meiótico (SEM), originados luego de sucesivas mitosis de la megáspora funcional (MF) (n) procedente de la división meiótica de la célula madre de la megáspora (CMM), de los sacos de tipo apospóricos (SEA) originados a través de sucesivas divisiones mitóticas de células nucelares. Los SEM se caracterizan por la presencia de un aparato oosférico bien definido en el extremo micropilar (una ovocélula y dos sinérgidas), una célula central con dos núcleo polares y un grupo de células antipodales en el extremo chalazal del ovario (Martínez et al., 2001). Los SEA se diferencian por presentar en un extremo el aparato oosférico (generalmente una ovocélula y dos sinérgidas), una célula central muy vacuolizada, con dos núcleos polares y ausencia de células antipodales. Asimismo, es posible distinguir sacos embrionarios mixtos (SEM+SEA) en los cuales se puede observar la presencia de sacos meióticos y apospóricos en el mismo ovario. Los ovarios clarificados que no mostraron

sacos embrionarios desarrollados de ningún tipo, fueron considerados como abortados (SEab).

III.4- Selección y obtención de secuencias de genes de arroz asociadas al ACL

A partir de la lista de genes localizados en la región de arroz *sinténica* al *locus* responsable de la apomixis en especies de *Paspalum* reportada por Hosjgaard et al., (2011), se seleccionaron para este trabajo tres genes que por sus anotaciones funcionales podrían cumplir un rol importante en el desarrollo reproductivo y estar alterados durante el desarrollo apomíctico: LOC_Os12g40770, codificante para una proteína con repeticiones de anquirina-1 (OsANK-TPR); LOC_Os12g40890 correspondiente a una proteína de respuesta a auxinas (OsIAA30) y LOC_Os12g41060 codificante para una proteína con dominios AP2 (OsAP2/ERF). Las secuencias genómicas completas, las secuencias codificantes (CDS), el ADNc y las secuencias proteicas predichas para cada gen fueron descargadas de la base “Rice Genome Annotation Project” (<http://rice.plantbiology.msu.edu/>). Posteriormente, se identificaron los genes correspondientes en la base GRAMENE (www.gramene.org) y se obtuvo la posición exacta en el genoma de la especie.

III.5- Identificación de transcritos de *P. notatum* similares a los genes de arroz

Desde el inicio del proyecto se dispuso de una base de referencia del transcriptoma del desarrollo reproductivo de *P. notatum* obtenida por el sistema FLX+ Roche 454 (Life Sciences). Dicha base de datos incluye el ensamblado de los transcritos expresados durante el desarrollo reproductivo, desde el estado de pre-meiosis hasta el estado de antesis, de los genotipos tetraploides C4-4x (sexual) y Q4117 (apomíctico) (Ortiz et al., 2017). La secuenciación y el análisis bioinformático fueron realizados en el Instituto de Agrobiotecnología de Rosario (INDEAR) en junio de 2013. Los resultados de la secuenciación se encuentran disponibles en el repositorio SRA (“Sequence Read Archive”) del Instituto Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov), bajo los números de acceso SRX1971037 y SRX1971038 para la biblioteca apomícticas y sexual, respectivamente (Ortiz et al., 2017). Las lecturas crudas obtenidas (largo promedio 482,54 pb) se procesaron siguiendo la metodología estándar. Se realizaron tres ensamblados *de novo* utilizando el programa Newbler v2.8 (454/Roche, Branford, CT, USA): *i*) ensamblado de las lecturas específicas de C4-4x (base SEX), *ii*) ensamblado de las lecturas específicas de Q4117 (base APO) y *iii*) ensamblado conjunto de las lecturas de C4-4x y Q4117 (base GLOBAL) (Ortiz et al., 2017). El ensamblado sexual cuenta con 35.430 isogrupos (genes) y 43.888 isotigs

(alelos/variantes de “*splicing*”), el apomítico 37.124 isogrupos y 47.569 isotigs y el ensamblado global 48.842 isogrupos y 67.617 isotigs, respectivamente. Los niveles de expresión de cada transcripto en el genotipo sexual y apomítico fueron estimados a partir del número de lecturas crudas (“*raw reads*”) de cada muestra (C4-4x y Q4117) que mapearon sobre el ensamblado global. Se realizaron comparaciones de a pares (APO contra SEX) con el programa EdgeR package (Robinson et al., 2010). Los transcriptos que mostraron un $\log_{2}FC > 3.0$ y un $FDR < 0.05$ fueron considerados como diferenciales. Este análisis permitió identificar 3.732 isotigs de los cuales 2.066 se encontraron sobre-expresados en el genotipo apomítico y 1.666 en el sexual (Ortiz et al., 2017).

Para identificar los transcriptos de *P. notatum* expresados durante el desarrollo reproductivo apomítico y sexual similares a los derivados de los genes de arroz seleccionados anteriormente (LOC_Os12g40770, LOC_Os12g40890 y LOC_Os12g41060), se realizaron análisis de BLASTX y BLASTP (“*Basic Local Alignment Search Tool*”) (Altschul et al., 1990) sobre las tres bases de referencia. Como consulta (*query*) se emplearon las secuencias codificantes (CDS) (XM_015763531.2, XM_015765085.2 y XM_015763987.2) y las secuencias proteicas (XP_015619017.1, XP_015620571.1 y XP_015619473.1) correspondientes a los genes de arroz *OsANK-TPR*, *OsIAA30* y *OsAP2/ERF*, respectivamente. Como parámetros de búsqueda se emplearon valores umbrales de: % identidad > 50 , e-value $< 10^{-5}$ y bite score > 150 (Ortiz et al., 2017, 2019). En el caso de la proteína con dominios AP2 se emplearon como consulta (*query*) además de las secuencias de arroz *OsAP2/ERF*, seis secuencias proteicas representativas de la subfamilia BBM (BABY BOOM) *Oryza sativa*: OsBBM1 (KAB8114989.1), OsBBM2 (EAY86677.1) y OsBBM3 (XP_015634444.1), *Brassica napus*: BnBBM2 (AAM33801.1), *Arabidopsis thaliana*: AtBBM (AAM33803.1) y *Pennisetum glaucum*: PsASGR-BBM-like1 (EU559277.1), y cinco de la subfamilia AP2 (APETALA2), *Rosa chinensis*: RcAP2-like (XP_024182693.1), *Setaria itálica*: SiAP2-like (XP_022684171.1), *Arabidopsis thaliana*: AtAP2-like (AAC13770.1), *Malus domestica* AHAP2 (AAL57045.2) y *Oryza sativa*: AP25 (B8AVJ9.1).

Los transcriptos (isotigs) identificados en las búsquedas BLAST fueron analizados en cuanto a la presencia de los dominios conservados de cada tipo de proteína (ANK-TPR, AUX/IAA y AP2) utilizando el programa Pfam (<http://pfam.xfam.org/>). Posteriormente, se realizaron alineamientos para determinar el grado de similitud entre las secuencias aminoacídicas predichas y las secuencias utilizadas como consulta empleando los programas ClustalW y Muscle (con los parámetros open gap penalty: 10; gap extend penalty: 0.1), disponibles en el software MEGA-X (Kumar et al., 2018). Las matrices obtenidas a partir de los alineamientos múltiples se utilizaron para construir árboles filogenéticos sin raíces

empleando el método Neighbor-joining o UPGMA con 1.000 sustituciones (“*bootstrap*”) utilizando el software MEGA-X (Sneath y Sokal, 1973, Kumar et al., 2018).

III.6- Identificación de transcritos pertenecientes a las familias ANK-TPR, Aux/IAA y AP2/ERF de *P. notatum*

Con el fin de identificar los transcritos expresados durante el desarrollo reproductivo sexual y apomítico pertenecientes a las familias génicas ANK-TPR y Aux/IAA se obtuvieron a partir de la base de datos “*Rice Genome Annotation Project*” (<http://rice.plantbiology.msu.edu/>), las secuencias proteicas correspondientes a las 22 proteínas de la familia ANK-TPR (Huang et al., 2009) y a las 31 proteínas de la familia Aux/IAA (Jain et al., 2006) reportadas para la especie. Entre ellas se incluyeron las secuencias aminoacídicas codificadas por los *locus* LOC_Os12g40770 (OsANK-TPR) y LOC_Os12g40890 (OsIAA30) localizados en la región genómica de arroz sinténica al ACL de *P. notatum* (Hojsgaard et al., 2011). Para el caso de la familia ANK-TPR además de las proteínas de arroz, se obtuvieron los únicos miembros de esta familia presentes en maíz (ZmANK7 y ZmANK61) y el único en *Arabidopsis* (AT3G04710) (Becerra et al., 2004; Jain et al., 2006). Los nombres y números de acceso de dichas secuencias se encuentran detallados en las Tablas VIII.1 y VIII.2 del Anexo. En el caso de la familia AP2/ERF se seleccionaron seis secuencias proteicas representativas de la subfamilia BBM (BABY BOOM) de *Oryza sativa*: OsBBM1 (KAB8114989.1), OsBBM2 (EAY86677.1) y OsBBM3 (XP_015634444.1), *Brasica napus*: BnBBM2 (AAM33801.1), *Arabidopsis thaliana*: AtBBM (AAM33803.1) y *Pennisetum glaucum*: PsASGR-BBM-like1 (EU559277.1), y cinco de la subfamilia AP2 (APETALA2), *Rosa chinensis*: RcAP2-like (XP_024182693.1), *Setaria itálica*: SiAP2-like (XP_022684171.1), *Arabidopsis thaliana*: AtAP2-like (AAC13770.1), *Malus domestica* AHAP2 (AAL57045.2) y *Oryza sativa*: AP25 (B8AVJ9.1) (Jofuku et al., 1994; Boutilier, 2002; Zhou et al., 2012; Lata et al., 2014; Conner et al., 2015; Han et al., 2018; Jha y Kumar, 2018; Khanday et al., 2019). Las secuencias seleccionadas fueron utilizadas como consulta en búsquedas BLASTP (% identidad > 60, e-value < 10⁻⁴ y bite score > 150) sobre la base GLOBAL de proteínas predichas del transcriptoma del desarrollo reproductivo de *P. notatum* (Ortiz et al., 2017). Las secuencias proteicas identificadas fueron analizadas con el programa Pfam (<https://pfam.xfam.org/>) a fin de confirmar la presencia de los dominios conservados correspondientes a cada familia. Posteriormente, se realizaron alineamientos con el programa Muscle, utilizando el método UPGMA (open gap penalty: -2,90; gap extend penalty: -0.1) de la versión MEGA-X (Kumar et al., 2018) a fin de identificar las regiones conservadas. Las matrices de distancias fueron posteriormente utilizadas para llevar a cabo el análisis filogenéticos utilizando el programa MEGA-X v10.1 (Kumar et al., 2018). Los

árboles filogenéticos se construyeron por el método *Neighbor-joining* empleando 1.000 sustituciones (“*bootstrap*”) para generar el árbol consenso de cada familia. Posteriormente, utilizando las secuencias proteicas de los genes LOC_Os12g40770 (ANK-TPR), LOC_Os12g40890 (Aux/IAA) y AtAP2-like se obtuvieron las posibles redes de interacción proteína-proteína utilizando la base de datos STRING (<https://string-db.org/>).

III.7- Aislamiento y análisis de cosegregación de fragmentos génicos de *P. notatum*

Como punto de partida para los análisis de cosegregación entre las secuencias de *P. notatum* identificadas en los puntos anteriores y el modo de reproducción (sexual o apomíctica), se emplearon los transcritos (isotigs) que mostraron mayor similitud con los genes *OsANK-TPR*, *OsIAA30* y con los genes pertenecientes a la subfamilia *AP2* y *BBM*, en las búsquedas BLASTX y BLASTP. Dado que al momento de realizar estos experimentos no se contaba con un genoma de referencia de *P. notatum*, las probables estructuras génicas se reconstruyeron utilizando como referencia las secuencias genómicas de sus ortólogos más cercanos correspondientes a *Oryza sativa* (OSNPB_120599900, OSNPB_120601300 y 4325035) y *Setaria itálica* (117848612 y 101771961). Las estructuras génicas predichas se construyeron utilizando programa “*Gene Structure Display Server*” (GSDS versión 2.0, <http://gsds.cbi.pku.edu.cn/index.php>) (Hu et al., 2015). Posteriormente, en base a la estructura génica predicha se diseñaron cebadores sobre los bordes de los exones, flanqueando intrones e incluyendo regiones conservadas, a fin de amplificar por PCR fragmentos específicos de cada gen que detecten polimorfismos entre los individuos sexuales y apomícticos y contengan los dominios de interés. El diseño de cebadores se realizó utilizando el programa Primer 3 v.0.4.0 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/>) (Untergasser et al., 2012). Las secuencias de los cebadores utilizados se muestran en la Tabla 4. Una vez diseñados los cebadores se realizaron experimentos de mapeo genético empleando los genotipos Q4188 (sexual), Q4117 (apomíctico) y la población F₁ segregante por el modo de reproducción, derivada del cruzamiento entre ambos (Stein et al., 2007, esta tesis). Las reacciones de amplificación de PCR para cada candidato se realizaron inicialmente sobre el ADN genómico de Q4188 y Q4117, empleando cebadores específicos de cada secuencia (Tabla 4). Para las amplificaciones que mostraron patrones polimórficos entre los genotipos parentales, se realizaron experimentos de análisis de segregante en grupo (BSA) (Michelmore et al., 1993). Se conformaron *in vitro* dos grupos (“*bulks*”) con una concentración final de 30 ng/μl a partir de la mezcla de cantidades equimolares de ADN genómico de cinco individuos F₁ sexuales (bulk-sex) y cinco individuos F₁ apomícticos (bulk-apo). Para confirmar los casos en los que se obtuvieron resultados positivos para el ligamiento se realizaron nuevas amplificaciones

empleando los individuos utilizados en los “bulks” (experimento de “debulk”) en forma individual y se agregaron al experimento 5 individuos sexuales y 5 apomícticos. En algunos casos se empleó mayor cantidad de individuos de la población F₁. Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 25 µl conteniendo 60 ng de ADN, 0,2 µM de cada cebador, 1x solución reguladora de PCR 1X (INBIO Highway), MgCl₂ 1,5 mM, dNTPs 0,2 mM y 1U Taq polimerasa (INBIO Highway). Las condiciones de reacción consistieron en una etapa inicial de desnaturalización de 5 min a 94 °C, seguida de 35 ciclos de 30 s a 94°C, 1 min a 55 °C-60°C (según la temperatura de “melting” de cada par de cebadores), 2 min a 72 °C y 10 min finales de elongación a 72 °C. Los productos de las amplificaciones se resolvieron por electroforesis en geles de agarosa al 1,5 - 2% teñidos con el fluoróforo SYBR® Safe stains (Promega Cat.# S-33102) en una proporción SYBR Safe: TAE 1X de 1:10.000 (v/v). La electroforesis se realizó en una cuba Mupid®-One (Ref. MU-0041-) conteniendo solución reguladora TAE 1X durante 2 horas a 50 V. Las imágenes de los geles se tomaron con Molecular Imager® Gel Doc™ XR System utilizando la opción SYBR® Safe.

Tabla 4. Cebadores utilizados para amplificar secuencias genómicas correspondientes a genes de *P. notatum* similares a los genes *OsANK-TPR*, *OsIAA30*, *AP2* y *BBM*

Genes	Cebador	Secuencia (5'-3')
Ank-TPR	Pn11445aF	GTGAGGGTGCCTCTCTAAGC
	Pn11445aR	AGCTCTAGCCAAACACAGGA
	Pn11446aF	AGTTTATGCTGGCTGCGTCT
	Pn11446aR	CGATTCATGCCAAATAGTGC
	Pn20570sF	GAAATCTGAGTTCTTCAATGATATGG
	Pn20570sR	TTGCAAAAGATTAACCAGTCAAG
	Pn20350aF	AAATCAAGGGGTGATGATGC
	Pn20350aR	CATTGTGTCTGATTCGGCTTG
	Pn20350a1F	CTTGTATGGGCTGCTGGTCA
	ANK20350F	CTCATCGACAACCTCCGTCT
IAA30	Pn21112aF	GGTGGACCTCAAGATGTACAAGA
	RTPn21112aR	TTCATGGCTTCTCTCTTTTCGTAG
AP2/BBM	PnAP2LF	GGCAGCTCCAAGTACAGAGG
	PnAP2LR	AGGTCAAGGTTGTGCTCGTC
	PnBBMF	GAACAAGAAGGGCAAGCAAG
	PnBBMR	ACCTCCCGTTGTGGTGGT

El análisis de ligamiento se realizó codificando los datos de presencia o ausencia de los marcadores segregantes en cada F₁ como derivados de *loci* heterocigotas y homocigotas, respectivamente. En primer lugar los valores de segregación de cada fragmento fueron contrastados individualmente contra los valores esperados para una población del tipo

“*psuedotestcross*” (1:1 o 3:1) mediante una prueba de Chi-cuadrado $_{1.g.l.}$ ($p > 0,05$) (Stein et al., 2007). Posteriormente se realizó una prueba de cosegregación entre los marcadores y el carácter apomixis a través de un test de segregación independiente (Chi-cuadrado $_{1.g.l.}$ $P < 0,05$). Posteriormente, en aquellos casos en los que se corroboró la existencia de ligamiento se estimaron las frecuencias de recombinación mediante la relación entre el número de individuos recombinantes (que en este caso coincide con el número de gametas recombinantes) sobre el número total de individuos parentales (Cervigni et al., 2008).

III.8- Mapeo físico de secuencias de *P. notatum*

Desde finales del año 2019 se contó con un borrador del genoma de *P. notatum* del citotipo diploide, que permitió la realización de experimentos de mapeo *in silico* para determinar la localización física de las secuencias de *P. notatum* en estudio. Brevemente, en 2017 se inició un proyecto dirigido a generar un primer borrador (secuenciación y ensamblado) del genoma de *P. notatum*, utilizando como material vegetal un citotipo diploide sexual (denominado #R1) que presenta alrededor de un 1% de sacos embrionarios apospóricos (Quarin et al., 2001). El proyecto general pretende utilizar este borrador como referencia para el ensamblado del genoma tetraploide (donde se expresa principalmente la apomixis) y reconstruir el ACL de la especie (Ortiz et al., 2019). Al presente se dispone de unos 80 Gb de secuencias genómicas de alta calidad (Q score $> 30,0$, largo = 150 pb) generados por la tecnología Illumina HiSeq-1.500 *paired-end* (cobertura de aproximadamente 100x) y 38,4 Gb de lecturas largas (Q score $> 7,0$, N50 18.709 pb) obtenidas por el sistema Oxford Nanopore (aproximadamente 48x). A partir de estos recursos se realizaron varios ensamblados en el Institut de Recherche Pour le Developpement (IRD) de Montpellier, Francia, de los cuales se seleccionó para este trabajo el generado con el programa Miniasm (Li, 2016). El mismo cubre unos 822 Mb y cuenta 3.843 *scaffolds* (supercontings) de un largo promedio de 214,03 kbp y un N50 de 299,7 kbp. Al utilizarse como referencia, este ensamblado permitió mapear más del 90% de las secuencias apareadas (*pair-end*) obtenidas por el sistema Illumina y alcanzó una cobertura mayor al 75% de acuerdo al programa BUSCO (Simao et al., 2015) (Ortiz et al., Comunicación personal). Esta referencia fue empleada como base de datos para análisis de BLASTN utilizando las secuencias nucleotídicas correspondientes a marcadores moleculares completamente ligados a la apomixis en la especie (C1069), y de los transcritos de *P. notatum* correspondientes a los genes ortólogos a *OsANK-TPR* y *OsIAA30*. Como parámetros de búsqueda se emplearon valores umbrales de: % identidad > 80 , E-value $< 1e^{-50}$ y bit score > 200 .

III.9- Clonado y secuenciación de fragmentos génicos ligados al ACL *P. notatum*

Los fragmentos que resultaron ligados al ACL de *P. notatum* o cosegragaron con el modo de reproducción en el análisis de ligamiento genético descrito en el punto III.7, fueron amplificados sobre ADN genómico de Q4188 (sexual) y Q4117 (apomítico) con los mismos cebadores y condiciones previamente mencionadas. Los productos de las amplificaciones se resolvieron por electroforesis en geles de agarosa entre 1,5 a 2% teñidos con el fluoróforo SYBR® Safe stains (Promega Cat.# S-33102) en una proporción SYBR Safe: TAE 1X de 1:10.000 (v/v). La electroforesis se realizó en una cuba Mupid®-One (Ref. MU-0041-) conteniendo solución reguladora TAE 1X durante 2 horas a 50 V. Las imágenes de los geles se tomaron con Molecular Imager® Gel Doc™ XR System utilizando la opción SYBR® Safe. Las bandas de interés se cortaron del gel con un bisturí, se purificaron con el sistema de limpieza de Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) y se clonaron en el sistema pGEM-T-easy (Promega) utilizando bacterias de *E. coli* competentes DH5 alpha por el método de cloruro de calcio (Promega). Al menos tres clones de cada amplicón se secuenciaron por el servicio de Macrogen Inc.(Corea). El programa VecScreen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>) se utilizó para identificar y eliminar los segmentos de los vectores presentes en las secuencias clonadas. Empleando la versión libre del programa Sequencher 4.10.1 (Gene Code Corporation), las réplicas de cada amplicón se alinearon para determinar la secuencia consenso de cada fragmento. Posteriormente, las secuencias consenso obtenidas para cada uno de los fragmentos se alinearon entre sí empleando el programa ClustalW (Chenna et al., 2003), a fin de determinar el/los polimorfismo/s de los alelos ligados al ACL. Además, se realizaron búsquedas BLASTN en la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para corroborar la identidad de los fragmentos clonados y sobre el transcriptoma de referencia del desarrollo reproductivo de *P. notatum* (Ortiz et al., 2017).

III.10- Extracción de ARNm y síntesis de ADNc

Con el fin de realizar estudios de expresión de los transcritos relevantes asociados a los genes de interés se realizó la extracción de ARN total a partir de tejido reproductivo y somático. Como tejido reproductivo se colectaron inflorescencias en cuatro estados del desarrollo del ovario: *i*) pre-meiosis, *ii*) meiosis, *iii*) post-meiosis y *iv*) anthesis de dos genotipos sexuales (C4-4x y Q4188), cuatro apomíticos (Q4117, J7, J40, J11) y seis híbridos F₁ de la población segregante (tres sexuales JS57, JS58, JS83 y tres apomíticos JS9, JS40, JS71). La clasificación del estado de desarrollo de las inflorescencias se realizó siguiendo el calendario reproductivo descrito por Laspina et al., (2008). Para esto se colectaron

inflorescencias en los diferentes estados y se mantuvieron en un recipiente con agua. Posteriormente en el laboratorio se disectaron las anteras y se extrajeron los granos de polen sobre un portaobjeto conteniendo una gota del colorante carmín acético (Carmín 10 mg/ml, ácido acético 45%), luego se cubrieron con un cubreobjeto. Los preparados fueron observados utilizando un microscopio óptico Leica DM2500 y las imágenes fueron documentadas utilizando una cámara digital (Leica Microsystemes, Wetzlar, Alemania). A partir del estado de desarrollo de la microesporogénesis y microgametogénesis se estimó el estado de desarrollo de la megagametogénesis y megasporogénesis (pre-meiosis, meiosis, post-meiosis y antesis) (Laspina et al., 2008). Asimismo, se recolectaron espiguillas dos días después de la antesis (en etapa de embriogénesis y formación del endosperma) de los genotipos Q4188 y Q4117. Como tejido somático, se extrajo ARN de hojas jóvenes y raíces en crecimiento correspondiente a los genotipos Q4188 y Q4117. Todo el material colectado, clasificado y debidamente rotulado fue conservado a -80°C hasta su uso.

La extracción del ARN total se realizó utilizando el método de TRIzol Reagent (Invitrogen) (Chomczynski, 1993). Se congelaron en N₂ líquido 50 mg de cada una de las muestras descritas en el párrafo anterior. Luego se disgregaron mecánicamente en mortero hasta obtener un polvo fino. Cada muestra fue transferida a un tubo Eppendorf de 1,5 ml conteniendo 1 ml de TRIzol Reagent, luego se homogeneizó e incubó por 5 min a -4°C. Posteriormente se agregaron 200 µl de cloroformo, se incubó durante 5 min a -4°C y se separó la fase soluble por centrifugación a 12.000 rpm a 4°C durante 15 min. La fase acuosa fue recuperada en un tubo Eppendorf de 1,5 ml limpio. El ARN se precipitó mediante el agregado de 500 µl de isopropanol frío e incubación a -4°C por 10 min. Luego se centrifugó a 12.000 rpm a -4°C durante 10 min y se descartó el sobrenadante utilizando una micropipeta. Posteriormente, se lavó el pellet de ARN durante 5 min con etanol 75 %, se centrifugó a 12.000 rpm a -4°C durante 5 minutos y nuevamente se descartó el sobrenadante. Finalmente, el pellet de ARN se secó bajo flujo laminar y se disolvió en 25 µl de agua estéril libre de nucleasas. La concentración del ARN se determinó mediante un fluorómetro Qubit utilizando Qubit™ RNA HS Assay Kit (Invitrogen Cat.# Q32852) y la integridad de las muestras se determinó por electroforesis en geles de agarosa al 1 % p/v teñido con SYBR® Safe stains (Promega Cat.# S-33102) en una proporción SYBR Safe: TAE 1X de 1:10.000 (v/v). La electroforesis se realizó en una cuba Mupid®-One (Ref. MU-0041-), previamente lavada con NaOH 0,4 M, conteniendo solución reguladora TAE 1X durante 1 hora a 50 V. Las imágenes se tomaron con Molecular Imager® Gel Doc™ XR System utilizando la opción SYBR® Safe

El ADNc se sintetizó a partir de 1 µg de ARN total, utilizando la enzima transcriptasa reversa SuperScript® II (Invitrogen Cat.# 11922-028) de acuerdo a lo indicado en el protocolo

estándar del proveedor. La reacción se realizó en un volumen final de 20 μ l, inicialmente se colocó 1 μ g de ARN total, 1 μ l de Oligo(dT) 100 μ M, 1 μ l de dNTPs 10 mM, H₂O hasta un volumen final de 12 μ l y se incubó a 65° C por 5 min. Posteriormente se adicionaron 4 μ l de solución reguladora 5X First-Strand y 2 μ l 0,1 M DTT, se homogenizó e incubó a 42°C durante 2 min. Luego se agregó 1 μ l (200 U) de la enzima SuperScript® II y se incubó a 42°C durante 50 min. Finalmente se inactivó la enzima a 70°C por 15 min y la preparación se almacenó a -20°C hasta su uso.

III.11- Análisis de expresión relativa por PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)

Para determinar la expresión relativa de los transcritos de *P. notatum* ortólogos a los genes *OsANK-TPR* y *OsIAA30* de arroz en tejido somático (hoja y raíz) y reproductivo (espiguillas en estados de pre-meiosis, meiosis, pos-meiosis y antesis) se realizaron experimentos de qRT-PCR siguiendo el protocolo descrito por Siena et al., (2014). Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un volumen final de 15 μ l conteniendo 20 ng de ADNc, 0,2 μ M de cada cebador, 1X Mezcla Real qPCR (Biodynamics). Las condiciones de reacción consistieron en una etapa inicial de desnaturalización de 2 min a 94°C seguida de 45 ciclos de 15 s a 94°C, 30 s a 57°C-60°C, 40 s a 72°C, utilizando un equipo Rotor gene Q (QIAGEN, Hilden, Alemania). En todos los casos se efectuaron tres réplicas técnicas de cada determinación y al menos dos repeticiones biológicas para cada genotipo y estadio.

Los cebadores para la amplificación de los fragmentos fueron diseñados utilizando el programa libre Primer 3 v.0.4.0 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/>). Se tomó como criterio que el fragmento amplificado presente un tamaño de entre 90 y 150 pb, que no incluya dominios conservados (a fin de asegurar la amplificación específica de los transcritos bajo estudio) y en lo posible estar anclados en los bordes de exones, para discriminar los amplicones derivados del ADNc y del ADN genómico (Tabla 5).

Tabla 5- Cebadores utilizados para los estudios de expresión por qRT-PCR de los genes de *P. notatum* ortólogos a *OsANK-TPR* y *OsIAA30*.

Cebadores	Secuencia (5'-3')
RTANK2F	AGTGCAGATGGAATTATAGAACACAC
RTANK2R	GATCTGCCTGATTTTCAGAGATGAC
RTANK3F	ATATTAGCGGTGTTCCAAGTTGAT
RTANK3R	TATGAGCTCTAGCCAAACACAGGA
RTANK4F	GAAATCTGAGTTCTTCAATGATATGG
RTANK4R	ACAAGTACATTGCTGAAAAGTATTCC
RTPn21112aF	TGGTGTGTCAACTGTCCTATCTG
RTPn21112aR	TTCATGGCTTCTCTCTTTTCGTAG
β -tubulinaF	GTGGAGTGGATCCCCAACAA
β -tubulinaR	AAAGCCTTCTCCTGAACATGG
Glucosa-6-fosfato DHF	CATCAGAGATGAGAAAGTCAAGGTT
Glucosa-6-fosfato DHR	AGCTTTAAGAATGAAAGGAACACCT

Como genes normalizadores se amplificaron fragmentos correspondientes a la β -tubulina (β -TUB) y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) debido a que ambos muestran una expresión estable durante el desarrollo reproductivo apomítico y sexual de *P. notatum* (Podio et al., 2014; Siena et al., 2014). Los datos de expresión fueron analizados manualmente empleando el método del Δ Ct (Pfaffl, 2001) y/o utilizando el programa REST (QIAGEN).

III.12- Análisis de expresión por PCR semicuantitativa (RT-PCR)

Se realizaron experimentos de amplificación por PCR semicuantitativa (RT-PCR) a fin de determinar diferencias de expresión de los transcritos ortólogos a *OsANK-TPR* y *OsIAA30* empleando los cebadores RTANK3F, RTANK3R y RTPn21112aF, RTPn21112aR, respectivamente (Ver Tabla 5). Las reacciones de amplificación fueron llevadas a cabo en un volumen final de reacción de 25 μ l por muestra utilizando 2 μ l de una dilución 1/5-1/10 de ADNc derivado de hojas, raíces e inflorescencias colectadas dos días después de antes de los genotipos Q4188 y Q4117, 1 U de ADN polimerasa Taq (INBIO Highway), 1,5mM de $MgCl_2$, 0,2 μ M de dNTPs, 0,2 μ M de cada cebador y agua libre de nucleasas. Las condiciones de reacción consistieron en una etapa inicial de desnaturalización de 5 min a 94°C, seguida de 33 ciclos de 30 s a 94°C, 1 min a 59°C, 40 s a 72°C. Como gen normalizador se amplificó un fragmento interno de β -tubulina, previamente utilizado para los análisis de expresión relativa. Todas las muestras de ADNc, fueron amplificadas al mismo tiempo para evitar variaciones debidas a la manipulación de las muestras (Sciore et al., 1998). Los productos de las amplificaciones se resolvieron por electroforesis en geles de agarosa al 2% teñidos con el fluoróforo SYBR® Safe stain (Promega Cat.# S-33102) en una proporción SYBR Safe: TAE 1X de 1:10.000 (v/v). La electroforesis se realizó en una cuba Mupid®-One (Ref. MU-0041-)

conteniendo solución reguladora TAE 1X durante 1 h 20 min a 50 V. Las imágenes se tomaron con Molecular Imager® Gel Doc™ XR System utilizando la opción SYBR® Safe.

La cuantificación de la expresión se realizó utilizando el software ImageJ, que cuantifica la cantidad de luz por pixel de un área determinada, construyendo con estos valores una curva de intensidad, de la que se obtiene un área a través del cálculo de integrales definidas, dicha área es una medida indirecta de la intensidad de las bandas (Abràmoff et al., 2004). Empleando dicho software se cuantificaron los niveles de expresión a partir de intensidades de las bandas amplificadas para cada gen, genotipo y tejido. Posteriormente, la expresión de los genes blanco se relativizó empleando los valores de expresión del gen de referencia *β-tubulina*.

III.13- Experimentos de hibridación *in situ* de tejidos

Con el fin de observar la localización de la expresión de los transcritos correspondientes al gen *PnIAA30* en tejido reproductivo se realizaron experimentos de hibridación *in situ* de tejido en secciones de ovarios de los genotipos Q4188 (sexual) y Q4117 (apomíctico) en diferentes estadios de desarrollo (pre-meiosis, meiosis y antesis). La metodología empleada se basó en el protocolo descrito previamente por Siena et al., (2014). Brevemente, inflorescencias en distintos estados de desarrollo fueron colectadas y fijadas en buffer de fijación (4% de paraformaldehído/0,25% glutaraldehído en solución reguladora fosfato 0,01 M pH 7,2). Las mismas fueron clasificadas en cuanto al desarrollo reproductivo (ver sección III.9), seccionadas y separadas bajo lupa estereoscópica. En el estadio de antesis se separaron los ovarios individuales mientras que en los estadios más jóvenes se utilizó la espiguilla entera para realizar la hibridación. En estos últimos se realizó un corte en la parte superior y lateral de la espiguilla para facilitar el ingreso de la parafina al interior de la misma. Posteriormente, se deshidrataron mediante incubaciones en una serie de etanol (70%, 80%, 95%, 100%) 30 min cada uno. Luego, se trataron empleando una serie de xilol/etanol (v/v) (1:3, 1:1, 3:1) durante 30 minutos en cada uno, consecutivamente se incubaron durante 60 min en xilol 100%, este último paso se repitió tres veces. Todos los tratamientos en los que se empleó xilol se realizaron baja campana a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras se infiltraron con parafina: xilol (1:1 v/v) e incubaron 4 h como mínimo a 42°C, este último paso se repitió dos veces. Finalmente, se incubaron en parafina 100% a 60°C durante dos días con al menos 4 cambios de parafina.

Los tacos (bloques de parafina con la muestra incluida) se confeccionaron colocando una pequeña capa de parafina líquida sobre un bloque metálico precalentado a 58°C, sobre

la misma se acomodaron de 5-10 ovarios longitudinalmente (ovarios en antrio) y lateralmente (ovarios en pre-meiosis y meiosis) y se cubrieron con parafina líquida a 60°C hasta el tope del molde. Posteriormente, se dejaron enfriar a temperatura ambiente durante dos horas y se almacenaron a 4°C. Los tacos se cortaron en secciones de 10 micras utilizando un Micrótopo Rotatorio TechLabs modelo YD A202D. Las tiras de parafina con las muestras seccionadas se colocaron en portaobjetos previamente lavados con Tween 20 al 4% y HCl 0,1 N, esterilizados y tratados con poli-L-lisina 100 mg/ml. Los cortes fueron desparafinados a través de una serie de xilol-etanol antes de realizar la hibridación.

Un fragmento de 500 pb específico del gen de *PnIAA30* fue seleccionado como sonda para la hibridación, el mismo fue clonado en el sistema pGEM-T-easy según lo descrito en el apartado III.9 de esta sección. El fragmento de ADN utilizado como sonda se generó por medio de una PCR M13 F/R del plásmido recombinante. Cabe destacar que el fragmento amplificado incluye los sitios promotores SP6/T7 del plásmido pGEM-T-easy. El producto de amplificación fue purificado con el sistema de limpieza de Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) para luego verificar el tamaño del producto en un gel de agarosa al 1,5 %. Un total de 1 µg del producto de amplificación puro fue utilizado para generar las sondas marcadas por medio del sistema de marcación de Roche DIG RNA (DIG RNA Labeling Kit SP6/T7 Cat. No. 1175025, Roche). La discriminación de las hebras sentido y antisentido se basó en la homología con la secuencia codificante conocida del gen, y la marcación con la RNA polimerasa correspondiente (promotor SP6 o T7). Las sondas se hidrolizaron químicamente con buffer $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ a 60°C hasta obtener fragmentos de aproximadamente 150-200 pb. El tiempo de hidrólisis en minutos (T) fue calculado según la fórmula; $T = L_0 - L_f / k$. L_0, L_f , donde; L_0 y L_f corresponde al largo inicial y final de la sonda (kb), respectivamente y k (0,11 kb/min) es la tasa de hidrólisis. El resultado de la hidrólisis fue verificado en gel de agarosa al 1,5 %. La sonda tratada fue precipitada con 5 µl de ácido acético al 10 %, 11 µl de acetato de sodio 3M y 2,5 V de etanol absoluto para su purificación. Luego de la incubación a -20 °C por 16 h y posterior centrifugación el precipitado fue lavado con etanol al 70 % para finalmente resuspender la sonda pura en 20 µl de H_2O libre de nucleasas.

La prehibridación se realizó en una solución reguladora de Tris-HCl 0,05 M pH 7,5 que contenía 1 µg/ml de proteinasa K en una cámara húmeda a 37 °C durante 10 min. La hibridación se realizó durante toda la noche en una cámara húmeda a 37 °C, en solución reguladora Tris-HCl pH 7,5 10 mM que contiene NaCl 300 mM, formamida al 50% (desionizada), EDTA 1 mM pH 8, 1x Denhardt, dextransulfato al 10%, 600 ng/ml de ARN total

y 60 ng de la sonda. Luego de la hibridación se realizó una serie de 4 lavados de 30 min cada uno con buffer SSC en concentración decreciente (4x, 2x, 1x y 0,5x) a 37 °C.

La detección se realizó siguiendo las instrucciones del kit de detección Roche Dig (DIG Nucleic Acid Detection Kit Cat. No. 11175041910, Roche Applied Science, Mannheim, Germany) utilizando un anticuerpo anti-DIG asociado a una fosfatasa alcalina y NBT/BCIP como sustratos. La reacción se detuvo con posteriores lavados con buffer de detección 4 (ph 8) y los preparados fueron montados en glicerol al 50 % antes de colocar el cubreobjeto. Todas las observaciones se llevaron a cabo utilizando un microscopio de transmisión de luz Nikon E200. Las imágenes se documentaron empleando una cámara Mikoba 845.

IV- RESULTADOS

IV.1- Clasificación de híbridos F₁ según el modo de reproducción

IV.1.1- Clasificación a través de marcadores moleculares

A fin de disponer del material experimental adecuado para la realización de los experimentos planteados en el trabajo de tesis, se determinó el modo reproductivo de 50 individuos de una población F₁ segregante por el modo de reproducción, obtenida a partir del cruzamiento entre el progenitor femenino Q4188 (tetraploide sexual de origen experimental) y el masculino Q4117 (tetraploide apomíctico natural). Dicha población incluyó 16 individuos remanentes de la población original generada por Stein et al., (2007), los cuales fueron reclasificados, y 34 nuevos individuos derivados del mismo cruzamiento obtenidos en esta tesis (Figura 7). En primer lugar la clasificación del modo reproductivo se llevó a cabo empleando dos marcadores moleculares completamente ligados a la apomixis en la especie: el SCAR *SPNA2*, desarrollado a partir de un marcador AFLP (E36M37c) 100 % ligado al ACL en *P. notatum* (Rebozzio et al., 2012) y el marcador de PCR *PPIAPO*, derivado de un clon de ADNc de arroz (C932) que mapea completamente ligado al ACL en al menos 4 especies de *Paspalum* (Spoto et al., 2016).



Figura 7. Población F₁ derivada del cruzamiento entre los genotipos Q4188 (sexual) y Q4117 (apomíctico) de *P. notatum* en los terrenos de la Facultad de Ciencias Agrarias UNR/IICAR.

La extracción de ADN genómico de los progenitores y de la totalidad de los individuos de la población, por el método descrito por Shagai-Maroo et al., (1984) permitió la obtención

de ADN de buena calidad en todas las muestras (Figura 8). La amplificación realizada con los cebadores del marcador SCAR *SPNA2* mostró la presencia del fragmento esperado de 114 pb (*SPNA2*) en cinco de los 26 individuos analizados (Figura 9a). Por su parte, la amplificación con los cebadores del marcador *PPIAPO* mostró la presencia de la banda esperada de 530 pb en 11 de los 50 individuos ensayados (Figura 9b). Dado el ligamiento completo de estos dos marcadores con el carácter apomixis, la presencia o la ausencia de los marcadores en cada uno de los individuos fue utilizada como criterio de clasificación del modo de reproducción de los híbridos, en apomíticos y sexuales, respectivamente. Como resultado de este análisis en la totalidad de los híbridos F_1 , 39 fueron clasificados como sexuales y 11 como apospóricos (relación 3,5 sex :1 apo) (Tabla 6). Es de destacar que esta relación de segregación del carácter en los individuos F_1 está dentro del rango de valores obtenidos previamente en poblaciones similares, obtenidas con los mismos u otros progenitores (Martínez et al., 2001; Stein et al., 2004a; Zilli et al., 2015).

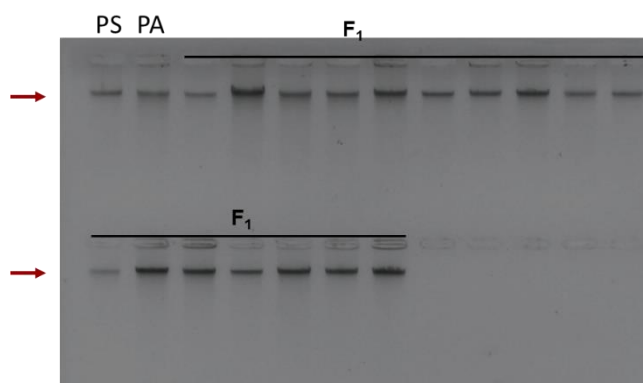


Figura 8. ADN genómico de *P. notatum*. Gel de agarosa al 0,8% teñido con fluoróforo *syber safe*, donde se observan bandas de alto peso molecular (indicado por las flechas) correspondientes al ADN genómico de: PS: progenitor sexual Q4188, PA: progenitor apomítico Q4117 y 17 individuos de la población F_1 .

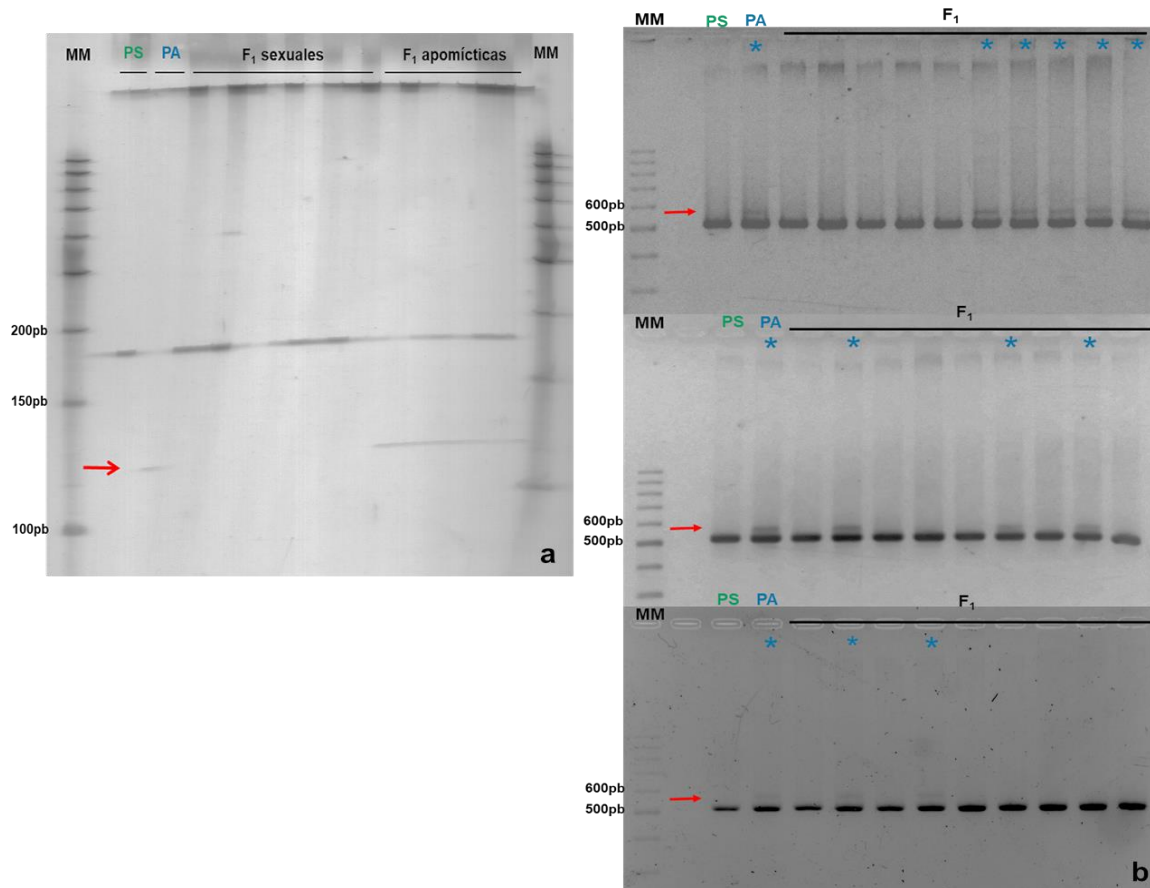


Figura 9. Resultados de la clasificación de la población F_1 por los marcadores SCAR *SPNA2* y *PPIAPO*. **a)** Gel de poliacrilamida al 6 % revelado con nitrato de plata mostrando productos de amplificación obtenidos con los cebadores de SCAR *SPNA2* para los ADN genómicos de Q4188 (PS), Q4117 (PA) y 18 individuos F_1 . Las flechas indican la banda de 114pb correspondiente al marcador *SPNA2*, presente en el progenitor masculino y algunos de los híbridos F_1 , clasificados como apospóricos. **b)** Geles de agarosa al 3 % teñidos con *syber safe* mostrando productos de amplificación obtenidos con los cebadores de *PPIAPO* para los ADN genómicos de Q4188 (PS), Q4117 (PA) y 30 individuos F_1 . Las flechas indican la banda de 530 pb correspondiente al marcador *PPIAPO*. El mismo está presente en el progenitor masculino y en algunas progenies (marcadas con asteriscos) que se clasificaron como apospóricos.

IV.1.2- Clasificación del modo reproductivo por citoembriología

Además de la clasificación de los individuos de la población F_1 y sus parentales a través de los marcadores moleculares *SPNA2* y *PPIAPO*, 100 % ligados a la aposporia, se realizó una clasificación por citoembriología a fin de descartar cualquier posible evento de recombinación entre los marcadores y el carácter apomixis. Para esto, se observaron entre 20 y 100 ovarios en anthesis de los 50 híbridos F_1 y de ambos genotipos parentales, utilizando la metodología del clarificado y microscopía DIC (Young et al., 1979). La clasificación del modo reproductivo se determinó teniendo en cuenta la morfología de los sacos embrionarios contenidos en los ovarios considerando la presencia de: 1) sacos embrionarios de tipo

meióticos (SEM), *ii*) sacos embrionarios meióticos y sacos embrionarios apospóricos (ovarios mixtos) y *iii*) solamente sacos embrionarios apospóricos (SEA). Se consideraron como apomícticos aquellos individuos que mostraron tanto, SEA como SEM y SEA (ovarios mixtos). Se consideraron como sexuales a todas las plantas que no presentaron la capacidad de formar sacos embrionarios apospóricos o mixtos, es decir todos aquellos individuos que mostraron exclusivamente SEMs. En la Figura 10 se muestran la morfología de los distintos tipos de ovarios utilizados para la clasificación.

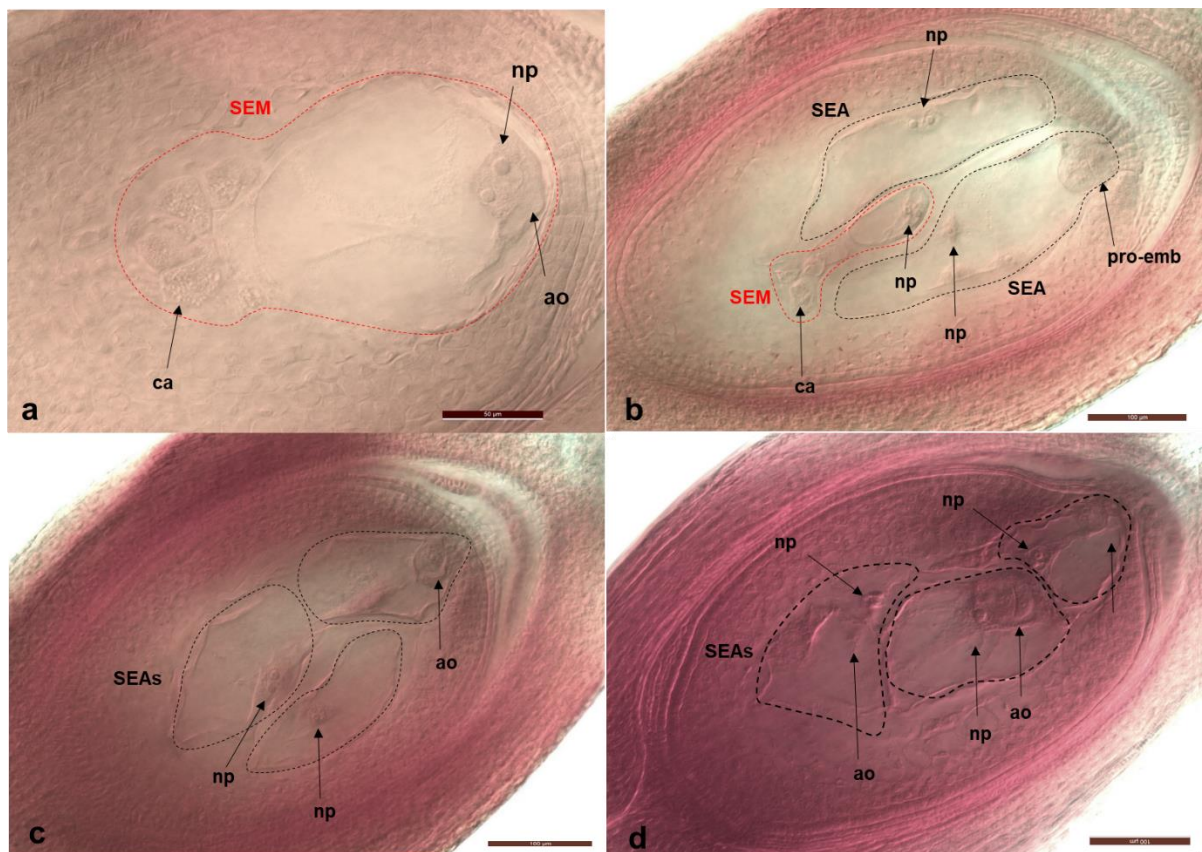


Figura 10. Fotografías DIC mostrando la morfología de los sacos embrionarios de *P. notatum*. **a)** Ovario conteniendo un saco embrionario meiótico (SEM), se observa el aparato oosférico y los 2 núcleos polares (np) de la célula central hacia el extremo micropilar y las antípodas hacia el extremo chalazal. **b)** Ovario conteniendo un saco embrionario meiótico delimitado por líneas punteada roja y dos sacos embrionarios apospóricos marcados con líneas punteadas negras. En uno de los sacos SEA se observa un proembrión en el extremo micropilar **c y d)** Ovario con tres SEAs, se observa claramente la ausencia de células antipodales en el extremo chalazal de cada saco embrionario. np: núcleos polares, ca: células antípodas, ao: aparato oosférico, pro-emb: proembrión, SEM: saco embrionario meiótico, SEA: saco embrionario apospórico.

Como era de esperar el genotipo parental sexual (Q4188) mostró exclusivamente ovarios con sacos embrionarios del tipo meiótico y el parental apomítico (Q4117) presentó una alta proporción de ovarios con SEA y ovarios mixtos (SEA+SEM) (Tabla 6). Por otra parte, de los 50 individuos F₁ analizados, 39 mostraron solo ovarios conteniendo SEM, siendo clasificados como sexuales, los 11 individuos restantes mostraron ovarios conteniendo SEAs o (SEA+SEM) por lo que se clasificaron como apospóricos. Estos resultados son concordantes con la clasificación a través de marcadores moleculares. En la Tabla 6 se presentan los resultados obtenidos por ambas metodologías.

Tabla 6. Clasificación de la población F₁ derivada del cruzamiento Q4188 x Q4117, incluidos estos, por medio de marcadores moleculares (SPNA2 y PPIAPO), y observaciones citoembriológicas.

Individuo	Marcadores		Ovarios analizados	% de ovarios				Clasificación
	PPIAPO	SPNA2		SEM	SEA	SEM+SEA	AB	
Q4188	No	No	21	90,5	0,0	0,0	9,5	S
Q4117	Si	Si	33	5,1	50,0	38,8	6,1	AF
JS7	No	No	43	88,4	0,0	0,0	11,6	S
JS8	No	No	40	87,5	0,0	0,0	12,5	S
JS32	No	No	23	87,0	0,0	0,0	13,0	S
JS34	No	No	31	80,6	0,0	0,0	19,4	S
JS 36	No	No	57	91,2	0,0	0,0	8,8	S
JS 56	No	No	59	94,9	0,0	0,0	5,1	S
JS 57	No	No	51	88,2	0,0	0,0	11,8	S
JS58	No	No	61	90,2	0,0	0,0	9,8	S
JS 70	No	No	76	86,8	0,0	0,0	13,2	S
JS 77	No	No	26	88,5	0,0	0,0	11,5	S
JS 83	No	No	48	91,7	0,0	0,0	8,3	S
JS 96	No	No	36	91,7	0,0	0,0	8,3	S
JS 98	No	No	32	93,8	0,0	0,0	6,3	S
JS 117	No	No	81	85,2	0,0	0,0	14,8	S
JS 118	No	No	76	86,8	0,0	0,0	13,2	S
JS 119	No	No	31	87,1	0,0	0,0	12,9	S
JS120	No	No	25	76,0	0,0	0,0	24,0	S
JS124	No	No	54	92,6	0,0	0,0	7,4	S
JS 128	No	No	60	85,0	0,0	0,0	15,0	S
JS 129	No	No	24	79,2	0,0	0,0	20,8	S
JS 131	No	No	38	92,1	0,0	0,0	7,9	S
JS132	No	nd	27	81,5	0,0	0,0	18,5	S
JS134	No	nd	54	79,6	0,0	0,0	14,8	S
JS138	No	nd	60	85,0	0,0	0,0	15,0	S
JS139	No	nd	51	92,2	0,0	0,0	7,8	S
JS 140	No	nd	23	87,0	0,0	0,0	13,0	S
JS144	No	nd	20	85,0	0,0	0,0	15,0	S
JS146	No	nd	31	87,1	0,0	0,0	12,9	S
JS148	No	nd	26	80,8	0,0	0,0	19,2	S
JS149	No	nd	20	80,0	0,0	0,0	20,0	S
JS151	No	nd	23	78,3	0,0	0,0	21,7	S

JS152	No	nd	22	95,5	0,0	0,0	4,5	S
JS153	No	nd	25	88,0	0,0	0,0	12,0	S
JS154	No	nd	20	95,0	0,0	0,0	5,0	S
JS155	No	nd	22	83,3	0,0	0,0	16,7	S
JS156	No	nd	23	100,0	0,0	0,0	0,0	S
JS157	No	nd	21	85,7	0,0	0,0	14,3	S
JS158	No	nd	20	95,0	0,0	0,0	5,0	S
JS159	No	nd	28	100,0	0,0	0,0	0,0	S
JS 9	Si	Si	40	15,0	52,5	12,5	20,0	AF
JS 71	Si	Si	50	10,0	44,0	40,0	6,0	AF
JS 40	Si	Si	47	2,1	68,1	27,7	2,1	AF
JS 123	Si	Si	79	8,9	58,2	25,3	7,6	AF
JS 130	Si	Si	44	27,3	36,4	27,3	9,1	AF
JS135	Si	nd	93	16,1	23,7	58,1	2,2	AF
JS136	Si	nd	37	18,9	37,8	32,4	10,8	AF
JS143	Si	nd	68	7,4	27,9	60,3	4,4	AF
JS145	Si	nd	62	22,6	24,2	46,8	3,2	AF
JS147	Si	nd	45	2,2	46,7	46,7	4,4	AF
JS150	Si	nd	51	17,6	43,1	31,4	7,8	AF

SEM: % de ovarios mostrando sacos embrionarios meióticos, SEA: % de ovarios mostrando sacos embrionarios apospóricos, SEM+SEA: % ovarios mixtos, mostrando los dos tipos de sacos, AB: % de ovarios con sacos embrionarios abortados, S: sexual, AF: apomítico facultativo, nd: no determinado.

En base a los datos obtenidos a través de las observaciones citoembriológicas presentadas en la Tabla 6, se calcularon los promedios generales, sus rangos con valor mínimo y máximo, y % C.V de los porcentajes de SEM, SEA, SEM+SEA y AB de los individuos F₁ sexuales y apomíticos de la población segregante (Q4188 x Q4117). Los resultados se presentan en la Tabla 7.

Tabla 7. Análisis de los valores obtenidos en las observaciones citoembriológicas de los individuos F₁ derivados del cruzamiento entre Q4188 y Q4117.

Progenie F ₁ (Q4188 x Q4117)	% de ovarios				
	SEM	SEA	SEM+SEA	AB	
Promedio general	87,8	0	0	12,1	
39 sexuales	Rango de medias	76-100	0	0	0-21,7
	%C.V	6,5	0	0	46,4
Promedio general	13,5	42,1	37,1	7,1	
11 apomíticos	Rango de medias	2,1-27,3	23,6-68,1	12,5-60,3	2,1-20
	%C.V	57,4	31,9	37,7	69,6

SEM: sacos embrionarios meióticos, SEA: sacos embrionarios apospóricos, SEM + SEA: sacos embrionarios mixtos, AB: sacos embrionarios abortados, % C.V: coeficiente de variación porcentual.

El promedio general del % SEM correspondiente a los 39 individuos F_1 sexuales arrojó un valor de 87,8, similar al valor observado en el parental femenino sexual Q4188 (% SEM= 90,5) (Tabla 1). Los valores mínimos y máximos de % SEM fueron 76 y 100, respectivamente, con un coeficiente de variación porcentual de 6,5 que indico homogeneidad en los datos. Por otro lado, los 11 individuos clasificados como apomítico mostraron un promedio de % de SEA de 42,1, que varió de 23,6 a 68,1, dentro de este rango se encuentra el valor observado en el parental apomítico Q4117. Lo mismo se observó para el caso del % de ovarios mixtos (SEM+SEA). Por el contrario, la proporción de ovarios con SEM varió de 2,1 a 27,3 desviándose del valor de 5,1 observado en Q4117, lo cual indica una amplia variación de este carácter en la progenie.

IV.2- Análisis de genes con repeticiones *anquirina* (ANK) expresados durante el desarrollo reproductivo de *P. notatum*

IV.2.1- Obtención y análisis de transcritos similares a *OsANK-TPR* de arroz

Como se mencionó en la introducción el gen LOC_Os12g04770 (*OsANK-TPR*) codificante para una proteína con repeticiones de anquirina-1, y se encuentra presente en la región del cromosoma 12 de arroz sinténica al ACL de *P. notatum* (Hojsgaard et al., 2011). Debido a las funciones relacionadas con procesos del desarrollo de numerosos genes con repeticiones ANK, se seleccionó *OsANK-TPR* para su estudio. Para comenzar el análisis se realizó una caracterización del gen, obteniendo la secuencia genómica, el CDS, el ADNc y la secuencia proteica predicha desde las bases de datos Gramene y NCBI.

El gen de arroz presenta un tamaño de 4.684 pb y consta de 11 exones y 10 intrones (Figura 11A), mientras que la secuencia de ADNc y CDS presentan un tamaño de 1.759 pb y 1.273 pb, respectivamente. Utilizando el programa Pfam (Finn et al., 2008) se determinó que la proteína de 427 aminoácidos contiene seis repeticiones de ANK y dos repeticiones TPR en el extremo carboxilo y amino terminal, respectivamente (Figura 11B). Este tipo proteína (ANK-TPR) pertenece a una de las 10 subfamilias ANK descritas en arroz, donde presenta 22 miembros (Huang et al., 2009), mientras que solo posee dos copias en maíz (Jiang et al., 2013) y una en Arabidopsis (Becerra et al., 2004).

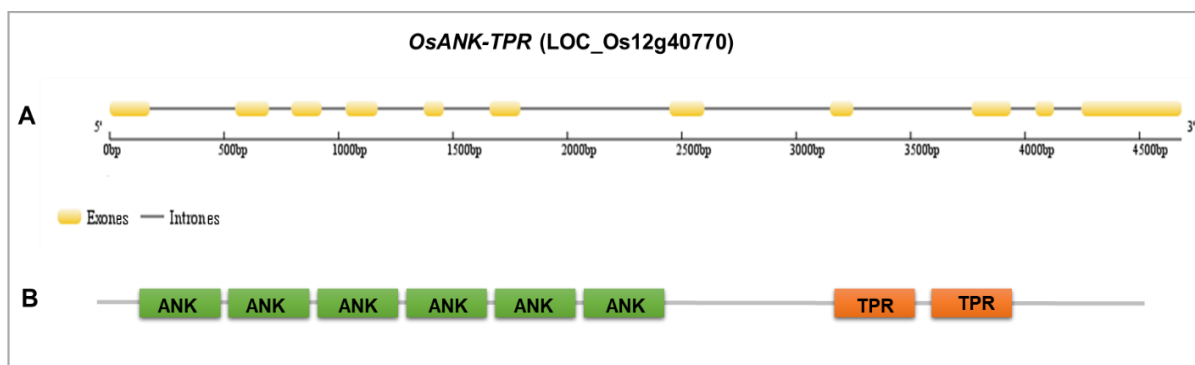


Figura 11. Esquemas de la estructura génica (A) y de la proteína predicha (B) del gen *OsANK-TPR* (LOC_Os12g40770). **A)** Esquema representativo de la estructura génica, los exones (11) están representados por rectángulos amarillos y los intrones (10) por líneas grises, **B)** Esquema representativo de los dominios conservados de la proteína *OsANK-TPR*. ANK: repeticiones de anquirina, TPR: repeticiones tetratricopetido.

Con el objetivo de identificar los transcritos de *P. notatum* similares al gen *OsANK-TPR*, se realizaron búsquedas de BLASTX y BLASTP sobre la base de datos de referencia del transcriptoma del desarrollo reproductivo de los genotipos tetraploides C4-4x (sexual) y

Q4117 (apomítico) disponible para la especie (Ortiz et al., 2017). Como consulta (*query*) se utilizó la secuencia codificante (CDS) y la secuencia proteica correspondiente al gen de arroz. Los resultados de las búsquedas arrojaron cinco transcritos (isotigs) similares en la base de datos sexual (score > 194, e-value < $8e^{-41}$) (Tabla 8) y cinco transcritos en la base de datos apomítica (score > 167, e-value < $1e^{-41}$) (Tabla 9). Las secuencias identificadas (sección Secuencias del anexo VIII) fueron analizadas con el programa Pfam (<https://pfam.xfam.org/>) para determinar si presentaban capacidad codificante y en ese caso establecer las estructuras de las proteínas predichas por cada uno. Todos los transcritos identificados en el transcriptoma sexual presentaron capacidad codificante para proteínas, pero solo dos correspondieron al tipo ANK-TPR, mientras que los otros tres restantes, codifican solamente para las repeticiones de anquirina (Tabla 8). En el caso de los transcritos detectados en la base apomítica, tres codifican para proteínas del tipo ANK-TPR y dos solo para las repeticiones ANK (Tabla 9). El hecho de haber detectado transcritos del tipo ANK-TPR en ambas bases (sex y apo), indica que este tipo de proteínas se expresa durante el desarrollo reproductivo y que podrían corresponder a transcritos derivados de genes ortólogos al gen *OsANK-TPR*.

Tabla 8. Transcritos similares a *OsANK-TPR* detectados en la base sexual (C4-4X)

Query	Subject Isotig	Isogroup (gen)	Tamaño (pb)	Tamaño (aa)	Identidad (%)	Alineamiento (aa)	e-value	Score	Tipo de proteína
<i>OsANK-TPR</i> (CDS)	17384	08926	1705	438	60,10	421	e-130	460	ANK-TPR
	20818	12360	1265	333	66,97	333	e-123	439	ANK
	20570	12112	1290	359	60,60	368	e-117	417	ANK-TPR
	10153	03312	1268	252	59,21	228	1e-67	253	ANK
	10154	03312	1250	147	62,69	134	8e-41	164	ANK

Tabla 9. Transcritos similares a *OsANK-TPR* detectados en la base apomítica (Q4117)

Query	Subject Isotig	Isogroup (gen)	Tamaño (pb)	Tamaño (aa)	Identidad (%)	Alineamiento (aa)	e-value	Score	Tipo de proteína
<i>OsANK-TPR</i> (CDS)	11445	03522	1686	426	60,57	421	e-131	465	ANK-TPR
	11446	03522	1460	421	60,92	412	e-129	457	ANK-TPR
	20350	0995	1713	472	50,12	431	9e-81	297	ANK-TPR
	15263	05431	904	167	63,64	154	8e-47	186	ANK
	15264	05431	578	145	66,42	134	1e-41	167	ANK

A fin de determinar las relaciones filogenéticas entre las secuencias de los transcritos de *P. notatum* (isotigs) detectados en el paso anterior con el gen de arroz *OsANK-TPR*, se

realizó un análisis de agrupamiento con las secuencias proteicas predichas para las proteínas del tipo ANK-TPR. Además de dichas secuencias se utilizó la proteína correspondiente al gen de *Arabidopsis* ortólogo a *OsANK-TPR* y una proteína del tipo ANK correspondiente a *Machantia polymorpha* como proteína fuera de grupo. En primer lugar, se realizó un alineamiento con el programa ClustaW (Chenna et al., 2003) y posteriormente se realizó el análisis de agrupamiento utilizando el método de UPGMA (Sneath y Sokal, 1973). Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de Nei y Kumar (2000) sobre la base del número de los aminoácidos diferentes entre las secuencias (Figura 12).

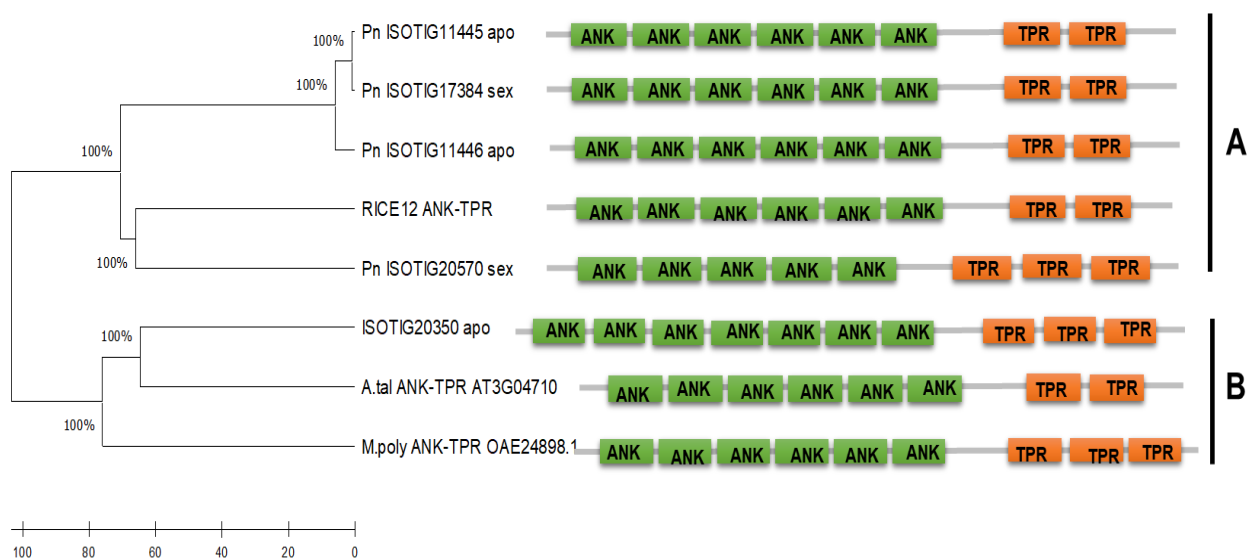


Figura 12. Relaciones evolutivas de proteínas ANK-TPR: Árbol filogenético construido utilizando el método del UPGMA (Sneath y Sokal, 1973) a partir de las secuencias de proteínas ANK-TPR predichas expresadas en el transcriptoma floral de *P. notatum*. El porcentaje de replicados en las pruebas de bootstrap (1000 repeticiones), en los cuales se asociaron los taxa analizados, se muestran en los brazos. Las distancias evolutivas fueron calculadas usando el número de diferencias de aminoácidos de cada secuencia. Los cálculos y el esquema del árbol fueron realizados con el programa MEGA-X (Kumar et al., 2018). A la derecha se muestran los esquemas de las proteínas predichas. Los recuadros verdes indican las repeticiones de ANK y los naranjas de TPR. RICE 12 ANK-TPR: LOC_Os12g40770.

Como resultado del análisis se observaron dos grupos de secuencias bien definidos, el primero (A) incluye a la proteína de arroz *OsANK-TPR* y a las secuencias proteicas codificadas por los isotigs 11445_apo, 11446_apo, 17384_sex y 20570_sex. Dado que los dos primeros corresponden al mismo isogrupo (ver Tabla 9) podrían ser alelos de un *locus* ortólogo al codificante para la proteína *OsANK-TPR*, expresados en la planta apomítica, mientras el isotig 17384 sería una forma alélica expresada en el transcriptoma sexual. El isotig 20570_sex correspondería a una forma similar expresada en el transcriptoma sexual. Esta última secuencia se diferencia de las anteriores por la presencia de una repetición ANK menos

y tres repeticiones del dominio TPR. El grupo B está compuesto por el isotig 20350, que correspondería a un segundo gen ortólogo de *P. notatum* con menor similitud (~ 50 %) a la OsANK-TPR bajo estudio, relacionado a la proteína ANK-TPR canónica, expresada en *Arabidopsis thaliana* (copia única en la especie) y *Marchantia polymorpha*, a una mayor distancia filogenético de esta última. Además, a fin de corroborar la relación de estas secuencias con el *locus* codificante para la proteína de arroz localizada en el cromosoma 12, las secuencias proteicas de las ANK-TPR de todos los isotigs (11445, 11446, 17384, 20570 y 20350) fueron localizadas sobre el genoma de arroz mediante análisis de BLASTX en la base Gramene (<http://www.gramene.org/>). Todas ellas, a excepción del isotig20350 (que mapeó en el cromosoma 5), mostraron homología la proteína ANK-TPR correspondientes a la región del cromosoma 12 sinténica al ACL, por lo cual fue posible comprobar su relación con el ACL.

Por otro lado, con el fin de identificar si alguno de los transcriptos similares al gen *OsANK-TPR* presenta una representación diferencial entre el desarrollo reproductivo sexual y apomítico, se realizaron nuevas búsquedas BLASTX, pero en este caso sobre el “ensamblado global del transcriptoma” (ensamblado conjunto de las lecturas de C4-4x y Q4117, ver parte III.5 de Materiales y Métodos) del desarrollo reproductivo de la especie (Ortiz et al., 2017). Dicho transcriptoma se utilizó como referencia para determinar el número de lecturas (reads normalizados) de cada uno de los transcriptos expresados en los transcriptomas apomítico y sexual, que pueden utilizarse para comparar los niveles de expresión de cada entidad en ambos transcriptomas (Ortiz et al., 2017, Archivo adicional 6). Para dicha búsqueda se utilizó como consulta, al igual que en las búsquedas anteriores, la secuencia codificante del gen *OsANK-TPR*. Como resultado se obtuvieron seis transcriptos similares a *OsANK-TPR* (score > 297, e-value < $1e^{-80}$) (Tabla 10), dos de los cuales (isotig 35667 y isotig 32130) mostraron una representación diferencial entre los transcriptomas de C4-4x (sexual) y Q4117 (apomítico) (FDR < 0.05 y $\log_2FC > |1.5|$) (Tabla 10). El isotig35667 presentó una expresión 14,8 veces superior en la base sexual ($\log_2FC = 3,8939$), mientras que el isotig32120 se expresa alrededor de cuatro veces más en el transcriptoma apomítico ($\log_2FC = -1,9264$). Mediante búsquedas BLASTN en los transcriptomas correspondientes se determinó que el isotig35667 es altamente similar (score > 389, e-value = 0,0) al transcripto isotig20570_sex, mientras que el isotig 32130 es altamente similar (score = 860, e-value = 0,0) al isotig 20350_apo (Tabla 10).

Tabla 10. Transcritos *ANK-TPR* similares al gen *OsANK-TPR* detectados en el ensamblado global de desarrollo reproductivo de *P. notatum*. Los datos de expresión fueron tomados del Ortiz et al. (2017), Material suplementario Tabla 6.

Isotigs base global	Isoforma base sexual	Isoforma base apomíctica	Lectural en APO	Lecturas en SEX	logFC	logCPM	p-value	FDR
isotig22564	isotig10153	-	0	4	5,02691	2,51746	0,12504	0,66067
isotig22565	isotig10154	-	0	2	4,07050	2,10314	0,50002	0,94142
isotig35667	isotig20570	-	1	17	3,89397	3,97377	0,00015	0,00557
isotig32130	-	isotig20350	30	8	-1,92646	4,91625	0,00048	0,01502
isotig33233	isotig20818	isotig15263	3	11	1,79652	3,68643	0,05746	0,49360
isotig32953	isotig17384	isotig11445	24	26	0,07879	5,27358	0,88786	1,00000

Lecturas en APO: número de lecturas del isotig/alelo correspondiente provenientes de la base apomíctica, Lecturas sex: número de lecturas del isotig/alelo, provenientes de la base sexual. LogFC: logaritmo en base 2 de la relación entre lecturas en SEX y lecturas en APO, LogCPM: logaritmo de lecturas de cada transcrita por millón de lecturas. p.value: probabilidad asociada, FDR: tasa de falso descubrimiento.

Estos resultados sugieren que el transcrita de *P. notatum* isotig 20570_sex, altamente similar a *OsANK-TPR*, se sobreexpresa durante el desarrollo reproductivo sexual en relación al desarrollo apomíctico.

IV.2.2- Identificación y estudios de filogenia de genes *ANK-TPR* expresados en *P. notatum*

Dado que la familia de proteínas con repeticiones de anquirina es altamente diversa, y que podrían existir varios genes codificantes en *P. notatum* con funciones semejantes, expresados durante el desarrollo reproductivo sexual y apomíctico, se realizó un análisis de BLASTP en el transcriptoma global utilizando como consulta (*query*) las proteínas pertenecientes a la subfamilia ANK-TPR de arroz (22 miembros) (Huang et al., 2009), *Arabidopsis* (un miembro) (Becerra et al., 2004) y maíz (dos miembros) (Jiang et al., 2013). Como resultado de este análisis se detectaron solo cuatro proteínas predichas de la familia ANK-TPR (codificadas por los isotig 19073; 32130, 32953 y 35667) similares (% Identidad > 50, e-value = 0 y Score >150) a las proteínas ANK-TPR de arroz, maíz y *Arabidopsis* (ver Tabla VIII.3 del Anexo). A partir de este resultado las secuencias proteicas se nombraron como: PnANK-TPR1 (isotig 19073), PnANK-TPR2 (isotig32130), PnANK-TPR3 (isotig 32953) y PnANK-TPR4 (isotig 35667) (Ver sección Secuencias del anexo). Las secuencias aminoácidas se utilizaron para realizar un alineamiento y construir un árbol filogenético empleando el programa MEGA-X (Figura 13). Como era de esperar, las proteínas codificadas por los isotigs 32953 (PnANK-TPR3) y 35667 (PnANK-TPR4) agruparon con la proteína *OsANK-TPR* (LOC_Os12g40770). Además, en este grupo también agrupó la secuencia de arroz codificada por el LOC_Os12g407080 (presuntamente parólogo a LOC_Os12g40770) y

la secuencia de maíz ZmANK7 codificada por el *locus* (Zm00001d030982). Por otro lado, la proteína PnANK-TPR2 (codificada por el isotig 32130) agrupó con la proteína codificada por el LOC_Os05g01310 de arroz (en coincidencia con el análisis realizado anteriormente), la proteína de ZmANK61 codificada por el *locus* (Zm00001d011102), y la proteína ANK-TPR de *Arabidopsis* codificada por el *locus* AT3G04710. La proteína PnANK-TPR1 predicha por el isotig 19073 agrupó con la proteína de arroz codificada por LOC_Os01g07980 (Figura 13). En base a estos grupos, que incluyeron a las proteínas ANK-TPR predichas de *P. notatum*, se realizaron nuevos alineamientos para determinar las regiones conservadas de las proteínas que se muestran en la Figura 8.

El alineamiento de las proteínas del grupo A (Figura 14A) muestra una alta conservación de los dominios ANK y TPR entre las cuatro secuencias del grupo. Las proteínas de *P. notatum* PnANK-TPR3 (expresado por el isotig 32953) y PnANK-TPR4 (forma derivada del isotig 35667) se diferencian entre sí por la presencia de un extremo amino terminal más largo en la forma PnANK-TPR3, similar a las proteínas de arroz y maíz que está ausente en PnANK-TPR4, y una delección de 6 aminoácidos en esta última sobre el extremo carboxilo terminal. La comparación de secuencias en el grupo B (Figura 14B), muestra asimismo un alto grado de conservación de aminoácidos, en donde la forma de *P. notatum* PnANK-TPR2 presenta un segmento de 16 aminoácidos en el extremo amino terminal ausente en todas las otras proteínas. Es de destacar aquí la gran similitud con la proteína de *Arabidopsis*, por lo cual podría corresponder a la forma canónica a partir de la cual derivaron las otras formas. En el caso del grupo C (Figura 14C), la proteína de *P. notatum* PnANK-TPR1 presenta 258 aminoácidos más que la proteína de arroz codificada por LOC_Os01g07980, esto se debe a que PnANK-TPR1 contiene seis repeticiones ANK, mientras que la proteína de arroz solo presenta tres. Se observa una elevada conservación entre las dos secuencias en las regiones correspondientes a las tres últimas repeticiones ANK y las tres repeticiones TPR de PnANK-TPR1 (aminoácido 258 al 539) y las tres repeticiones ANK y TPR de la proteína de arroz (aminoácido 1 al 282).

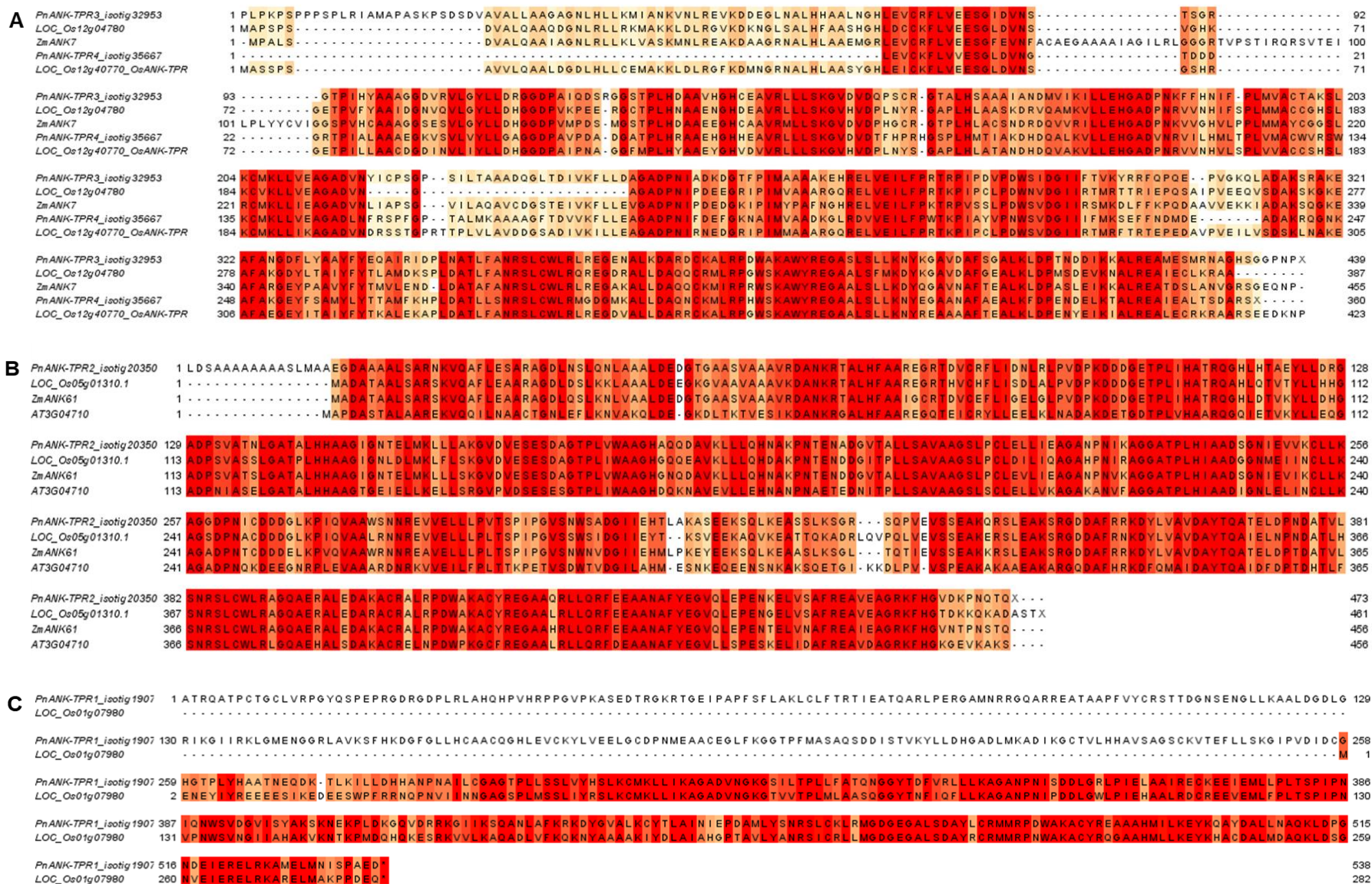


Figura 14. Alineamiento de proteínas ANK-TPR expresadas en *P. notatum* con sus posibles secuencias ortólogas de arroz, Arabidopsis y maíz. El alineamiento se realizó con el programa Muscle y la visualización con Jalview 2.10.5. **A)** Alineamiento del grupo de proteínas homólogas a OsANK-TPR (LOC_Os12g40770). **B)** Alineamiento del grupo de proteínas homólogas al único miembro ANK-TPR de *Arabidopsis* y **C)** Alineamiento de PnANK-TPR1 y la proteína de arroz codificada por LOC_Os01g07980.

IV.2.3- Aislamiento y análisis de cosegregación de secuencias génicas *ANK-TPR* de *P. notatum*

Para corroborar la presencia de los genes de *P. notatum* que codifican para las proteínas ANK-TPR detectados en los estudios transcriptómicos anteriores, y determinar a su vez el posible ligamiento genético entre los mismos y el modo de reproducción, se realizaron experimentos de análisis de segregantes en grupos (Michelmore et al., 1993) a partir de amplificaciones por PCR del ADN genómico de los individuos Q4188 (sexual) y Q4117 (apomítico), un grupo sexual (BS) y uno apomítico (BA). Cada grupo representativo del modo de reproducción, estuvo integrado por cinco individuos F₁ de cada clase (sexuales y apomíticos), derivados de la población segregante (Q4188 x Q4117). Los cebadores utilizados para la amplificación de cada transcritto se muestran en la Tabla 11. Como primer paso y con el objetivo de determinar la disposición de las secuencias exónicas presentes en los isotigs se reconstruyeron las estructuras génicas hipotéticas para cada transcritto utilizando como referencia las secuencias genómicas de arroz (OSNPB_120599900) y *Setaria itálica* (117848612).

Tabla 11.- Cebadores diseñados para amplificar secuencias genómicas correspondientes a los genes de *P. notatum* homólogos a *OsANK-TPR*.

Cebador	Secuencia (5'-3')
Pn11445aF	GTGAGGGTGCGTCTCTAAGC
Pn11445aR	AGCTCTAGCCAAACACAGGA
Pn11446aF	AGTTTATGCTGGCTGCGTCT
Pn11446aR	CGATTCATGCCAAATAGTGC
Pn20570sF	GAAATCTGAGTTCTTCAATGATATGG
Pn20570sR	TTGCAAAAGATTAACCAAGTCAAG
Pn20350aF	AAATCAAGGGGTGATGATGC
Pn20350aR	CATTGTGTCTGATTCGGCTTG
Pn20350a1F	CTTGTATGGGCTGCTGGTCA
ANK20350F	CTCATCGACAACCTCCGTCT
ANK20350F	TCCACGGTCAAGGAGGTA

El alineamiento de los isotigs 11445_apo y 17384_sex con la secuencia genómica de arroz mostró que los transcritos codifican para 11 exones, al igual que la estructura génica de *OsANK-TPR*. Además, se observa diferencia en una porción específica de baja homología en el exón 11 (Figura 15A). Como era de esperar, se obtuvieron similares resultados para el isotig 11446, siendo la ausencia del último exón la diferencia encontrada comparado con el gen de arroz (Figura15B). La amplificación por PCR sobre el ADN genómico con los cebadores Pn11445aF y Pn11445aR mostraron un fragmento monomórfico de aproximadamente 700 pb y otro polimórfico de 800 pb presente en el genotipo sexual

(Q4188), y solo el fragmento de 700 pb en el apomítico. Este resultado mostró una diferencia genética entre ambos genotipos, pero las amplificaciones en los grupos apo y sex mostraron patrones monomórficos (Figura 15C). Es probable que se trate de la amplificación de un alelo presente en el genotipo sexual (derivados de una inserción), y que el *locus* segrega independientemente del modo de reproducción. Las amplificaciones para el isotig 11446 con los cebadores Pn11446aF y Pn11446aR, resultaron en una sola banda monomórfica de 400pb, lo cual indica la inexistencia de polimorfismos entre las formas sexual y apomítica del gen en la región amplificada, por lo cual no fue posible realizar un análisis de ligamiento con este fragmento (Figura 15D).

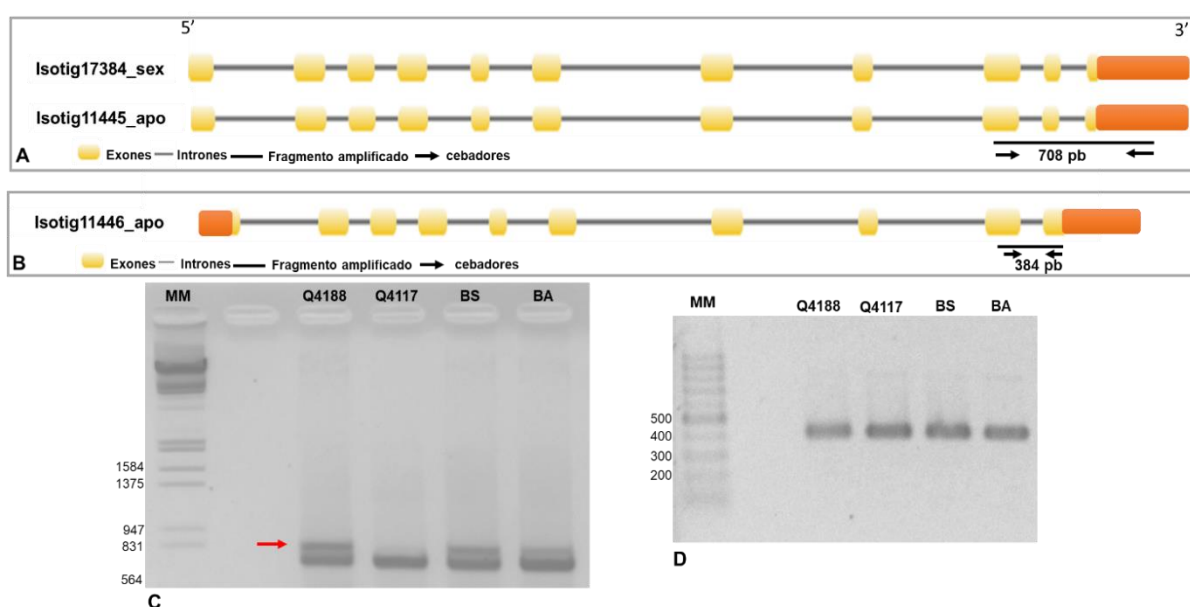


Figura 15. Esquema de las estructuras génicas y patrones de amplificación correspondientes a los isotigs 17384_sex, 11445_apo y 11446_apo. **A)** Esquema de las estructuras a génicas hipotéticas para los isotigs 17384_sex y 11445_apo. **B)** Esquema de las estructuras a génicas hipotéticas para el isotig 11446_apo. Las regiones indicadas en naranja representan sectores de baja homología con la referencia. **C)** Gel de agarosa al 2 % con bandas correspondiente a las amplificaciones de los isotig 17384_sex y isotig 11445_apo. La flecha roja indica la banda polimórfica perteneciente al genotipo Q4188, ausente en el padre apomítico (Q4117) que resultó monomórfica entre los grupos apo y sex. **D)** Gel de agarosa al 2 % con banda monomórfica correspondiente a la amplificación del isotig 11446_apo. MM: marcador molecular, Q4188: madre sexual, Q4117: padre apomítico, BS: grupo/ *bulk* sexual, BA: grupo/ *bulk* apomítico.

A fin de determinar un posible ligamiento del alelo polimórfico derivado de la amplificación de los isotigs 17384_sex y 11445_apo que pudo no detectarse en el análisis de grupos, se relizaron nuevas amplificaciones utilizando los mismos cebadores descritos anteriormente sobre ADN genómico de los individuos parentales (Q4188 y Q4117) y 19 individuos F₁ (14 sexuales y cinco apomíticos). Los resultados de la amplificación se

muestran en la Figura 16. En primera medida se determinó la relación de segregación (presencia: ausencia) del fragmento polimórfico (marcador) en los individuos F_1 , como derivado de un *locus* heterocigota uniplexo (Aaaa), segregando de organismo tetraploide en caso de herencia disómica o polisómica mediante una prueba de Chi cuadrado (χ^2). De las 19 plantas F_1 , seis y 13 mostraron la presencia y ausencia de la banda polimórfica, respectivamente. Estos valores ajustaron a una relación de segregación 1:1 (presencia: ausencia) con un valor $\chi^2 = 2,5789$ y un p-valor $> 0,1$, para un tipo de marcador ADS (alelo de dosis simple). Esta relación es independiente del nivel de ploidía y el tipo de herencia del organismo (Wu et al., 1992).

Para evaluar si el marcador segrega de manera independiente o ligado al modo reproductivo, nuevamente se empleó una prueba de Chi-cuadrado (χ^2) contrastando los valores de segregación observados contra los esperados para segregación independientemente de dos *loci* en una población segregante del tipo retrocruza. La prueba de cosegregación mostró un valor de $\chi^2 = 6,8947$ con lo cual ajustó a una segregación independiente al modo de reproducción ($p > 0.05$). Este resultado confirma que el polimorfismo detectado no se encuentra ligado genéticamente al ACL. Probablemente se deba a la amplificación de un gen parálogo localizado en otra región genómica independiente.

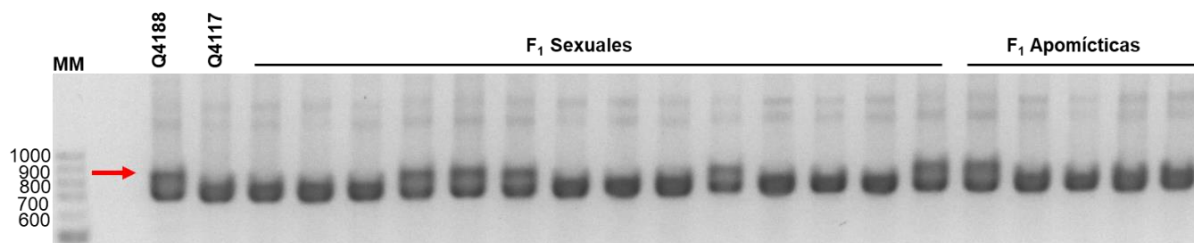


Figura 16. Gel de agarosa al 2 % mostrando la amplificación de los isotigs 17384_{sex} y 11445_{apo} empleando los cebadores Pn11445aF y Pn11445aR sobre los genotipos parentales y 19 individuos de la población segregante por el modo de reproducción (14 F_1 sexuales y CINCO F_1 apomíticas). La flecha roja indica la banda polimórfica.

Por otro lado, las amplificaciones para el isotig 20570_{sex}, resultaron en una banda monomórfica de aproximadamente 1.300 pb, coincidente con el tamaño esperado tomando como referencia la estructura génica obtenida hipotéticamente (Figura 17A), demostrando que el alelo detectado está presente tanto en el genoma sexual (Q4188) como en el apomítico (Q4117) y no fue posible utilizarlo para realizar el análisis de ligamiento (Figura 17B).

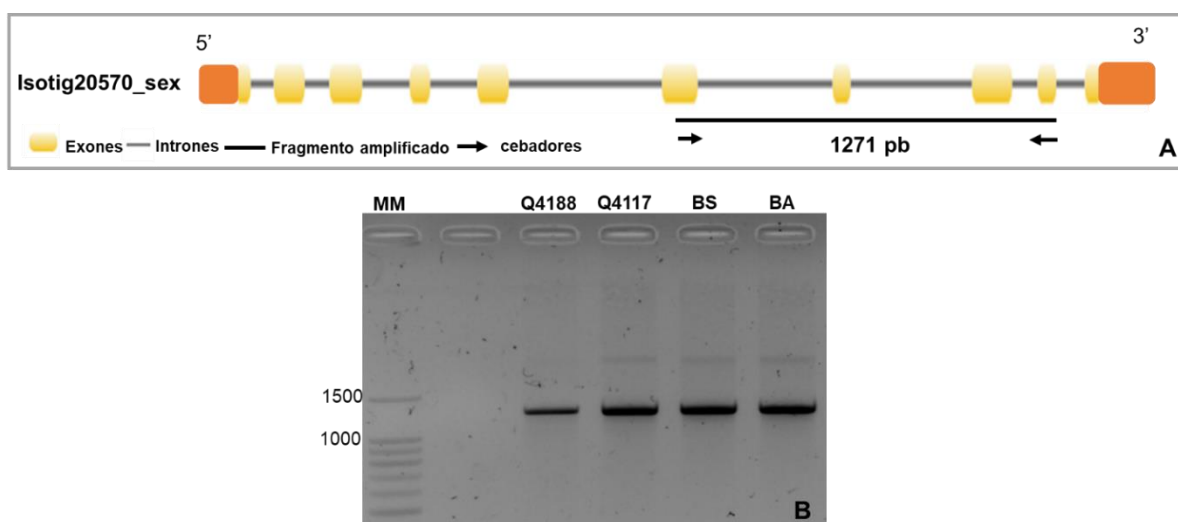


Figura 17. Esquema de la estructura génica y amplificaciones del isotig 20570. **A)** Esquema de la estructura génica hipotética de *P. notatum* obtenidas con la secuencia genómica de *OsANK-TPR* como referencia. Las regiones naranjas de los exones representan baja homología con la referencia. **B)** Gel de agarosa al 2% con banda monomórfica correspondiente a la amplificación del isotig 20570. MM: marcador molecular, Q4188: madre sexual, Q4117: padre apomítico, BS: bulk sexual, BA: bulk apomítico.

En el caso de la amplificación del isotig 20350_apo, las amplificaciones sobre ADN genómico se realizaron empleando tres juegos de cebadores diferentes. Los tamaños de los fragmentos amplificados resultaron coincidentes con los esperados, tomando como referencia la estructura génica hipotética generada con la secuencia genómica de *Setaria itálica* (117848612) (Figura 18A). Las amplificaciones realizadas con el juego1 (ANK20350F y ANK20350R) mostraron una banda monomórfica de aproximadamente 250 pb, y una polimórfica de 300 pb, presente en el genotipo sexual que resultó monomórfica entre los grupos (Figura 18B). Las amplificaciones con el juego de cebadores 2 (Pn20350a1F y Pn20350aR) mostraron una banda monomórfica del peso esperado (2000-3000pb) y un patrón de bandas múltiples. Una de ellas de aproximadamente 700 pb mostró una banda polimórfica en el progenitor apomítico y en el grupo apomítico, ausente en el progenitor sexual y en el grupo sexual. Los resultados de dicha amplificación, que sugeriría un posible ligamiento genético de este alelo con el modo de reproducción, no pudo repetirse consistentemente en las amplificaciones de las progenies F₁. (Figura 18C). El juego de cebadores 3 (Pn20350aF y Pn20350aR) amplificó una banda monomórfica de 760 pb, aproximado al peso esperado y una segunda banda/alelo polimórfico de más de 1000 pb, presente en el parental apomítico y ausente en el parental materno (Figura 18D). La segregación de este alelo, como en el caso anterior, resultó independiente del modo de reproducción.

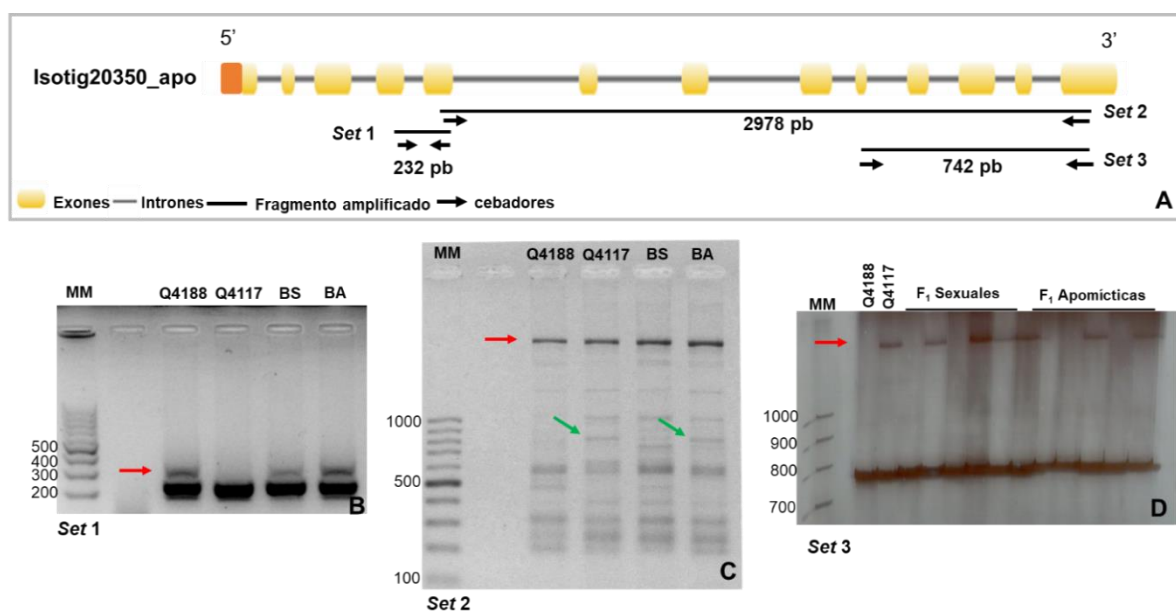


Figura 18. Esquema de la estructura génica y amplificaciones del isotig 20350_apo. **A)** Esquema de las estructuras a génicas hipotéticas obtenidas para el isotigs 20350_apo. **B)** Gel de agarosa al 2 % con bandas correspondiente a la amplificación con el set 1 de cebadores. La flecha roja indica la banda polimórfica ausente en el parental apomítico (Q4117). **C)** Gel de agarosa al 2 % con banda monomórfica correspondiente a la amplificación con el set 2 de cebadores. **D)** Gel de poliacrilamida al 6 % con bandas correspondiente a las amplificaciones con el set 3 de cebadores. La flecha roja indica la banda polimórfica ausente en el parental sexual (Q4188), en dos individuos F₁ sexuales y en dos apomíticos. MM: marcador molecular, Q4188: madre sexual, Q4117: padre apomítico, BS: bulk sexual, BA: bulk apomítico.

Estos resultados mostraron que, a pesar de amplificar diferentes regiones del gen, no fue posible determinar su ligamiento con el modo reproductivo.

IV.2.3.1. Mapeo físico de *PnANK-TPR3* en el genoma (2x) de *P. notatum*

Como se mencionó en la introducción, desde el año 2019 nuestro equipo cuenta con un borrador del genoma de *P. notatum* de un citotipo diploide sexual (denominado #R1) que presenta alrededor de un 1% de sacos embrionarios apospóricos (Quarin et al., 2001). Con el fin de mapear *in silico*, las secuencia de los isotigs/genes 17384_sex y 11445_apo (*PnANK-TPR3*), se utilizaron dichas secuencias en búsquedas BLASTN (% identidad > 80, e-value < e⁻⁵⁰ y bit score > 200) sobre el borrador del genoma previamente mencionado. El análisis determinó que ambas secuencias mapearon en el ensamblado (*scaffold*) utg001669l que presenta un largo total de 582.227 bp y que contienen al marcador C1069 100% ligada al ACL (Tabla 12). En ambos casos, se detectaron regiones de similitud superiores al 90% en la mayor parte del largo de los isotigs (963 bases/ 1705 bases totales del isotig 17384_sex y 1088 bases/ 1686 bases totales del isotig 11445_apo).

Tabla 12. Resultados de las búsquedas BLASTN sobre el borrador del genoma del citotipo diploide sexual #R1 de *P. notatum*.

Query	Subject (Scaffold)	Identidad (%)	Alineamiento (bases)	e-value	Score
<i>PnANK-TPR3</i> Isotig17384_sex	utg001669I	90,88	340	4e-120	436
		89,94	179	2e-54	219
		92,12	165	3e-56	224
		93,71	143	1e-51	209
		97,79	136	2e-58	231
<i>PnANK-TPR3</i> Isotig11445_apo	utg001669I	92,47	465	0	654
		97,79	136	2e-58	231
		92,73	165	7e-58	230
		90,50	179	3e-56	224
		93,71	143	1e-51	209
C1069 Isotig17513_apo	utg001669I	80,90	2408	0	1633

Posteriormente, utilizando como referencia la secuencia génica del *scaffold* utg001669I se construyeron las secuencias génicas del gen *PnANK-TPR3* y se compararon con la secuencia del gen de arroz *OsANK-TPR* (Figura 19). Este análisis determinó que el gen *PnANK-TPR3* resultó muy similar a *OsANK-TPR*, conteniendo los 11 exones predichos y manteniendo un alto grado de microcolinealidad entre ambos.

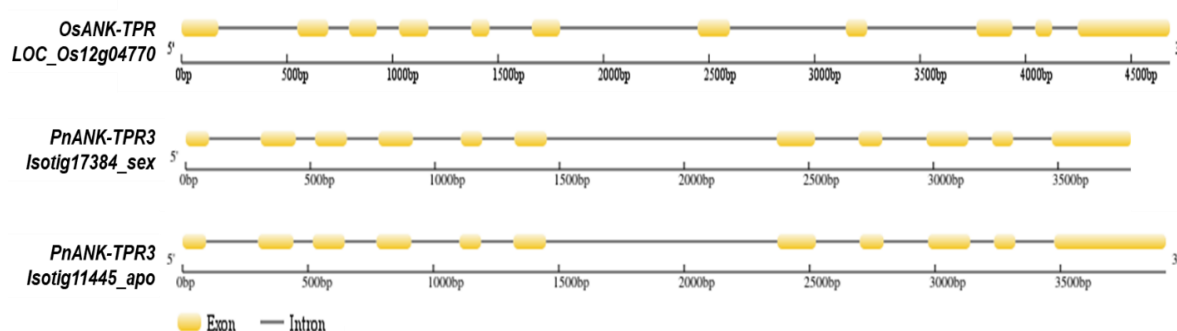


Figura 19. Comparación de la estructura génica de los isotigs 17384_sex y 11445_apo (*PnANK-TPR3*) de *Paspalum notatum* con su homólogo de arroz *OsANK-TPR* (LOC_Os12g04770).

Estos resultados indican que *PnANK-TPR3*, similar a *OsANK-TPR* se encuentra físicamente cercano a uno de los marcadores específicos del ACL de *P. notatum* (Ortiz et al., 2013) y por lo tanto se localizaría en un fragmento cromosómico cosegregante con la

apomixis en la especie. Además, se observó una buena colinealidad espacial del marcador y el gen ANK-TPR entre arroz y *P. notatum* (Figura 20).

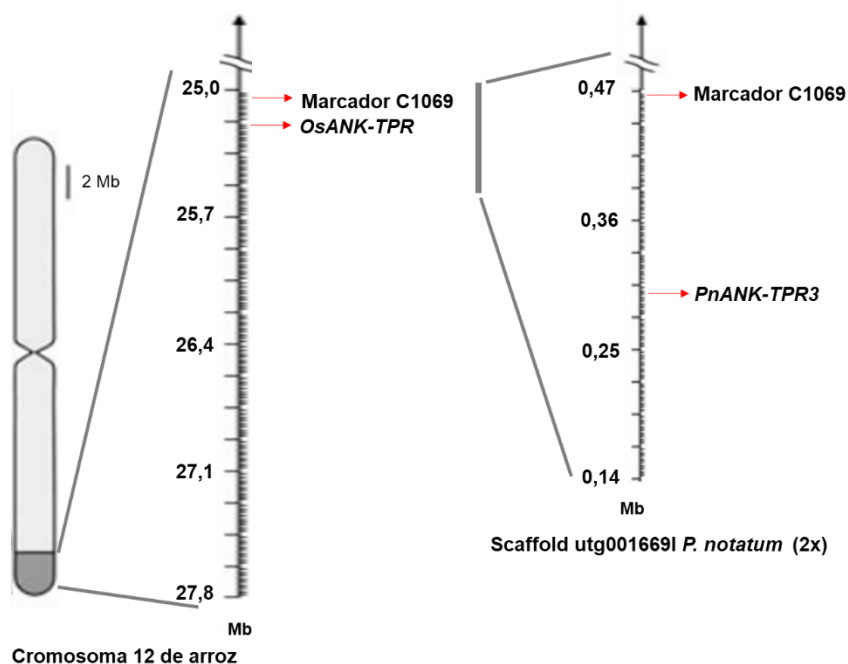


Figura 20. Representación esquemática del mapa físico de la región del cromosoma 12 de y del *scaffold* utg001669I de *P. notatum*. En ambos esquemas se localizaron las secuencias correspondientes al marcador C1069 y el gen codificante para la proteína con repeticiones de anquirina ANK-TPR.

IV.2.4- Análisis de expresión de genes *PnANK-TPR* en tejido floral

Con el propósito de estudiar los niveles de expresión de los genes *PnANK-TPR2* (isotig20350_apo), *PnANK-TPR3* (isotigs 17384_sex y 11445_apo) y *PnANK-TPR4* (isotig20570_sex) durante el desarrollo reproductivo de *P. notatum*, se realizaron experimentos de qRT-PCR sobre una mezcla *in vitro* equimolar del ADNc obtenido a partir de ARNm de espiguillas de los diferentes estadios del desarrollo reproductivo (pre-meiosis, meiosis, post-meiosis y antesis) de los genotipos C4-4X y Q4117. Además, se estudiaron los patrones de expresión de *PnANK-TPR3* en nuevos experimentos de qRT-PCR sobre ADNc obtenido a partir del ARNm de cada estadio del desarrollo reproductivo (pre-meiosis, meiosis, post-meiosis y antesis) individualmente, de los genotipos Q4188 y Q4117. Las reacciones de amplificación fueron realizadas utilizando cebadores diseñados para la amplificación específica de cada gen/alelo (Tabla 13). Los amplicones obtenidos para cada gen fueron de 100 a 150 pb. Los genes de referencia utilizados para la normalización de la expresión fueron la β -tubulina y glucosa- 6-fosfato deshidrogenasa.

Tabla 13. Cebadores empleados en los estudios de expresión de los genes *PnANK-TPR*.

Cebador	Secuencia (5'-3')
RTANK2F	AGTGCAGATGGAATTATAGAACACAC
RTANK2R	GATCTGCCTGATTTTCAGAGATGAC
RTANK3F	ATATTAGCGGTGTTCCAAGTTGAT
RTANK3R	TATGAGCTCTAGCCAAACACAGGA
RTANK4F	GAAATCTGAGTTCTTCAATGATATGG
RTANK4R	ACAAGTACATTGCTGAAAAGTATTCC
β -tubulinaF	GTGGAGTGGATCCCCAACAA
β -tubulinaR	AAAGCCTTCCTCCTGAACATGG
Glucosa-6-fosfato DHF	CATCAGAGATGAGAAAGTCAAGGTT
Glucosa-6-fosfato DHR	AGCTTTAAGAATGAAAGGAACACCT

Previo a los experimentos de qRT-PCR, se realizaron reacciones de PCR convencionales sobre ADN y ADNc de los genotipos C4-4X, Q4188 y Q4117, con el fin de validar la expresión *in vivo* de los transcritos y detectar posibles polimorfismos entre los genotipos sexuales (C4-4X y Q4188) y apomítico (Q4117). Para ello se emplearon cebadores que incluyeron la región amplificada en los estudios de qRT-PCR (Tabla 11 y 13). Los resultados de las amplificaciones para los genes *PnANK-TPR2* (isotig20350_apo), *PnANK-TPR3* (isotigs 17384_sex y 11445_apo) y *PnANK-TPR4* (isotig20570_sex) demostraron la presencia de los transcritos tanto en los genotipos sexuales como en el apomítico, sin polimorfismo aparente entre estos (Figura 21).

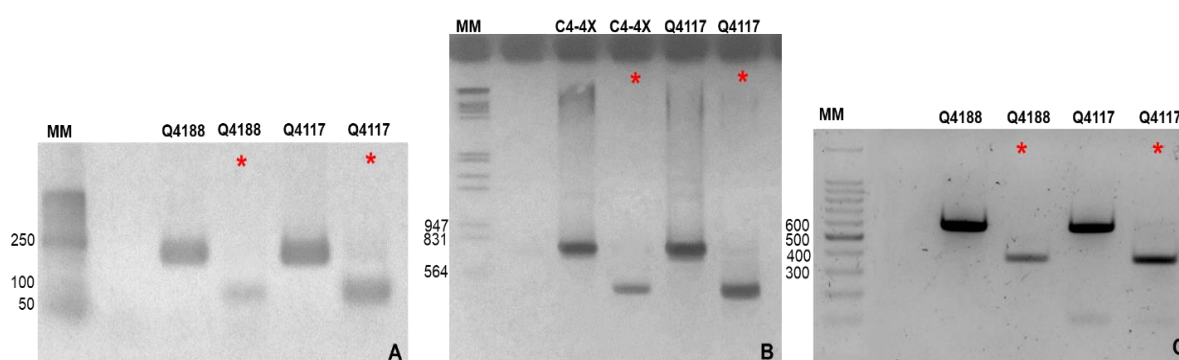


Figura 21. Geles de agarosa al 2% con productos de las amplificaciones sobre ADN y ADNc de C4-4X, Q4188 y Q4117. **A)** Amplificación del isotig 20350_apo (*PnANK-TPR2*) empleando los cebadores RTANK2F y RTANK2R. **B)** Amplificación de los isotigs 17384_sex y 11445_apo (*PnANK-TPR3*) empleando los cebadores Pn11445aF y Pn11445aR. **C)** Amplificación del isotig 20570_sex (*PnANK-TPR4*) empleando los cebadores RTANK4F y Pn20570sR. Los asteriscos rojos indican amplificación sobre ADNc.

Los análisis en la mezcla de estadios del desarrollo mostraron que la expresión de los genes *PnANK-TPR2* y *PnANK-TPR4* es similar en ambos genotipos. Los análisis estadísticos de estos resultados, realizados con el programa Rest2009 se presentan en la Tabla 14. Los mismos revelaron que las diferencias de expresión encontradas entre los genotipos fueron no significativas ($p > 0,1$). Por el contrario, los análisis de expresión relativa para *PnANK-TPR3* mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los genotipos C4-4X y Q4117, con una disminución de la expresión del gen en el genotipo apomítico (Figura 22).

Tabla 14. Resultados de los análisis de la expresión relativa de *PnANK-TPR2*, *PnANK-TPR3* y *PnANK-TPR* en mezcla de estadios del desarrollo de genotipos Q4188 y Q4117, obtenidos con el programa Rest2009.

Estadio del desarrollo	Individuo	Modo Reproductivo	Expresión Relativa	Error Estándar	Resultado	p-valor
<i>PnANK-TPR2</i>	C4-4x	Sexual	1	-	-	-
	Q4117	Apomítica facultativa	0,734	0,669-0,797	Dif. no significativas	0,23
<i>PnANK-TPR3</i>	C4-4x	Sexual	1	-		
	Q4117	Apomítica facultativa	0,257	0,207 - 0,307	DOWN	0,034
<i>PnANK-TPR4</i>	C4-4x	Sexual	1	-		
	Q4117	Apomítica facultativa	0,780	0,571 - 1,182	Dif. no significativas	0,31

No significativas: las diferencias de expresión entre los genotipos son estadísticamente NO significativas
 DOWN: Q4117 presenta una menor expresión de gen con respecto a C4-4x.

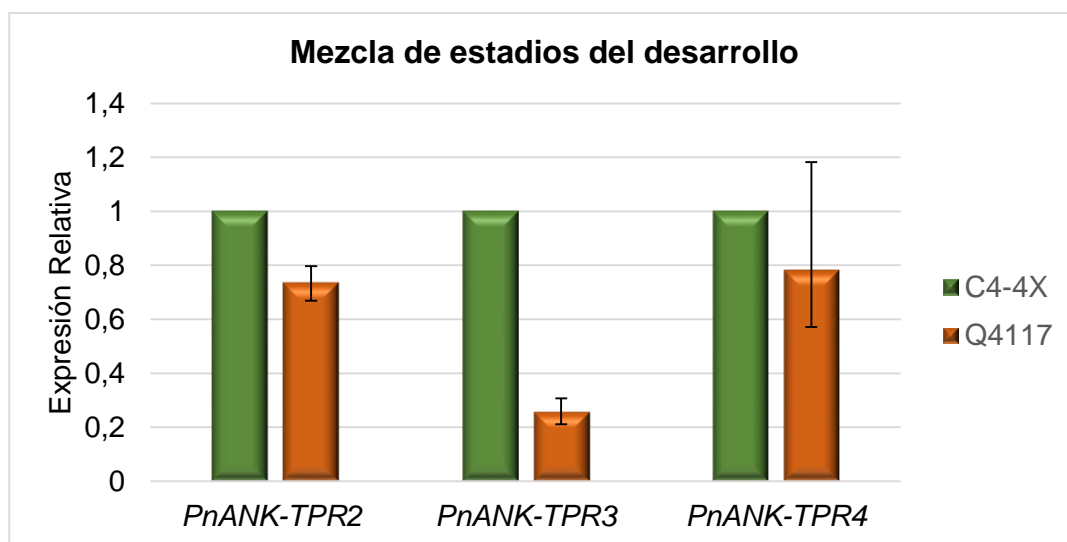


Figura 22. Gráfica de expresión relativa de *PnANK-TPR2*, *PnANK-TPR3* y *PnANK-TPR4* en mezcla de estadios del desarrollo de C4-4X y Q4117. *PnANK-TPR3* muestra diferencias de expresión estadísticamente significativas ($p < 0,01$) entre los genotipos. Las gráficas representan los resultados de dos réplicas biológicas con al menos tres réplicas técnicas cada uno. *PnANK-TPR2*: isotig 20350_apo, *PnANK-TPR3*: isotig 17384_sex y 11445_apo, *PnANK-TPR4*: isotig 20570_sex.

En base a los resultados de expresión obtenidos para *PnANK-TPR3* en mezcla de estadios del desarrollo, se realizaron nuevos experimentos de qRT-PCR con el propósito de estudiar los patrones de expresión de dicho gen entre los genotipos Q4188 y Q4117, en cada estadio del desarrollo reproductivo (pre-meiosis, meiosis, post-meiosis y antesis) (Figura 23). Los análisis comparativos de la expresión de *PnANK-TPR3* mostraron diferencias no estadísticamente significativas en los estadios de pre-meiosis y post-meiosis (Tabla 15). Sin embargo, se observaron diferencias significativas en los estadios de meiosis y antesis, donde el transcripto mostró una expresión de alrededor de 10 y 4 veces superior en el genotipo sexual (Q4118) que en el apomítico (Q4117), respectivamente (Tabla 15).

Tabla 15. Resultados de los análisis de la expresión relativa de *PnANK-TPR3* en pre-meiosis, meiosis, post-meiosis y antesis de genotipos Q4188 y Q4117, obtenidos con el programa Rest2009.

Estadio del desarrollo	Individuo	Modo Reproductivo	Expresión Relativa	Error Estándar	Resultado	p-valor
Premeiosis	Q4188	Sexual	1	-	-	-
	Q4117	Apomítica facultativa	1,007	0,905 – 1,123	Dif. no significativas	0,73
Meiosis	Q4188	Sexual	1	-	-	-
	Q4117	Apomítica facultativa	0,099	0,068 – 0,149	DOWN	0,00
Postmeiosis	Q4188	Sexual	1	-	-	-
	Q4117	Apomítica facultativa	0,753	0,589 - 1,070	Dif. no significativas	0,4
Antesis	Q4188	Sexual	1	-	-	-
	Q4117	Apomítica facultativa	0,594	0,491 - 0,680	DOWN	0,00

No significativas: las diferencias de expresión entre los genotipos son estadísticamente NO significativas
DOWN: Q4117 presenta una menor expresión de gen con respecto a Q4188.

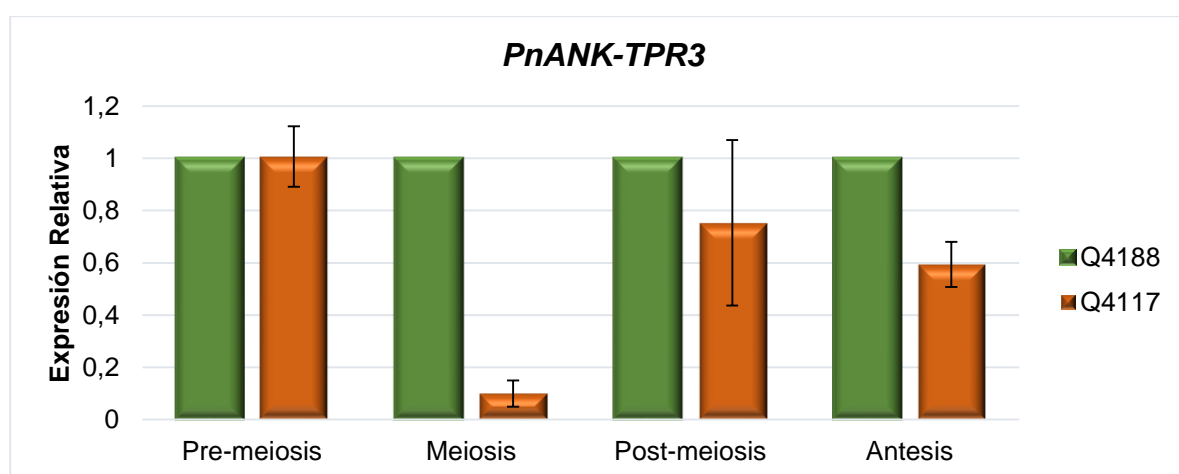


Figura 23. Gráfica de expresión relativa del gen *PnANK-TPR3* en cada estadio del desarrollo reproductivo, comparada entre los genotipos Q4188 (sexual) y Q4117 (apomítico). *PnANK-TPR3* muestra diferencias de expresión estadísticamente significativas ($p < 0,001$) entre los genotipos, en los estadios de meiosis y antesis. *PnANK-TPR3*: isotigs 17384_sex y 11445_apo.

Considerando la marcada diferencia de expresión de *PnANK-TPR3* en el estadio de meiosis entre los genotipos, se realizaron nuevos experimentos qRT-PCR con el objetivo de determinar si dicha diferencia de expresión realmente está asociada con el modo reproductivo. Los experimentos se realizaron sobre ADNc derivado de ARNm de espiguillas en meiosis de tres individuos F₁ sexuales y tres apomícticos de la población segregante, derivada del cruzamiento Q4188 x Q4117. Los resultados de expresión relativa mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los individuos F₁ sexuales y F₁ apomícticos ($p < 0,05$), con una disminución de la expresión de *PnANK-TPR3* en los individuos apomícticos (Tabla 16 y Figura 24).

Tabla 16. Resultados de los análisis estadísticos de la expresión relativa de *PnIAA30* en antes de seis individuos F₁ derivados de Q4188 x Q4117, obtenidos con el programa Rest2009.

Individuo	Modo Reproductivo	Expresión Relativa	Error Estándar	Resultado	P-valor
JS 57	Sexual	0,929	0,80 - 1,10	Dif. no significativa	0,5
JS 58	Sexual	0,673	0,49 - 0,93	Dif. no significativa	0,3
JS 83	Sexual	1	-	referencia	-
JS 9	Apomíctica facultativa	0,565	0,47 - 0,66	<i>DOWN</i>	0,041
JS 40	Apomíctica facultativa	0,472	0,45 - 0,49	<i>DOWN</i>	0,032
JS 71	Apomíctica facultativa	0,562	0,48 - 0,66	<i>DOWN</i>	0,04

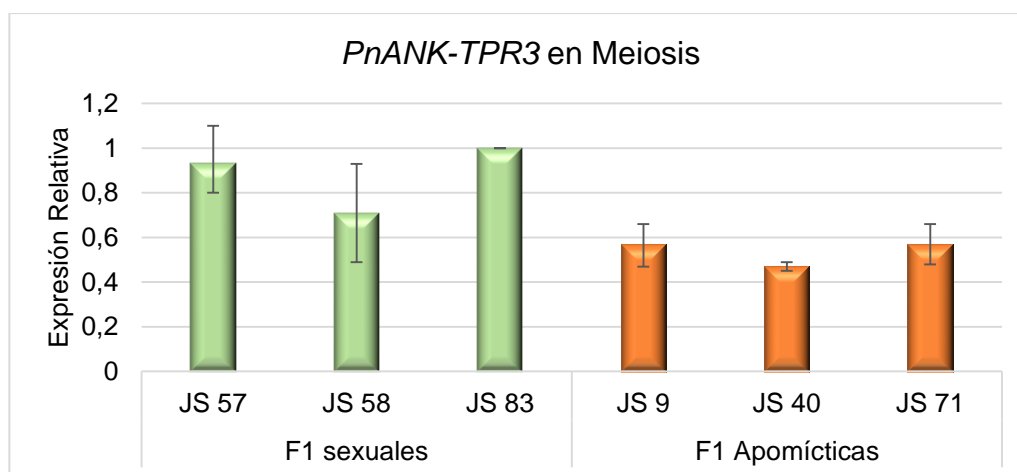


Figura 24. Gráfica de expresión relativa del gen *PnANK-TPR3* en el estadio de meiosis en tres individuos F₁ sexuales y tres apomícticos, derivados de Q4188 x Q4117. *PnANK-TPR3* muestra diferencias de expresión estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los individuos sexuales y apomícticos. *PnANK-TPR3*: isotigs 17384_sex y 11445_apo.

Finalmente, se determinaron los niveles de expresión de *PnANK-TPR3* en tejido vegetativo a través de PCR semicuantitativa (RT-PCR) sobre ADNc derivado del ARNm de hoja y raíz, de los genotipos Q4188 y Q4117. Se empleó como referencia la amplificación del gen β -*tubulina*. Los productos de amplificación se resolvieron en gel de agarosa al 2% (Figura 25A y B) y empleando el software ImageJ (Abràmoff et al., 2004) se cuantificaron las intensidades de las bandas amplificadas para cada gen, genotipo y tejido (Ver III.12 de Materiales y Métodos). La cuantificación de las bandas correspondientes a los amplicones de *PnANK-TPR3* se relativizó con la cuantificación de la intensidad de las bandas correspondiente a las amplificaciones del gen de referencia β -*tubulina* en Q4188 y Q4117. Los resultados de este análisis se muestran en la Figura 25C y D, donde no se aprecian diferencias de expresión de *PnANK-TPR3* entres los genotipos Q4188 y Q4117 en tejidos somáticos (hoja y raíz).

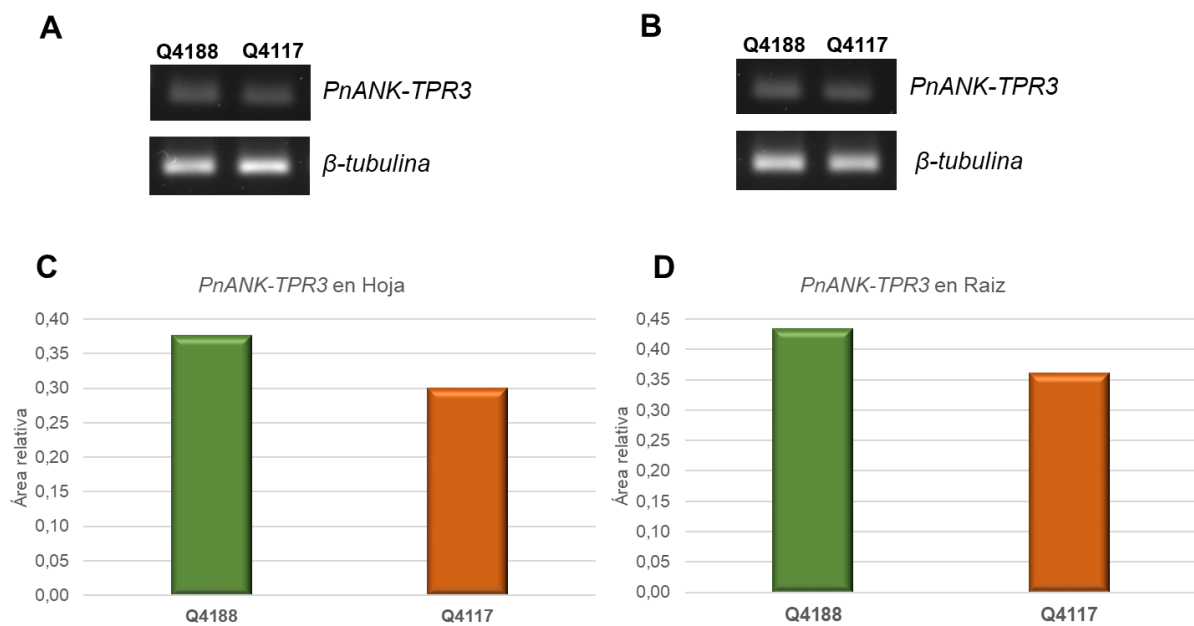


Figura 25. A) Bandas de las amplificaciones del gen *PnANK-TPR3* y β -*tubulina* sobre tejidos de hoja. B) Bandas de las amplificaciones del gen *PnANK-TPR3* y β -*tubulina* sobre tejido de raíz. C) Cuantificación relativizada de *PnANK-TPR3* sobre tejido de hoja, para los genotipos Q4188 y Q4117. D) Cuantificación de *PnANK-TPR3* sobre tejido de raíz, para los genotipos Q4188 y Q4117.

Estos resultados indican que el gen *PnANK-TPR3*, que se localiza en la región del ACL podría desempeñar un papel común en los tejidos no reproductivos de las plantas apomícticas y sexuales, pero tener una función específica en tejido reproductivo, asociados con el modo de reproducción.

IV.2.5- Identificación de posibles interactores de OsANK-TPR

Con el propósito de identificar las proteínas que interactúan con OsANK-TPR (LOC_Os12g40770), se utilizó el software libre STRING empleando la secuencia proteica del gen OsANK-TPR de arroz localizado en la región del cromosoma 12. La red resultante con un valor alto de confianza (0,700) identificó 10 proteínas, entre ellas se encuentran genes vecinos, genes que se co-expresan y proteínas homólogas. La mayoría de las interacciones están determinadas de manera experimental y/o desde bases de datos curadas (líneas de color rosa y celeste) (Figura 26). El listado de las proteínas identificadas a través de esta red se detalla en la Tabla 17.

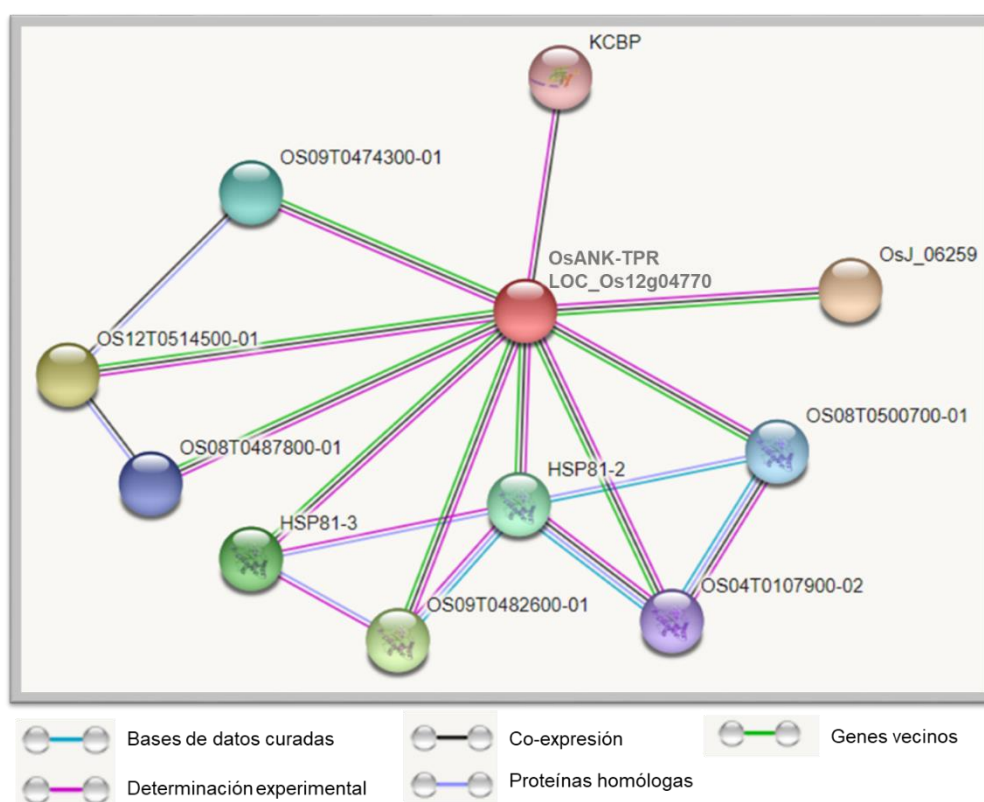


Figura 26. Representación de la red de interacción proteína-proteína de OsANK-TPR identificados utilizando la base de datos STRING con un alto valor de confianza (0,700).

Tabla 17. Lista de las proteínas identificadas *in silico* por la base de datos STRING, como los primeros interactores de la cáscara de OsANK-TPR (LOC_Os12g04770).

Organismo	Accesión	Proteína
Oryza sativa	OsJ_06259	Putative PKG-Ib
	Os12t0514500-01	Hsp90
	Os09t0482600-01	Heat shock protein 81-3
	OS09T0482400-01	Heat shock protein 81-3
	OS09T0482100-01	Heat shock protein 81-2
	Os09t0474300-01	Hsp90
	Os08t0500700-01	Putative heat shock protein 82
	Os08t0487800-01	Putative heat shock protein 82
	Os04t0107900-02	Hsp90
	Os04g0666900	(KCBP) Kinesin-like protein KIN-14I

Dentro de las proteínas detectadas se encuentra Kinesin-like protein KIN-14I una proteína perteneciente a una antigua superfamilia de proteínas motoras dependientes de microtúbulos. Dichas proteínas participan en una lista extensa y diversa de funciones celulares esenciales, que incluyen mitosis, citocinesis, polarización celular, alargamiento celular, desarrollo flagelar y transporte intracelular (Shen et al., 2012). Específicamente las proteínas del tipo KCBP actúa en la organización de los microtúbulos corticales y funciona en la formación del huso y del fragmoplasto (Bowser y Reddy, 1997; Mathur y Chua, 2000; Vos et al., 2000). La unión doble de microtúbulos y filamentos de actina por KCBP es clave en la configuración del citoesqueleto durante la morfogénesis de las células de los tricomas (Tian et al., 2015). Curiosamente en *P. notatum* Pessino et al., (2001), mediante *differential display*, detectó tres fragmentos diferencialmente expresados en el genotipo apomíctico Q4117, homólogo al dominio repetitivo KSP correspondiente a una proteína Kinesina de *Caernohabditis elegans*.

IV.3- Análisis de genes de respuesta temprana a auxina *Aux/IAA* expresados durante el desarrollo reproductivo de *P. notatum*

IV.3.1- Obtención y análisis de transcritos homólogos a *Os/IAA30* de arroz

El LOC_Os12g40890 (*Os/IAA30*) es otro de los genes posicionados en la región del cromosoma 12 de arroz sinténica al ACL de *P. notatum* (Hojsgaard et al., 2011). Dicho gen codifica para una proteína con dominio *Aux/IAA* de respuesta temprana a auxina que interactúa reprimiendo la acción de los factores de transcripción ARF (*Auxin Response Factors*), los cuales, a su vez, activan o reprimen la transcripción de sus genes blanco (Luo et al., 2018). Por lo expuesto anteriormente, este gen se eligió para estudiar su posible relación con el carácter apomixis. En primer lugar, se realizó una caracterización de la estructura del LOC_Os12g40890, en cuanto a su secuencia genómica, codificante (CDS), ADNc y proteína predicha, a partir de la información disponible en las bases de datos Gramene y NCBI. El gen presenta un tamaño de 5.258 pb y consta de cinco exones y cuatro intrones (Figura 27A), mientras que la secuencia de ADNc y CDS presentan un tamaño de 1.544 pb y 834 pb, respectivamente. Utilizando el programa Pfam (Finn et al., 2008) se determinó que codifica para una proteína de 277 aminoácidos que contiene un dominio *Aux/IAA* de respuesta temprana a auxina (Figura 27B).

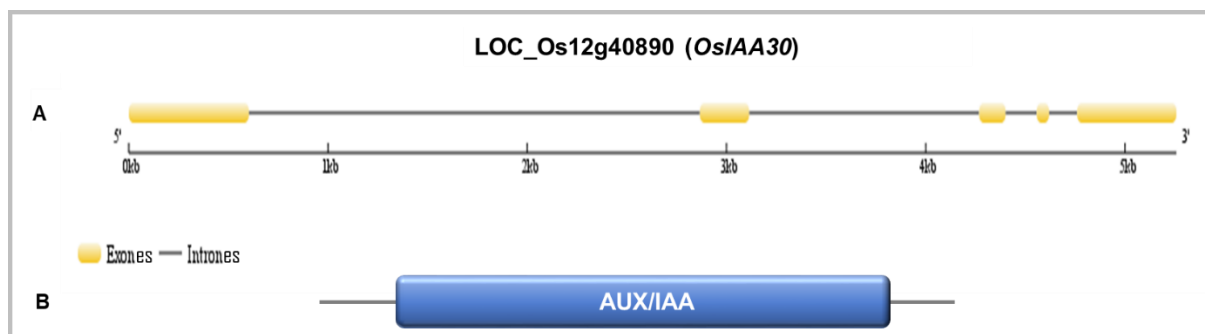


Figura 27. Esquemas de la estructura génica del LOC_Os12g40890 (*Os/IAA30*). **A)** Esquema representativo de la estructura génica incluyendo desde el nucleótido 1 al 5.258. Los exones (5) están representados por rectángulos amarillos y los intrones (4) por líneas grises, **B)** Esquema representativo de la estructura de la proteína con el dominio conservado *Aux/IAA*:

Con el objetivo de identificar los transcritos de *P. notatum* similares a *Os/IAA30* que se expresan durante el desarrollo reproductivo, se realizaron búsquedas BLASTX y BLASTP en los transcriptomas de referencia del genotipo tetraploide sexual C4-4x y tetraploide apomítico Q4117 (Ortiz et al., 2017). Para esto, se utilizó como consulta (*query*) la secuencia codificante (CDS) y la secuencia proteica correspondiente al gen de arroz *Os/IAA30*. Los resultados de las búsquedas arrojaron cuatro transcritos (isotigs) altamente similares a *Os/IAA30* en el transcriptoma del genotipo sexual (score > 207, e-value < 5e⁻⁵⁴) (Tabla 18) y

cuatro en el transcriptoma apomítico (Tabla 19) (score > 202, e-value < 2e⁻⁵²) (Ver sección Secuencias del anexo). Utilizando el programa Pfam se determinaron las estructuras proteicas predichas para cada secuencia, donde se observó que tanto los cuatro transcritos identificados en el transcriptoma sexual, como los cuatro identificados en el transcriptoma apomítico codifican para proteínas del tipo Aux/IAA. Además, a fin de corroborar la relación de estas secuencias con la proteína OsIAA30, las mismas fueron localizadas sobre el genoma de arroz mediante análisis de BLASTX en la base Gramene (<http://www.gramene.org/>). De los ocho isotigs, cinco (18298_sex, 06657_sex, 06658_sex, 21112_apo y 23154_apo) mostraron homología con la proteína OsIAA30 (LOC_Os12g40890), los tres isotigs restantes (21549_sex, 08581_apo y 08582_apo) arrojaron homología con la proteína OsIAA13, codificada por LOC_Os03g53150 posicionado en el cromosoma tres de arroz (Tablas 18 y 19).

En el caso de las tres secuencias altamente similares a *OsIAA30* detectadas en el transcriptoma sexual, dos correspondieron al mismo isogrupo (isogroup01542), por lo cual representarían variantes alélicas de un mismo gen, y la tercera a un isogrupo diferente (isogroup09840). Las dos secuencias IAA30 detectadas en el transcriptoma apomítico, corresponden a dos isogrupos (genes) diferentes (isogroup 10667 e isogroup 12709) por lo cual corresponderían a transcritos derivados de genes parálogos.

Tabla 18. Transcritos similares a *OsIAA30* detectados en la base sexual (C4-4X)

Query	Subject Isotig	Isogroup (gen)	Tamaño (pb)	Tamaño (aa)	Identidad (%)	Alineamiento (aa)	e-value	Score	Identidad en arroz
<i>OsIAA30</i> (CDS)	18298	09840	1563	277	70,14	277	4e-82	300	IAA30
	06658	01542	1108	284	65,49	284	1e-79	292	IAA30
	06657	01542	1348	254	62,60	254	1e-62	236	IAA30
	21549	13091	1192	234	66,28	172	5e-54	207	IAA13

Tabla 19. Transcritos similares a *OsANK-TPR* detectados en la base apomítica (Q4117)

Query	Subject Isotig	Isogroup (gen)	Tamaño (pb)	Tamaño (aa)	Identidad (%)	Alineamiento (aa)	e-value	Score	Identidad en arroz
<i>OsIAA30</i> (CDS)	21112	10667	1583	278	73,38	278	2e-84	308	IAA30
	23154	12709	1312	282	65,25	282	9e-80	293	IAA30
	08581	02062	1233	229	66,28	172	2e-55	212	IAA13
	08582	02062	1215	235	63,95	172	2e-52	202	IAA13

Como se mencionó en la introducción las proteínas de respuesta temprana a auxina (Aux/IAA) contienen cuatro dominios conservados, el dominio I, responsable de la represión de sus genes blanco y del reclutamiento del correpresor TOPLESS (TPL) (Szemenyei et al., 2008; Tiwari et al., 2004), el dominio II que contiene la secuencia consenso GWPPV, denominado “*degron*” que le confiere inestabilidad a la proteína y provoca la degradación rápida de las Aux/IAA al interactuar con las proteínas F-box TIR1/AFB (Tiwari et al., 2004; Dharmasiri et al., 2005), y los dominios C-terminal III y IV que son regiones de dimerización involucradas en la homo y/o hetero-dimerización con proteínas Aux/IAA y/o con los factores de respuesta a auxina (ARFs), respectivamente (Guilfoyle, 2015). Con el objetivo de determinar el grado de conservación entre la proteína de arroz OsIAA30 y las cinco proteínas similares expresadas en el transcriptoma de *P. notatum*, se realizó el alineamiento de las secuencias utilizando el programa Muscle y se visualizaron con el programa Jalview 2.10.5 en base al grado de conservación de los aminoácidos. Los resultados de dicho alineamiento se muestran en la Figura 28, donde se puede observar un alto grado de conservación en los cuatro dominios de todas las proteínas, a excepción de la proteína codificada por el isotig 06657_sex que mostró una delección en la región terminal del dominio IV. Además, se detectaron tres inserciones y dos delecciones en las proteínas predichas por los isotigs 24154_apo, 06657_sex y 06658_sex, diferenciándolas de OsIAA30 y de los isotigs 18298_sex y 21112_apo, aunque en todos los casos por fuera de los dominios conservados. Las tres inserciones presentan siete, cuatro y tres aminoácidos, la primera se posiciona entre el aminoácido 68 de la secuencia consenso, la segunda en el 105 y la tercera, en el aminoácido 157. Por otro lado, las delecciones presentan cinco y cuatro aminoácidos, comenzado en los aminoácidos 32 y 81, respectivamente.

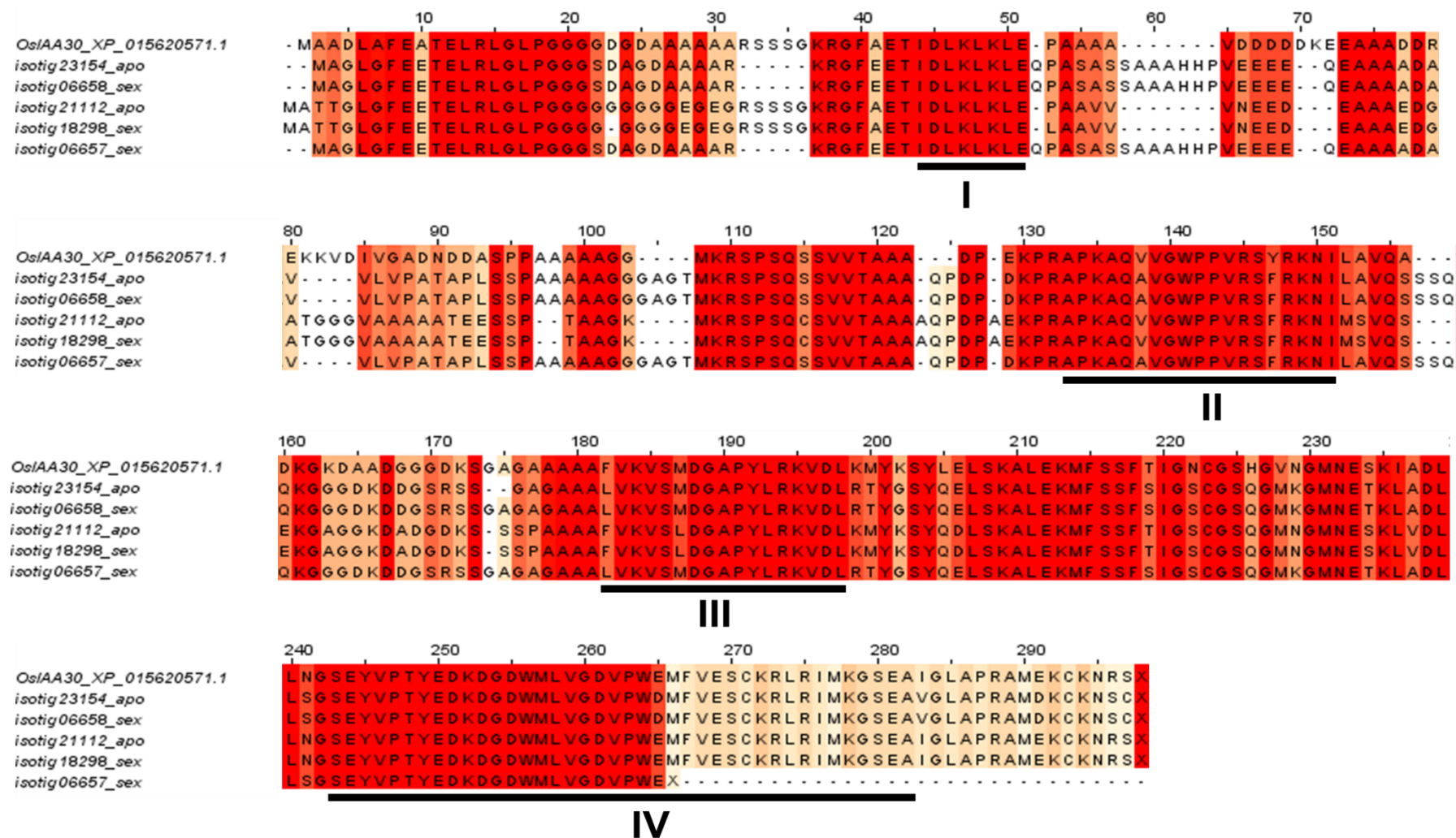


Figura 28. Alineamiento de las secuencias proteicas predichas de los transcritos similares a OslAA30 expresados en *P. notatum*. Los dominios conservados están subrayados e indicados por números romanos.

Con el objetivo de observar las relaciones filogenéticas entre las secuencias de *P. notatum* y OsIAA30, se construyó un árbol a partir del alineamiento descrito anteriormente, empleando como fuera de tipo (*outgroup*) una proteína Aux/IAA de *Marchantia polymorpha*, utilizando el software MEGA-X 4.0. El árbol filogenético resultante se presenta en la Figura 29.

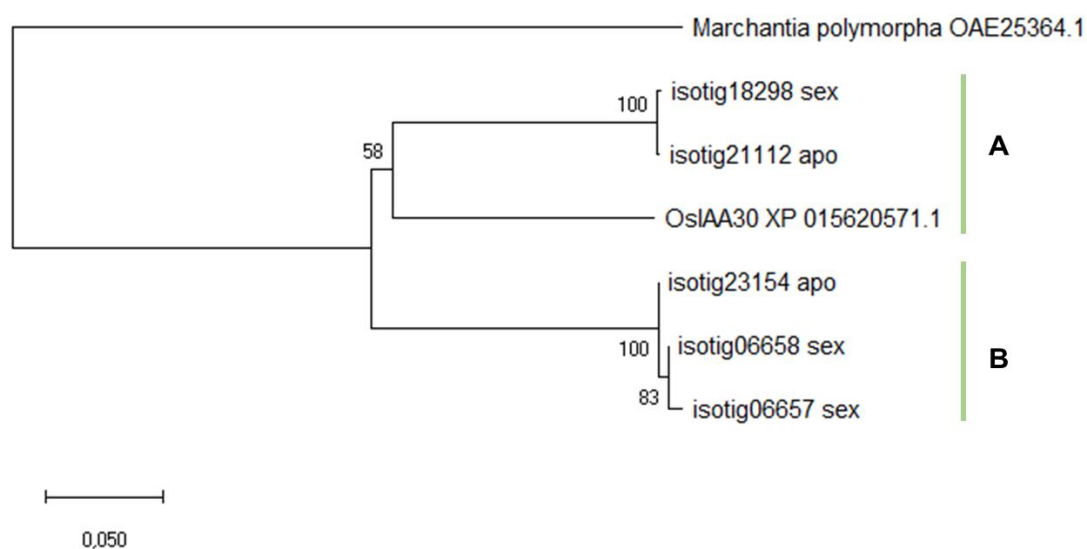


Figura 29. Árbol filogenético mostrando las relaciones filogenéticas entre las proteínas Aux/IAA predichas de *P. notatum* y OsIAA30.

En concordancia con los resultados obtenidos en el alineamiento de proteínas expuesto en la Figura 28, el árbol resultante muestra dos grupos bien definidos. El grupo A contiene a la proteína OsIAA30 junto con los isotigs 18298_sex y 21112_apo, mientras que en el grupo B, agrupan las proteínas predichas de los isotigs 06658 y 06657 sexuales (pertenecientes al mismo isogrupo), y el isotig 23154_apo. Estos resultados indican que las secuencias de las proteínas predichas codificadas por los transcritos 18228_sex y 21112_apo derivarían de genes ortólogos al gen de arroz codificante para OsIAA30 y que las secuencias del grupo B posiblemente deriven de un gen parálogo.

Estos análisis permitieron identificar transcritos expresados durante el desarrollo sexual y apomíctico, cuyas proteínas predichas resultaron altamente similares a la proteína OsIAA30 codificada por el *locus* el LOC_Os12g40890.

IV.3.2- Búsqueda de transcritos similares al gen *OsIAA30* de arroz con expresión diferencial entre los transcriptomas sexual y apomítico de *P. notatum*

Con el fin de identificar si alguno de los transcritos similares al gen *OsIAA30* presenta una representación diferencial durante el desarrollo reproductivo sexual y apomítico, se realizaron nuevas búsquedas BLASTX, pero en este caso sobre el “ensamblado global del transcriptoma” (ensamblado conjunto de las lecturas de C4-4X y Q4117) (Ortiz et al., 2017). La metodología fue la misma que se utilizó para el gen *OsANK-TPR*, utilizando como consulta la secuencia codificante del gen *OsIAA30*. Como resultado se obtuvieron cinco transcritos altamente similares a *OsIAA30* (score > 202, e-value < $2e^{-52}$) (Tabla 20). Ninguno de ellos mostró diferencias de expresión estadísticamente significativas (valor umbral $\text{Log}_2\text{FC} > |1.0|$, $\text{FDR} < 0.05$) entre los transcriptomas apomítico y sexual. Sin embargo, de acuerdo al número de lecturas los transcritos más expresados corresponden al isotig33023 (Tabla 20). Mediante búsquedas BLASTN en los transcriptomas correspondientes (sexual y apomítico) se determinó que el isotig 33023 es altamente similar (score = 2083, e-value = 0,0) a los transcritos de los isotig 18298_sex y el isotig 21112_apo (score = 2054, e-value = 0,0) detectados previamente como los más similares a *OsIAA30* (Tabla 20).

Tabla 20. Transcritos *Aux/IAA* similares al gen *OsIAA30* detectados en el ensamblado global de desarrollo reproductivo de *P. notatum*. Los datos de expresión fueron tomados del Ortiz et al. (2017), Material suplementario Tabla 6.

Isotigs base global	Isoforma base sexual	Isoforma base apomítica	Lectura en APO	Lectura en SEX	logFC	logCPM	p-value	FDR
isotig22208	isotig06657	-	2	5	1,23531	2,97735	0,45321	0,94142
isotig22209	isotig06658	isoig23154	17	11	-0,65825	4,52056	0,34527	0,94142
isotig22774	isotig21549	Isotig08581	75	49	-0,64905	6,52193	0,01530	0,21213
isotig33023	isotig18298	isotig21112	216	159	-0,47797	8,08768	0,00179	0,04458
isotig22775	-	isoig08582	6	6	-0,03555	3,51900	1	1

IV.3.3- Identificación y estudios de filogenia de genes *Aux/IAA* expresados en *P. notatum*

Como se desarrolló en la introducción, la familia de proteínas de respuesta temprana a auxina *Aux/IAA* es numerosa, por lo que podrían existir varios genes codificantes para proteínas de este tipo expresados durante el desarrollo reproductivo sexual y apomítico de *P. notatum*, además de los ya identificados en la sección anterior. Para conocer qué otros transcritos codificantes para proteínas del tipo *Aux/IAA* se expresan en el transcriptoma de *P. notatum* se realizaron búsquedas BLASTP sobre el transcriptoma global, utilizando como consulta (*query*) las proteínas pertenecientes a la familia *Aux/IAA* de arroz (31 miembros) (Jain et al., 2006). Como resultado de este análisis se detectaron 23 proteínas predichas con valores elevados de similitud (% ID > 50, e-value = 0 y Score >150) (ver Tabla VIII.4 del Anexo). A fin de determinar los tipos de proteínas *Aux/IAA* expresadas durante el desarrollo reproductivo de *P. notatum*, las secuencias aminoacídicas de arroz y *P. notatum* fueron alineadas y utilizadas en la construcción de un árbol filogenético empleando el programa MEGA-X (Figura 30). Como proteína fuera de grupo se utilizó una proteína *Aux/IAA* de *M. polymorpha*. Como era de esperar, las proteínas codificadas por el isotig 33023, desde ahora nombrado como PnIAA30, agrupó con la proteína OsIAA30 codificada por el gen LOC_Os12g40890, localizado en la región del cromosoma de arroz sinténica al ACL de *P. notatum*. Junto con estas proteínas se agruparon la proteína de arroz OsIAA11 y las proteínas predichas de los isotigs 22208 y 22209. La mayoría de las proteínas de arroz agruparon con proteínas similares de *P. notatum*, excepto para dos grupos formados por i) las proteínas OsIAA4 y OsIAA8 y ii) OsIAA22, OsIAA25, OsIAA27, OsIAA28 y OsIAA29. Estos resultados indican que la familia *Aux/IAA* en *P. notatum* presenta al menos 23 miembros expresados en el transcriptoma floral. De las proteínas predichas, tres (isotig 33023, 22208 y 22209) resultaron asociados al gen de arroz (OsIAA30) presente en la región del cromosoma 12 de arroz sinténica al ACL, mientras que las otras 20 agruparon con 21 proteínas de arroz formando 13 grupos.

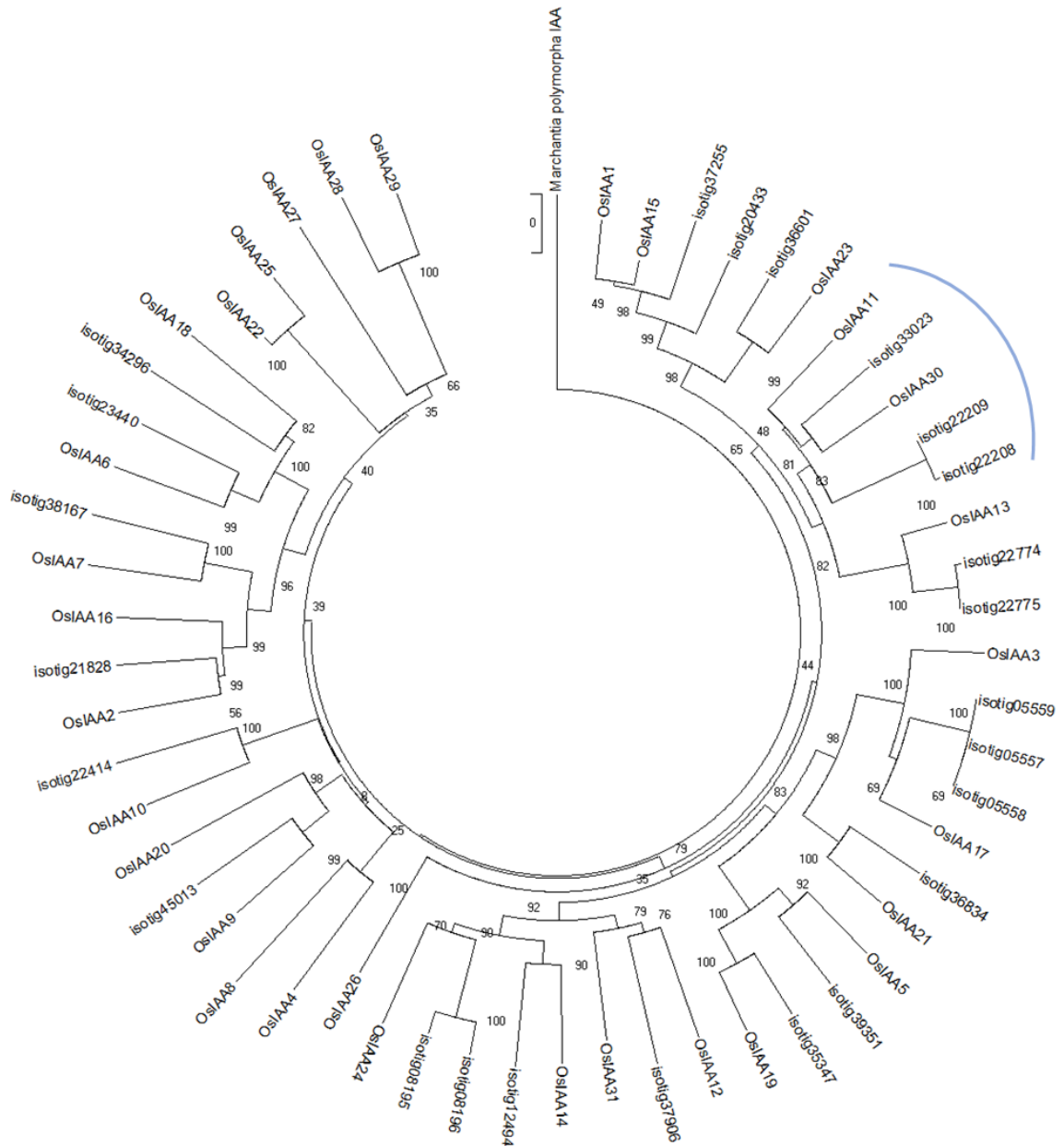


Figura 30. Árbol filogenético construido con secuencias proteicas de la familia Aux/IAA de *Oryza sativa* y *Paspalum notatum*. Como proteínas fuera de grupo (*outgroup*) se utilizó una proteína con dominio Aux/IAA de *Marchantia polymorpha*. La línea de color azul indica el grupo que incluye a OsIAA30 y la proteína PnIAA30 predicha por el Isotig 33023.

IV.3.4- Aislamiento y análisis de cosegregación de secuencias génicas de *PnIAA30* de *P. notatum*

Con el fin de corroborar la presencia de *PnIAA30* (isotig 18298_sex y 21112_apo) en el genoma de *P. notatum*, y a su vez determinar su posible ligamiento genético con el modo de reproducción, se realizaron experimentos de análisis de segregantes en grupos (BSA) (Michelmore et al., 1993). Este análisis se realizó a partir de amplificaciones por PCR de ADN genómico de los individuos parentales Q4188 (sexual) y Q4117 (apomíctico), y de un grupo de individuos sexual (BS) y uno de apomíctico (BA). Cada grupo representativo del modo de reproducción fue integrado por cinco individuos F₁ de cada clase (sexuales y apomícticos), derivados de la población de mapeo descrita anteriormente. Los cebadores utilizados para la amplificación de las secuencias genómicas se muestran en la Tabla 21.

Tabla 21.- Cebadores diseñados para la amplificación de las secuencias genómicas correspondientes del gen *PnIAA30* homólogos a *OsIAA30*.

Cebador	Secuencia (5'-3')
Pn21112aF	GGTGGACCTCAAGATGTACAAGA
RTPn21112aR	TTCATGGCTTCTCTCTTTTCGTAG

Como primer paso y con el objetivo de determinar la disposición de los exones se reconstruyeron las estructuras génicas hipotéticas para cada transcripto utilizando como referencia las secuencias genómicas de arroz *OsIAA30* (OSNPB_120601300). El alineamiento de los isotigs 18298_sex y 21112_apo con la referencia mostró que los transcriptos codifican para cinco exones, al igual que la estructura génica de *OsIAA30* (Figura 31A). De esta manera se diseñaron los cebadores anclados sobre los bordes de los intrones a fin de amplificar secuencias intrónicas que normalmente resultan más efectivas para detectar polimorfismos entre individuos (Figura 31A). La amplificación por PCR sobre el ADN genómico con los cebadores Pn21112aF y RTPn21112aR, mostró un fragmento monomórfico de aproximadamente 1.900 pb presente en los dos genotipos (Q4188 y Q4117) y en los dos grupos (BS y BA), y otro fragmento polimórfico de menor peso presente solo en el genotipo apomíctico (Q4117) y en el grupo apomíctico (BA) (Figura 31B). Dada la similitud de secuencia evidenciada previamente entre los transcriptos expresados de ambos parentales, es probable que esta diferencia se deba a la amplificación de un alelo específico presente en el genotipo apomíctico (derivado de una delección de unas pocas bases). Vale aclarar que el alelo polimórfico no pudo resolverse adecuadamente del alelo monomórfico a pesar de realizar varias pruebas con diferentes concentraciones de agarosa (1,5-3,0%) y condiciones de electroforesis (40- 80 V constantes) (Figura 31B).

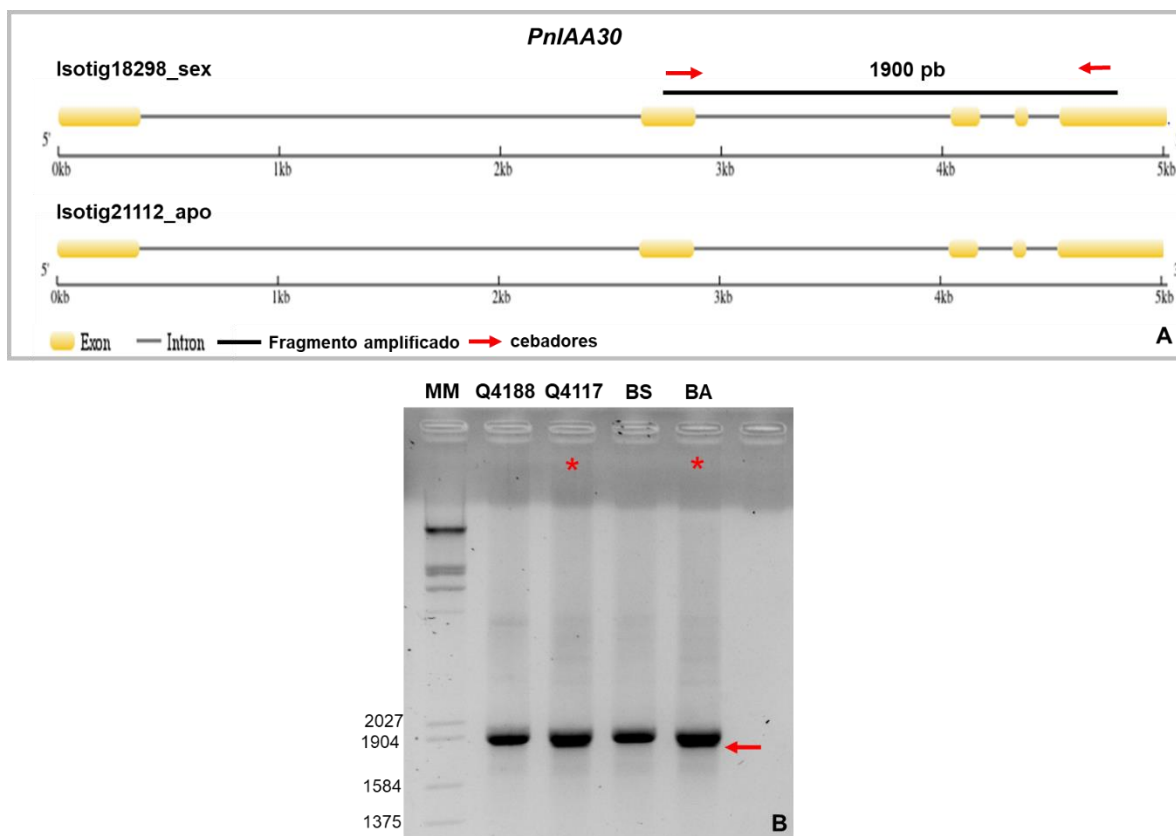


Figura 31. Estructuras génicas y amplificación por PCR de los transcritos 18298_sex, 21112_apo (*PnlAA30*). **A)** Esquema de las estructuras génicas hipotéticas para ambos transcritos. **B)** Gel de agarosa al 1,5 % con bandas correspondiente a las amplificaciones por PCR. La flecha roja indica la banda polimórfica presente en el genotipo Q4117 y ausente en el progenitor sexual (Q4188), que mantuvo su polimorfismo entre los grupos apo (BA) y sex (BS). MM: marcador molecular, Q4188: madre sexual, Q4117: padre apomítico, BS: grupo/ *bulk* sexual, BA: grupo/ *bulk* apomítico.

A fin de evaluar el posible ligamiento del alelo polimórfico obtenido en el análisis de segregantes en grupos, se realizó la amplificación sobre el genoma de los individuos parentales (Q4188 y Q4117) y 20 individuos F_1 (10 sexuales y 10 apomíticos) de la población segregante (Q4188 x Q4117) utilizando los mismos cebadores descritos anteriormente. Los resultados de la amplificación se muestran en la Figura 32. La presencia de la banda polimórfica pudo ser detectada solo en cuatro de los 20 individuos F_1 empleados (todos apomíticos). Para el análisis de ligamiento se determinó la relación de segregación (presencia:ausencia) del fragmento polimórfico (marcador) en los individuos F_1 , como derivado de un *locus* heterocigota uniplexo (Aaaa) segregando de un organismo tetraploide en caso de herencia disómica o polisómica, mediante una prueba de Chi cuadrado (χ^2). Los valores 4:16 (presencia:ausencia), no ajustaron a ninguna de las hipótesis de relaciones de segregación planteadas, obteniéndose valores de $\chi^2 > 7$ y p-valores $< 0,01$. En base a estos resultados la banda polimórfica evaluada se consideró como un marcador con segregación distorsionada. Sin embargo, y dado que el carácter apomixis segrega en forma distorsionada (Stein et al.,

2007), se realizó una prueba para determinar si el marcador segrega de manera independiente o ligado al modo reproductivo. Para esto, se realizó una prueba de Chi-cuadrado (χ^2), contrastando los valores de segregación observados, con los valores esperados para una segregación independientemente de dos *loci* (apomixis y marcador) en una población segregante del tipo pseudo-retrocruza (*pseudo-testcross*) (1:1). La prueba de cosegregación mostró un valor de $\chi^2 = 10,4$ ($p = 0,0154$) con lo cual no ajustó a una segregación independiente, es decir que el marcador polimórfico de *PnIAA30* segrega ligado al modo de reproducción apomíctica de *P. notatum*. Con el fin de estimar la distancia genética del marcador al ACL de *P. notatum*, se determinó el porcentaje de recombinación dividiendo el número individuos (gametas) recombinantes (apomícticos sin el marcador y sexuales con el marcador) sobre el número de individuos parentales totales (6/20) multiplicado por 100. El cálculo arrojó un 30 % de recombinación, lo cual indica que el fragmento amplificado se encuentra ligado al ACL de *P. notatum*, a una distancia de aproximadamente 30 cM.

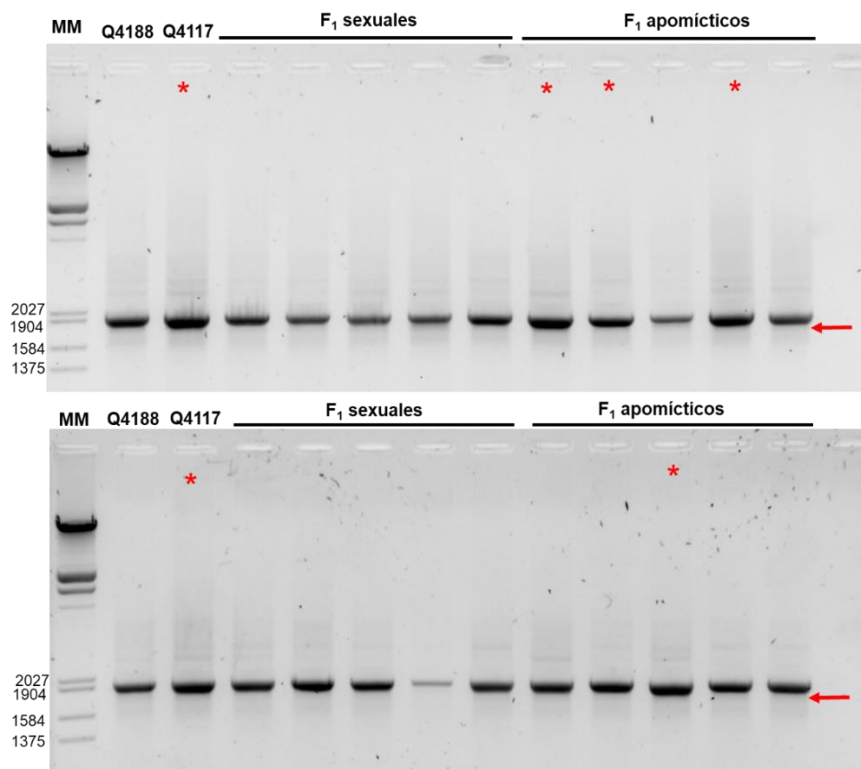


Figura 32. Gel de agarosa al 1,5 % mostrando la amplificación del gen *PnIAA30* empleando los cebadores Pn21112aF y RTPn21112aR, sobre los genotipos parentales y 20 individuos de la población segregante por el modo de reproducción (10 F₁ sexuales y 10 F₁ apomícticos). La flecha roja indica la banda polimórfica evaluada y los asteriscos rojos la presencia de la misma.

Con el objetivo de confirmar a nivel de secuencia el alelo polimorfismo ligado al ACL de *P. notatum*, se aislaron los fragmentos de la banda monomórfica presente en los dos genotipos (Q4188 y Q4117) y la posible banda polimórfica del genotipo Q4117, se clonaron en el vector pGEM®-T easy, y se transformaron bacterias de *E. coli* DH5-Alpha. Luego de la purificación de los plásmidos, se corroboró la presencia de los fragmentos de interés mediante PCR, empleando los mismos cebadores utilizados en el análisis de ligamiento (Pn21112aF y RTPn21112aR) (Figura 33). La secuenciación de los insertos se realizó en Macrogen, Corea. (ver sección III.8 de Materiales y Métodos).

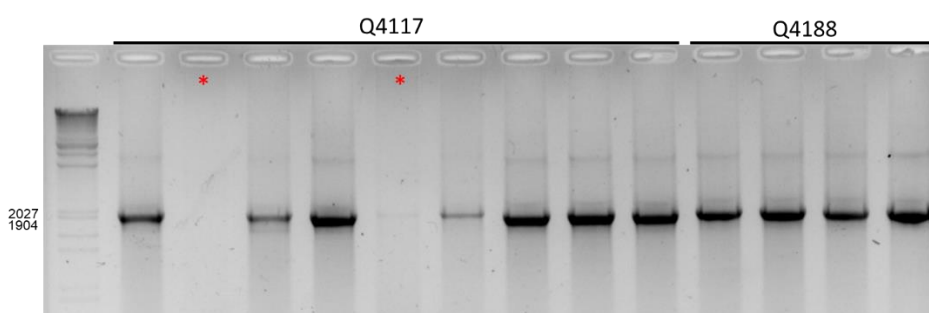


Figura 33. Gel de agarosa al 1,5 % mostrando la amplificación de control de los clones *PnIAA30* provenientes de Q4188 y Q4117, empleando los cebadores Pn21112aF y RTPn21112aR. Los asteriscos rojos marcan amplificaciones desde plásmidos que no incorporaron el fragmento de interés.

Los resultados de la secuenciación fueron analizados mediante alineamientos empleando el programa ClustalW. Estos mostraron la presencia de tres secuencias, una única amplificada en el parental sexual Q4188, con un tamaño de 1.913 pb, y dos secuencias en el parental apomítico Q4117 de 1.918 y 1.892 pb. Las tres secuencias se denominarán de aquí en adelante como SEX_Q4188_a, APO_Q4117_a y APO_Q4117_b, respectivamente (Ver sección Secuencias del Anexo). El alineamiento de dichas secuencias (Figura 34) muestra una elevada similitud entre las mismas, a excepción de una inserción de 6 pb y una delección de 31 pb, solo presentes en la secuencia APO_Q4117_b, posicionadas en la base 840 y 1.332, respectivamente. Estos resultados indican la presencia de un alelo del gen *PnIAA30* presente tanto en el genotipo sexual como en el apomítico (SEX_Q4188_a y APO_Q4117_a) y otro alelo con 25 pb menos, presente en el genotipo apomítico (APO_Q4117_b) que podría corresponder al fragmento ligado al ACL descrito anteriormente. Dichos resultados coinciden con la banda monomórfica de aproximadamente 1.910 pb y la banda polimórfica de aproximadamente 1.890 pb, observadas en los geles de agarosa de las Figura 31B y 32.

Con el fin de corroborar la identidad de las secuencias clonadas, se analizó la similitud de las mismas mediante búsquedas BLASTN en las bases de datos sexual y apomítica del

transcriptoma floral de *P. notatum*. La secuencia SEX_Q4188_a mostró homología con cuatro sitios (% Identidad > 98,39 e-value < $2e^{-24}$ y score > 115) que se corresponden con el isotig 18298_sex de la base sexual (Tabla 22). Resultados similares se obtuvieron para las secuencias APO_Q4117_a y APO_Q4117_b, observándose cuatro sitios altamente homólogos (% Identidad > 98,39 e-value < $2e^{-24}$ y score > 115) con el isotig 21112_apo (Tabla 23). Los cuatro sitios homólogos a las secuencias 18298_sex y 21112_apo son coincidentes con las secuencias exónicas incluidas en el fragmento amplificado (Figura 31A).

APO_Q4117_a 1 GGTGGACCTCAAGATGTACAAGAGCTACCAGGACCTGTCCAAGGCGCTCGAGAAGATGTTGAGCTCCTTCACCATCGGTACGTAGTTACGTACGTAATTAATT...ATTACCATTTCTCTACAAAATAAAT 128
 SEX_Q4188_a 1 GGTGGACCTCAAGATGTACAAGAGCTACCAGGACCTGTCCAAGGCGCTCGAGAAGATGTTGAGCTCCTTCACCATCGGTACGTAGTTACGTACGTAATTAATTATTATTACCATTTCTCTACAAAATAAAT 131
 APO_Q4117_b 1 GGTGGACCTCAAGATGTACAAGAGCTACCAGGACCTGTCCAAGGCGCTCGAGAAGATGTTGAGCTCCTTCACCATCGGTACGTAGTTACGTACGTAATTAATTATTATTACCATTTCTCTACAAAATAAAT 131

Consensus
 GGTGGACCTCAAGATGTACAAGAGCTACCAGGACCTGTCCAAGGCGCTCGAGAAGATGTTGAGCTCCTTCACCATCGGTACGTAGTTACGTACGTAATTAATTATTATTACCATTTCTCTACAAAATAAAT

Occupancy

APO_Q4117_a 129 TAAATCATGCATGGATTTTTCTAATTAATAATCAAAAATTAGAGAGTCCAAAACCAAGTAGTAGCTGCAATTGTGCATGTTGGGTAACAGACTGCAGATTAGTGGGCAAATCTTCTTTGTTGCAC 259
 SEX_Q4188_a 132 TAAATCATGCATGGATTTTTCTAATTAATAATCAAAAATTAGAGAGTCCAAAACCAAGTAGTAGCTGCAATTGTGCATGTTGGGTAACAGACTGCAGATTAGTGGGCAAATCTTCTTTGTTGCAC 262
 APO_Q4117_b 132 TAAATCATGCATGGATTTTTCTAATTAATAATCAAAAATTAGAGAGTCCAAAACCAAGTAGTAGCTGCAATTGTGCATGTTGGGTAACAGACTGCAGATTAGTGGGCAAATCTTCTTTGTTGCAC 262

Consensus
 TAAATCATGCATGGATTTTTCTAATTAATAATCAAAAATTAGAGAGTCCAAAACCAAGTAGTAGCTGCAATTGTGCATGTTGGGTAACAGACTGCAGATTAGTGGGCAAATCTTCTTTGTTGCAC

Occupancy

APO_Q4117_a 260 TTAAATTTGCAGCTTATTATTAGTTATTTCCACATGAATGAAATACATATAGTTTGCTCATGAAATTCCTTATATAAAAAGAGTACTAACAATGTAAGTACTCATATTACAGTGGACTCCTCCTC 390
 SEX_Q4188_a 263 TTAAATTTGCAGCTTATTATTAGTTATTTCCACATGAATGAAATACATATAGTTTGCTCATGAAATTCCTTATATAAAAAGAGTACTAACAATGTAAGTACTCATATTACAGTGGACTCCTCCTC 393
 APO_Q4117_b 263 TTAAATTTGCAGCTTATTATTAGTTATTTCCACATGAATGAAATACATATAGTTTGCTCATGAAATTCCTTATATAAAAAGAGTACTAACAATGTAAGTACTCATATTACAGTGGACTCCTCCTC 393

Consensus
 TTAAATTTGCAGCTTATTATTAGTTATTTCCACATGAATGAAATACATATAGTTTGCTCATGAAATTCCTTATATAAAAAGAGTACTAACAATGTAAGTACTCATATTACAGTGGACTCCTCCTC

Occupancy

APO_Q4117_a 391 CATTGTGTTGTGTATATAATTTGCACACGTTGGGTATGTAGAGCTTATATGATTGCATTATTGGCATTCCCATGTGTGGTGGTGGTCACCATGTGGTTTGGCCAGTGGCGCGCTCCATGATTTGCATCC 521
 SEX_Q4188_a 394 CATTGTGTTGTGTATATAATTTGCACACGTTGGGTATGTAGAGCTTATATGATTGCATTATTGGCATTCCCATGTGTGGTGGTGGTCACCATGTGGTTTGGCCAGTGGCGCGCTCCATGATTTGCATCC 524
 APO_Q4117_b 394 CATTGTGTTGTGTATATAATTTGCACACGTTGGGTATGTAGAGCTTATATGATTGCATTATTGGCATTCCCATGTGTGGTGGTGGTCACCATGTGGTTTGGCCAGTGGCGCGCTCCATGATTTGCATCC 524

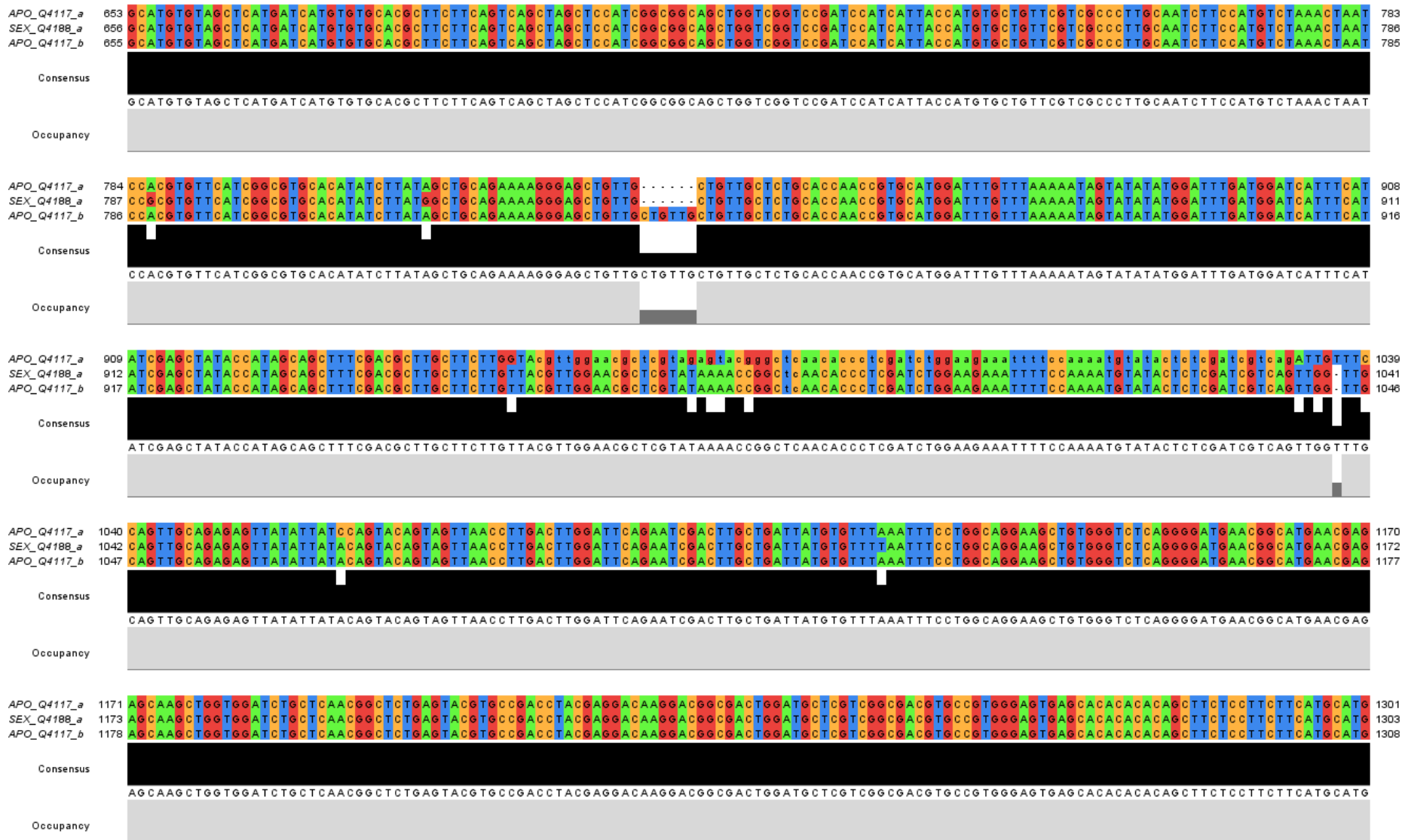
Consensus
 CATTGTGTTGTGTATATAATTTGCACACGTTGGGTATGTAGAGCTTATATGATTGCATTATTGGCATTCCCATGTGTGGTGGTGGTCACCATGTGGTTTGGCCAGTGGCGCGCTCCATGATTTGCATCC

Occupancy

APO_Q4117_a 522 TTGGTAGGTGTCGGCCATAGCTGGCATAGTCCCGCTGTCCCTCCAACACCGAGATGGCGGACCGATCGAGTATCTCTTCTCGGGCGCCCTTTCTTCCTCCTCTTGGCTGCCGCTGCCCTGTGAGCAACTACAT 652
 SEX_Q4188_a 525 TTGGTAGGTGTCGGCCATAGCTGGCATAGTCCCGCTGTCCCTCCAACACCGAGATGGCGGACCGATCGAGTATCTCTTCTCGGGCGCCCTTTCTTCCTCCTCTTGGCTGCCGCTGCCCTGTGAGCAACTACAT 655
 APO_Q4117_b 525 TTGGTAGGTGTCGGCCATAGCTGGCATAGTCCCGCTGTCCCTCCAACACCGAGATGGCGGACCGATCGAGTATCTCTTCTCGGGCGCCCTTTCTTCCTCCTCTTGGCTGCCGCTGCCCTGTGAGCAACTACAT 654

Consensus
 TTGGTAGGTGTCGGCCATAGCTGGCATAGTCCCGCTGTCCCTCCAACACCGAGATGGCGGACCGATCGAGTATCTCTTCTCGGGCGCCCTTTCTTCCTCCTCTTGGCTGCCGCTGCCCTGTGAGCAACTACAT

Occupancy



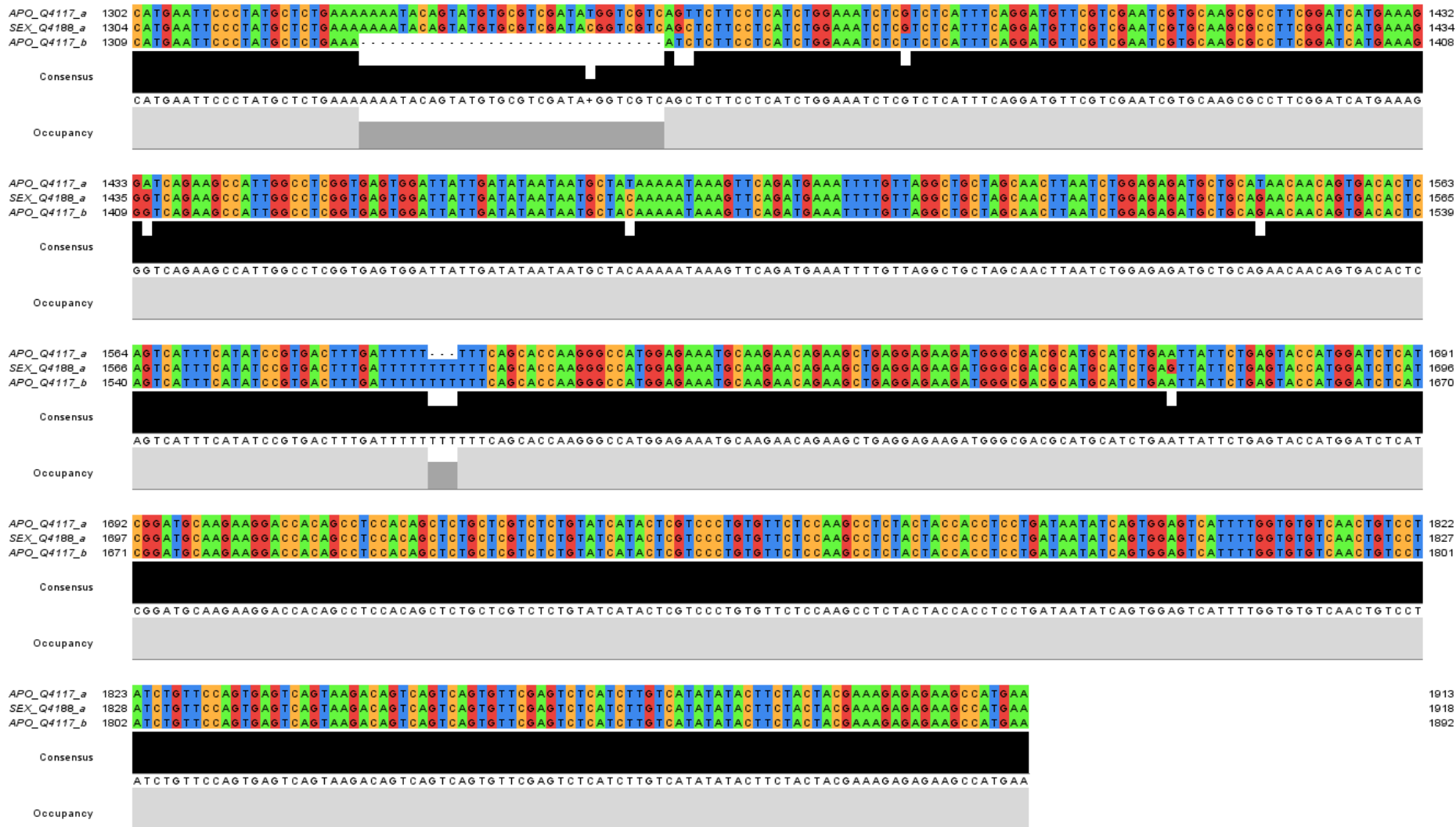


Figura 34. Análisis de alineamiento de secuencias nucleotídicas de los fragmentos génicos clonados, correspondientes a los isotigs 18298_sex y 21112_apo (PnIAA30).

Tabla 22. Resultados de búsquedas BLASTN en la base de datos sexual (C4-4X) del transcriptoma floral de *P. notatum* para la secuencia SEX_Q4188_a.

Query	Subject (isotig)	Identidad (%)	Alineamiento (bases)	e-value	Score
SEX_Q4188_a	Isotig 18298	99,68	315	$2e^{-175}$	617
		100	135	$2e^{-70}$	268
		100	78	$2e^{-36}$	155
		98,39	62	$2e^{-24}$	115

Tabla 23. Resultados de búsquedas BLASTN en la base de datos apomíctica (Q4117) del transcriptoma floral de *P. notatum* para las secuencias APO_Q4117_a y APO_Q4117_b.

Query	Subject (isotig)	Identidad (%)	Alineamiento (bases)	e-value	Score
APO_Q4117_a	Isotig 21112	100	315	$8e^{-178}$	624
		100	135	$2e^{-70}$	268
		100	78	$2e^{-36}$	155
		100	62	$2e^{-27}$	123
APO_Q4117_b	Isotig 21112	100	315	$8e^{-178}$	624
		100	135	$2e^{-70}$	268
		100	78	$2e^{-36}$	155
		98,39	62	$2e^{-24}$	115

IV.3.4.1- Mapeo físico de *PnIAA30* en el genoma (2x) de *P. notatum*

Al igual que el análisis efectuado para el gen *PnANK-TPR3* en la sección IV.2.3.1, con el fin de mapear *in silico* las secuencias de los isotigs 18298_sex y 21112_apo (*PnIAA30*) en *P. notatum*, se realizaron búsquedas BLASTN (% identidad > 80, e-value < e^{-5}) sobre los 3.843 supercontigs que constituyen el borrador del genoma de la especie. El análisis determinó que ambas secuencias mapearon en el ensamblado utg001669I. Los resultados se muestran en la Tabla 24, donde en ambos casos se detectaron cinco regiones de similitud superiores al 86 % en la mayor parte del largo de los transcritos (1408 bases/ 1563 bases totales del isotig 18298_sex y 1551 bases/ 1583 bases totales del isotig 21112_apo), coincidente con las cinco regiones exónicas de *OsIAA30* y de las estructuras génica hipotéticas de los isotigs bajo estudio (18298_sex y 21112_apo), construidas con la secuencia genómica de *OsIAA30* (Ver Figura 31A). Vale destacar que el ensamblado utg001669I es el mismo en el que se posicionaron los isotigs 17384_sex y 11445_apo (*PnANK-TPR3*) y la sonda C1069 100 % ligado al ACL de *P. notatum*.

Tabla 24. Resultados de las búsquedas BLASTN sobre el borrador del genoma del citotipo diploide sexual #R1 de *P. notatum*.

Query	Subject	Identidad (%)	Alineamiento (pb)	Query start	Query end	Subject start	Subject end	e-value	Score
<i>PnIAA30</i> Isotig18298_sex	utg001669l	87,05	502	1	490	142202	142667	3e ⁻¹⁴⁶	523
	utg001669l	89,29	252	493	739	144803	145042	5e ⁻⁷⁹	300
	utg001669l	92,19	128	738	864	146058	146180	9e ⁻⁴²	176
	utg001669	89,83	59	872	930	146307	146362	1e ⁻¹⁰	73,1
	utg001669	87,97	640	949	1563	146521	147134	0	708
<i>PnIAA30</i> Isotig21112_apo	utg001669l	86,69	526	3	516	142182	142667	4e ⁻¹⁵⁰	536
	utg001669l	88,89	252	519	765	144803	145042	2e ⁻⁷⁷	294
	utg001669l	92,19	128	764	890	146058	146180	9e ⁻⁴²	176
	utg001669	89,83	59	898	956	146307	146362	1e ⁻¹⁰	73,1
	utg001669	88,01	634	975	1583	146521	147129	0	704

Posteriormente, utilizando como referencia la secuencia genómica del ensamblado utg001669l, se construyeron las secuencias génicas correspondientes a los isotigs 18298_sex y 21112_apo (*PnIAA30*), y se compararon con la estructura del gen de arroz *OsIAA30* (Figura 35). Este análisis determinó que el gen *PnIAA30* posee una estructura similar a *OsIAA30*, conteniendo los cinco exones predichos y manteniéndose un alto grado de microcolinealidad entre ambos.

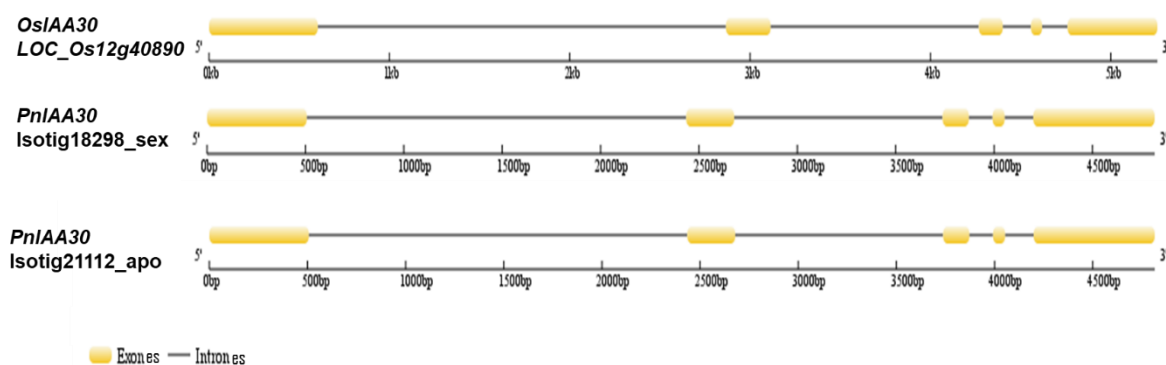


Figura 35. Comparación de la estructura génica de *PnIAA30* (sexual y apomíctica), y su homólogo de arroz *OsIAA30* (LOC_Os12g40890).

Estos resultados indican que el gen *PnIAA30*, al igual que *PnANK-TPR3*, se encuentra localizado físicamente en ACL de *P. notatum*, en el segmento cromosómico delimitado por los marcadores C996 y C1069. Estos marcadores son sondas heterólogas (de arroz) que mapean en la región telomérica del cromosoma 12 de arroz, sinténica al ACL y que

cosegregan estrictamente con la apomixis en *P. notatum* (Ortiz et al., 2013). Además, se observó una alta conservación de la microcolinealidad en esta región entre arroz y *P. notatum* (Figura 36). Evidentemente el análisis de cosegregación que detectó un polimorfismo ligado a 30 cM del ACL podría entonces corresponder a una secuencia duplicada que se encuentra en las cercanías del ACL.

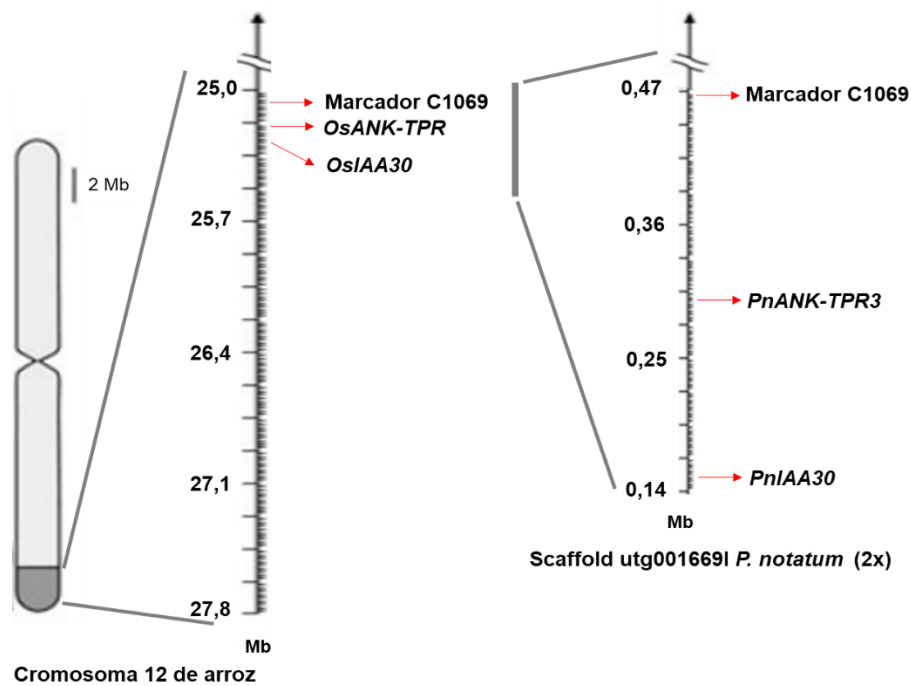


Figura 36. Representación esquemática del mapa físico de la región del cromosoma 12 de arroz sinténica al ACL, y del ensamblado utg001669I del genoma diploide de *P. notatum*. La orientación de las secuencias se basó en la referencia de arroz.

IV.3.5- Análisis de expresión de genes *PnIAA30* en tejido floral

Con el propósito de estudiar los niveles de expresión *PnIAA30* (isotigs 18298_sex y 21112_apo) durante el desarrollo reproductivo de *P. notatum*, se realizaron experimentos de qRT-PCR sobre ADNc obtenido a partir del ARNm de espiguillas en los estadios de meiosis y anthesis de los genotipos Q4188 (sexual) y Q4117 (apomítico). Las reacciones de amplificación fueron realizadas utilizando cebadores diseñados para la amplificación específica de los isotigs con un tamaño esperado de los amplicones de 109 pb (Tabla 25). Los genes de referencia utilizados para la normalización de los valores de expresión fueron los correspondientes a la β -tubulina y glucosa- 6-fosfato deshidrogenasa (Tabla 25).

Previo a los experimentos de qRT-PCR, se realizó una amplificación por PCR convencional sobre ADN y ADNc de los genotipos Q4188 y Q4117 con el fin de detectar posibles polimorfismos entre el genotipo sexual (Q4188) y apomíctico (Q4117), y validar la expresión *in vivo* de los transcritos, respectivamente. Para ello se emplearon los cebadores RTPn21112aF y RTPn21112aR sobre ambos templados (Tabla 25). Los resultados de las amplificaciones para *PnIAA30* se correspondieron al tamaño esperado de 109 pb (Figura 37).

Tabla 25. Cebadores empleados en los estudios de expresión de los genes *PnIAA30*.

Cebador	Secuencia (5'-3')
RTPn21112aF	TGGTGTGTCAACTGTCCTATCTG
RTPn21112aR	TTCATGGCTTCTCTCTTTTCGTAG
β-tubulinaF	GTGGAGTGGATCCCCAACA
β-tubulinaR	AAAGCCTTCCTCCTGAACATGG
Glucosa-6-fosfato DHF	CATCAGAGATGAGAAAGTCAAGTT
Glucosa-6-fosfato DHR	AGCTTTAAGAATGAAAGGAACACCT

Estos resultados demostraron la expresión de los transcritos correspondientes al gen *PnIAA30* durante el desarrollo reproductivo tanto en los genotipos sexuales como en el apomíctico, sin evidenciar diferencias entre ellos, resultados similares se obtuvieron al amplificar el ADN genómico (Figura 37).

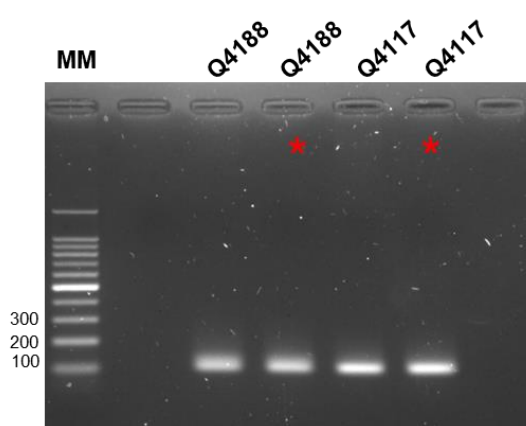


Figura 37. Gel de agarosa al 1,5% con productos de la amplificación de los genes *PnIAA30* empleando los cebadores RTPn21112aF y RTPn21112aR sobre ADN genómico y ADNc de Q4188 y Q4117. Los asteriscos rojos indican amplificación sobre ADNc.

Una vez confirmado el patrón de amplificación sobre el ADNc de una única banda correspondiente a los transcritos derivados *PnIAA30*, se realizaron estudios de la expresión de este transcrito durante el desarrollo reproductivo en los estadios de meiosis y antesis.

Los análisis de expresión en ambos genotipos (Q4188 y Q4117) mostraron que, en meiosis, el transcripto sexual se expresó en un nivel superior, aunque este no resultó estadísticamente significativo (Tabla 26 y Figura 38A). Sin embargo, en el estado de antesis, las diferencias de expresión a favor del genotipo sexual fueron mayores y estadísticamente significativas (Tabla 26 y Figura 38B).

Tabla 25. Resultados de los análisis de la expresión relativa de *PnIAA30* en meiosis y antesis de los genotipos Q4188 y Q4117, obtenidos con el programa Rest2009.

Estadio del desarrollo	Individuo	Modo Reproductivo	Expresión Relativa	Error Estándar	Resultado	p-valor
Meiosis	Q4188	Sexual	1	-	Dif. no significativas	0,1
	Q4117	Apomíctica facultativa	0,707	0,625 - 0,808		
Antesis	Q4188	Sexual	1	-	DOWN	0,03
	Q4117	Apomíctica facultativa	0,329	0,214 - 0,451		

No significativas: las diferencias de expresión entre los genotipos son estadísticamente NO significativas
 DOWN: Q4117 presenta una menor expresión de *PnIAA30* con respecto a Q4188 en antesis ($p < 0.05$)

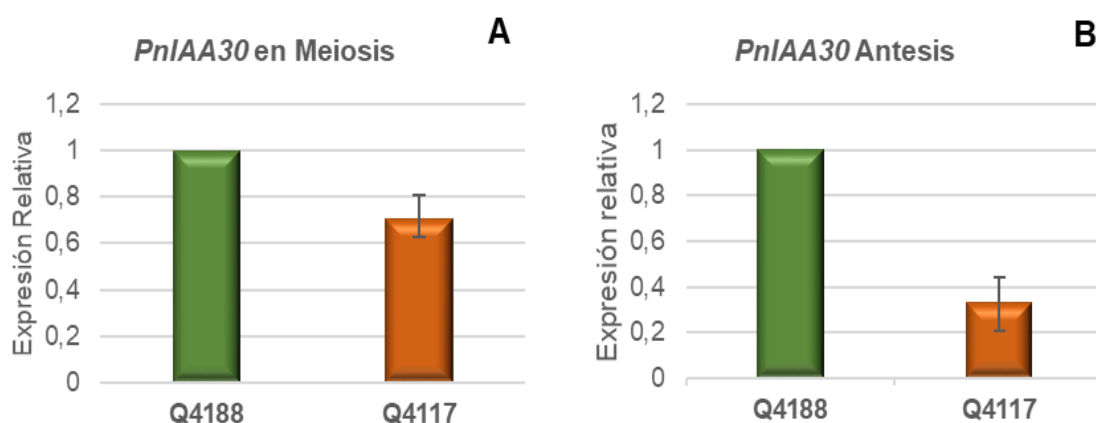


Figura 38. Gráfica de expresión relativa del gen *PnIAA30* en el estado de meiosis y antesis de los genotipos Q4188 (sexual) y Q4117 (apomíctico). **A)** Expresión relativa del gen *PnIAA30* en el estado de meiosis entre los genotipos. **B)** Expresión relativa del gen *PnIAA30* en el estado de antesis. Las gráficas representan los resultados de dos réplicas biológicas con al menos tres réplicas técnicas en cada uno.

Posteriormente, con el fin de determinar si las diferencias de expresión del gen bajo estudio en el estado de antesis se asociaban al modo reproductivo, se realizaron nuevos experimentos qRT-PCR sobre muestras de ADNc de espiguillas en antesis de tres individuos F_1 sexuales y tres apomícticos de la población segregante. Los resultados de expresión mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los tres individuos sexuales y dos

individuos apomícticos, con una disminución de la expresión de *PnIAA30* en estos últimos (Tabla 27 y Figura 39). No se observaron diferencias significativas entre los individuos sexuales y el individuo apomíctico JS 9, pudiendo este resultado, estar relacionado con el elevado % de ovarios abortados (baja expresión de la aposporía) observado en la caracterización citoembriológica (Ver Tabla 6 de la sección IV.1.2).

Tabla 27. Resultados de los análisis estadísticos de la expresión relativa de *PnIAA30* en antesis de seis individuos F₁ derivados de Q4188 x Q4117, obtenidos con el programa Rest2009.

Individuo	Modo Reproductivo	Expresión Relativa	Error Estándar	Resultado	P-valor
JS 57	Sexual	1,02	0,822 - 1,221	Dif. no significativa	0,1
JS 58	Sexual	0,739	0,634 - 0,883	Dif. no significativa	0,92
JS 83	Sexual	1	-	referencia	-
JS 9	Apomíctica facultativa	0,712	0,583 - 0,902	Dif. no significativa	0,1
JS 40	Apomíctica facultativa	0,453	0,355 - 0,602	<i>DOWN</i>	0,04
JS 71	Apomíctica facultativa	0,330	0,268 - 0,418	<i>DOWN</i>	0,03

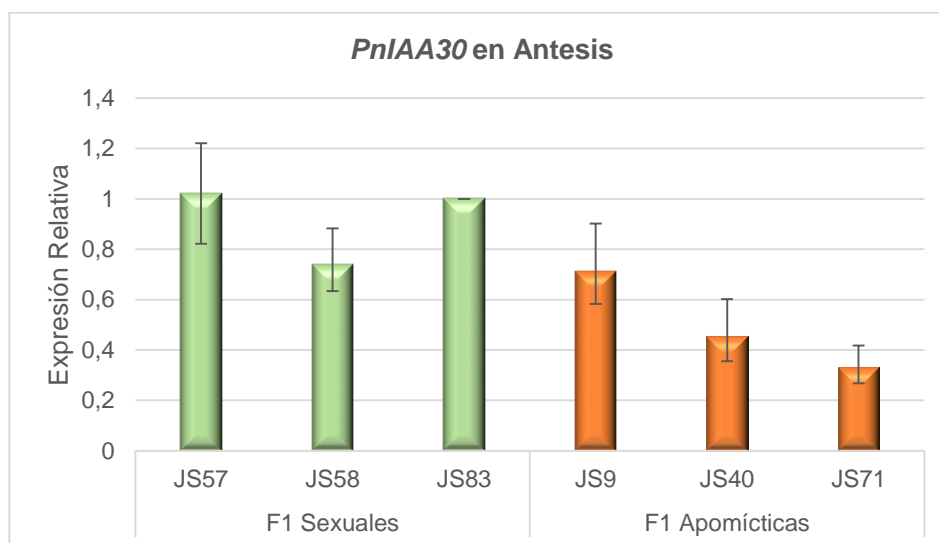


Figura 39. Expresión relativa del gen *PnIAA30* en el estadio de antesis en tres individuos F₁ sexuales y tres apomícticos, derivados del cruzamiento entre Q4188 x Q4117. *PnIAA30* muestra diferencias de expresión estadísticamente significativas entre los individuos sexuales y dos apomícticos.

Por otro lado, con el propósito de determinar si los niveles de expresión de *PnIAA30* se correlacionan con el grado de expresividad de la aposporía, se realizaron nuevos experimentos qRT-PCR sobre ADNc de espiguillas en antesis de tres genotipos hermanos

completos (J7, J11 y J40) con diferente grado de expresividad del carácter (J7 100 %, J40 56 % y J11 3 %) (Acuña C, comunicación personal). Los resultados experimentales mostraron una disminución de la expresión de *PnIAA30* asociada negativamente con el grado de expresividad de la aposporía. En este sentido la expresión del transcripto en el genotipo J11 (apomítico con alta expresión de la sexualidad), resultó superior a la detectada en el individuo J40 (que presenta un 56% de sacos apospóricos) aunque la diferencia no resultó estadísticamente significativa, y que la expresión en el genotipo J7 (que muestra solo sacos embrionarios apospóricos), donde si resultó estadísticamente significativa (Tabla 28 y Figura 40A). Los análisis de correlación arrojaron un $R^2 = 0,8929$, confirmando que existe una correlación negativa entre la expresión relativa del transcripto *PnIAA30* y el grado de aposporía (Figura 40B).

Tabla 28. Resultados de los análisis estadísticos de la expresión relativa de *PnIAA30* en antesis de tres genotipos con diferente grado de aposporía, obtenidos con el programa Rest2009.

Genotipo	Expresividad de la aposporía (%)	Expresión Relativa	Error Estándar	Resultado	p-valor
J 11	3%	1	-		
J 40	56%	0,875	0,686 - 1,077	Dif. no significativa	0,57
J 7	100%	0,502	0,402 - 0,673	DOWN	0,03

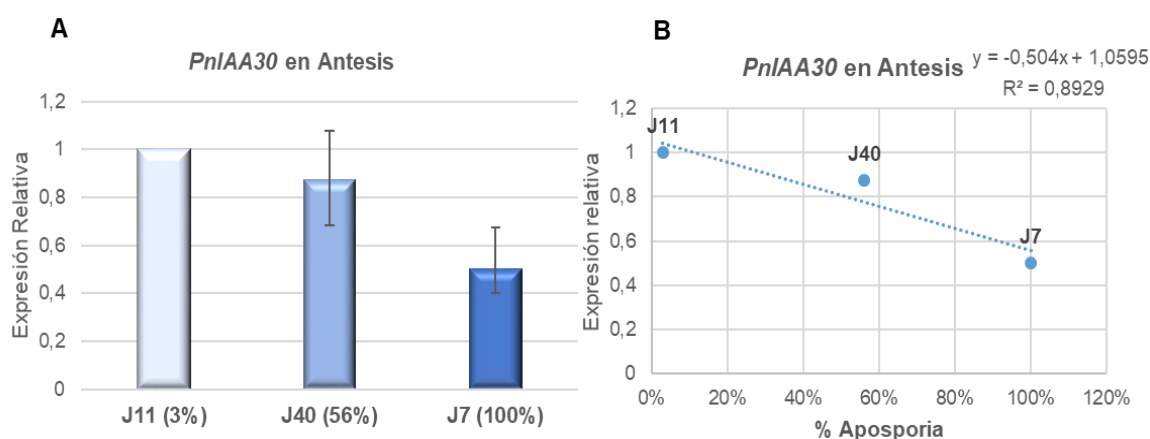


Figura 40. A) Expresión relativa del gen *PnIAA30* en el estadio de antesis en tres genotipos hermanos completos con diferente grado de aposporía. **B)** Análisis de correlación entre el grado de aposporía y los niveles de expresión relativa de *PnIAA30*.

Como se describió en la introducción, mutantes homocigotas para el gen *IAA16* de *Arabidopsis* (ortólogo a *OsIAA30* y presunto ortólogo a *PnIAA30*) fueron incapaces de producir descendencia, indicando que este gen podría estar asociado a alguna de las etapas de la gametogénesis o embriogénesis (Rinaldi et al., 2012). Teniendo en cuenta dicho

antecedente y al resultado experimental descrito anteriormente que indica una alta expresión en la antesis del genotipo sexual, se estudiaron los niveles de expresión de *PnIAA30* durante la embriogénesis. Para esto, se realizaron experimentos de PCR semicuantitativa (RT-PCR) utilizando como molde ADNc obtenido derivado de espiguillas a dos días después de la antesis (embriogénesis temprana), de los genotipos Q4188 y Q4117. Como gen de referencia se utilizó la β -tubulina. Los productos de amplificación se resolvieron en geles de agarosa al 2% (Figura 41A) y se utilizó el programa ImageJ (Abramoff et al., 2004) para cuantificar los niveles de expresión a partir de intensidades de las bandas amplificadas para cada gen y genotipo. Los resultados del experimento se muestran en la Figura 41A, en donde se puede observar mayor intensidad de la banda amplificada en el genotipo sexual (Q4188) en relación a la apomítico (Q4117). Cabe destacar que si bien el gen de referencia presentó una leve variación entre los genotipos (probablemente debido a la carga de ADNc), la cuantificación de las bandas de amplificación con programa ImageJ determinó que, se obtuvieron diferencias del transcripto *PnIAA30* entre los genotipos apomítico y sexual (Figura 41B). Esto fue confirmado cuando se normalizó la intensidad de las bandas amplificación de *PnIAA30* con el gen de referencia β -tubulina en Q4188 y Q4117 (Figura 41C). Los resultados de este análisis indican una expresión de 0,93 veces mayor del gen en el genotipo sexual (Q4188) durante la embriogénesis temprana, en comparación con la expresión en el genotipo apomítico (Q4117).

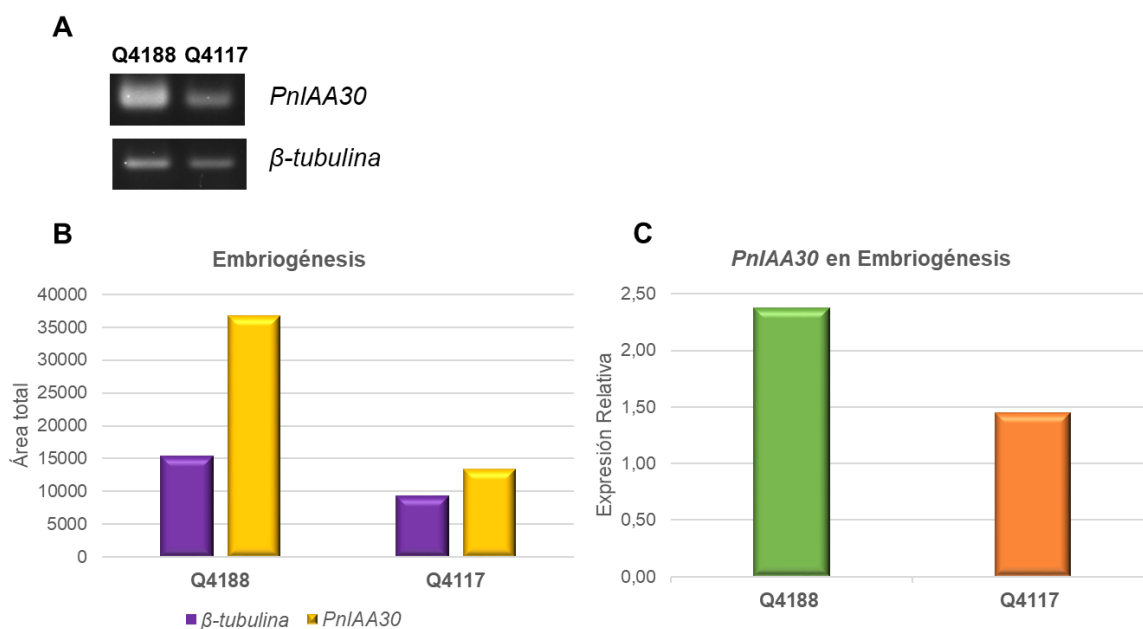


Figura 41. **A)** amplificaciones del gen *PnIAA30* y la β -tubulina en muestras de ADNc de dos días después de la antesis. **B)** Cuantificación de las bandas de las amplificaciones de β -tubulina y *PnIAA30* empleando el software image J. **C)** Cuantificación de la expresión de *PnIAA30* normalizada con el gen referencia β -tubulina.

Finalmente, se determinaron los niveles de expresión de *PnIAA30* en tejido vegetativo. Se realizaron experimentos de qRT-PCR sobre ADNc de hojas jóvenes de los genotipos Q4188 y Q4117. Nuevamente, como gen normalizador se utilizó la β -*tubulina*. Los análisis de expresión relativa mostraron una expresión similar en ambos genotipos (Figura 42) (Tabla 29).

Tabla 29. Resultados de la amplificación de *PnIAA30* en hojas de los genotipos Q4188 y Q4117. En análisis estadísticos se realizó con el programa Rest2009.

Individuo	Modo Reproductivo	Expresión Relativa	Error Estándar	Resultado	P-valor
Q4188	Sexual	1	-		
Q4117	Apomítica facultativa	0,874	0,785 - 0,970	Dif. no significativa	0,75

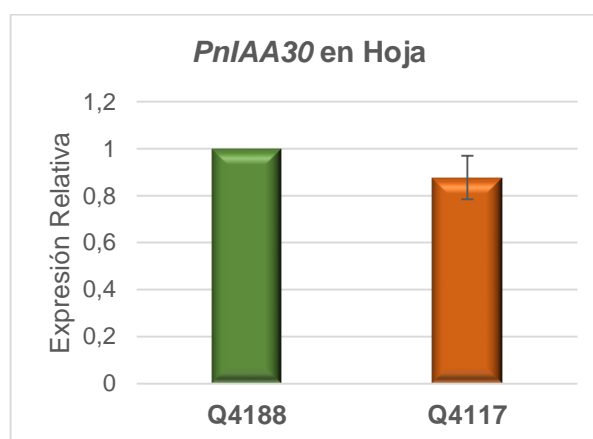


Figura 42. Expresión relativa del gen *PnIAA30* en hoja, comparada entre los genotipos Q4188 (sexual) y Q4117 (apomítico).

IV.3.6- Estudios de hibridación *in situ* de tejidos de *PnIAA30*

Debido a que los experimentos descritos anteriormente mostraron una mayor expresión del gen *PnIAA30* durante el desarrollo reproductivo sexual comparado con el apomítico, se realizaron experimentos de hibridación *in situ* de tejidos a fin de determinar la localización precisa de su expresión en pre-meiosis/meiosis y anthesis. Estos estadios fueron seleccionados debido a que son claves en el desarrollo de las células iniciales de la aposporía y del saco embrionario, respectivamente, y por ser los momentos en donde los experimentos de qRT-PCR mostraron diferencias de la expresión.

Para el diseño de la sonda de hibridación se seleccionó a un fragmento de 523 pb, localizado entre la posición 1007 y 1530 de los transcritos isotig 18298_sex y 21112_apo (Figura 43). Dicha región no presenta homología con las demás secuencias codificantes para proteínas del tipo Aux/IAA expresadas en el transcriptoma de *P. notatum*. El fragmento de 523

pb amplificado desde ADNc de Q4188 y Q4117 empleando los cebadores IS_PnIAA_F y IS_PnIAA_R (Tabla 30), se clonó en el vector pGEM®-T easy, y se transformaron bacterias de *E. coli* DH5-Alpha. Luego de la purificación de los plásmidos, se corroboró la presencia de los fragmentos de interés mediante PCR, empleando los mismos cebadores (Figura 43). La secuenciación de los insertos se realizó en Macrogen, Corea. Las secuencias obtenidas por secuenciación fueron chequeadas en las bases del transcriptoma sexual y apomítico de *P. notatum* mediante búsquedas BLASTN. Los resultados de dichas búsquedas confirmaron que los fragmentos correspondían a los isotig 18298_sex y 21112_apo (% ID = 100, e-value = 0). Los experimentos correspondientes a la amplificación y marcación de la sonda se resumen en la sección III.13 de Materiales y Métodos.

Tabla 30.- Cebadores utilizados para la amplificación de la secuencia empleada en la síntesis del fragmento utilizado como sonda.

Cebadores	Secuencia (5'-3')
IS_PnIAA_F	CGACGCATGCATCTGAATTA
IS_PnIAA_R	TGCATGGAACAGTTAACACCA

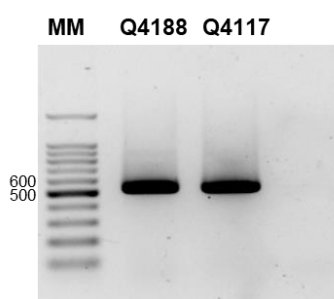


Figura 43. Gel de agarosa al 1,5 % mostrando la amplificación del fragmento de 523 pb (correspondiente a *PnIAA30*) empleado como sonda en el plásmido recombinante luego de la clonación.

Los resultados de las hibridaciones con la sonda antisentido (la cual detecta al transcripto codificante de *PnIAA30*), mostraron señales de expresión en ambos genotipos Q4188 (sexual) y Q4117 (apomítico), y en ambos estadios del desarrollo reproductivo evaluados. En premeiosis, se observó una fuerte hibridación en células de la nucela que rodean a la célula madre de la megáspora, y en parte de los tegumentos de óvulos de ambos genotipos, con una mayor intensidad en el genotipo Q4188 (Figura 44 A-D). Es de destacar que en Q4188 no se detectó hibridación en la CMM, mientras que si se observó en Q4117 (Figuras 44 A y B). Con respecto a la hibridación sobre las anteras se observó señal en los microsporocitos de ambos genotipos (Figura 44 C y D).

La hibridación con la sonda sentido (que detecta la hebra antisentido del transcripto) mostró señales leves de hibridación sobre células de la nucela y parte de los tegumentos

durante la meiosis del genotipo Q4188, mientras que no produjo señales significativas sobre el óvulo del genotipo Q4117. En este caso los microsporocitos no mostraron señal de hibridación en ninguno de los dos genotipos (Figura 44 E-H).

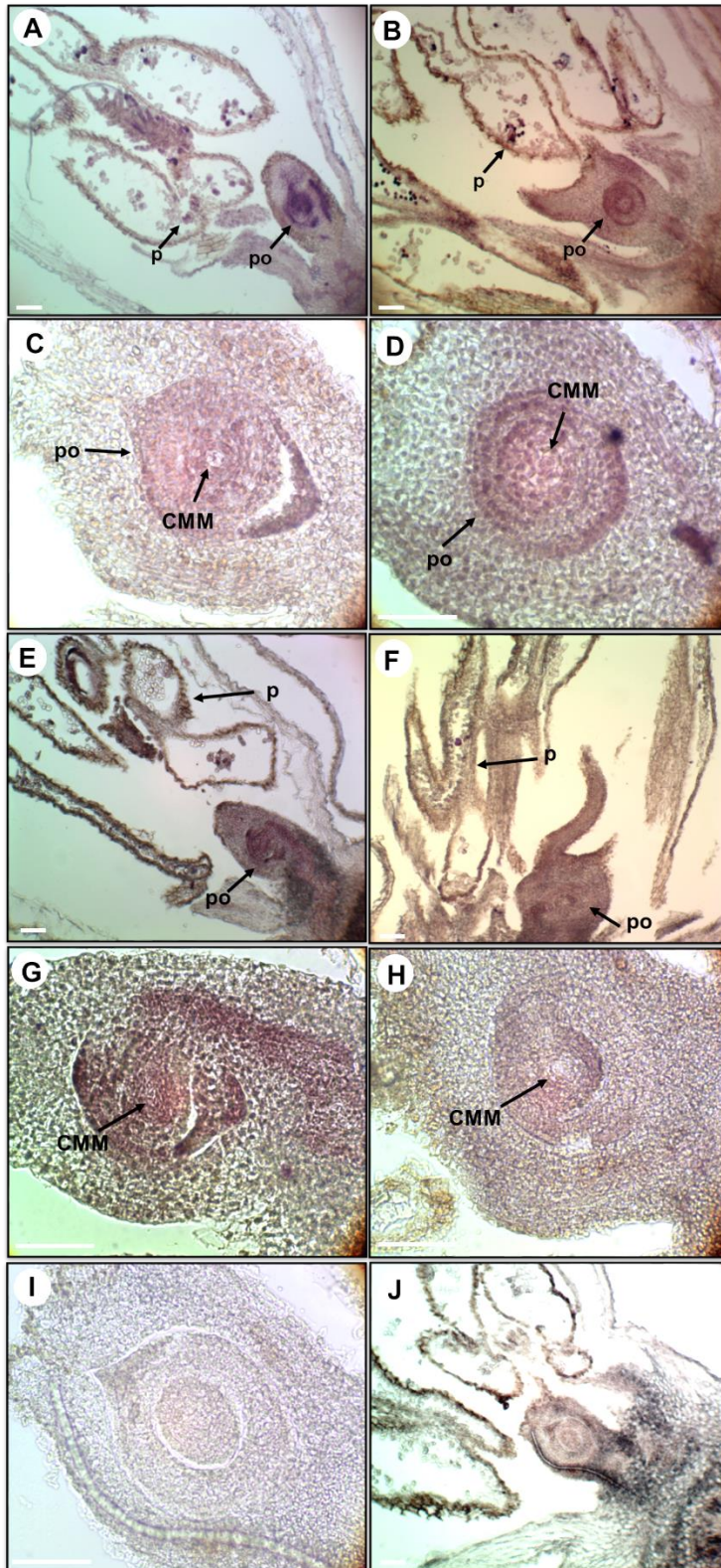


Figura 44. Hibridación *in situ* del transcrito *PnIAA30* sobre tejido reproductivos de Q4188 (sexual) y Q4117 (apomíctico) en estadio de pre-meiosis/meiosis. **A)** Hibridación de órganos reproductivos de Q4188 con la sonda antisentido. Se observa hibridación en el ovario y en los microsporocitos. **B)** Hibridación de órganos reproductivos de Q4117 con la sonda antisentido. Se observa hibridación en el ovario y en los microsporocitos. **C)** Óvulo de Q4188 en premeiosis hibridado con la sonda antisentido. Se observa una fuerte hibridación en las células de la nucela, que rodean a la célula madre de la megáspora (CMM) y en parte de los tegumentos. No se observa hibridación en la CMM. **D)** Óvulo de Q4117 en premeiosis hibridado con la sonda antisentido. Se detecta hibridación en las células de la nucela, parte de los integumentos y en la CMM. **E)** Vista general de los órganos reproductivos de Q4188 hibridados con la sonda sentido. Se observa una leve hibridación en los microsporocitos y ovario. **F)** Vista general de los órganos reproductivos de Q4117 hibridados con la sonda sentido. No se detectó señal de hibridación. **G)** Óvulo de Q4118 en meiosis hibridado con la sonda sentido. Se observa hibridación en células de la nucela y parte de los tegumentos. **H)** Óvulo de Q4117 en de meiosis hibridado con la sonda sentido. Se detecta una leve señal de hibridación. **I)** y **J)** Control de hibridación en tejidos de Q4117 (solución sin sonda). CMM: célula madre de la megáspora, po: primordio de óvulo, p: polen. Las barras corresponden a 50 micras.

La hibridación con la sonda antisentido en el estadio de antesis mostró una hibridación muy contrastante entre los genotipos sexual y apomíctico. En Q4188 mostró una fuerte señal de hibridación en las células de la nucela y aparato oosférico, y una leve señal en núcleos polares y células antipodales del óvulo (Figura 45 A-C). Sin embargo, en el genotipo Q4117 se observó una leve a nula señal en las células de la nucela, y aparato oosférico, y una señal tenue en los núcleos polares (Figura 45 D-F). La hibridación con el transcrito sentido, la cual detecta al transcrito antisentido de *PnIAA30*, mostró señales débiles en la nucela del óvulo del individuo sexual (Figura 38. G-H), en cambio, en el genotipo apomíctico, no pudo advertirse hibridación en ninguno de los tejidos de los óvulos analizados (Figura 45 J-K).

Estos resultados indican que el transcrito *PnIAA30* se expresa durante el desarrollo reproductivo en ambos estadios analizados (en coincidencia con lo observado en los experimentos de qRT-PCR) y que el transcrito codificante para la proteína tiene una expresión localizada en la nucela, tegumentos y microsporocitos durante las etapas tempranas de desarrollo (premeiosis/meiosis) de ambos genotipos. Sin embargo, en el genotipo sexual no se observó hibridación en la legítima CMM, mientras que si se detectó hibridación en la CMM del genotipo apomíctico. La hebra antisentido, solo mostró una leve hibridación en el genotipo sexual. Por otro lado, en el estado de antesis se observaron patrones de hibridación bien contrastantes con una fuerte hibridación de la sonda antisentido en el tejido nucelar, núcleos polares y aparato oosférico del genotipo sexual, y una señal mucho menos marcada en el apomíctico. En este estadio, la hebra sentido detectó muy bajas señales de hibridación, con lo cual el transcrito antisentido de *PnIAA30* resultó prácticamente indetectable. Estos patrones de hibridación concuerdan con los resultados del análisis de expresión durante los primeros estadios de desarrollo embrionario, en donde se observan una mayor expresión del transcrito en el genotipo sexual.

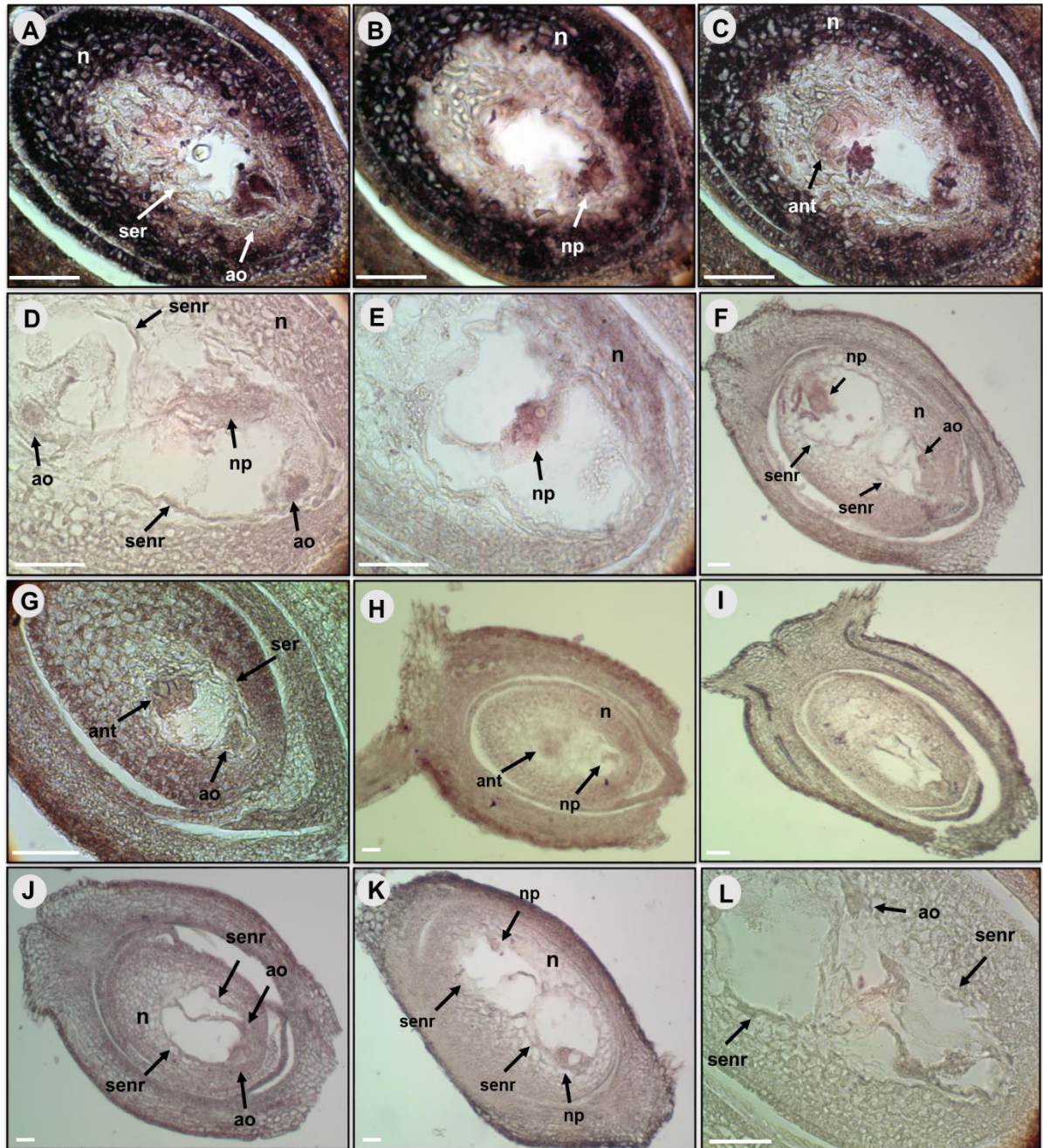


Figura 45. Hibridación *in situ* del transcrito *PnIAA30* sobre tejido reproductivo de *P. notatum* en anthesis. **A-C**) Óvulos de Q4188 (sexual) hibridado con la sonda antisentido. Se observa una intensa señal de hibridación en células de la nucela y en el aparato oosférico, y una hibridación más leve en los núcleos polares y aún más tenue en las antípodas. **D-F**) Óvulos de Q4117 (apomíctico) hibridado con la sonda antisentido. La hibridación detectó una leve hibridación en las células de la nucela y aparato oosférico, con mayor intensidad en los núcleos polares. **G-H**) Óvulos de Q4188 hibridados con la sonda sentido. Se observa una leve hibridación en las células de la nucela, y no se detectó señal en el aparato oosférico, núcleos polares y antípodas. **J-K**) Óvulos Q4117 hibridado con la sonda sentido. No se detectó señal de hibridación. **I y L**) Control de hibridación con óvulos de Q4117 (solución sin sonda). Ninguna señal fue observada. ser: saco embrionario reducido, senr: saco embrionario no reducido, n: nucela, np: núcleos polares, ao: aparato oosférico, ant: antípodas. Las barras corresponden a 50 micras.

IV.3.7- Identificación de posibles proteínas interactoras de OsIAA30

Con el objetivo de conocer que proteínas están estrechamente vinculadas con OsIAA30 e identificar las posibles vías metabólicas en las cuales participa esta proteína se utilizó el software libre STRING, empleando como consulta a la secuencia proteica del gen de arroz. La red resultante con un valor alto de confianza (0,700) identificó 9 proteínas asociadas entre las que se encuentran proteínas codificadas por: genes vecinos, genes que se co-expresan con OsIAA30 y proteínas homólogas. La mayor parte de las interacciones fueron determinadas de manera experimental y/o desde bases de datos curadas (líneas de color rosa y celeste) (Figura 46).

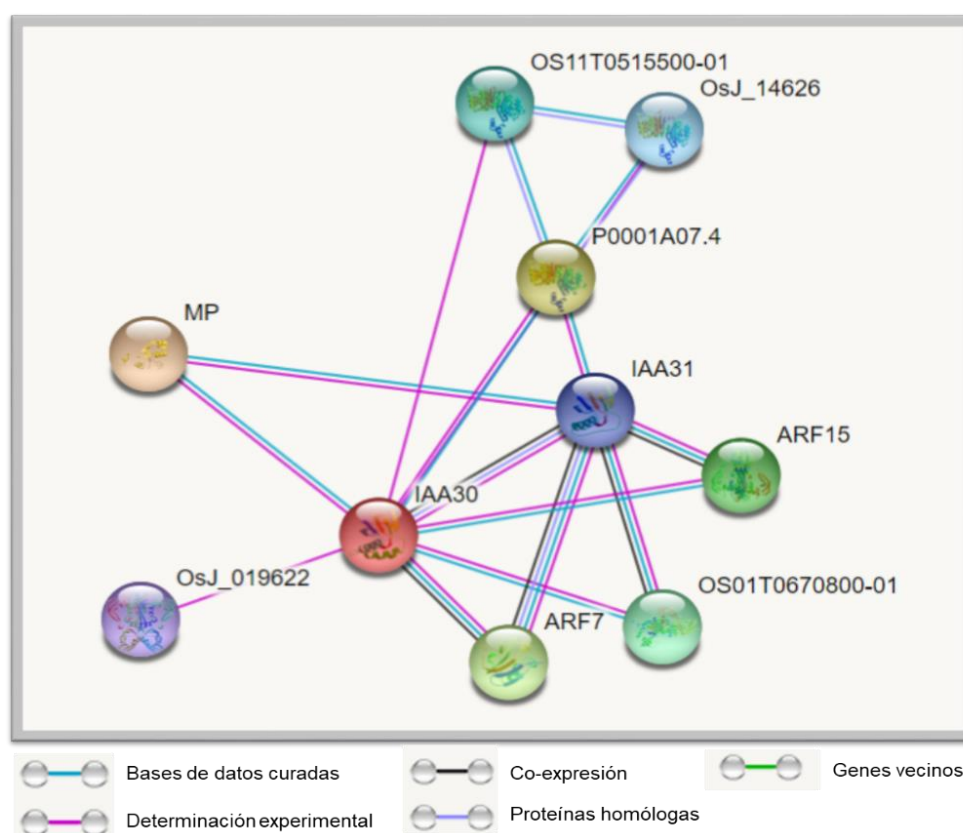


Figura 46. Representación de la red de interacciones proteína-proteína de OsIAA30 identificada por la base de datos STRING (valor de confianza = 0,700).

El listado de las proteínas identificadas se detalla en la Tabla 31. Entre estas pueden reconocerse principalmente a los factores de transcripción ARFs (*Auxin Response Factors*) 2, 7, 11, 15 y 16. Otro tipo de proteínas identificadas dentro de la red e interaccionando directamente con OsIAA30, fueron las proteínas del tipo TIR1-Like (*Transport Inhibitor Response 1-like*). Este tipo de proteínas forma parte del complejo proteico ubiquitina ligasa SCF^{TIR1} junto a otras proteínas y son las encargadas de censar los niveles de auxina en el

núcleo. (Tan et al., 2007; Parry et al., 2009; Weijers y Wagner, 2016). Además, se identificó una proteína (OsIAA31) de la misma familia que la proteína bajo estudio.

Tabla 31. Lista de las proteínas identificadas *in silico* por la base de datos STRING, como los primeros interactores de la cáscara de OsIAA30 (LOC_Os12g04890).

Organismo	Accesión	Proteína
<i>Oryza sativa</i>	MP (ARF11)	<i>Auxin response factor 11</i>
	Os05g0150500	<i>TIR1-like</i>
	ARF7	<i>Auxin response factor 7</i>
	ARF15	<i>Auxin response factor 15</i>
	OS01T0670800-01	<i>Auxin response factor 2</i>
	OS11T0515500-01	<i>TIR1-like</i>
	OsJ_14626	<i>TIR1-like</i>
	IAA31	<i>Auxin-responsive protein IAA31</i>
	OsJ_019622	<i>Auxin response factor 16</i>

IV.4- Análisis de genes pertenecientes a la familia *AP2/ERF* expresados durante el desarrollo reproductivo de *Paspalum notatum*

IV.4.1- Obtención y análisis de transcritos homólogos a *OsAP2/ERF* de arroz

Como se mencionó previamente, en la región del cromosoma 12 de arroz sinténica al ACL de *P. notatum*, se encuentra el LOC_Os12g41060 (*OsAP2/ERF*) (Hojsgaard et al., 2011). Como se desarrolló en la introducción este gen pertenece a la superfamilia *AP2/ERF*. Varios miembros de esta superfamilia fueron asociados a la diferenciación de órganos florales y a la embriogénesis (Kim et al., 2006). Además, se ha reportado que el gen *PsBBM-like* perteneciente a esta superfamilia está directamente asociado la apomixis en *Pennisetum* spp. (Conner et al., 2015).

Con el objetivo de determinar si transcritos de *P. notatum* relacionados a *OsAP2/ERF* se expresan durante el desarrollo reproductivo, se realizaron búsquedas BLASTX sobre los transcriptomas de los genotipos tetraploides C4-4x (sexual) y Q4117 (apomíctico) (Ortiz et al., 2017). Para esto, se utilizó como consulta la secuencia codificante (CDS) y proteica correspondiente al gen de arroz *OsAP2/ERF*. Los resultados de la búsqueda se muestran en las Tablas 32 y 33. Como se observa, ninguna de las secuencias nucleotídicas mostró valores de similitud a *OsAP2/ERF* de acuerdo a los criterios establecidos (% identidad > 60, e-value < 10⁻⁴ y bite score > 150). Estos resultados indican que no se detectaron transcritos altamente similares a *OsAP2/ERF* expresados durante el desarrollo reproductivo de *P. notatum*. Esto puede deberse a que, al tratarse de un factor de transcripción, su nivel de expresión haya quedado por debajo del límite de detección del sistema 454-Roche y que por lo tanto no esté representado en los transcriptomas.

Tabla 32. Resultado de las búsquedas BLASTP en la base sexual (C4-4X).

Query	Subject Isotig	Identidad (%)	Alineamiento (aa)	e-value	Score
<i>OsAP2/ERF</i> (CDS)	19776	58,73	63	4e-09	58,5
	26037	52,38	63	1e-08	57,4
	28528	50,79	63	4e-08	55,5

Tabla 33. Resultado de las búsquedas BLASTP en la base apomíctica (Q4117).

<i>Query</i>	<i>Subject Isotig</i>	<i>Identidad (%)</i>	<i>Alineamiento (aa)</i>	<i>e-value</i>	<i>Score</i>
OsAP2/ERF (CDS)	21343	58,73	63	5e-09	58,5
	27770	52,38	63	1e-08	57,4
	27240	50,79	63	4e-08	55,5

IV.4.2- Identificación y estudio general de genes *AP2/ERF* expresados en *P. notatum*

Teniendo en cuenta el resultado obtenido en el punto anterior y con el objetivo de detectar si otros miembros de esta superfamilia se encuentran expresados durante el desarrollo reproductivo de *P. notatum*, se utilizó una segunda estrategia de trabajo en la cual se realizaron búsquedas de BLASTP sobre el transcriptoma global empleando como consulta seis secuencias proteicas representativas del grupo de proteínas BBM (BABY BOOM) pertenecientes al clado *euANT*: *Oryza sativa*: OsBBM1, OsBBM2 y OsBBM3, *Brasica napus*: BnBBM1, *Arabidopsis thaliana*: AtBBM y *Pennisetum glaucum*: PsASGR-BBM-like1; y cinco de la subfamilia AP2 (APETALA2): *Rosa chinensis*: RcAP2-like, *Setaria itálica*: SiAP2-like, *Arabidopsis thaliana*: AtAP2-like, *Malus domestica* AHAP2 y *Oryza sativa*: APL25 (Jofuku et al., 1994; Boutilier, 2002; Zhou et al., 2012; Lata et al., 2014; Conner et al., 2015; Han et al., 2018; Jha y Kumar, 2018; Khanday et al., 2019). Considerando que *Oryza sativa* y *Setaria itálica* además de pertenecer a la misma familia (*Poaceas*) que *P. notatum*, son especies filogenéticamente cercanas, es oportuno resaltar la posición física de los genes codificantes para las proteínas elegidas de dichas especies. Los genes de arroz codificantes para APL25, BBM1, BBM2 y BBM3 se localizan en el cromosoma 4 (posición: 33.070.236 – 33.073.978), 11 (posición: 10.863.991 – 10.868.270), 2 (posición: 24.264.206 – 24.265.833) y 1 (posición: 39.142.206 – 39.144.326), respectivamente. El gen de *Setaria Itálica* codificante para SiAP2-like se localiza en el cromosoma 6 (posición 31.561.317 – 31.563.286).

Como resultado de este análisis se identificaron cinco proteínas predichas similares a AP2-like y cuatro proteínas similares a BBM (% Identidad > 65, e-value < 5e⁻⁶², bit score > 213) (% Identidad > 65,57, e-value < 4e⁻⁶², bit score > 206) (Ver Tabla VIII.5 del Anexo). De los cinco isotigs homólogos a las proteínas AP2-like, los isotig 06878 y 06079 pertenecen a un mismo isogrup/gen 00558, al igual que los isotigs 23310 y 23311 (isogroup 06591) y el último isotig pertenece al isogroup 12917, lo que indica la presencia de al menos tres genes de los cuales dos presentan variantes alélicas (Tabla 34). Para el caso de los isotigs homólogos a las proteínas BBM se detectaron tres isogrupos/genes, el isogroup 00620

integrado por los isotigs 07295 y 07297, y los isogroups 04808 y 17469 integrados por los isotig 19745 y 36244, respectivamente (Tabla 34). Las secuencias identificadas se detallan en la sección Secuencias del Anexo.

Tabla 34. Miembros de la superfamilia AP2/ERF expresados durante el desarrollo reproductivo de *P. notatum*.

Queries	Subject (<i>P. notatum</i>)	Isogrupos/gen
<ul style="list-style-type: none"> • AtAP2-like • APL25 • AHAP2 • SiAP2-like • RcAP2-like 	isotig06879	isogroup00558
	isotig06878	
	isotig31692	isogroup12917
	isotig23310	isogroup06591
	isotig23311	
<ul style="list-style-type: none"> • BnBBM2 • AtBBM • PsASGR-BBM-like1 • OsBBM1 • OsBBM2 • OsBBM3 	isotig19745	isogroup04808
	isotig07297	isogroup00620
	isotig07295	
	isotig36244	isogroup17469

AtAP2-like: *Arabidopsis thaliana* (AAC13770.1). APL25: *Oryza sativa* (B8AVJ9.1). SiAP2-like: *Setaria itaica* (XP_022684171.1). RcAP2-like: *Rosa chinensis* (XP_024182693.1). AHAP2: *Malus domestica* (AAL57045.2). AtBBM: *Arabidopsis thaliana* (AAM33803.1). BnBBM2: *Brasica napus* (AAM33801.1). PsASGR-BBM-like1: *Pennisetum glaucum* (EU559277.1). OsBBM1, OsBBM2, OsBBM3: *Oryza sativa* (KAB8114989.1, EAY86677.1, XP_015634444.1).

Mediante búsquedas BLASTN en las bases de los transcriptomas C4-4X (sexual) y Q4117 (apomítico) se determinaron las isoformas sexuales y apomíticas a las que corresponden los transcritos identificados en el punto anterior (Tabla 35).

Tabla 35. Identificación de las isoformas sexuales y apomítica correspondientes a los transcritos AP2/ERF detectados en la base global de desarrollo reproductivo de *P. notatum*.

Isotigs base GLOBAL *	Isogrupos/gen	Isoforma base SEX	Isoforma base APO
isotig06879	isogroup00558	isotig08400	isotig32043
isotig06878		isotig08399	-
isotig31692	isogroup12917	isotig10774	isotig12508
isotig23310	isogroup06591	isotig06560	isotig22288
isotig23311		isotig06559	-
isotig19745	isogroup04808	isotig10031	Isotig07752
isotig07297	isogroup00620	isotig17661	Isotig06736
isotig07295		-	Isotig06737
isotig36244	isogroup17469	Isotig04813	Isotig04886

*Isotigs identificados en la base de datos global presentados en la tabla 34

Las secuencias proteicas obtenidas fueron alineadas empleando el software Muscle, y a partir de dicha matriz de alineamiento se construyó un árbol filogenético utilizando el programa MEGA-X (Figura 47). Como era de esperar y coincidentemente con los resultados de las búsquedas BLASTP, las proteínas codificadas por los isotigs 06879, 06878, 31692, 23310 y 23311 formaron un grupo (señalado como A) con las proteínas AP2-like (clado *eu AP2*) en el árbol filogenético. En este caso, solo los dos transcritos (isotigs 06879, 06878) pertenecientes al isogroup 00558, aparecen agrupados junto a las proteínas AP2 de arroz y *Setaira*, lo que indica que podrían corresponder a genes homólogos. Los otros tres transcritos (isotigs 31692, 23310 y 23311), formaron un grupo aparte y podrían derivar de genes ortólogos. Por otro lado, los transcritos 19745, 07297, 07295 y 36244 agruparon con las proteínas BBM pertenecientes a la subfamilia BABY BOOM (indicado como B) en la Figura 47. Sin embargo, en este caso, todas las secuencias de *P. notatum* formaron un grupo aparte. Estos resultados indicarían la presencia, en el transcriptoma floral de *P. notatum*, de transcritos derivados de menos tres genes (isogrupos) de la subfamilia BBM y tres a la subfamilia APETALA2.

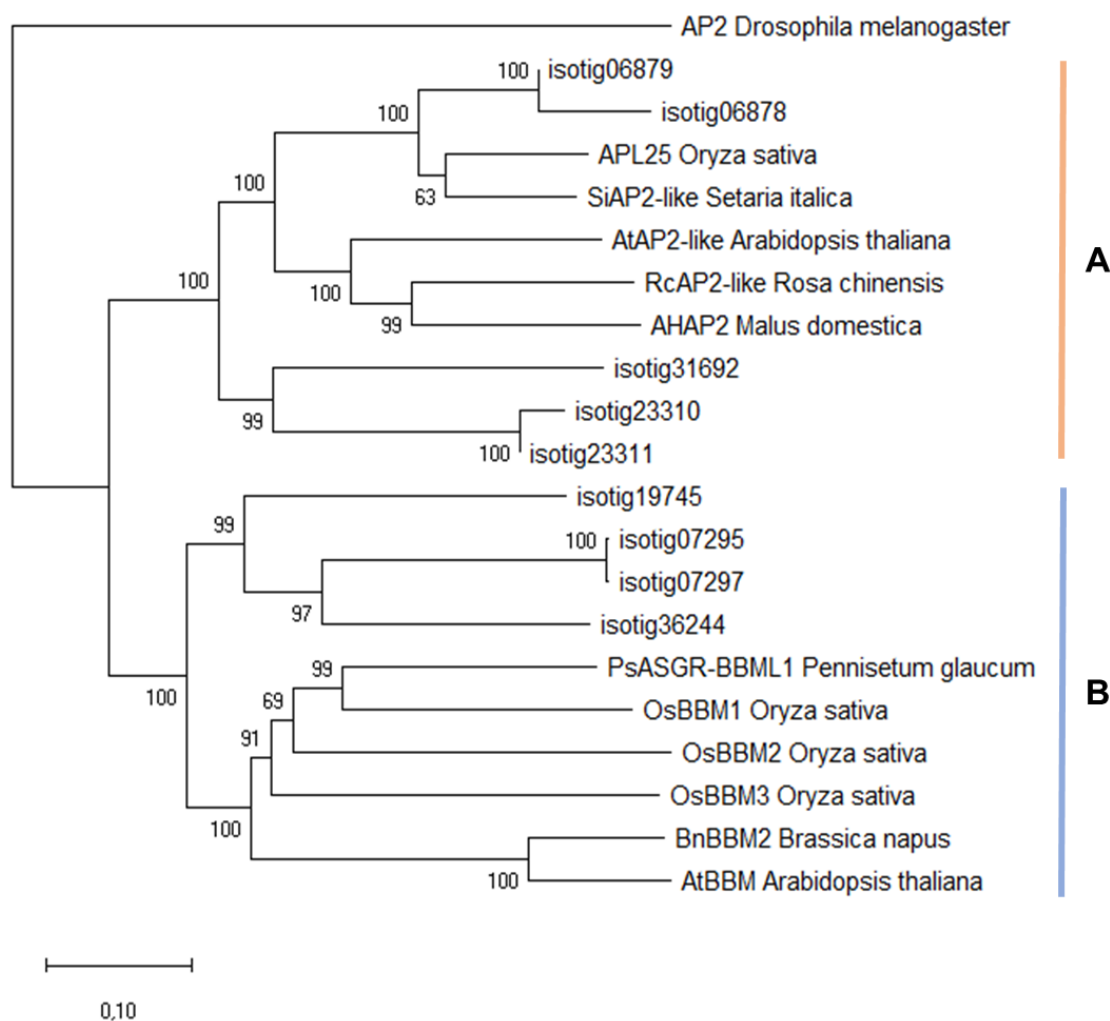


Figura 47. Árbol filogenético de proteínas de las subfamilias BABY BOOM y APETALA2. El análisis incluyó las proteínas pertenecientes a: *Pennisetum glaucum*, *Oryza Sativa*, *Setaria italica*, *Malus domestica*, *Rosa chinensis*, *Brassica napus*, *Arabidopsis thaliana* y *P. notatum*. **A:** proteínas predichas por los transcritos de *P. notatum* que agrupan con las proteínas AP2-like reportadas en otras especies. **B:** proteínas predichas por los transcritos de *P. notatum* que agrupan con la proteína BBM.

IV.4.2.1- Aislamiento y análisis de cosegregación de secuencias génicas AP2 de *P. notatum*.

Teniendo en cuenta el grupo “A” del árbol filogenético de la Figura 47, formado por proteínas del tipo APETALA2, se seleccionaron los isotigs/alelos 06878 y 06879 (ensamblado global del transcriptoma) para su estudio. Dichos isotigs/alelos están representados por los isotigs 08399 y 08400 en la base sexual del transcriptoma (C4-4x), y el isotig 32043 en la base apomíctica (Q4117) (Ver Tabla 35). Con el fin de corroborar la presencia de *PnAP2-like* (isotig 08399_sex, 08400_sex y 32043_apo) en el genoma de *P. notatum*, y a su vez determinar su posible ligamiento genético con el modo de reproducción, se realizaron experimentos de

análisis de segregantes en grupos (Michelmore et al., 1993). Este análisis se realizó a partir de amplificaciones por PCR del ADN genómico de los individuos Q4188 (sexual) y Q4117 (apomíctico), y un grupo sexual (BS) y uno apomíctico (BA). Cada grupo representativo del modo de reproducción, integrado por cinco individuos F_1 de cada clase (sexuales y apomícticos), derivados de la población segregante (Q4188 x Q4117). Los cebadores utilizados para la amplificación de los transcritos se muestran en la Tabla 36.

Tabla 36.- Cebadores para la amplificación de las secuencias genómicas correspondientes al gen *PnAP2-like*.

Cebadores	Secuencia (5'-3')
PnAP2LF	GGCAGCTCCAAGTACAGAGG
PnAP2LR	AGGTCAAGGTTGTGCTCGTC

Como primer paso y con el objetivo de determinar la disposición de las secuencias exónicas de *PnAP2-like* se reconstruyeron las estructuras génicas hipotéticas para cada transcrito utilizando como referencia la secuencia genómica de *AP2-like* de *Setaria itálica* (101771961) (Figura 48). El alineamiento de los isotigs 08399_sex, 08400_sex y 32043_apo mostró que el isotig 08399_sex codifica para ocho exones con ausencia del segundo y tercer exón comparado con la secuencia genómica de *Setaria*. El isotig 08400 codifica para seis exones, con ausencia de los primeros cuatro exones y isotig 32043_apo codifica para siete exones con ausencia del primer y último exón comparo con la secuencia genómica de *AP2-like* de *Setaria itálica* (Figura 48A). Las amplificaciones por PCR sobre el ADN genómico, empleando los los cebadores PnAP2LF y PnAP2LR, mostraron un fragmento monomórfico de aproximadamente 680 pb, y otro polimórfico de 720 pb presente solo en el genotipo sexual (Q4188), y en el grupo sexual (BS) (Figura 48B).

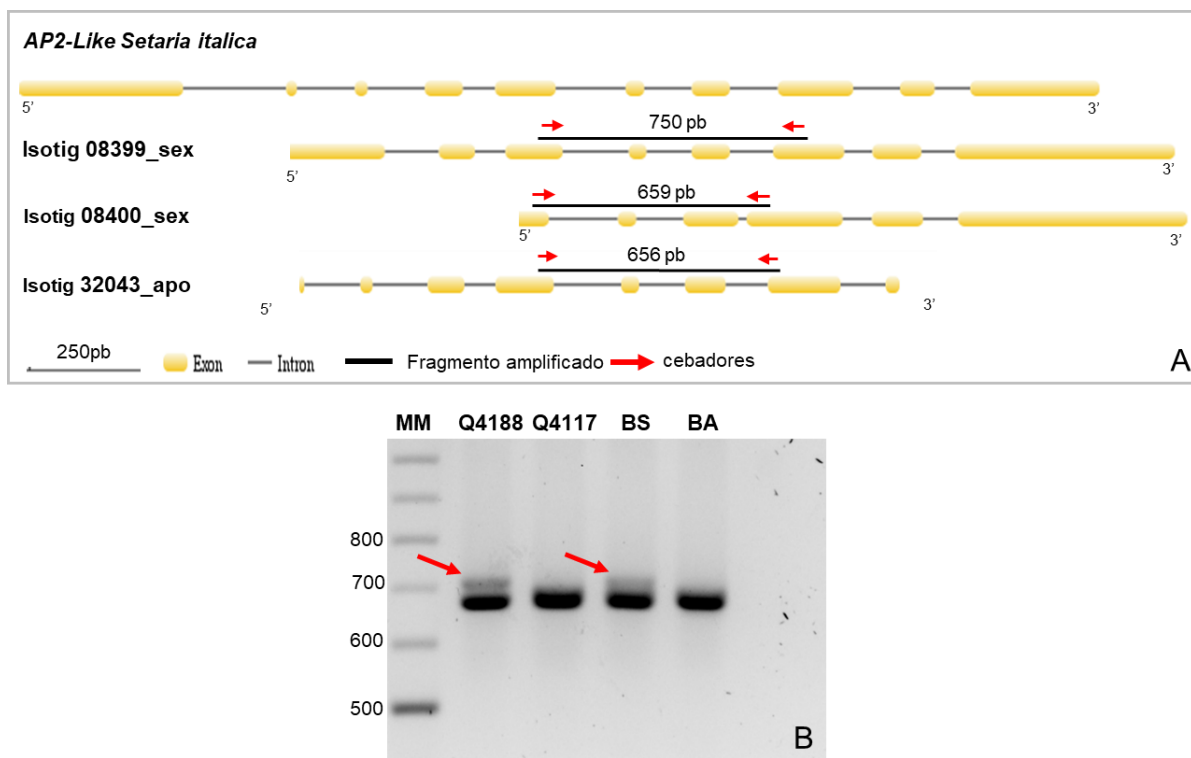


Figura 48. Esquema de las estructuras génicas y patrones de amplificación correspondientes a *PnAP2-like*. **A)** Esquema de las estructuras a génicas hipotéticas para de los isotigs expresados en los genotipos sexual y apomítico. **B)** Gel de agarosa al 2 % con bandas correspondiente a las amplificaciones de los isotigs sobre ADN genómico. La flecha roja indica la banda polimórfica presente en el genotipo Q4188 y ausente en el progenitor apomítico (Q4117), que mantuvo su polimorfismo entre los grupos apo (BA) y sex (BS). MM: marcador molecular, Q4188: madre sexual, Q4117: padre apomítico, BS: grupo/ *bulk* sexual, BA: grupo/ *bulk* apomítico.

A fin de evaluar el posible ligamiento del alelo polimórfico obtenido en el análisis de segregantes en grupos, se realizó la amplificación de la secuencia *PnAP2-like* sobre ADN genómico de los individuos parentales (Q4188 y Q4117) y 28 individuos F_1 (18 sexuales y 10 apomíticos) derivados del cruzamiento (Q4188 x Q4117), empleando los mismos cebadores descritos anteriormente. Los resultados mostraron la presencia de la banda polimórfica en 15 de los 28 individuos F_1 empleados. Del total de 18 individuos sexuales, 13 presentaron el marcador y cinco no, mientras que de los 10 individuos apomíticos solo dos amplificaron el marcador (Figura 49). Para determinar la posible asociación del polimorfismo con el modo de reproducción, se determinó la relación de segregación (presencia:ausencia) del fragmento polimórfico (marcador) en los individuos F_1 , como derivado de un *locus* heterocigota uniplexo (Aaaa), segregando de organismo tetraploide en caso de herencia disómica o polisómica mediante una prueba de Chi cuadrado (χ^2). Los valores 13:15 (presencia:ausencia) ajustaron a una relación de segregación 1:1 con un valor $\chi^2 = 0,14286$ y un p-valor = 0,7055, para un tipo de marcador ADS (alelo de dosis simple). Para determinar si el marcador segrega de

manera independiente o ligado al modo reproductivo, nuevamente se realizó una prueba de Chi-cuadrado (χ^2), contrastando los valores de segregación observados, con los valores esperados para una segregación independientemente de dos *loci* en una población segregante del tipo pseudo-retrocruza (*pseudo-testcross*). La prueba de cosegregación mostró un valor de $\chi^2_{g,l=2} = 9,429$ que no ajustó a una segregación independiente ($p = 0,020$) y el valor de recombinación resultó igual a $r = 0,25$ (7/28). Estos resultados indican que el marcador polimórfico de *PnAP2-like* segrega ligado a la sexualidad.

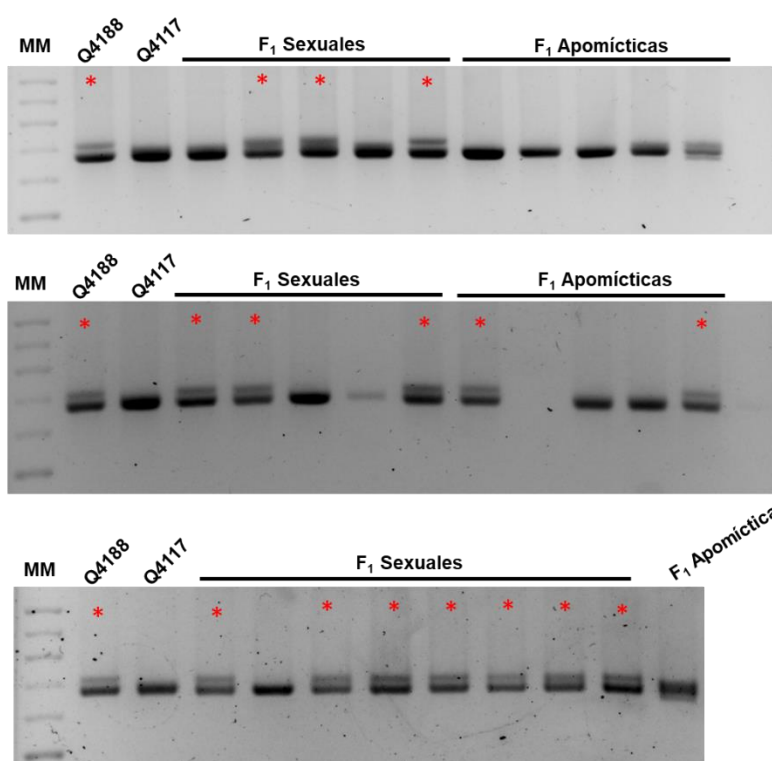


Figura 49. Geles de agarosa al 2 % mostrando la amplificación de *PnAP2-like*, empleando los cebadores PnAP2LF y PnAP2LR, sobre los genotipos parentales y 28 individuos de la población segregante (18 F₁ sexuales y 10 F₁ apomícticas). Los asteriscos rojos indican la presencia del marcador polimórfico.

Con el fin de corroborar la identidad de los fragmentos amplificados, se aislaron del gel de agarosa las bandas amplificadas en los dos genotipos Q4188 (sexual) y Q4117 (apomíctico). Posteriormente se clonaron en el vector de clonado pGEM®-T easy y se transformaron, con dicho vector, bacterias de *E. coli* DH5-Alpha. Luego de la purificación de los plásmidos, se corroboró la presencia de los fragmentos de interés mediante PCR, empleando los mismos cebadores utilizados en el análisis de ligamiento (PnAP2LF y PnAP2LR) (Figura 50). La secuenciación de los insertos se realizó en Macrogen, Corea. (ver sección III.8 de Materiales y Métodos).

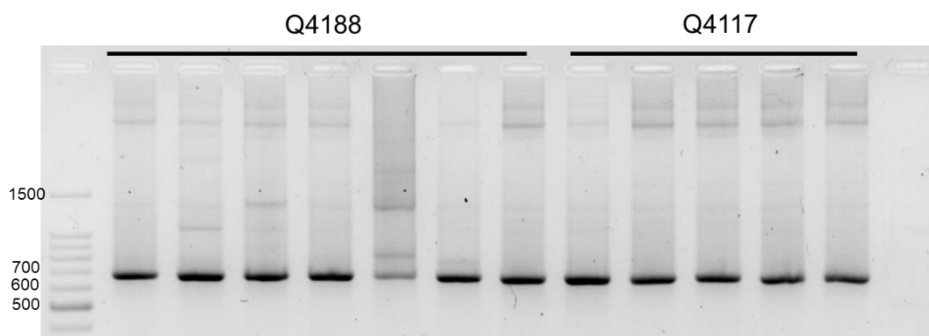


Figura 50. Gel de agarosa al 2 % mostrando la amplificación de control de clonado de los fragmentos *PnAP2-like* provenientes de Q4188 y Q4117, empleando los cebadores PnAP2LF y PnAP2LR desde ADN plasmídico transformado.

El análisis de las secuencias obtenidas mostró la presencia de dos secuencias consenso con una elevada similitud entre ellas, una de 680 pb proveniente del genotipo sexual (Q4188) a la que nombramos como PnAP2L_Q4188_SEX, y otra secuencia de 678 pb proveniente del genotipo apomíctico (Q4117) a la que llamamos como PnAP2L_Q4117_APO (Ver sección Secuencias del Anexo). A fin de corroborar la identidad de las secuencias clonadas se realizaron búsquedas BLASTN en las bases de datos sexual y apomíctica del transcriptoma floral de *P. notatum*. Las secuencias sexuales mostraron homología con cuatro sitios (% Identidad = 100 e-value < 0,12 y bit score > 38,2) que se corresponden con el isotig 08400_sex de la base sexual (Tabla 37). Resultados similares se obtuvieron para las secuencias apomícticas, observándose cuatro sitios altamente similares (% Identidad = 100 e-value < 0,11 y bit score > 38,2) con el isotig 32043_apo (Tabla 38). Los cuatro sitios homólogos a las secuencias de los isotigs 08400_sex y 32043_apo son coincidentes con las secuencias exónicas incluidas en el fragmento amplificado (Figura 51A). La banda polimórfica de 750 pb, posiblemente correspondiente al alelo 08399 no se detectó dentro de las secuencias clonadas, probablemente a su menor representación en la amplificación.

Tabla 37. Resultados de búsquedas BLASTN en la base de datos sexual (C4-4X) del transcriptoma floral de *P. notatum* para la secuencia PnAP2L_Q4188_SEX.

Query	Subject (isotig)	Identidad (%)	Alineamiento (bases)	e-value	Score
PnAP2L_Q4188_SEX	Isotig 08400	100	95	$2e^{-106}$	383
		100	83	$7e^{-40}$	165
		100	46	$8e^{-11}$	91,7
		100	19	0,11	38,2

Tabla 38. Resultados de búsquedas BLASTN en la base de datos sexual (Q4117) del transcriptoma floral de *P. notatum* para la secuencia PnAP2L_Q4117_APO.

Query	Subject (isotig)	Identidad (%)	Alineamiento (bases)	e-value	Score
PnAP2L_Q4117_APO	Isotig 32043	100	95	5e ⁻⁴⁷	188
		100	83	8e ⁻⁴⁰	165
		100	46	9e ⁻¹⁸	91,7
		100	19	0,12	38,2

Posteriormente las secuencias PnAP2L_Q4188_SEX y PnAP2L_Q4117_APO se utilizaron como consulta en análisis de BLASTN en la base de datos del NCBI. Las búsquedas realizadas revelaron que tanto PnAP2L_Q4188_SEX como PnAP2L_Q4117_APO presentan homología con *AP2-like ethylene-responsive transcription factor TOE3* de *Setaria itálica* (XM_004976979.3, % Identidad: 100%, e-value: 3e⁻³⁹), con *APETALA-like protein 5* de *Setaria viridis* (XM_034749248.1, % Identidad: 98,96%, e-value: 1e⁻³⁷), y con *AP2-like ethylene-responsive transcription factor TOE3* de *Panicum hallii* (XM_025968714.1, % Identidad: 96,84%, e-value: 6e⁻³⁵) (Tabla 39). Estos resultados indican que los fragmentos PnAP2L_Q4188_SEX y PnAP2L_Q4117_APO (*PnAP2-like*) corresponden a un miembro de la subfamilia *AP2-like* de *P. notatum* expresados en el transcriptoma floral que se asocia a la reproducción sexual.

Tabla 39. Análisis de similitud de secuencias (BLASTN) para PnAP2L_Q4188_SEX y PnAP2L_Q4117_APO

Accesión	Descripción	% Cob.	e-value	%Ident.
XM_004976979.3	<i>Setaria itálica AP2-like ethylene-responsive transcription factor TOE3</i>	39	3e-39	100
XM_034749248.1	<i>Setaria viridis APETALA2-like protein 5</i>	39	1e-37	98,96
XM_025968714.1	<i>Panicum hallii AP2-like ethylene-responsive transcription factor TOE3</i>	38	6e-35	96,84

IV.4.2.1.1- Análisis de expresión de genes *PnAP2-like* en tejido floral

Para identificar si alguno de los transcritos similares a los genes *AP2-like* presenta una representación diferencial entre el desarrollo reproductivo sexual y apomíctico, se extrajeron los datos de expresión *in silico* desde la Tabla 6 del material suplementario de Ortiz et al., 2017. Ninguno de los cinco transcritos mostró una representación diferencial significativa entre los transcriptomas de C4-4x (sexual) y Q4117 (apomíctico) (FDR > 0,05 y

p- values > 0,05) (Tabla 40). Cabe resaltar que la mayoría de estos transcritos, y en especial los isotigs 06879 y 06878 detectados como los más similares a APL25 (*Oryza sativa*) y SiAP2-like (*Setaria italica*) (Ver Figura 47), mostraron una expresión baja en ambos transcriptomas (número de lecturas 1-29) como es de esperar para factores de transcripción de este tipo.

Tabla 40. Datos de expresión *in silico* de los transcritos detectados como similares a genes AP2-like, tomados del Ortiz et al. (2017) (Material suplementario Tabla 6),

Isotigs base global	Isoforma base apomictica	Isoforma base sexual	Lectura en APO	Lectura en SEX	logFC	logCPM	p-value	FDR
isotig06879	isotig08400	isotig32043	2	1	-0,95075	2,32670	1	1
isotig06878	isotig08399	-	2	5	1,23530	2,97735	0,45320	0,94141
isotig31692	isotig10774	isotig12508	29	27	-0,13876	5,42633	0,89400	1
isotig23310	isotig06560	isotig22288	21	19	-0,17956	4,97892	0,87475	1
isotig23311	isotig06559	-	1	1	-0,03226	2,10392	1	1

Con el propósito de validar *in vivo* la expresión de *PnAP2-like* (isotigs 08399_sex, 08400_sex y 32043_apo) durante el desarrollo reproductivo de *P. notatum*, se realizaron amplificaciones de PCR sobre ADNc obtenido a partir del ARNm de espiguillas de los genotipos Q4188 y Q4117 en los estadios de meiosis y antesis. Los cebadores empleados en este análisis fueron los mismos utilizados para el análisis de ligamiento (Tabla 36). Los productos de amplificación se resolvieron en geles de agarosa al 2%, donde se observó la presencia de dos transcritos de 700 y 280 pb, respectivamente, en ambos genotipos y estados reproductivos (Figura 51).

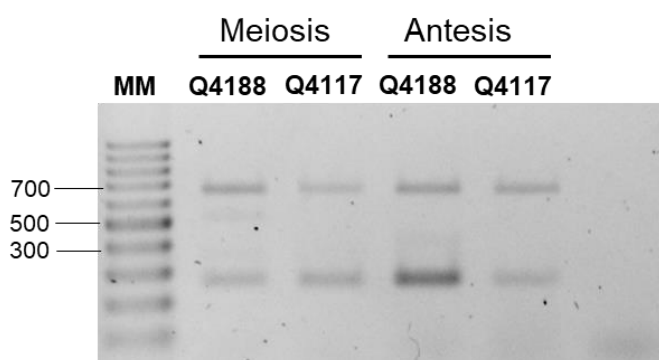


Figura 51. Gel de agarosa al 2% mostrando los productos de la amplificación de cDNA de los isotigs 08399_sex, 08400_sex y 32043_apo (*PnAP2-like*) empleando los cebadores PnAP2LF y PnAP2LR sobre ADNc en los estadios de antesis y meiosis de Q4188 y Q4117.

Estos resultados confirman la expresión de *PnAP2-like*, representante de la familia AP2, durante los estadios de meiosis y antesis en los genotipos Q4188 (sexual) y Q4117 (apomítico). La presencia de dos bandas, podría indicar la existencia de variantes de *splicing* que involucran la pérdida de exones entre los sitios de apareamiento de los cebadores. Esto último, sin embargo, deberá corroborarse experimentalmente mediante la utilización de estrategias de amplificación diseñadas para este fin.

IV.4.2.1.2- Identificación de posibles proteínas interactoras de AtAP2-like

Con el propósito de conocer las proteínas estrechamente relacionadas con proteínas APETALA2 e identificar las posibles vías metabólicas en las cuales participan, se seleccionó la proteína AtAP2-like (*Arabidopsis thaliana*), homóloga a las proteínas predichas *PnAP2-like* (ver sección IV.4.2) para utilizarla como consulta en la base de datos STRING (<https://string-db.org/>). El análisis de los interactores mostró solo una proteína relacionada, determinada experimentalmente, con un valor intermedio-alto de confianza (0,400) (Figura 52).

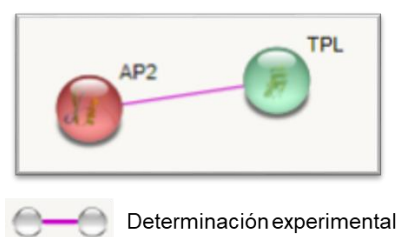


Figura 52. Representación de la red de interacciones proteína-proteína de AtAP2-like identificadas por la base de datos STRING (valor de confianza = 0,400).

La proteína identificada TPL, corresponde a TOPLESS, un miembro perteneciente a la familia de proteínas GROUCHO (Gro)/Tup1, integrada por co-represores de la expresión génica, reclutados por una gran variedad de factores de transcripción de unión a ADN (Liu y Karmarkar, 2008). Las proteínas de la familia TOPLESS también interactúan con proteínas del tipo Aux/IAA, uniéndose a estas últimas para reprimir la acción de los factores de transcripción ARFs (Auxin Response Factors) (Szemenyei et al., 2008; Ito et al., 2016). Es interesante destacar, que nuevamente las vías de señalización de auxinas están presentes en los procesos metabólicos asociados al modo de reproducción y a la apomixis en *P. notatum*.

IV.4.2.2- Búsqueda de transcritos similares a genes *BBM* con expresión diferencial entre los transcriptomas sexual y apomíctico de *P. notatum*

En base a los resultados obtenidos en la sección IV.4.2, se comenzó con el estudio de genes *BABY BOOM* pertenecientes al clado *euANT*, expresados durante el desarrollo reproductivo de *P. notatum*. La selección de los transcritos se realizó en base a las búsquedas BLASTX y BLASTP sobre el ensamblado global del transcriptoma del desarrollo reproductivo (Ortiz et al., 2017) (Ver Tabla 34). A fin de determinar los niveles de expresión de los transcritos identificados, se tomaron los datos de la tabla de expresión reportada por (Ortiz et al., 2017). Los mismos se muestran en la Tabla 41.

Tabla 41. Transcritos similares a genes *BBM*, detectados en el ensamblado global de desarrollo reproductivo de *P. notatum*. Los datos de expresión fueron tomados de Ortiz et al. (2017), Material suplementario Tabla 6.

Isotigs base global	Isoforma base apomíctica	Isoforma base sexual	Lectura en APO	Lectura en SEX	logFC	logCPM	p-value	FDR
isotig19745	isotig07752	isotig10031	22	19	-0,24629	5,01155	0,75547	1
isotig07297	Isoig06736	isotig17661	0	1	-3,15390	1,84048	1	1
isotig07295	Isotig06737		1	0	-3,18616	1,84129	1	1
Isotig36244	isotig04886	Isotig04813	23	7	-1,73436	4,61043	0,00525	0,1

De los cuatro transcritos analizados solo el isotig 36244, mostró una representación posiblemente diferencial entre los transcriptomas de C4-4x (sexual) y Q4117 (apomíctico) (p-value: 0.005 y logFC > |-1,73|). Si bien el valor de la probabilidad corregida (FDR) resultó mayor al límite considerado habitualmente (FDR < 0.05), al tratarse de factores de transcripción, que normalmente presentan bajos niveles de expresión, se consideró como umbral el valor de $p < 0,01$. Este transcrito muestra una expresión 3,31 veces superior en la base apomíctica (Q4117) que en la base sexual (C4-4x) (Tabla 41). Dado que genes *BBM* han sido asociados a la partenogénesis en genotipos apomícticos de *Pennisetum* spp. (Conner et al., 2015; Vijverberg et al., 2019; Ozias-Akins y Conner, 2020) y a la embriogénesis somática en especies sexuales (Khanday et al., 2019), se renombró al isotig 36244 como *PnBBM1-like*. Mediante búsquedas BLASTN en los transcriptomas correspondientes se determinó que el isotig 36244 es altamente similar (score = 2083, e-value = 0,0) al transcrito isotig 04813_sex y el isotig 04886_apo (score = 2054, e-value = 0,0) (Tabla 41).

IV.4.2.2.1- Aislamiento y análisis de cosegregación de secuencias génicas *BBM* de *P. notatum*.

Teniendo en cuenta los resultados presentados en la Tabla 41, se seleccionaron como base de la secuencia codificante de *PnBBM1-like* a los transcritos 04813_sex y 04886. Dichos transcritos corresponderían a productos del mismo gen expresados durante el desarrollo reproductivo de C4-4x (isotig 04813) y de Q4117 (isotig 04886). En primer lugar y con el objetivo de determinar la disposición de las secuencias exónicas se reconstruyeron las estructuras génicas hipotéticas para cada transcripto utilizando como referencia la secuencia genómica del gen de arroz *OsBBM3* (4325035). El alineamiento mostró que el isotig 04813_sex codifica para ocho exones, con ausencia del último exón comparado con la secuencia de *Oryza*, mientras que el isotig 04886_apo codifica para siete exones, con ausencia del segundo y tercer exón presentes en arroz, y un exón final adicional (Figura 53A). Para corroborar la presencia de la secuencia genómica de *PnBBM* en *P. notatum*, y a su vez determinar un posible ligamiento genético con el modo de reproducción, se realizaron experimentos de análisis de segregantes en grupos (Michelmore et al., 1993) a partir de amplificaciones por PCR del ADN genómico de los individuos Q4188 (sexual) y Q4117 (apomítico), un grupo de sexual (BS) y uno apomítico (BA). Cada grupo representativo del modo de reproducción, estuvo integrado por 5 individuos F₁ de cada clase (sexuales y apomíticos), derivados de la población segregante (Q4188 x Q4117). Los cebadores utilizados para la amplificación de *PnBBM* muestran en la Tabla 42.

Tabla 42.- Cebadores diseñados para la amplificación de las secuencias genómicas correspondientes del gen *PnBBM* homólogos a genes *BBM*.

Cebador	Secuencia (5'-3')
PnBBMF	GAACAAGAAGGGCAAGCAAG
PnBBMR	ACCTCCCGTTGTGGTGGT

La amplificación por PCR sobre el ADN genómico de los genotipos parentales con los cebadores PnBBMF y PnBBMR, mostró un fragmento monomórfico de aproximadamente 710 pb y dos bandas polimórficas, una presente en el genotipo sexual (Q4188) de aproximadamente 800 pb y la otra presente en el genotipo apomítico (Q4117) de aproximadamente 750 pb. Sin embargo, ambas bandas polimórficas no mostraron diferencias entre los grupos sexual y apomítico, indicando una segregación independientemente al modo de reproducción (Figura 53B).

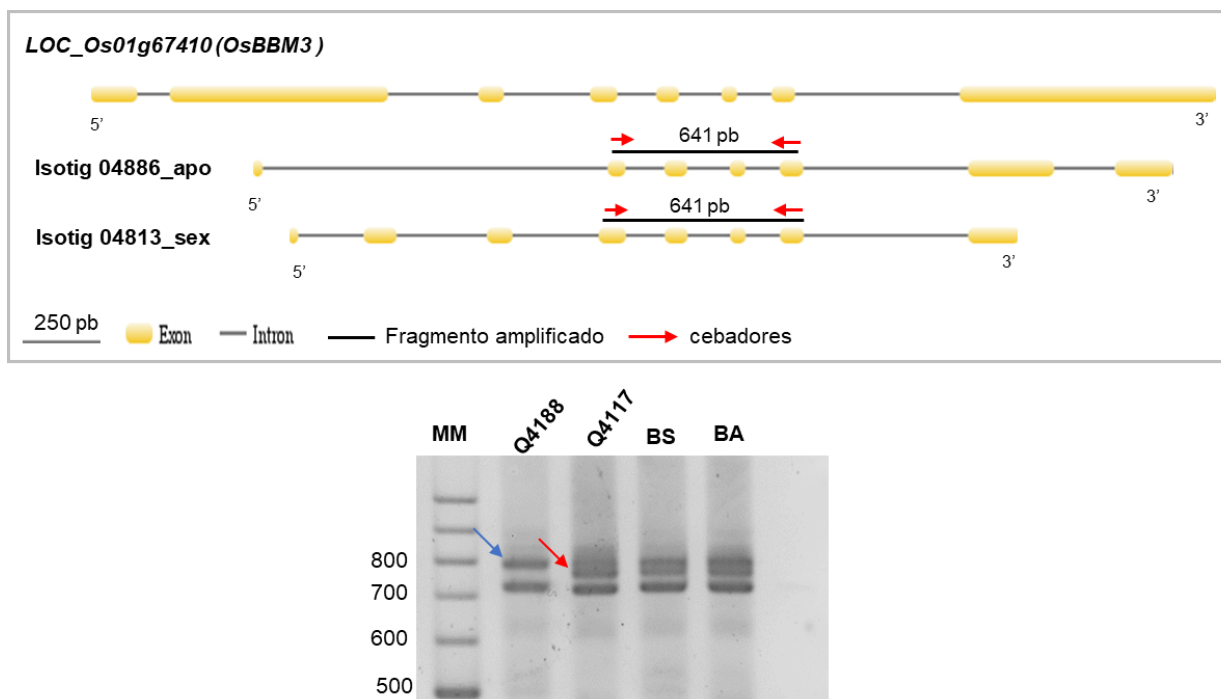


Figura 53. Estructuras génicas y patrones de amplificación correspondientes a *PnBBM* (isotigs04813_sex y 04886_apo). **A)** Esquema de las estructuras a génicas hipotéticas para de los isotigs. **B)** Gel de agarosa al 2 % mostrando los productos de amplificación de *PnBBM*. La flecha azul indica la banda polimórfica presente en el genotipo Q4188 y la roja la banda polimórfica específica del progenitor apomítico (Q4117). MM: marcador molecular, Q4188: madre sexual, Q4117: padre apomítico, BS: grupo/ *bulk* sexual, BA: grupo/ *bulk* apomítico.

A fin de corroborar la segregación independiente o detectar algún grado de ligamiento entre gen *PnBBM* y el carácter apomixis que pudo haber quedado enmascarada en el análisis de grupos, se realizó la misma amplificación descrita anteriormente sobre el ADN genómico de los individuos parentales (Q4188 y Q4117) y 20 individuos F_1 (10 sexuales y 10 apomíticos) derivados del cruzamiento (Q4188 x Q4117). Los resultados de la amplificación se muestran en la Figura 54, donde se observa la presencia de la banda polimórfica correspondiente al progenitor apomítico en 14 de los 20 individuos F_1 empleados (7 sexuales y 7 apomíticos). Para el análisis de ligamiento del marcador/banda con el modo reproductivo apomítico, en lugar se determinó la relación de segregación (presencia:ausencia) del fragmento polimórfico (marcador) en los individuos F_1 , como derivado de un *locus* heterocigota uniplexo (Aaaa), segregando de organismo tetraploide en caso de herencia disómica o polisómica mediante una prueba de Chi cuadrado (χ^2). El valor obtenido Chi =14:6 no ajustó a una relación de segregación 1:1 ($\chi^2_{1:1} = 4,2632$ y p-valor = 0,03895). Posteriormente, los valores de presencia:ausencia se contrastaron contra el modelo de alelos en dosis doble, que presentan una relación de segregación 5:1 (Stein et al. 2004). En este caso el valor de Chi $\chi^2_{5:1} = 2,546$ ajustó al modelo indicando que se trataría de un *locus* en dosis doble. Por otro lado, dado que del total de individuos que presentaron el marcador la

mitad es de reproducción sexual y la otra mitad de reproducción apomítica, se desprende que *PnBBM* segrega de manera independiente al modo de reproducción.

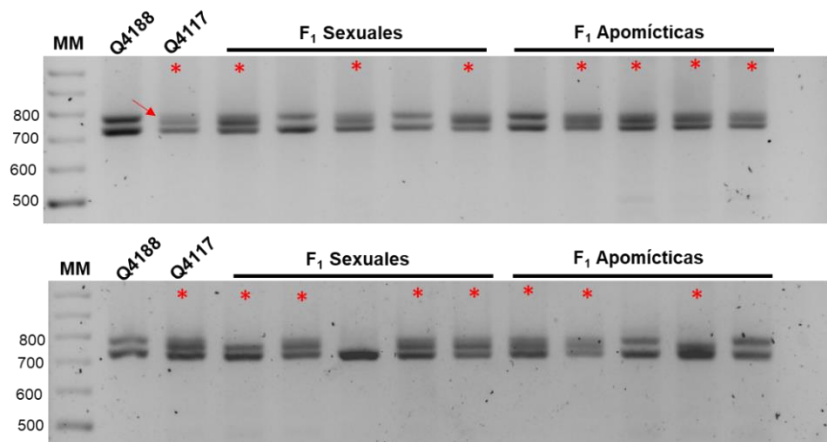


Figura 54. Gel de agarosa al 2 % mostrando la amplificación de *PnBBM* (isotigs 04813_sex 04886_apo), empleando los cebadores PnBBMF y PnBBMR, sobre los genotipos parentales y 20 individuos de la población segregante por el modo de reproducción (10 F₁ sexuales y 10 F₁ apomíticas). Los asteriscos rojos indican la presencia del marcador polimórfico.

Estos resultados indican que transcritos con similitud a los genes *AP2* y *BBM-like* están expresados en el transcriptoma del desarrollo reproductivo de *P. notatum*. En el caso del gen similar a *AP2*, se determinó que el mismo cosegrega con el modo reproductivo sexual y que se expresan probablemente dos transcritos. Los mismos podrían estar relacionados con las vías de respuesta a auxinas actuantes durante el desarrollo reproductivo. En el caso de *BBM-like* se detectaron dos transcritos similares a genes *BBM* que muestran diferencias estructurales entre los genotipos sexual y apomítico. En este caso, sin embargo, el gen codificante segrega en forma independiente al modo de reproducción.

V- DISCUSIÓN

V.1- Caracterización de la población de mapeo tetraploide de *P. notatum*.

La clasificación de los 50 individuos de la población F_1 segregante por el modo reproductivo proveniente del cruzamiento entre los genotipos Q4188 (tetraploide sexual) y Q4117 (tetraploide apomítico), llevada a cabo a través de técnicas citoembriológicas y moleculares, permitió corroborar el modo de reproducción del material experimental y diseñar los experimentos descritos anteriormente. Tanto el marcador *SPNA2* con el *PPIAPO*, permitieron una clasificación rápida del modo reproductivo de los individuos en estado vegetativo, posteriormente corroborado mediante estudios citoembriológicos. En este caso ambos marcadores mostraron su capacidad para utilizarse rutinariamente en la clasificación de poblaciones grandes. En especial el fragmento de PCR generado por el marcador *PPIAPO*, se presenta como el más adecuado debido a que no requiere la utilización de geles de poliacrilamida para su resolución.

El análisis de segregación del modo de reproducción mostró una relación de 3,5:1 de plantas sexuales vs. apospóricas. Esta relación de segregación, que era esperada en esta población, se puede explicar por el modelo de herencia propuesto por Martínez et al., (2001), observado repetidamente en poblaciones segregantes de *P. notatum* (Stein et al., 2004; Acuña et al., 2009, 2011). Como se desarrolló en la introducción, los autores postularon que el carácter apomixis estaría controlado por un *locus* simple dominante que muestra distorsión de la segregación, posiblemente debida a una letalidad parcial asociada a las gametas que llevan el/los factores determinantes de la aposporia o bien, a un efecto letal pleiotrópico con penetrancia incompleta (Martínez et al., 2001). Distorsiones similares a favor de los individuos sexuales fueron observadas en poblaciones segregantes de varias gramíneas apomíticas, sugiriendo que ésta es una característica común en varias especies (Ozias-Akins y van Dijk, 2007). Es importante destacar, que la distorsión observada en la transmisión del carácter apomixis debe ser considerada asimismo en el estudio de los genes localizados en el ACL. Por lo tanto, la disponibilidad de la población F_1 , clasificada según su modo reproductivo, permitió determinar el ligamiento genético entre los genes candidatos, posiblemente implicados en el carácter apomixis, y el ACL como se describirá más adelante.

V.2- Análisis de genes con repeticiones *Anquirina (ANK)* expresados durante el desarrollo reproductivo de *P. notatum*

Como se desarrolló previamente en la introducción, estudios de mapeo comparativo permitieron conocer relaciones sinténicas entre marcadores ligados a la apomixis, en especies de *P. notatum*, y el mapa genético de arroz. Utilizando sondas heterólogas Pupilli et al., (2001) identificaron un conjunto de marcadores posicionados en la región distal del brazo largo del cromosoma 12 de arroz, que segregaron estrictamente ligados a la apomixis en *P. simplex* y *P. malacophyllum* (Hosjgaard et al., 2011). Resultados similares se obtuvieron en *P. notatum*, donde se detectó *sintenia* del ACL con los cromosomas 12 y 2 de arroz, así como con los cromosomas 3 y 5 de maíz (Martínez et al., 2003; Pupilli et al., 2004; Podio et al., 2012a). En todas estas especies, el ACL se encuentra delimitado por los marcadores C996A y C1069, lo cual restringe la región a unos 5,8 cM del mapa genético de arroz que corresponde a una distancia física de alrededor de 1.062 kb. Esta región genómica de *Paspalum* probablemente incluya los determinantes genéticos de la reproducción apomíctica. Considerando que la apomixis podría haber surgido a partir de la desregulación de los genes implicados en la reproducción sexual, los genes localizados en estas regiones de arroz podrían estar relacionados con el modo reproductivo. El análisis de las secuencias génicas presentes en el segmento de arroz sinténico al ACL mostró anotaciones posiblemente relacionadas al modo de reproducción. Entre ellas se encuentra el **LOC_Os12g40770** codificante para una proteína miembro de la superfamilia ANK (*ANKYRIN*) (Hosjgaard et al., 2011), específicamente a la subfamilia ANK-TPR (Huang et al., 2009).

La superfamilia de genes *ANK (ANKYRIN)* es una de las más extensas y se encuentra presente en todas las especies. Las proteínas ANK reportadas en plantas se clasifican en 13 subfamilias basadas en diferentes dominios acompañantes, identificados a través de numerosos estudios de estructura de genoma y perfiles de expresión de genes. En las plantas, este tipo de proteínas generalmente está involucrada en procesos fisiológicos y del desarrollo como: la señalización y el crecimiento (Yuan et al., 2013), la diferenciación de plástidos (Garcion et al., 2006), la embriogénesis (Albert et al., 1999), la biogénesis de cloroplastos (Bae et al., 2008), la formación de grana (Cui et al., 2011), la morfogénesis foliar (Ha et al., 2004), la germinación del polen y el crecimiento polarizado del tubo polínico (Huang et al., 2006, 2007). Asimismo, proteínas con repeticiones ANK fueron asociadas al desarrollo floral en arroz (Huang et al., 2009). La subfamilia *ANK-TPR* presenta genes duplicados en tándem, lo que explica la cantidad de miembros de esta subfamilia. Dado que los miembros de *ANK-TPR* (22 miembros) en arroz son mucho más que los presentes en la misma subfamilia de *Arabidopsis* (solo un miembro) (Becerra et al., 2004), maíz (dos miembros) (Jiang et al., 2013) y tomate (cuatro miembros) (Yuan et al., 2013), se supone que la familia *ANK-TPR* en esta

especie podría haber surgido de múltiples eventos de duplicación para ganar miembros durante el proceso de evolución (Huang et al., 2009). La mayoría de las proteínas que contienen motivos TPR están asociadas con complejos multiproteicos. Además, existe amplia evidencia que indica que los motivos TPR son importantes para el funcionamiento de los complejos de chaperonas, ciclo celular, transcripción y transporte de proteínas (Blatch y Lässle, 1999).

En este trabajo de Tesis se identificaron cuatro miembros de la subfamilia ANK-TPR expresados durante el desarrollo reproductivo, denominados *PnANK-TPR1* (isotig 19073), *PnANK-TPR2* (isotig 32130), *PnANK-TPR3* (isotig 32953) y *PnANK-TPR4* (isotig 35667). Este número se relaciona con el de los miembros de dicha subfamilia identificados en *Arabidopsis*, maíz y tomate (Becerra et al., 2004; Jiang et al., 2013; Yuang et al., 2013). El análisis de las proteínas predichas de las cuatro secuencias aisladas confirmó la presencia de los dominios ANK y TPR. Los análisis filogenéticos realizados incluyendo las 22 secuencias proteicas ANK-TPR de arroz (Huang et al., 2009), las dos de maíz (Jiang et al., 2013) y el único miembro de *Arabidopsis* (Becerra et al., 2004), indicaron que las proteínas *PnANK-TPR* están estrechamente relacionados con los miembros ANK-TPR de dichas especies. La proteína *PnANK-TPR2* agrupó con uno de los miembros de maíz (*ZmANK61*) y con el único miembro ANK-TPR de *Arabidopsis* (*At3G04710*), indicando su ortología con estos. Curiosamente, *PnANK-TPR3* y *PnANK-TPR4* agruparon con la proteína codificada por *LOC_Os12g40770* posicionado en la región del cromosoma 12 de arroz sinténica al ACL de *P. notatum* y con su parálogos *LOC_Os12g40780*, surgido probablemente por duplicación en tándem (Huang et al., 2009). Estos últimos resultados coincidieron con la identificación de los transcritos similares al *LOC_Os12g40770* en el transcriptoma sexual y apomíctico, respectivamente: *PnANK-TPR3* presenta dos variantes alélicas (isotigs 11445_apo y 11446_apo) expresadas durante el desarrollo reproductivo apomíctico, y un alelo (Isotig 17384_sex) expresado durante el desarrollo sexual, mientras que *PnANK-TPR4* está representado por un alelo (isotig 20570_sex) solo expresado durante el desarrollo sexual de *P. notatum*.

Aunque no se pudo determinar *in vivo* el ligamiento genético de los genes *PnANK-TPR* con el ACL, se localizó una secuencia altamente similar a *PnANK-TPR3* en el mismo ensamblado (utg001669l) en el que mapea la sonda heteróloga C1069 (uno de los marcadores de la región del cromosoma 12 de arroz sinténica al ACL) que cosegrega estrictamente con la apomixis en la especie (Ortiz et al., 2013). Este resultado muestra la existencia de microcolinealidad en este segmento entre arroz y *P. notatum*. Además, vale destacar que tanto las secuencias de *PnANK-TPR3* y *PnANK-TPR4* mapearon en la región del cromosoma 12 de arroz sinténica al ACL confirmado la sintenia entre estas regiones genómicas detectadas previamente en *Paspalum* (Pupilli et al., 2001; Martinez et al., 2003;

Pupilli et al., 2004; Stein et al., 2007; Hojsgaard et al., 2011; Podio et al., 2012; Ortiz et al., 2013) y *Brachiaria brizantha* (Pessino et al., 1998).

Los estudios de qRT-PCR de los genes *PnANK-TPR* en diferentes estadios del desarrollo permitieron asociar la expresión diferencial de uno de estos (*PnANK-TPR3*) con el modo de reproducción. Se caracterizó la expresión de los mismos en tejidos reproductivos de genotipos apomícticos y sexuales. Específicamente, *PnANK-TPR3* mostró diferencias significativas de expresión relativa entre el genotipo sexual y el apomíctico durante los estadios de meiosis y antesis. Los resultados para el estadio de meiosis se repitieron en seis individuos (tres sexuales y tres apomícticos) de la población F₁ (Q4188 x Q4117). El estadio de “meiosis” es un momento clave de la reproducción apomíctica dado que, a partir de este momento, una o más células de la nucela, cercanas a la MMC, se diferencian como iniciales de la aposporia (AI) para posteriormente dar origen al saco embrionario apospórico. En contraste, en la reproducción sexual la CMM sufre meiosis para dar origen a cuatro células, tres de estas degeneran y una toma identidad de megáspora funcional (Laspina et al., 2008; Ortiz et al., 2013). Los resultados presentados en este trabajo indican que *PnANK-TPR3* está regulado negativamente al momento de la meiosis en los individuos apospóricos analizados. Sumado a esto, *PnANK-TPR3* mostró muy bajos niveles de expresión en tejido somático (hoja y raíz). Resultados similares fueron reportados por Huang et al., (2009) para seis genes *ANK* de arroz miembros de la subfamilia *ANK-TPR*, los mismos presentaron niveles elevados de expresión en tejidos reproductivos comparado con tejidos vegetativos. Cinco de estos mostraron la mayor expresión en panículas en desarrollo y el sexto tuvo niveles de expresión elevados en panícula y endosperma. En maíz, experimentos de RT-PCR para el gen *ZmANK7*, similar a *PnANK-TPR3*, no detectaron expresión en hoja y tallo, y mostraron señal de expresión muy leve en raíz (Jiang et al., 2013). Sin embargo, mediante datos de secuencias expresadas (ESTs) Jiang et al., (2013) detectaron señal específica de expresión del gen *ZmANK7* en endosperma. Estos antecedentes, sumado a los resultados obtenidos, avalan la hipótesis de que el gen *PnANK-TPR3* tendría una función específica en tejido reproductivo, asociados con el modo de reproducción.

Curiosamente, Jeon et al., (2015) evaluaron mutantes de T-DNA en arroz (Jeon et al., 2000) revelando que dos alelos mutantes de dos genes (LOC_Os01g07640 y LOC_Os05g01310), miembros de la subfamilia *ANK-TPR* similares a la proteína de *Arabidopsis AtTPR10* (Prasad et al., 2010), no produjeron descendencia homocigota en la siguiente generación. Los fenotipos letales probablemente sugieren un papel crucial de estos genes *ANK* en el crecimiento y desarrollo del embrión de arroz. Es relevante destacar que *PnANK-TPR2* es muy similar a LOC_Os05g01310 y a *AtTPR10*. Aunque no hay estudios realizados en mutantes de *AtTPR10*, se cree que la proteína codificada por dicho gen

funcionaría también como chaperona molecular para proteger a las plantas de diversos estreses abióticos (Paeng et al., 2020).

Una línea de investigación interesante se deriva de los estudios de interacción proteína-proteína con miembros de la familia ANK-TPR. Uno de los interactores detectados corresponde a una kinesina. Las kinesinas son una superfamilia de proteínas motoras de microtúbulos (MT) presente en todos los organismos eucariotas que participan en una lista extensa y diversa de funciones celulares esenciales, que incluyen mitosis, citocinesis, polarización celular, alargamiento celular, desarrollo flagelar, transporte intracelular y morfogénesis (Shen et al., 2012). Las kinesinas se clasifican según la homología de secuencia en sus dominios motores, clasificándose en 14 subfamilias (Lawrence et al., 2004). Una de las proteínas detectadas como interactora directa de OsANK-TPR (LOC_Os12g40770) es una proteína kinesina codificada por Os04g0666900, miembro de la subfamilia kinesinas-14. Esta proteína es específica de plantas y se denomina proteína de unión a calmodulina (KCBP) (Richardson et al., 2006). En arroz, al igual que en *Arabidopsis*, existe un solo miembro del tipo de proteínas KCBP codificado por el *locus* LOC_Os04g57140/Os04g0666900, coincidentemente es el detectado en la red de interacciones proteína-proteína. Estudios detallados en *A. thaliana* y otros organismos indican que la KCBP funciona en la organización/estabilidad de las proteínas metalotioneínas (MTs) en células mitóticas y en la interfase, en consecuencia, en la morfogénesis celular (Oppenheimer et al., 1997; Reddy y Day, 2000; Vos et al., 2000; Preuss et al., 2003). Interesantemente, en *P. notatum* Pessino et al., (2001), mediante un estudio de *differential display*, detectaron tres fragmentos expresados en el genotipo apomítico Q4117, correspondientes a un fragmento conteniendo el dominio repetitivo KSP de una proteína Kinesina de *Caenorhabditis elegans*. Estos antecedentes indicarían que la regulación negativa de *PnANK-TPR3*, ortólogo a *OsANK-TPR* (LOC_Os12g40770), podría formar parte de una cascada de señalización involucrada en la determinación del destino de las células de la nucela y su posible canalización hacia la gametogénesis.

V.3- Análisis de genes de respuesta temprana a auxina (*Aux/IAA*) expresados durante el desarrollo reproductivo de *P. notatum*

De acuerdo a lo descrito en la introducción, una de las secuencias identificadas en la región del cromosoma 12 de arroz sinténica con el ACL de *P. notatum*, pertenece a un gen (LOC_Os12g40890; *Os/IAA30*), codificante para una proteína de respuesta temprana a auxina, miembro de la familia génica *Aux/IAA* (Hojgaard et al., 2011).

El ácido indol acético (IAA) es una fitohormona de la familia de las auxinas que regula varios procesos durante el crecimiento y desarrollo de las plantas que incluyen entre otros la dominancia apical, la respuesta gravitrópica, la embriogénesis y organogénesis, la diferenciación vascular, la iniciación del eje radicular y raíces laterales, y el alargamiento del brote (De Smet y Jürgens, 2007; Ljung, 2013). Se sabe que los cambios espaciales y temporales en los niveles de auxinas desencadenan la reprogramación de genes que se activan, en respuesta a esta hormona, en tejidos específicos y que requieren de la acción de los denominados genes de respuesta temprana. Estos últimos son los mediadores entre los niveles intracelulares de auxina y los genes blanco. Entre estos genes, los miembros de la familia *Aux/IAA* (*AUXIN/INDOLEACETIC ACID*), han sido caracterizados como proteínas nucleares de vida corta que desempeñan un papel crucial en la represión de los niveles de expresión de genes activados por las proteínas ARFs (*Auxin Response Factors*) (Abel et al., 1994; Dreher et al., 2006). Las proteínas *Aux/IAA* interactúan entre sí y con las proteínas ARFs mediante los dominios C-terminales III y IV, respectivamente (Guilfoyle, 2015). Los genes *Aux/IAA* están presentes como familias multigénicas y son exclusivos de plantas (Reed, 2001).

En el presente trabajo de tesis se detectaron 23 transcritos expresados durante el desarrollo reproductivo de *P. notatum* cuyas proteínas predichas resultaron altamente similares a 19 de los 31 miembros de la familia *Aux/IAA* de *Oryza sativa* (Jain et al., 2006). El análisis de los dominios de las 23 proteínas identificadas confirmó que todas ellas están estructuralmente relacionadas con las proteínas de la familia. El número de miembros detectados en el transcriptoma floral indica que la familia *Aux/IAA* es relativamente extensa en *P. notatum*, al igual que en las especies mencionadas previamente, con un número de miembros cercano a los de *Sorghum bicolor* (26) (Wang et al., 2010), *Citrus* (26) (Xie et al., 2015), *Eucalyptus grandis* (26) (Yu et al., 2015), *Solanum lycopersicum* (26) (Audran-Delalande et al., 2012), *Solanum tuberosum* (26) (Wu et al., 2012) y *Vitis vinifera* (26) (Çakir et al., 2013). Los análisis filogenéticos realizados incluyendo las 31 secuencias proteicas *Aux/IAA* de arroz (Jain et al., 2006) y las 23 de *P. notatum*, mostraron al menos tres proteínas (codificadas por los isotigs 33023, 22208 y 22209) asociadas a la proteína de arroz *OsIAA30*,

mientras que las otras 20 agruparon con 21 proteínas de arroz formando 13 grupos bien diferenciados e indicando la presencia de los posibles genes ortólogos entre ambas especies. Estudios de expresión por qRT-PCR de los genes *OsIAA* en tejidos somáticos y reproductivos en arroz mostraron una alta complejidad en los patrones de expresión, siendo en algunos casos tejido-específicos, lo cual indica que algunos miembros podrían realizar funciones definidas durante el desarrollo o crecimiento y otros actuar de forma redundante (Jaing et al., 2006). Debido a la cercanía filogenética entre *P. notatum* y arroz, es posible suponer que los transcriptos Aux/IAA detectados en el transcriptoma floral presenten similares patrones de expresión a los reportados en arroz, y probablemente puedan exhibir una conservación funcional en ambas especies.

Los transcriptos similares a LOC_Os12g40890 (*OsIAA30*) identificados en el transcriptoma del desarrollo reproductivo de *P. notatum*, correspondieron con el transcripto 33023 del ensamblado global. El isotig 33023 se encuentra representado por el isotig 18298 expresado durante el desarrollo sexual, y el isotig 21112 expresado durante el desarrollo apomíctico. Ambos transcriptos resultaron altamente similares. El alineamiento de las secuencias proteicas codificadas por estos transcriptos y *OsIAA30* mostró una conservación cercana al 100 % de los dominios I, II, III y IV. El análisis filogenético en el que además se incluyeron otras proteínas de *P. notatum* identificadas como similares a *OsIAA30*, mostró la formación de un grupo bien definido entre los isotigs 18298_sex y 21112_apo y *OsIAA30*. Estos resultados indican que ambos transcriptos derivarían del gen denominado *PnIAA30*, que correspondería al gen ortólogo de *OsIAA30*. El alto grado de conservación de los dominios proteicos entre *OsIAA30* y *PnIAA30* sugiere que su función estaría conservada en ambas especies.

En base a la población F₁ segregante por el modo reproductivo se determinó que una forma alélica de *PnIAA30* se encuentra genéticamente ligada al ACL a una distancia de recombinación aproximada de $r = 0.30$. Si bien en este experimento no pudo determinarse un ligamiento completo del alelo segregante con el ACL, la presencia de este marcador probablemente se deba a un gen parálogo, resultado de una duplicación reciente en las cercanías del ACL en la especie. Este resultado es coincidente con trabajos previos como por ejemplo el reportado por Felitti et al., (2011), en el cual un fragmento diferencialmente expresado entre flores apomícticas y sexuales previo a la meiosis, denominado N20, fue localizado a 20 cM del ACL. La extensión de este fragmento mostró una gran similitud con el gen *LORELEY*, que está asociado a la entrega de gametos masculinos a la célula de huevo durante la doble fecundación en *Arabidopsis* (Felitti et al., 2011).

El mapeo *in silico* de la secuencia de *PnIAA30* sobre el borrador del genoma diploide de *P. notatum*. mostró que una secuencia altamente similar se posiciona en el supercontig utg001669l. Dicho ensamblado contiene además una secuencia similar a la sonda heteróloga C1069, que mapea 100% ligada ACL en varias especies del género (Ortiz et al., 2013). Sumado a esto, en este trabajo de tesis se determinó que el gen *PnANK-TPR3*, ortólogo a otro de los genes de arroz localizado en la región sinténica al ACL, también se ubica en dicho ensamblado. Esos resultados marcan una evidencia consistente de que un gen ortólogo a *OsIAA30* (*PnIAA30*) está efectivamente localizado en el ACL y que la disposición génica en esta región en *P. notatum* es colineal con la región del cromosoma 12 de arroz. Este resultado tiene gran relevancia desde el punto de vista de la estructura génica del ACL.

Los estudios de expresión de *PnIAA30* en diferentes estadios del desarrollo permitieron determinar una regulación diferente de acuerdo al modo de reproducción. Específicamente, *PnIAA30* mostró diferencias significativas de expresión relativa entre el genotipo sexual y el apomíctico durante el estadio de antesis, con una mayor expresión en el genotipo sexual. Las diferencias de expresión de *PnIAA30* observadas en antesis se repitieron en cinco individuos (tres sexuales y dos apomícticos) de la población F₁ (Q4188 x Q4117). Por otra parte, se observó que la expresión de *PnIAA30* se asocia negativamente con el grado de expresividad de la aposporía. Resultados similares fueron reportados por Siena et al., (2014) para el gen *PnTgs1-like* en *P. notatum*, donde observaron una correlación negativa de la expresión del gen con el grado de expresividad de la aposporía. Estos resultados avalan la teoría del surgimiento de la apomixis como una desregulación en la expresión de los genes involucrados en la vía canónica sexual (Koltunow y Grossniklaus, 2003). Por otro lado, mediante experimentos RT-PCR se determinó que *PnIAA30* presenta mayor expresión durante la embriogénesis en el genotipo sexual respecto del apomíctico. Estos resultados son de gran relevancia ya que existen diferencias en el proceso de formación del embrión por sexualidad o apomixis. En la reproducción sexual los núcleos espermáticos ingresan al saco embrionario a través de una de las sinérgidas y uno de ellos se fusiona con la célula huevo (*n*) para dar origen al cigoto (*2n*), a partir del cual desarrollará el embrión. En contraste, en la aposporía el embrión se desarrolla por partenogénesis en ausencia de la fertilización de la célula huevo. La disminución de la expresión de uno de los genes de la familia de respuesta temprana a auxina como el *PnIAA30*, indica que varios de los factores de transcripción que interactúan con él, quedan libres para inducir la transcripción de los genes blanco. Este mecanismo podría estar relacionado con la partenogénesis del embrión durante la formación de las semillas apomícticas. Khanday et al., (2019), demostraron recientemente que la sobre-regulación de las auxinas, está estrechamente relacionada a la inducción de la embriogénesis somática en arroz. Sin embargo, esta hipótesis deberá ser contrastada experimentalmente.

Por otro lado, se detectó una expresión similar y relativamente baja de *PnIAA30* en las hojas, tanto del genotipo sexual como el apomíctico, lo cual sugiere que este gen jugaría un papel específico durante el desarrollo reproductivo tal como se ha propuesto para varios genes miembros de la familia (Radoeva et al., 2014).

Sumado a los estudios de expresión expuestos anteriormente, los experimentos de hibridación *in situ* de tejidos con fragmentos del gen *PnIAA30* revelaron un patrón de expresión espacial contrastante entre plantas sexuales y apomícticas en los estadios de premeiosis/meiosis y anthesis. En el genotipo sexual, la hebra sentido se expresa con una marcada intensidad en células de la nucela que rodean a la célula madre de la megáspora (CMM), y en parte de los tegumentos del óvulo, pero no se detectó ARNm en la CMM. En el genotipo apomíctico, se observó expresión en gran parte de la nucela, parte de los tegumentos del óvulo y particularmente, contrastante con lo observado en el genotipo sexual, se detectó expresión en la CMM. Esta expresión localizada, podría estar relacionada con una diferente regulación de los destinos celulares. Mientras en el genotipo sexual la CMM mantiene su respuesta a auxinas y puede dividirse para formar las megásporas reducidas, en el genotipo apomíctico la expresión de *PnIAA30* podría estar retrasando la entrada a la meiosis. En un trabajo reciente Soliman et al., (2019), demostraron que la entrada a la meiosis femenina en los ovarios de los individuos apomícticos está retrasada con relación a los sexuales en *Paspalum rufum*. Los resultados de la hibridación *in situ* en el estadio de anthesis con la hebra antisentido, coincidieron con los resultados de expresión por qRT-PCR. El transcrito codificante se expresa de manera contrastante entre los genotipos sexual y apomíctico. En el genotipo sexual se expresa con una evidente intensidad en las células de la nucela y aparato oosférico, y una leve expresión en núcleos polares y células antipodales del óvulo. Esto podría estar relacionado con un estado de reposo de toda la estructura del gametofito en espera de la fertilización de la célula huevo y los núcleos polares. En cambio, en el genotipo apomíctico no se detectó expresión significativa en ninguna de las estructuras observadas (células de la nucela, aparato oosférico, y núcleos polares). Esto indicaría que estos tejidos podrían responder de manera diferente a la acción de las auxinas y, en consecuencia, estar bajo un control diferente al observado en los ovarios sexuales.

En los individuos apospóricos, varias células somáticas nucelares se vuelven sensibles a señales aún desconocidas que inducen la adquisición de un destino gametofítico, pero sin determinar la entrada a la meiosis. Por lo tanto, se vuelven capaces de dividirse y formar un megagametofito funcional mitóticamente, integrado por células no reducidas (Hand y Koltunow, 2014). En *Arabidopsis* se informó que las proteínas ARGONAUTA 9 (AGO9) y RNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE 6 (RDR6) controlan la especificidad de los

megasporocitos y la formación de gametas femeninas a través del silenciamiento de ARN pequeño (sRNA) dependiente de AGO9. Las mutaciones en AGO9 y RDR6 conducen a la diferenciación de múltiples CMM capaces de iniciar la gametogénesis (Olmedo-Monfil et al., 2010). Un estudio reciente mostró que la proteína TRANSCRIPTION EXPORT1 (TEX1) evita que las células somáticas experimenten la formación de CMM en forma autónoma a través de la restricción de la expresión del FACTOR DE RESPUESTA AUXIN 3 (ARF3), mediada por Trans-Acting Small interfering RNA 3 (TAS3). Además, se observó que una mutación en TEX1 conduce a la formación de múltiples CMM (Su et al., 2017). Interesantemente, como se ha descrito previamente, el candidato *PnIAA30* parece estar activo en la CMM del genotipo apomíctico y se expresa fuertemente en la nucela de plantas sexuales. *PnIAA30* resultó ser el ortólogo putativo de *IAA16* de *Arabidopsis* y *OsIAA30* de arroz. Sumado a eso la red de proteínas interactoras de *OsIAA30* determinó una relación directa con los factores de transcripción ARFs (*Auxin Response Factors*) 2, 7, 11, 15 y 16. Este último resultado era esperable ya que las Aux/IAA reprimen la actividad de los ARFs y por ende los niveles de la expresión de genes activados por estos últimos (Abel et al., 1994; Dreher et al., 2006). Un estudio reciente llevado a cabo en arroz por Zhao et al., (2020) detectó genes relacionados con la señalización de auxinas con abundantemente expresión en la etapa de célula arqueosporial (AC) y/o de la CMM durante la megasporogénesis. Los niveles de transcripción relativa de cinco genes ARFs (*OsARF2*, *OsARF3*, *OsARF9*, *OsARF14* y *OsARF15*), fueron significativamente más altos en la etapa AC en comparación con las otras etapas de la megasporogénesis. De manera similar, *OsIAA7* y *OsIAA30* se encontraron preferencialmente expresados en óvulos tempranos en la etapa AC (Zhao et al., 2020). Estos datos sugieren la posible participación de estos genes relacionados con la señalización de auxinas en la megasporogénesis del arroz. Vale recordar que el cambio dinámico temporal y espacial en los niveles de auxina puede finalmente ser transformado en la señalización de reprogramación génica, regulando así, de manera precisa los procesos de crecimiento y desarrollo de las plantas (Luo et al., 2018).

En este trabajo se observó que el transcripto codificante de *PnIAA30* está sobreexpresado en la nucela, núcleos polares y aparato oosférico del megagametofito del genotipo sexual comparado con el apomíctico, donde la actividad de *PnIAA30* es casi imperceptible. Estos resultados son coincidentes con las diferencias de expresión detectadas por qRT-PCR. Según los datos obtenidos en los experimentos de RT-PCR, los niveles de la expresión del gen en genotipo sexual son elevados al comienzo de la embriogénesis, comparado con la expresión en el genotipo apomíctico. En *Arabidopsis* mutantes *iaa16-1* homocigotas (ortólogo a *OsIAA30* y presunto ortólogo a *PnIAA30*), fueron incapaces de producir descendencia, indicando que este gen podría estar asociado a alguna de las etapas

de la gametogénesis o embriogénesis (Rinaldi et al., 2012). Otros genes *Aux/IAA* de *Arabidopsis* también fueron asociados a estas etapas del desarrollo, el gen *IAA18* se expresa en el dominio apical de los embriones en etapa globular, en el meristemo apical del brote y en el dominio adaxial de los cotiledones de embriones en etapa de corazón. Estudios complementarios de ganancia de función demostraron que *IAA18* desempeña un rol importante en el patrón apical embrionario reprimiendo la actividad de ARF5 y de otros ARFs (Ploense et al., 2009). En *Solanum lycopersicum* mutaciones en *SlIAA9* produjeron frutos partenocárpicos y anomalías en la forma de la hoja (Wang et al., 2005; Mazzucato et al., 2015; Koenig et al., 2009). Recientemente, se observaron resultados similares en la mutante *Sliaa9-crispr*, obtenida a través del sistema CRISPR/Cas9, la misma también presentó partenocarpia y hojas anormales (Ueta et al., 2017). En base a los resultados y antecedentes expuestos podemos suponer que la sobreexpresión de *PnIAA30* en los ovarios sexuales en el estadio de premeiosis estaría arrojando el crecimiento y la división de las células nucelares para permitir la entrada a la meiosis exclusivamente de la CMM, mientras que la regulación negativa en los ovarios apomícticos posibilitaría la entrada en mitosis de las células nucelares alguna de las cuales podrían formar las iniciales de la aposporia. Por otro lado, en la antesis, la fuerte expresión de la hebra codificante de *PnIAA30* en los ovarios sexuales contribuiría a mantener quiescente el saco embrionario hasta la llegada de los núcleos espermáticos del polen, mientras que la regulación negativa en los ovarios apomícticos licenciaría a la célula huevo a realizar partenogénesis.

Es relevante destacar que recientemente se ha demostrado que la regulación mediada por sRNA de las vías de auxinas y el control de genes ARFs son fundamentales para promover la apomixis en *P. notatum* (Ortiz et al., 2019). Por otro lado, es importante destacar que se detectó una correlación relevante entre varios genes expresados diferencialmente durante el desarrollo reproductivo de *P. simplex* (Polegri et al., 2010) y *P. notatum* (Laspina et al., 2008), relacionados con el metabolismo de auxinas. Entre ellos, *P. simplex* B4/122-1 y *P. notatum* DDT13682x que corresponden a proteínas del tipo F-box, y *P. simplex* D4/153-8 y *P. notatum* DDT32844x1 correspondientes a enzimas de ubiquitinación (Ortiz et al., 2013). Estos antecedentes, sumados a los resultados que se describen más arriba, revelan la importancia del estudio del metabolismo de auxinas en relación a la reproducción apomíctica en *P. notatum*.

V.4- Análisis de genes pertenecientes a la familia AP2/ERF expresados durante el desarrollo reproductivo de *P. notatum*

El LOC_Os12g41060 (*OsAP2/ERF*) es otro de los genes candidatos presente en la región del cromosoma 12 de arroz sinténica al ACL de *Paspalum* (Hojsgaard et al., 2011). Este gen codifica para una proteína con dominio AP2, perteneciente a la superfamilia AP2/ERF (*APETALA2/ETHYLENE RESPONSIVE ELEMENT BINDING FACTOR*) también conocida como AP2/EREBP (*APETALA2/ETHYLENE RESPONSE ELEMENT-BINDING PROTEIN*) (Kim et al., 2006). Esta superfamilia integra a factores de transcripción importantes en el desarrollo y es una de las familias más extensas del reino vegetal (Kim et al., 2006). Los miembros de esta superfamilia desempeñan una gran variedad de funciones a lo largo del ciclo de vida de las plantas que incluyen desde regulaciones claves en procesos del crecimiento y desarrollo, como la determinación de la identidad de los órganos florales, la maduración de los frutos, el control de la identidad de las células epidérmicas de las hojas y mecanismos utilizados para responder a estreses bióticos y abióticos (Riechmann y Meyerowitz, 1998).

En este trabajo de tesis, no pudo detectarse ningún transcrito expresado en el transcriptoma floral similar al codificado por el locus LOC_Os12g41060. Sin embargo, utilizando como consulta sobre la base de datos de las proteínas predichas de *P. notatum*, seis miembros representativos del grupo de proteínas BBM (BABY BOOM) pertenecientes al clado *euANT*: *Oryza sativa*: OsBBM1, OsBBM2 y OsBBM3, *Brasica napus*: BnBBM1, *Arabidopsis thaliana*: AtBBM y *Pennisetum glaucum*: PsASGR-BBM-like1, y cinco miembros del clado *euAP2* perteneciente a la familia AP2-like (APETALA2-LIKE): *Rosa chinensis*: RcAP2-like, *Setaria itálica*: SiAP2-like, *Arabidopsis thaliana*: AtAP2-like, *Malus domestica* AHAP2 y *Oryza sativa*: APL25 (Jofuku et al., 1994; Boutilier, 2002; Zhou et al., 2012; Lata et al., 2014; Conner et al., 2015; Han et al., 2018; Jha y Kumar, 2018; Khanday et al., 2019), se identificaron nueve posibles miembros de la superfamilia AP2/ERF expresadas durante el desarrollo reproductivo. De las nueve proteínas, cuatro (codificadas por: isotig19745, isotig07297, isotig07295 y isotig36244) presentaran una elevada homología con los miembros representativos del grupo de proteínas BBM (BABY BOOM), y las cinco restantes (codificadas por: isotig06879, isotig06878, isotig31692, isotig23310, isotig23311) con miembros del clado *euAP2* perteneciente a la familia AP2-like. Teniendo en cuenta el número de miembros de la superfamilia AR2/ERF reportados en otras especies como por ejemplo *Arabidopsis* (147 miembros) (Dietz et al., 2010), soja (98) (Zhang et al., 2008), tomate (85) (Sharma et al., 2010), arroz (165) (Sharoni et al., 2011), papa (155) (Charfeddine et al., 2014) y *Brachypodium distachyon* (149) (Chen et al., 2016), es posible que dicha superfamilia en *P. notatum*

contenga aún más miembros de los identificados que por su baja expresión no hayan sido detectados durante la secuenciación y ensamblado.

Los análisis filogenéticos, incluyendo las seis secuencias proteicas BBM, las cinco AP2-like y las nueve detectadas en la base global del transcriptoma de *P. notatum*, arrojaron dos grupos coincidentes con los resultados de las búsquedas BLASTP. Uno de estos grupos está integrado por las proteínas las proteínas AP2-like y sus homólogas en *P. notatum*. Dos de estos transcriptos (isotigs 06879, 06878) pertenecientes al isogroup/gen 00558 nombrado como *PnAP2-like*, agruparon junto a las proteínas AP2-like de arroz (APL25) y *Setaria* (SiAP2-like), lo que indicaría ortología entre ellos. El otro grupo está conformado por las proteínas BBM y sus homólogos en *P. notatum*. Sin embargo, en este caso todas las secuencias de *P. notatum* formaron un grupo aparte.

PnAP2-like se encuentra representado por los isotigs 08399 y 08400 en el transcriptoma sexual y el isotig 32043 en apomítico. Los análisis de ligamiento de dicho gen con el modo reproductivo, empleando la población F₁, detectaron un alelo específico del genotipo materno sexual que cosegrega ligado al modo reproductivo sexual. La identidad de los fragmentos del genotipo sexual (PnAP2L_Q4188_SEX) y del apomítico (PnAP2L_Q4117_APO), coincidieron con los isotigs 08400 y 32043, respectivamente. Los resultados de las búsquedas BLASTN sobre la base de datos del NCBI, utilizando como consulta estas últimas secuencias, arrojaron homología con una secuencia codificantes AP2-like de *Setaria viridis*, y dos secuencias *TARGE OF EAT3 (TOE3)* de *Setaria italica* y *Panicum halli*. Los genes *TOE* pertenecen a la familia AP2-like, específicamente al clado *euAP2* también integrado por el gen homeótico *AP2*, se caracterizan por presentar un sitio de unión al micro miRNA172 (Kim et al., 2006; Shigyo et al., 2006) que, junto a otros miembros de la familia, regula postranscripcionalmente la expresión de estos genes (Aukerman y Sakai 2003; Chen, 2004; Lauter et al., 2005). En *Arabidopsis* la acumulación de miARN172 causa un defecto en la identidad de los órganos florales, similar a lo observado en las mutantes *ap2* con pérdida de función. (Chen, 2004; Teotia y Tang, 2015). Jung et al., (2014) observaron que plantas transgénicas de *Arabidopsis* que sobreexpresaron un gen *TOE3* (rTOE3-ox) “resistente” a miR172, presentaban flores indeterminadas, con numerosos estambres y órganos carpeloides. Al parecer *TOE3* se une al segundo intrón del gen *AGAMOUS (AG)* y, en consecuencia, la expresión de *AG* se reduce significativamente en plantas rTOE3-ox. También se ha demostrado que *TOE3* interactúa con el gen *AP2* en el núcleo, dado el papel principal de *AP2* en el patrón floral, miR172 probablemente regula a *TOE3* en dicho proceso, al menos en parte a través de *AP2* (Jung et al., 2014).

La red de interacciones proteína-proteína de AtAP2-like de Arabidopsis, homóloga a PnAP2-like, identificó una proteína denominada TOPLESS, miembro de la familia de proteínas GROUCHO (Gro)/Tup1 integrada por co-represores de la expresión génica, reclutados por una gran variedad de factores de transcripción de unión a ADN (Liu y Karmarkar, 2008). Las proteínas de la familia TOPLESS también interactúan con proteínas del tipo Aux/IAA, uniéndose a estas últimas para reprimir la acción de los factores de transcripción ARFs (Auxin Response Factors) (Szemenyei et al., 2008; Ito et al., 2016). Teniendo en cuenta los resultados y antecedentes expuestos, podríamos pensar en una regulación diferencial de *PnAP2-like* regida por miARN172 en plantas sexuales y apomícticas, posiblemente relacionada con la identidad celular durante la megasporogénesis y/o megagametogénesis de ambos genotipos. Aunque para poder confirmar dicha hipótesis deberían realizarse estudios más exhaustivos de expresión (qRT-PCR, RT-PCR e hibridaciones *in situ*) para *PnAP2-like*. Además, es relevante destacar que nuevamente las vías de señalización de auxinas están presentes en los procesos metabólicos asociados al modo de reproducción y a la apomixis en *P. notatum*.

Por otro lado, una de las proteínas de *P. notatum* (codificada por el isotig 36244) homóloga al grupo de proteínas BBM, renombrado como *PnBBM-like*, mostró una representación posiblemente diferencial entre los transcriptomas de C4-4x (sexual) y Q4117 (apomíctico), con un aumento de la expresión en este último. *PnBBM-like* se encuentra representado por los isotigs 04813 y 04886 en la base sexual y apomíctica del transcriptoma, respectivamente. Aunque no se pudo determinar su ligamiento con ACL de la especie, es importante destacar que representa un candidato interesante para continuar con su estudio, ya que se ha demostrado que los genes *BBM* están involucrados en la regulación de la totipotencia de células vegetales, la proliferación celular, la formación de brotes, la inducción de embriogénesis somática, el desarrollo, la promoción de la apogamia y la estimulación de la transformación (Boutilier et al., 2002; Passarinho et al., 2008; Heidmann et al., 2011; Lowe et al., 2016; Horstman et al., 2017; Bui et al., 2017). Además, se reportó que *BnBBM* en *Brassica napus* se expresa de manera preferencial y activa una ruta de transducción de señales que conduce a la inducción de células somáticas diferenciadas y a la formación de embriones somáticos (Boutilier et al., 2002). Curiosamente, el gen *PsASGR-BABYBOOM-like*, localizado en la región genómica asociada a la apomixis en *Pennisetum glaucum* (una especie de reproducción apomíctica), se expresa en óvulos antes de la fertilización e induce partenogénesis. La expresión ectópica de este gen en plantas sexuales induce a la generación de progenies haploides (Conne et al., 2015). Sumado a estos antecedentes, un estudio reciente realizado en arroz logró la generación de semillas clonales a partir de la combinación de mutantes MiMe (mitosis por meiosis) con una línea transgénica que expresa el gen

BABYBOOM1 de la propia especie (Khanday et al., 2019). Estos antecedentes indicarían un posible rol de los genes *BBM* en la partenogénesis de especies apospóricas como *P. notatum*.

VI- CONCLUSIONES

El presente trabajo de tesis estuvo dirigido a la caracterización molecular genes de *P. notatum* ortólogos a los genes de arroz **LOC_Os12g40770** (*OsANK-TPR*) que codifica para una proteína con repeticiones de anquirina, el **LOC_Os12g40890** (*OsIAA30*) miembro de la familia de genes Aux/IAA de respuesta temprana a auxinas y **LOC_Os12g41060** (*OsAP2/ERF*) codificante para una proteína con repeticiones AP2, localizados en un segmento del cromosoma 12 de arroz que resultó sinténico al ACL de la especie bajo estudio. Dado que estos genes están asociados a procesos de la división celular, respuestas a hormonas y desarrollo, los posibles ortólogos de *P. notatum* podrían estar relacionados con el cambio del modo reproductivo de sexualidad a apomixis que muestran los citotipos tetraploides naturales.

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo se pudo arribar a las siguientes conclusiones:

1) Existen al menos cuatro miembros de la subfamilia *ANK-TPR* expresados durante el desarrollo reproductivo de *P. notatum* (*PnANK-TPR1-4*). *PnANK-TPR3* resultó altamente similar a *OsANK-TPR* (LOC_Os12g40770) por lo cual califica como el presunto ortólogo.

2) *PnANK-TPR3* muestra diferencias significativas de expresión relativa entre el genotipo sexual y el apomítico durante los estadios de meiosis y antesis. Transcritos de este gen se sobreexpresan durante el desarrollo sexual en comparación con el apomítico. Las diferencias en el estadio de meiosis se mantienen entre individuos sexuales y apomíticos de la población F₁ (Q4188 x Q4117).

3) *PnANK-TPR3* muestra muy bajos niveles de expresión en tejido somático.

4) *PnANK-TPR3* formaría parte de una cascada de señalización involucrada en la determinación del destino de las células de la nucela y su posible canalización hacia la gametogénesis.

5) Se identificaron al menos 22 miembros de la familia *Aux/IAA* expresados durante el desarrollo floral de *P. notatum*, homólogos a 19 de los 31 miembros de la misma familia de arroz.

6) *PnIAA30* resultó altamente similar a *OsIAA30* (LOC_Os12g40890) y genéticamente ligada al ACL de *P. notatum* a una distancia de recombinación aproximada de $r = 0.30$.

7) El mapeo sobre el borrador del genoma diploide de *P. notatum* determinó que existe una buena colinealidad entre secuencias del ACL y de la región del cromosoma 12 de arroz sintenia a este. Entre estas se encuentra el marcador C1069 (100% ligado al ACL), los genes *ANK-TPR* (*OsANK-TPR* y *PnANK-TPR3*) y los genes *IAA30* (*OsIAA30* y *PnIAA30*).

8) El gen *PnIAA30* muestra niveles de expresión significativamente superiores en el genotipo sexual respecto del apomítico, durante la antesis y la embriogénesis. La diferencia en el estadio de antesis fue corroborada en individuos sexuales y apomíticos de la población F₁ (Q4188 x Q4117).

9) La expresión de *PnIAA30* presenta una asociación negativa con el grado de expresividad de la aposporia.

10) La expresión del gen *PnIAA30* entre los genotipos apomíticos y sexuales no mostró diferencias significativas en tejido somático (hoja).

11) La localización de la expresión del gen *PnIAA30* mostró diferencias durante las etapas de premeiosis/meiosis y antesis. El transcripto presentó fuerte expresión en la CMM del genotipo apomítico, mientras que en el genotipo sexual la CMM no mostró hibridación, pero si se detectó una fuerte expresión del transcripto en la nucela del óvulo. Asimismo, se evidenciaron claras diferencias en el estado de antesis.

12) La sobreexpresión de *PnIAA30* en la nucela de ovarios sexuales en el estadio de premeiosis arrestaría el crecimiento y la división de las células nucelares para permitir la entrada a la meiosis exclusivamente de la CMM, mientras que la regulación negativa en los ovarios apomíticos posibilitaría la entrada en mitosis de las células nucelares, alguna de las cuales podrían formar las iniciales de la aposporia.

13) La fuerte expresión de la hebra codificante de *PnIAA30* en los ovarios sexuales contribuiría a mantener quiescente al saco embrionario hasta la llegada de los núcleos espermáticos del polen, mientras que la regulación negativa en los ovarios apomíticos licenciaría a la célula huevo a realizar partenogénesis.

14) No se detectaron transcriptos similares a *OsAP2/ERF* (LOC_Os12g41060) expresados durante el desarrollo reproductivo de *P. notatum*. Esto quizás derive de la baja expresión de este tipo de factores de transcripción.

15) Se identificaron al menos nueve proteínas miembros de la superfamilia AP2/ERF expresadas durante el desarrollo reproductivo de *P. notatum*. Cuatro de estas resultaron homólogas a miembros del grupo de proteínas BBM (BABY BOOM) pertenecientes al clado *euANT*, y las cinco restantes a miembros del clado *euAP2* perteneciente a la familia AP2-like.

16) *PnAP2-like* resultó altamente similar a las proteínas APL25 (*Oryza sativa*) y SiAP2-like (*Seteria italica*), por lo que calificaría como un gen ortólogo de esta familia. Además, uno alelo de *PnAP2-like* es específico del genotipo sexual y muestra una cosegregación con el modo de reproducción sexual.

17) Fragmentos de *PnAP2-like* sexuales y apomícticas muestran una elevada homología con genes *AP2* y *TOE3* caracterizados por presentar un sitio de unión al micro miRNA172.

18) *PnBBM-like* mostró una representación diferencial entre los transcriptomas de C4-4x (sexual) y Q4117 (apomíctico), con un aumento de la expresión en este último, pudieron relacionarse con la partenogénesis en individuos apomícticos de la especie.

VII- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abel S, Nguyen MD, y Theologis A. (1995). The PS-IAA4/5-like family of early auxin-inducible mRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of molecular biology*, 251(4), 533-549.
- Abel S, Oeller PW, Theologis A (1994) Early auxin-induced genes encode short-lived nuclear proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 326-330.
- Abel S, Theologis A (1996) Early genes and auxin action. *Plant Physiology* 111: 9-17.
- Abràmoff MD, Magalhães PJ, Ram SJ (2004) Image processing with imageJ. *Biophotonics International* 11: 36-41.
- Acuña CA, Blount AR, Quesenberry KH, Hanna WW, Kenworthy KE (2007). Reproductive characterization of bahiagrass germplasm. *Crop Science*, 47(4), 1711-1717.
- Acuña CA, Blount AR, Quesenberry KH, Kenworthy KE, Hanna WW (2009) Bahiagrass tetraploid germplasm: Reproductive and agronomic characterization of segregating progeny. *Crop Science* 49: 581-588.
- 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.
- Acuña CA, Martínez EJ, Zilli AL, Brugnoli EA, Espinoza F, Marcón F, Urbani MH, Quarín CL (2019) Reproductive Systems in *Paspalum*: Relevance for Germplasm Collection and Conservation, Breeding Techniques, and Adoption of Released Cultivars. *Frontiers in Plant Science* 10: 1-17.
- 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 Interspecific Hybrids Derived from Sexual and Apomictic. *Crop Science* 55: 1947-1956.
- Aida M, Beis D, Heidstra R, Willemsen V, Blilou I, Galinha C, Nussaume L (2004) The PLETHORA genes mediate patterning of the *Arabidopsis* root stem cell niche. *Cell* 119: 109-120.
- 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(4), 1733-1741.
- Albert S, Després B, Guilleminot J, Bechtold N, Pelletier G, Delseny M, Devic M. (1999). The EMB506 gene encodes a novel ankyrin repeat containing protein that is essential for the normal development of *Arabidopsis* embryos. *Plant J* 17: 169-179

- Albertini E, Marconi G, Barcaccia G, Raggi L, Falcinelli M (2004) Isolation of candidate genes in *Poa pratensis* L. *Plant Mol Biol* 56: 879-894
- Albertini E, Marconi G, Reale L, Barcaccia G, Procceddu A, Ferranti F, Falcinelli M (2005) SERK and APOSTART. Candidates genes for apomixis in *Poa pratensis*. *Plant Physiology* 138: 2185-2199.
- Albertini E, Barcaccia G, Mazzucato A, Sharbel TF, Falcinelli M. (2010). Apomixis in the era of biotechnology. In *Plant developmental biology-Biotechnological perspectives* (pp. 405-436). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Albertini E, Barcaccia G, Carman JG, Pupilli F (2019) Did apomixis evolve from sex or was it the other way around? *Journal of experimental botany* 70: 2951-2964.
- Allen MD, Yamasaki K, Ohme-Takagi M, Tateno M, Suzuki M. (1998). A novel mode of DNA recognition by a β -sheet revealed by the solution structure of the GCC-box binding domain in complex with DNA. *The EMBO Journal*, 17(18), 5484-5496.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215: 403-410.
- Amiteye S, Corral JM, Vogel H, Sharbel TF. (2011). Analysis of conserved microRNAs in floral tissues of sexual and apomictic *Boechera* species. *BMC genomics*, 12(1), 500.
- Amiteye S, Corral JM, Vogel H, Kuhlmann M, Mette MF, Sharbel TF. (2013). Novel microRNAs and microsatellite-like small RNAs in sexual and apomictic *Boechera* species. *MicroRNA*, 2(1), 46-63.
- Asker SE; Jerling L (1992). *Apomixis in plants*. Boca Raton, USA: CRC Press.
- Aukerman MJ, Sakai H. (2003). Regulation of flowering time and floral organ identity by a microRNA and its *APETALA2-like* target genes. *The Plant Cell*, 15(11), 2730-2741.
- Bae W, Lee YJ, Kim DH, Lee J, Kim S, Sohn EJ, Hwang I. (2008). *AKR2A*-mediated import of chloroplast outer membrane proteins is essential for chloroplast biogenesis. *Nature cell biology*, 10(2), 220-227.
- Barcaccia G, Albertini E (2013) Apomixis in plant reproduction: A novel perspective on an old dilemma. *Plant Reproduction* 26(3): 159–179.
- Bashaw EC, Hovin AW, Holt EC. (1970). Apomixis, its evolutionary significance and utilization in plant breeding. In *Proceedings of the XI International Grassland Congress held at Surfers Paradise, Queensland, Australia, 13-23 April 1970*.
- Bassa C, Mila I, Bouzayen M, Audran-Delalande C (2012) Phenotypes associated with down-regulation of SI-IAA27 support functional diversity among aux/IAA family members in tomato. *Plant and Cell Physiology* 53: 1583-1595.
- Becerra C, Jahrmann T, Puigdomènech P, Vicient CM (2004) Ankyrin repeat-containing proteins in Arabidopsis: Characterization of a novel and abundant group of genes coding ankyrin-transmembrane proteins. *Gene* 340: 111-121.

- Benhamed M, Servet C, Zhou DX. (2006). Arabidopsis GCN5, HD1, and TAF1/HAF2 interact to regulate histone acetylation required for light-responsive gene expression. *The Plant Cell*, 18(11), 2893-2903.
- Blatch GL, Lässle M (1999) The tetratricopeptide repeat: A structural motif mediating protein-protein interactions. *BioEssays* 21: 932-939.
- Bork P. (1993). Hundreds of ankyrin-like repeats in functionally diverse proteins: mobile modules that cross phyla horizontally?. *Proteins* 17: 363–374.
- Bouaziz D, Charfeddine M, Jbir R, Saidi MN, Pirrello J, Charfeddine S, Bouzayen M, Gargouri-Bouazid R (2015) Identification and functional characterization of ten *AP2/ERF* genes in potato. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 123: 155-172.
- Boutillier K, Offringa R, Sharma VK, Kieft H, Ouellet T, Zhang L, Hattori J (2002) Ectopic Expression of BABY BOOM Triggers a Conversion from Vegetative to Embryonic Growth. *The Plant Cell* 14: 1737-1749.
- Bowman JL, Smyth DR, Meyerowitz EM. (1989). Genes directing flower development in Arabidopsis. *Plant Cell* 7, 37-52.
- Bowman JL, Smyth DR Meyerowitz EM. (1991). Genetic interactions among floral homeotic genes of Arabidopsis. *Development*, 112(1), 1-20.
- Bowman JL, Alvarez J, Weigel D, Meyerowitz EM, Smyth DR. (1993). Control of flower development in Arabidopsis thaliana by *APETALA* and interacting genes. *Development* 7 79,721-743.
- Bowman JL, Kohchi T, Yamato KT, Jenkins J, Shu S, Ishizaki K, Adam C. (2017). Insights into land plant evolution garnered from the *Marchantia polymorpha* genome. *Cell*, 171(2), 287-304.
- Breeden L, y Nasmyth K. (1987). Cell cycle control of the yeast HO gene: cis-and trans-acting regulators. *Cell*, 48(3), 389-397.
- Brukhin V, Baskar R (2019) A brief note on genes that trigger components of apomixis. *Journal of Biosciences* 44: 45.
- Burton GW (1940) A cytological study of some species in the genus *Paspalum*. *Journal of Agricultural Research* 60: 193-7.
- 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.
- Çakir B, Kiliçkaya O, Olcay AC (2013) Genome-wide analysis of *Aux/IAA* genes in *Vitis vinifera*: Cloning and expression profiling of a grape *Aux/IAA* gene in response to phytohormone and abiotic stresses. *Acta Physiologiae Plantarum* 35: 365-377.
- 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: 1179-1191.
- Calderón Villalobos LIA, Lee S, De Oliveira C, Ivetac A, Brandt W, Armitage L, Sheard LB (2012) A combinatorial TIR1/AFB-Aux/IAA co-receptor system for differential sensing of auxin. *Nature Chemical Biology* 8: 477-485.
- Campos-Rivero G, Osorio-Montalvo P, Sánchez-Borges R, Us-Camas R, Duarte-Aké, F, De-la-Peña C. (2017). Plant hormone signaling in flowering: an epigenetic point of view. *Journal of plant physiology*, 214, 16-27.
- 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.
- Carranco R, Espinosa JM, Prieto-Dapena P, Almoguer C, Jordano J. (2010). Repression by an auxin/indole acetic acid protein connects auxin signaling with heat shock factor-mediated seed longevity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(50), 21908-21913.
- 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.
- Cervigni GD, Paniego N, Diaz M, Selva JP, Zappacosta D, Zanazzi D, Landerreche I, Martelotto L, Felitti S, Pessino S, Spangenberg G, Echenique V (2008) Expressed sequence tag analysis and development of associated markers in a near-isogenic plant system of *Eragrostis curvula*. *Plant Mol Biol* 67: 7-10.
- Chakrabarty B, Parekh N (2014) Identifying tandem Ankyrin repeats in protein structures. *BMC Bioinformatics* 15:
- Chase A (1939) *Paspalum* of South America. *Cont US Natl Herb Vol 28: Part1*.
- Chen L; Miyazaki C; Kojima A; Saito A; Adachi T (1999). Isolation and characterisation of a gene expressed during early embryo sac development in apomictic Guinea grass (*Panicum maximum*). *Journal of Plant Physiology* 154: 55-62.
- Chen L, Han J, Deng X, Tan S, Li L, Li L, Zhou J (2016) Expansion and stress responses of AP2/EREBP superfamily in *Brachypodium Distachyon*. *Scientific Reports* 6: 1-14.
- Chen X. (2004). A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in Arabidopsis flower development. *Science*, 303(5666), 2022-2025.
- Chomczynski P. (1993). A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques*, 15(3), 532-4.
- Chu HY, Wegel E, Osbourn A. (2011). From hormones to secondary metabolism: the emergence of metabolic gene clusters in plants. *The Plant Journal*, 66(1), 66-79.
- Coen ES, Meyerowitz EM. (1991). The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature*, 353(6339), 31-37.

- Colombo L, Franken J, Koetje E, van Went J, Dons HJ, Angenent GC, van Tunen AJ. (1995). The petunia MADS box gene FBP11 determines ovule identity. *The Plant Cell*, 7(11), 1859-1868.
- Colono C, Ortiz JPA, Permingeat HR, Souza Canada ED, Siena LA, Spoto N, Galdeano F et al. (2019) A Plant-Specific TGS1 Homolog Influences Gametophyte Development in Sexual Tetraploid *Paspalum notatum* Ovules. *Frontiers in Plant Science* 10: 1-14.
- Conner JA, Goel S, Gunawan G, Cordonnier-Pratt MM, Johnson VE, Liang C, Wang H et al. (2008) Sequence analysis of bacterial artificial chromosome clones from the apospory-specific genomic region of *Pennisetum* and *Cenchrus*. *Plant Physiology* 147: 1396-1411.
- Conner JA, Mookkan M, Huo H, Chae K, Ozias-Akins P (2015) A parthenogenesis gene of apomict origin elicits embryo formation from unfertilized eggs in a sexual plant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112: 11205-11210.
- Conner JA, Ozias-Akins, P. (2017). Apomixis: engineering the ability to harness hybrid vigor in crop plants. In *Plant Germline Development* (pp. 17-34). Humana Press, New York, NY.
- 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) *Plant Cell Structure and Ultrastructure*.
- Cui J, Yu M, Niu J, Yue Z, Xu Z. (2011). Expression of leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) inhibits the processing of uMtCK to induce cell death in a cell culture model system. *Bioscience reports*, 31(5), 429-437.
- d'Erfurth I, Cromer L, Jolivet S, Girard C, Horlow C, Sun Y, To JP, Berchowitz LE, Copenhaver GP, Mercier R (2010) The cyclin-A CYCA1; 2/TAM is required for the meiosis I to meiosis II transition and cooperates with OSD1 for the prophase to first meiotic division transition. *PLoS Genet*, 6(6), e1000989.
- Dash M, Malladi A. (2012). The *AINTEGUMENTA* genes, *MdANT1* and *MdANT2*, are associated with the regulation of cell production during fruit growth in apple (*Malus domestica* Borkh). *BMC plant biology*, 12(1), 98.
- Dawe RK, Lowry EG, Gent JI, Stitzer MC, Swentowsky KW, Higgins DM, Ross-Ibarra J et al. (2018) A Kinesin-14 Motor Activates Neocentromeres to Promote Meiotic Drive in Maize. *Cell* 173: 839-850.e18.
- De Oliveira FA, Vigna BBZ, Da Silva CC, Fávero AP, De Matta FP, Azevedo ALS, De Souza AP (2020) Coexpression and Transcriptome analyses identify active Apomixis-related genes in *Paspalum notatum* leaves. *BMC Genomics* 21: 1-15.
- De Smet I, y Jürgens G. (2007). Patterning the axis in plants—auxin in control. *Current opinion in genetics & development*, 17(4), 337-343.

- Depetris MB, Acuña CA, Pozzi FI, Quarín CL, Felitti SA (2018) Identification of genes related to endosperm balance number insensitivity in *Paspalum notatum*. *Crop Science* 58: 813-822.
- Depetris MB, Acuña CA, Gutierrez S, Marcón F, Felitti SA (2020) Fungal endophyte diversity in *Paspalum* and effects on plant growth. *Grass and Forage Science* 75: 316-325.
- Devos KM, Gale MD. (1997). Comparative genetics in the grasses. In *Oryza: From Molecule to Plant* (pp. 3-15). Springer, Dordrecht.
- Dharmasiri N, Estelle M (2004) Auxin signaling and regulated protein degradation. *Trends in Plant Science* 9: 302-308.
- Dietz KJ, Vogel MO, Viehhauser A (2010) AP2/EREBP transcription factors are part of gene regulatory networks and integrate metabolic, hormonal and environmental signals in stress acclimation and retrograde signalling. *Protoplasma* 245: 3-14.
- Dreher KA, Brown J, Saw RE, Callis J (2006) The Arabidopsis Aux/IAA protein family has diversified in degradation and auxin responsiveness. *Plant Cell* 18: 699-714.
- Dusi DMA (2001) Apomixis in *Brachiaria decumbens* Stapf. PhD thesis, University of Wageningen, Wageningen, 167: 151-162.
- Ebina M, Nakagawa H, Yamamoto T, Araya H, Tsuruta S, Takahra M y Nakayima K (2005) *Grassland Science* 51: 71-78.
- Effendi Y, Scherer GFE (2011) *AUXIN BINDING-PROTEIN1 (ABP1)*, a receptor to regulate auxin transport and early auxin genes in an interlocking system with *PIN* proteins and the receptor *TIR1*. *Plant Signaling and Behavior* 6: 1101-1103.
- Elliott RC, Betzner AS, Huttner E, Oakes MP, Tucker WQ, Gerentes D, Smyth DR. (1996). *AINTEGUMENTA*, an *APETALA2-like* gene of Arabidopsis with pleiotropic roles in ovule development and floral organ growth. *The Plant Cell*, 8(2), 155-168.
- Espinoza F, Daurelio LD, Pessino SC, Valle EM, Quarín CL (2006) Genetic characterization of *Paspalum notatum* accessions by AFLP markers. *Plant Syst Evol* 258: 147-159
- Fei X, Shi J, Liu Y, Niu J, Wei A (2019) The steps from sexual reproduction to apomixis. *Planta* 249: 1715-1730.
- Felitti SA, Seijo GG, González AM, Podio M, Laspina NV, Siena L, Ortiz JPA, Pessino SC (2011) Expression of *lorelei-like* genes in aposporous and sexual *Paspalum notatum* plants. *Plant Molecular Biology* 77: 337-354.
- Felitti SA, Acuña CA, Ortiz JPA, Quarín CL (2015) Transcriptome analysis of seed development in apomictic *Paspalum notatum*. *Annals of Applied Biology* 167: 36-54.
- Feng JX, Liu D, Pan Y, Gong W, Ma LG, Luo JC, Deng XW, Zhu YX (2005) An Annotation Update via cDNA Sequence Analysis and Comprehensive Profiling of Developmental, Hormonal or Environmental Responsiveness of the Arabidopsis *AP2/EREBP* Transcription Factor Gene Family. *Plant Molecular Biology* 59: 853-868.
- Fukaki H, Okushima Y, Tasaka M. (2007). Auxin-mediated lateral root formation in higher plants. *International review of cytology*, 256, 111-137.

- Gale MD, Devos KM (1998) Comparative genetics in the grasses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 1971-1974.
- Galla G, Siena LA, Ortiz JPA, Baumlein H, Barcaccia G, Pessino SC, Bellucci M, Pupilli F (2019) A Portion of the Apomixis *Locus* of *Paspalum Simplex* is Microsyntenic with an Unstable Chromosome Segment Highly Conserved Among *Poaceae*. *Scientific Reports* 9: 1-12.
- Garcia-Aguilar M, Michaud C, Leblanc O, Grimanelli D (2010) Inactivation of a DNA methylation pathway in maize reproductive organs results in apomixis-like phenotypes. *Plant Cell* 22: 3249-3267.
- Garcion C, Guilleminot J, Kroj T, Parcy F, Giraudat J, Devic M (2006) AKRP and EMB506 are two ankyrin repeat proteins essential for plastid differentiation and plant development in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 48: 895-906.
- Gates RN, Quarin CL, Pedreira CG. (2004). Bahiagrass. Warm-season (C4) grasses, 45, 651-680.
- Goel S, Chen Z, Conner JA, Akiyama Y, Hanna WW, y Ozias-Akins P. (2003). Delineation by fluorescence in situ hybridization of a single hemizygous chromosomal region associated with aposporous embryo sac formation in *Pennisetum squamulatum* and *Cenchrus ciliaris*. *Genetics*, 163(3), 1069-1082.
- Goldental-Cohen S, Israeli A, Ori N, Yasuor H (2017) Auxin response dynamics during wild-type and entire flower development in tomato. *Plant and Cell Physiology* 58: 1661-1672.
- Grimanelli D, García M, Kaszas E, Perotti E, Leblanc O (2003) Heterochronic Expression of Sexual Reproductive Programs during Apomictic Development in *Tripsacum*. *Genetics* 165: 1521-1531.
- Grimanelli D, Leblanc O, Espinosa E, Perotti E, González De León D, Savidan Y (1998) a. Mapping diplosporous apomixis in tetraploid *Tripsacum*: One gene or several genes? *Heredity*.80(1): 33.a
- Grimanelli D, Leblanc O, Espinosa E, Perotti E, de Leon DG, Savidan Y (1998) b. Non-Mendelian transmission of apomixis in maize-Tripsacum hybrids caused by a transmission ratio distortion. *Heredity* 80: 40-47
- Grimanelli D, Leblanc O, Perotti E, Grossniklaus U (2001) Developmental genetics of gametophytic apomixis. *Trends in Genetics*. 17(10): 597-604.
- Grossniklaus U, Nogler GA, Van Dijk PJ. (2001). How to avoid sex: the genetic control of gametophytic apomixis. *The plant cell*,13(7), 1491-1498.
- Grossniklaus U (2017) Polyspermy produces tri-parental seeds in maize. *Current Biology* 27: R1300-R1302.
- Guerin J, Rossel JB, Robert S, Tsuchiya T, Koltunow A. (2000). A *DEFICIENS* homologue is down-regulated during apomictic initiation in ovules of *Hieracium*. *Planta*, 210(6), 914-920.

- Guilfoyle T, Hagen G, Ulmasov T, Murfett J (1998) How does auxin turn on genes? *Plant Physiology* 118: 341-347.
- Guilfoyle TJ, Hagen G. (2007). Auxin response factors. *Current opinion in plant biology*, 10(5), 453-460.
- Guilfoyle TJ (2015) The PB1 domain in auxin response factor and aux/IAA proteins: A versatile protein interaction module in the auxin response. *Plant Cell* 27: 33-43.
- Guseman JM, Hellmuth A, Lanctot A, Feldman TP, Moss BL, Klavins E, Calderón Villalobos LIA, Nemhauser JL (2015) Auxin-induced degradation dynamics set the pace for lateral root development. *Development (Cambridge)* 142: 905-909.
- Ha CM, Jun JH, Nam HG, Fletcher JC. (2004). *BLADE-ON-PETIOLE1* encodes a BTB/POZ domain protein required for leaf morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 45(10), 1361-1370.
- Hamann T, Benkova E, Bäurle I, Kientz M, Jürgens G. (2002). The *Arabidopsis BODENLOS* gene encodes an auxin response protein inhibiting MONOPTEROS-mediated embryo patterning. *Genes & development*, 16(13), 1610-1615.
- Han Y, Tang A, Wan H, Zhang T, Cheng T, Wang J, Yang W et al. (2018) An *APETALA2* homolog, *RcAP2*, regulates the number of rose petals derived from stamens and response to temperature fluctuations. *Frontiers in Plant Science* 9: 1-12.
- Hand ML, Koltunow AMG (2014) The genetic control of apomixis: Asexual seed formation. *Genetics* 197: 441-450.
- Hanna WW, Bashaw EC (1987) Apomixis: its identification and use in plant breeding (1987) *Crop Sci.* 27: 1136-1139.
- Hanna WW, Dujardin M, Ozias-Akins P, Lubbers E, Arthur L (1993) Reproduction, cytology and fertility of pearl millet (*Pennisetum squamulatum*) Bc4 plants. *Journal of Heredity* 84: 213-216.
- Hardtke CS, Berleth T. (1998). The *Arabidopsis* gene *MONOPTEROS* encodes a transcription factor mediating embryo axis formation and vascular development. *The EMBO journal*, 17(5), 1405-1411.
- Haughn GW, Somerville CR. (1988). Genetic control of morphogenesis in *Arabidopsis*. *Developmental Genetics*, 9(2), 73-89.
- Heidmann I, de Lange B, Lambalk J, Angenent GC, Boutilier K (2011) Efficient sweet pepper transformation mediated by the *BABY BOOM* transcription factor. *Plant Cell Reports* 30: 1107-1115.
- 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.
- Horstman A, Willemsen V, Boutilier K, Heidstra R (2014) AINTEGUMENTA-LIKE proteins: Hubs in a plethora of networks. *Trends in Plant Science* 19: 146-157.

- Horstman A, Li M, Heidmann I, Weemen M, Chen B, Muino JM, Angenent GC, Boutiliera K (2017) The *BABY BOOM* transcription factor activates the *LEC1-ABI3-FUS3-LEC2* network to induce somatic embryogenesis. *Plant Physiology* 175: 848-857.
- Hu B, Jin J, Guo AY, Zhang H, Luo J, Gao G (2015) GSDS 2.0: An upgraded gene feature visualization server. *Bioinformatics* 31: 1296-1297.
- Huala E, Sussex IM. (1992). *LEAFY* interacts with floral homeotic genes to regulate *Arabidopsis* floral development. *Plant Cell* 4,901 -913.
- Huang BQ y Russell SD (1992) Female germ unit: organization, isolation and function. in: *Sexual reproduction in flowering plants*. Editado por Russell SD y Dumas C. Academic Press Inc. Harcourt Brace Jovanovich Publishers.
- Huang J, Chen F, Del Casino C, Autino A, Shen M, Yuan S, Peng J et al. (2006) An ankyrin repeat-containing protein, characterized as a ubiquitin ligase, is closely associated with membrane-enclosed organelles and required for pollen germination and pollen tube growth in lily. *Plant Physiology* 140: 1374-1383.
- Huang J, Zhao X, Yu H, Ouyang Y, Wang L, Zhang Q (2009) The ankyrin repeat gene family in rice: Genome-wide identification, classification and expression profiling. *Plant Molecular Biology* 71: 207-226.
- Huff DR, Bara JM (1993). Determining genetic origins of aberrant progeny from facultative apomictic Kentucky bluegrass using a combination of flow cytometry and silver stained RADP markers. *Theor Appl Genet* 87: 201 - 208.
- Rodrigues JC, Cabral GB, Dusi DM, de Mello LV, Rigden DJ, Carneiro VT. (2003). Identification of differentially expressed cDNA sequences in ovaries of sexual and apomictic plants of *Brachiaria brizantha*. *Plant molecular biology*, 53(6), 745-757.
- Irikova T, Grozeva S, Denev I. (2012). Identification of *BABY BOOM* and *LEAFY COTYLEDON* genes in sweet pepper (*Capsicum annuum L.*) genome by their partial gene sequences. *Plant Growth Regulation*, 67(2), 191-198.
- Irish VF, Sussex IM. (1990). Function of the *apetala1-1* gene during *Arabidopsis* floral development. *Plant Cell* 2,741 - 753
- Ito J, Fukaki H, Onoda M, Li L, Li C, Tasaka M, Furutani M (2016) Auxin-dependent compositional change in Mediator in ARF7- and ARF19-mediated transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113: 6562-6567.
- Jain M, Kaur N, Garg R, Thakur JK, Tyagi AK, Khurana JP (2006) Structure and expression analysis of early auxin-responsive *Aux/IAA* gene family in rice (*Oryza sativa*). *Functional and Integrative Genomics* 6: 47-59.
- Jain M, Nijhawan A, Arora R, Agarwal P, Ray S, Sharma P, et al., Khurana JP. (2007). F-box proteins in rice. Genome-wide analysis, classification, temporal and spatial gene expression during panicle and seed development, and regulation by light and abiotic stress. *Plant physiology*, 143(4), 1467-1483.

- Jarret RL, Ozias-Akins P, Phatak S, Nadimpalli R, Duncan R, Hiliard S. (1995). DNA contents in *Paspalum spp.* determined by flow cytometry. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 42(3), 237-242
- Jeon JS, Lee S, Jung KH, Jun SH, Jeong DH, Lee J, Kim C et al. (2000) T-DNA insertional mutagenesis for functional genomics in rice. *Plant Journal* 22: 561-570.
- Jessup RW, Burson BL, Burrow G, Wang YW, Chang C, Li Z, Hussey MA et al. (2003). Segmental allotetraploidy and allelic interactions in buffelgrass (*Pennisetum ciliare* (L.) Link syn. *Cenchrus ciliaris* L.) as revealed by genome mapping. *Genome*, 46(2), 304-313.
- Jha P, Kumar V (2018) *BABY BOOM (BBM)*: a candidate transcription factor gene in plant biotechnology. *Biotechnology Letters* 40: 1467-1475.
- Jiang H, Wu Q, Jin J, Sheng L, Yan H, Cheng B, Zhu S (2013) Genome-wide identification and expression profiling of ankyrin-repeat gene family in maize. *Development Genes and Evolution* 223: 303-318.
- Jiang M, Hu H, Kai J, Traw MB, Yang S, Zhang X (2019) Different knockout genotypes of *OsAA23* in rice using CRISPR/Cas9 generating different phenotypes. *Plant Molecular Biology* 100: 467-479.
- Jofuku K D, Den Boer BG, Van Montagu M, Okamoto JK. (1994). Control of Arabidopsis flower and seed development by the homeotic gene *APETALA2*. *The Plant Cell*, 6(9), 1211-1225.
- Jung J, Lee S, Yun J, Lee M, Park C (2014) Plant Science The miR172 target *TOE3* represses *AGAMOUS* expression during Arabidopsis floral patterning. *Plant Science* 215-216: 29-38.
- Juranić M, Tucker MR, Schultz CJ, Shirley NJ, Taylor JM, Spriggs A., Koltunow AM et al. (2018). Asexual female gametogenesis involves contact with a sexually-fated megaspore in apomictic *Hieracium*. *Plant physiology*, 177(3), 1027-1049.
- Kalluri UC, Difazio SP, Brunner AM, Tuskan GA (2007) Genome-wide analysis of *Aux/IAA* and *ARF* gene families in *Populus trichocarpa*. *BMC Plant Biology* 7: 1-14.
- Kato H, Kouno M, Takeda M, Suzuki H, Ishizaki K, Nishihama R, Kohchi T. (2017). The roles of the sole activator-type auxin response factor in pattern formation of *Marchantia polymorpha*. *Plant and Cell Physiology*, 58(10), 1642-1651.
- Keller B, Feuillet C. (2000). Colinearity and gene density in grass genomes. *Trends in plant science*, 5(6), 246-251.
- Kepinski S, Leyser O (2005) The Arabidopsis F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* 435: 446-451.
- 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.
- Kidinger B, Bai D, Sokolov V (1996) Assignment of a gene(s) conferring apomixis in *Tripsacum* to a chromosome arm: cytological and molecular evidence. *Genome* 39: 1133-1141.

- Kim S, Soltis PS, Wall K, Soltis DE (2006) Phylogeny and domain evolution in the *APETALA2-like* gene family. *Molecular Biology and Evolution* 23: 107-120.
- Klucher KM, Chow H, Reiser L, Fischer RL. (1996). The *AINTEGUMENTA* gene of *Arabidopsis* required for ovule and female gametophyte development is related to the floral homeotic gene *APETALA2*. *The Plant Cell*, 8(2), 137-153.
- Koenig D, Bayer E, Kang J, Kuhlemeier C, Sinha N. (2009). Auxin patterns *Solanum lycopersicum* leaf morphogenesis. *Development*, 136(17), 2997-3006.
- Koltunow AM, Grossniklaus U (2003) APOMIXIS: A Developmental Perspective. *Annual Review of Plant Biology* 54: 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.
- Hand ML, Koltunow AM. (2014). The genetic control of apomixis: asexual seed formation. *Genetics*, 197(2), 441-450.
- Komaki MK, Okada K, Nishino E, Shimura Y. (1988). Isolation and characterization of novel mutants of *Arabidopsis thaliana* defective in flower development. *Development* 704, 195-203.
- Krizek BA. (1999). Ectopic expression of *AINTEGUMENTA* in *Arabidopsis* plants results in increased growth of floral organs. *Developmental genetics*, 25(3), 224-236.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K (2018) MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35: 1547-1549.
- Kunst L, Klenz JE, Martinez-Zapater J, Haughn GW. (1989). *AP2* gene determines the identity of perianth organs in flowers of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 7,1195-1208
- Laspina NV, 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.
- Lata C, Mishra AK, Muthamilarasan M, Bonthala VS, Khan Y, Prasad M (2014) Genome-wide investigation and expression profiling of AP2/ERF transcription factor superfamily in foxtail millet (*Setaria italica* L.). *PLoS ONE* 9: 1-14.
- Lauter N, Kampani A, Carlson S, Goebel M, Moose SP. (2005). microRNA172 down-regulates *glossy15* to promote vegetative phase change in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(26), 9412-9417.
- Lavy M, Estelle M (2016) Mechanisms of auxin signaling. *Development (Cambridge)* 143: 3226-3229.
- 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; Armstead I; Pessino SC; Ortiz JPA; Evans C; do Valle CB; Hayward MD (1997) Non-radioactive mRNA fingerprinting to visualise gene expression in mature ovaries of *Brachiaria* hybrids derived from *B. brizantha*, an apomictic tropical forage. *Plant Science* 126: 49-58.
- Leon-Kloosterziel KM, Keijzer CJ, Koornneef M. (1994). A seed shape mutant of *Arabidopsis* that is affected in integument development. *The Plant Cell*, 6(3), 385-392.
- Li G, Suggs J, Gill T. (2002). The effect of anterior cruciate ligament injury on knee joint function under a simulated muscle load: a three-dimensional computational simulation. *Annals of biomedical engineering*, 30(5), 713-720.
- Li H (2016) Minimap and minimiasm: Fast mapping and de novo assembly for noisy long sequences. *Bioinformatics* 32: 2103-2110.
- Li L, Wetzel S, Plückthun A, Fernandez JM. (2006). Stepwise unfolding of ankyrin repeats in a single protein revealed by atomic force microscopy. *Biophysical journal*, 90(4), L30-L32.
- Li SB, Xie ZZ, Hu CG, Zhang JZ (2016) A review of auxin response factors (ARFs) in plants. *Frontiers in Plant Science* 7: 1-7.
- Liscum E, Reed JW (2002) Genetics of *Aux/IAA* and *ARF* action in plant growth and development. *Plant Molecular Biology* 49: 387-400.
- Liu ZW, Wang RC, 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(5), 599-605.
- Liu Z, Franks RG, Klink VP (2000) Regulation of gynoeceium marginal tissue formation by *LEUNIG* and *AINTEGUMENTA*. *Plant Cell* 12: 1879-1891.
- Ljung K. (2013). Auxin metabolism and homeostasis during plant development. *Development*, 140(5), 943-950.
- Lowe K, Wu E, Wang N, Hoerster G, Hastings C, Cho MJ, Scelonge C et al. (2016) Morphogenic regulators Baby boom and Wuschel improve monocot transformation. *Plant Cell* 28: 1998-2015.
- Lu H, Liu Y, Greenberg JT. (2005). Structure–function analysis of the plasma membrane-localized *Arabidopsis* defense component ACD6. *The Plant Journal*, 44(5), 798-809.
- Ludwig Y, Zhang Y, Hochholdinger F (2013) The maize (*Zea mays* L.) *AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID* gene family: Phylogeny, synteny, and unique root-type and tissue-specific expression patterns during development. *PLoS ONE* 8: 1-12.
- Ludwig-Müller J (2014) Auxin homeostasis, signaling, and interaction with other growth hormones during the clubroot disease of *Brassicaceae*. *Plant Signaling and Behavior* 9:
- Luo J, Zhou JJ, Zhang JZ (2018) *Aux/IAA* gene family in plants: Molecular structure, regulation, and function. *International Journal of Molecular Sciences* 19: 1-17.

- Lux S, John K, Bennet V. (1990). Analysis of cDNA for human erythrocyte ankyrin indicates a repeated structure with homology to tissue-differentiation and cell-cycle control proteins. *Nature* 344: 36-42.
- Mancini M, Woitovich N, Permingeat HR, Podio M, Siena LA, Ortiz JPA, Pessino SC, Felitti SA (2014) Development of a modified transformation platform for apomixis candidate genes research in *Paspalum notatum* (bahiagrass). *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 50: 412-424.
- Mancini M, Permingeat H, Colono C, Siena L, Pupilli F, Azzaro C, de Alencar Dusi DM et al. (2018) The *MAP3K-coding QUI-GON JINN (QGJ)* gene is essential to the formation of unreduced embryo sacs in paspalum. *Frontiers in Plant Science* 871.
- 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.
- Martínez EJ, Urbani MH, Quarín CL, Ortiz JPA (2001) Inheritance of Apospory in Bahiagrass, *Paspalum Notatum*. *Hereditas* 135: 19-25.
- Martínez EJ, Hopp HE, Stein J, Ortiz JPA (2003) Genetic characterization of apospory in tetraploid *Paspalum notatum* based on the identification of linked molecular markers. 1-9.
- 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.
- Mau M, Corral JM, Vogel H, Melzer M, Fuchs J, Kuhlmann M, Sharbel TF, et al. (2013). The conserved chimeric transcript *UPGRADE2* is associated with unreduced pollen formation and is exclusively found in apomictic *Boechera* species. *Plant physiology*, 163(4), 1640-1659.
- Mau M, Lovell JT, Corral JM, Kiefer C, Koch MA, Aliyu OM, Sharbel TF. (2015). Hybrid apomicts trapped in the ecological niches of their sexual ancestors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(18), E2357-E2365.
- Mazzucato A. (1995). Italian germplasm of *Poa pratensis* L. 2: Isozyme progeny test to characterize genotypes for their mode of reproduction. *Journal of Genetics and Breeding (Italy)*.
- Mazzucato A, Cellini F, Bouzayen M, Zouine M, Mila I, Minoia S, Petrozza A et al. (2015) A *TILLING* allele of the tomato *Aux/IAA9* gene offers new insights into fruit set mechanisms and perspectives for breeding seedless tomatoes. *Molecular Breeding* 35.
- McKenney PT, Driks A, Eichenberger P. (2013). The Bacillus subtilis endospore: assembly and functions of the multilayered coat. *Nature Reviews Microbiology*, 11(1), 33-44.
- Michaelis P, Bennett V. (1992). The ANK repeat: A ubiquitous motif involved in macromolecular recognition. *Trends Cell Biol* 2: 127–129.

- Michelmore RW, Paran I, Kesseli RV. (1991). Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proceedings of the national academy of sciences*, 88(21), 9828-9832.
- Mizukami Y, Fischer RL. (2000). Plant organ size control: *AINTEGUMENTA* regulates growth and cell numbers during organogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(2), 942-947.
- Mlotshwa S, Yang Z, Kim Y, Chen X. (2006). Floral patterning defects induced by Arabidopsis APETALA2 and microRNA172 expression in *Nicotiana benthamiana*. *Plant molecular biology*, 61(4-5), 781-793.
- Modrusan Z, Reiser L, Feldmann KA, Fischer RL, Haughn GW. (1994). Homeotic transformation of ovules into carpel-like structures Arabidopsis. *Plant Cell* 6,333-349.
- Moffatt BA, y Weretilnyk EA. (2001). Sustaining S-adenosyl-l-methionine-dependent methyltransferase activity in plant cells. *Physiologia Plantarum*, 113(4), 435-442.
- Morgan RN, Ozias-Akins P, Hanna WW (1998) Seed set in an apomictic BC3 pearl millet. *International Journal of Plant Science* 159: 89-97. Moore.
- Morrone O, Aagesen L, Scataglini MA, Salariato DL, Denham SS, Chemisquy MA, Zuloaga FO, et al. (2012). Phylogeny of the *Panicaceae* (*Poaceae: Panicoideae*): integrating plastid DNA sequences and morphology into a new classification. *Cladistics*, 28(4), 333-356.
- Mosavi LK, Cammett TJ, Desrosiers DC, Peng Z (2004) The ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition. *Protein Science* 13: 1435-1448.
- Mou S, Liu Z, Guan D, Qiu A, Lai Y, He S. (2013). Functional analysis and expressional characterization of rice ankyrin repeat-containing protein, *OsPIANK1*, in basal defense against *Magnaporthe oryzae* attack. *PLoS One*, 8(3), e59699.
- Ni J, Wang G, Zhu Z, Zhang H, Wu Y, Wu P (2011) *OsIAA23*-mediated auxin signaling defines postembryonic maintenance of QC in rice. *Plant Journal* 68: 433-442.
- Nicora E, Agrasar ZER (1987) Los géneros de gramíneas de América Austral: Argentina, Chile, Uruguay y áreas limítrofes de Bolivia, Paraguay y Brasil. Buenos Aires: Hemisferio Sur.
- Nogler GA (1984a) Gametophytic apomixis. En: Johri BM (ed). *Embryology of angiosperms*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 475-518.
- Nole-Wilson S, Tranby TL, Krizek BA. (2005). *AINTEGUMENTA-like (AIL)* genes are expressed in young tissues and may specify meristematic or division-competent states. *Plant molecular biology*, 57(5), 613-628.
- Nonomura AK, Miyoshi K, Eiguchi M, Suzuki T, Miyao A, Hirochika H, Kurata N et al. (2015) The *MSP1* Gene Is Necessary to Restrict the Number of Cells Entering into Male and Female Sporogenesis and to Initiate Anther Wall Formation in Rice Published by: American Society of Plant Biologists (ASPB) Linked references are available on JSTOR for t. 15: 1728-1739.

- Nowack MK, Grini PE, Jakoby MJ, Lafos M, Koncz C, Schnittger A (2006) A positive signal from the fertilization of the egg cell sets off endosperm proliferation in angiosperm embryogenesis. *Nature Genetics* 38: 63-67.
- Noyes RD, Rieseberg LH (2000) Two independent *loci* control agamospermy (Apomixis) in the triploid flowering plant *Erigeron annuus*. *Genetics* 155: 379-390.
- Nützmann HW, Scazzocchio C, Osbourn A. (2018). Metabolic gene clusters in eukaryotes. *Annual Review of Genetics*, 52, 159-183.
- Oeller PW, Keller JA, Parks JE, Silbert JE, Theologis A (1993) Structural characterization of the early indoleacetic acid-inducible genes, *PS-IAA4/5* and *PS-IAA6*, of pea (*Pisum sativum* L.). *Journal of Molecular Biology* 233: 789-798.
- Ogawa D, Johnson SD, Henderson ST, Koltunow AM. (2013). Genetic separation of autonomous endosperm formation (AutE) from the two other components of apomixis in *Hieracium*. *Plant Reproduction*, 26(2), 113-123.
- Ohme-Takagi M, Shinshi H. (1995). Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. *The Plant Cell*, 7(2), 173-182.
- Ohto MA, Fischer RL, Goldberg RB, Nakamura K, Harada JJ. (2005). Control of seed mass by *APETALA2*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(8), 3123-3128.
- Okamura JK, Caster B, Villarreal R, Van Montagu M, Jofuku KD. (1997). The AP2 domain of *APETALA2* defines a large new family of DNA binding proteins in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(13), 7076-7081.
- 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.
- Oppenheimer DG, Pollock MA, Vacik J. (1997). Essential role of a kinesin-like protein in Arabidopsis trichome morphogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 94: 6261–6266.
- Ortiz JPA, Pessino SC, Leblanc O, Hayward MD y CL Quarin (1997) Genetic fingerprinting for determining the mode of reproduction in *Paspalum notatum*, a subtropical apomictic forage grass. *Theor Appl Genet* 95: 850-856.
- Ortiz, JPA.; Pessino, SC; Bhat, V; Hayward, MD; Quarin, CAL. (2001). A genetic linkage map of diploid *Paspalum notatum*. *Crop Science, Madison* 4: 1-4.
- Ortiz JPA, Quarin 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.
- Ortiz JPA, Revale S, Siena LA, Podio M, Delgado L, Stein J, Leblanc O, Pessino SC (2017) A reference floral transcriptome of sexual and apomictic *Paspalum notatum*. *BMC Genomics* 18: 1-14.
- Ortiz JPA, Leblanc O, Rohr C, Grisolia M, Siena LA, Podio M, Colono C et al. (2019) Small rna-seq reveals novel regulatory components for apomixis in *Paspalum notatum*. *BMC Genomics* 20(1), 487.

- Ortiz JPA, Siena LA, Grisolia M, Rohr C, Vazquez M, Podio M, Mariac C, Pessino SC, Leblanc O (2019). Progress towards the generation of a reference genome of *Paspalum notatum*. XVII Congreso Latinoamericano de Genética. Mendoza, Argentina. E-ISSN: 1852-6322
- Ouakfaoui S El, Schnell J, Abdeen A, Colville A, Labbé H, Han S, Baum B et al. (2010) Control of somatic embryogenesis and embryo development by *AP2* transcription factors. *Plant Molecular Biology* 74: 313-326.
- Ozias-Akins P, Lubbers EL, Hanna WW, McNay JW. (1993). Transmission of the apomictic mode of reproduction in *Pennisetum*: co-inheritance of the trait and molecular markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 85(5), 632-638.
- Ozias-Akins, P; Roche, D; Hanna, WW (1998) Tight clustering and hemizygoty of apomixis-linked molecular markers in *Pennisetum squamulatum* implies genetic control of apospory by divergent *locus* that may have no allelic form in sexual genotypes. *Proceedings of National Academy of Sciences, USA* 95: 5127-5132.
- Ozias-Akins P, van Dijk PJ. (2007) Mendelian genetics of apomixis in plants. *Annu Rev Genet* 41: 509-537.
- Ozias-Akins P, Conner JA (2020) Clonal Reproduction through Seeds in Sight for Crops. *Trends in Genetics* 36: 215-226.
- Paeng SK, Kang CH, Chi YH, Chae HB, Lee ES, Park JH, Wi SD et al. (2020) *AtTPR10* containing multiple ANK and TPR domains exhibits chaperone activity and heat-shock dependent structural switching. *Applied Sciences (Switzerland)* 10.
- Parry G, Calderon-Villalobos LI, Prigge M, Peret B, Dharmasiri S, Itoh H, Lechner E et al. (2009) Complex regulation of the *TIR1/AFB* family of auxin receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 22540-22545.
- Passarge E, Horsthemke B, Farber RA. (1999). Incorrect use of the term synteny. *Nat Genet*, 23(4), 387.
- Passarinho P, Ketelaar T, Xing M, Van Arkel J, Maliepaard C, Hendriks MW, Joosen R et al. (2008) *BABY BOOM* target genes provide diverse entry points into cell proliferation and cell growth pathways. *Plant Molecular Biology* 68: 225-237.
- Pawlowski WP, Wang CJR, Golubovskaya IN, Szymaniak JM, Shi L, Hamant O, Cande WZ et al. (2009). Maize *AMEIOTIC1* is essential for multiple early meiotic processes and likely required for the initiation of meiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(9), 3603-3608.
- Pelaz S, Ditta GS, Baumann E, Wisman E, Yanofsky MF. (2000). B and C floral organ identity functions require *SEPALLATA MADS-box* genes. *Nature*, 405(6783), 200-203.
- Pessino SC, Evans C, Ortiz JPA, Armstead I, Do Valle CB, Hayward MD (1998) A genetic map of the apospory-region in *Brachiaria* hybrids: Identification of two markers closely associated with the trait. *Hereditas* 128: 153-158.
- Pessino SC, Espinoza F, Martínez 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.

- Peterson AT, Soberón J, Sánchez-Cordero V. (1999). Conservatism of ecological niches in evolutionary time. *Science*, 285(5431), 1265-1267.
- Petrov, DF; Belousova, NI; Fokina, ES (1979) Inheritance of apomixis and its elements in corn-Tripsacum hybrids. *Genetika* 15: 1827-1836.
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29: 45e - 45.
- Ploense SE, Wu MF, Nagpal P, Reed JW (2009) A gain-of-function mutation in *IAA18* alters Arabidopsis embryonic apical patterning. *Development* 136: 1509-1517.
- 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. *Journal of Experimental Botany* 61: 1869-1883.
- Prasad BD, Goel S, Krishna P (2010) *In Silico* identification of carboxylate clamp type tetratricopeptide repeat proteins in Arabidopsis and rice as putative co-chaperones of Hsp90/Hsp70. *PLoS ONE* 5: 1-18.
- Preuss ML, Delmer DP, Liu B. (2003). The cotton kinesin-like calmodulin-binding protein associates with cortical microtubules in cotton fibers. *Plant Physiology* 132: 154–160
- 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, Martínez 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.
- Pupilli F, Barcaccia G (2012) Cloning plants by seeds: Inheritance models and candidate genes to increase fundamental knowledge for engineering apomixis in sexual crops. *Journal of Biotechnology* 159: 291-311.

- Quarin CL, Burson BL, Burton GW. (1984). Cytology of intra-and interspecific hybrids between two cytotypes of *Paspalum notatum* and *P. cromyorrhizon*. *Botanical Gazette*, 145(3), 420-426.
- Quarin CL, Lombardo EP (1986) Niveles de ploidía y distribución geográfica de *Paspalum quadrifarium* (Gramineae). *Mendeliana* 7: 101-107.
- Quarin CL (1992) The nature of apomixis and its origin in *Panicoid* grasses. *Apomixis Newsletter* 5: 8-15.
- Quarin, C. L. (1999). Effect of pollen source and pollen ploidy on endosperm formation and seed set in pseudogamous apomictic *Paspalum notatum*. *Sexual Plant Reproduction*, 11(6), 331-335.
- 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(5), 243-249.
- Quarin CL, Urbani MH, Blount AR, Martínez EJ, Hack CM, Burton GW, Quesenberry KH (2003) Registration of Q4188 and Q4205, sexual tetraploid germplasm lines of *Bahiagrass*. *Crop Sci.* 43: 745-746.
- Rebozzio RN, Rodríguez MP, Stein J, Ortiz JPA, Quarin CL, Espinoza F (2012) Validation of molecular markers linked to apospory in tetraploid races of bahiagrass, *Paspalum notatum* Flügge. *Molecular Breeding* 29: 189-198.
- Reddy A, Day I. (2000). The role of the cytoskeleton and a molecular motor in trichome morphogenesis. *Trends in Plant Science* 5: 503–505.
- Reed JW (2001) Roles and activities of Aux/IAA proteins in Arabidopsis. *Trends in Plant Science* 6: 420-425.
- Reiser L, Fischer RL (1993) The ovule and the embryo sac. *Plant Cell* 5: 1291-1301.
- Rhoades MW, Reinhart BJ, Lim LP, Burge CB, Bartel B, Bartel DP. (2002). Prediction of plant microRNA targets. *cell*, 110(4), 513-520.
- Richardson DN, Simmons MP, Reddy AS. (2006). Comprehensive comparative analysis of kinesins in photosynthetic eukaryotes. *BMC genomics*, 7(1), 18.
- Riechmann JL, Meyerowitz EM (1998) The *AP2/EREBP* family of plant transcription factors. *Biological Chemistry* 379: 633-646.
- Rieu I, Bots M, Mariani C, Weterings KAP. (2005). Isolation and expression analysis of a tobacco [*Nicotiana tabacum*] AINTEGUMENTA ortholog (NtANTL). *Plant and Cell Physiology* (Japan).
- Rinaldi MA, Liu J, Enders TA, Bartel B, Strader LC (2012) A gain-of-function mutation in IAA16 confers reduced responses to auxin and abscisic acid and impedes plant growth and fertility. *Plant Molecular Biology* 79: 359-373.
- Robert S, Kleine-Vehn J, Barbez E, Sauer M, Paciorek T, Baster P, Vanneste S et al. (2010) *ABP1* mediates auxin inhibition of clathrin-dependent endocytosis in arabidopsis. *Cell* 143: 111-121.

- Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 26(1), 139-140.
- Roche D, Cong P, Chen Z, Hanna WW, Gustine DL, Sherwood RT, Ozias-Akins P. (1999). An apospory-specific genomic region is conserved between Buffelgrass (*Cenchrus ciliaris* L.) and *Pennisetum squamulatum* Fresen. *The Plant Journal*, 19(2), 203-208.
- Roche D, Hanna WW, Ozias-Akins P (2001), Is Supernumerary Chromatin Involved in Gametophytic Apomixis of Polyploidy Plants?. *Sex Plant Reprod* 13: 343-349.
- Rodrigues JC, Cabral GB, Dusi DM, de Mello LV, Rigden DJ, Carneiro VT (2003) Identification of differentially expressed cDNA sequences in ovaries of sexual and apomictic plants of *Brachiaria brizantha*. *Plant Mol Biol* 53(6):745–757
- Roje S. (2006). S-Adenosyl-L-methionine: beyond the universal methyl group donor. *Phytochemistry*, 67(15), 1686-1698.
- Sakamoto H, Matsuda O, Iba K. (2008). *ITN1*, a novel gene encoding an ankyrin-repeat protein that affects the ABA-mediated production of reactive oxygen species and is involved in salt-stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 56(3), 411-422.
- Sakamoto H, Nakagawara Y, Oguri S (2013) The Expression of a Novel Gene Encoding an Ankyrin-Repeat Protein, *DRA1*, is Regulated by Drought-Responsive Alternative Splicing. 7: 3886.
- Salvo SA, Hirsch CN, Buell CR, Kaeppler SM, Kaeppler HF. (2014). Whole transcriptome profiling of maize during early somatic embryogenesis reveals altered expression of stress factors and embryogenesis-related genes. *PLoS One*, 9(10), e111407.
- Sartor ME, Espinoza F, Quarin CL (2009) Mode of Reproduction of Colchicine-Induced Tetraploids. *Crop Science* 49: 1270-1276.
- Savidan Y (2000) Apomixis: genetics and breeding. *Plant breeding reviews* 18: 13-86.
- 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.
- Schultz EA, Haughn GW. (1993). Genetic analyses of the floral initiation process (FLIP) in *Arabidopsis*. *Development* 779,745-765.
- Sciore P, Boykiw R, Hart DA (1998) Semiquantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction Analysis. 429-437.
- Sedgwick SG, Smerdon SJ (1999) The ankyrin repeat: A diversity of interactions on a common structural framework. *Trends in Biochemical Sciences* 24: 311-316.
- Seppy M, Manni M, Zdobnov EM (2019) BUSCO: Assessing genome assembly and annotation completeness. *Methods in Molecular Biology* 1962: 227-245.
- Shannon S, Meeks-Wagner DR. (1993). Genetic interactions that regulate inflorescence development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 5,639-655.

- Shannon S, Meeks-Wagner DR. (1993). Genetic interactions that regulate inflorescence development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 5(6), 639-655.
- Sharbel TF, Voigt ML, Corral JM, Thiel T, Varshney A, Kuhmlehn J, et al. (2009). Molecular signatures of apomictic and sexual ovules in the *Boechera holboellii* complex. *Plant J* 58: 870-882.
- Sharma MK, Kumar R, Solanke AU, Sharma R, Tyagi AK, Sharma AK (2010) Identification, phylogeny, and transcript profiling of *ERF* family genes during development and abiotic stress treatments in tomato. *Molecular Genetics and Genomics* 284: 455-475.
- Sharma P, Singh R, Sehrawat N (2020) A critical review on: Significance of floral homeotic APETALA2 gene in plant system. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 10: 124-130.
- Sharoni AM, Nuruzzaman M, Satoh K, Shimizu T, Kondoh H, Sasaya T, Choi IR et al. (2011) Gene structures, classification and expression models of the *AP2/EREBP* transcription factor family in rice. *Plant and Cell Physiology* 52: 344-360.
- Shen Z, Collatos AR, Bibeau JP, Furt F, Vidali L. (2012). Phylogenetic analysis of the Kinesin superfamily from *physcomitrella*. *Frontiers in plant science*, 3, 230.
- Shigyo M, Hasebe M, Ito M (2006) Molecular evolution of the AP2 subfamily. *Gene* 366: 256-265.
- Shigyo M, Ito M (2004) Analysis of gymnosperm two *AP2 domain-containing* genes. *Development Genes and Evolution* 214: 105-114.
- Shimkets LJ. (2013). Prokaryotic life cycles. *The Prokaryotes*, edited by E. Rosenberg EF DeLong S, Lory E, Stackebrandt, F. Thompson, Springer, Berlin, 317-336.
- 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.
- Singh S, Singh A, Yadav S, Gautam V, Singh A, Sarkar AK. (2017). Sirtinol, a Sir2 protein inhibitor, affects stem cell maintenance and root development in *Arabidopsis thaliana* by modulating auxin-cytokinin signaling components. *Scientific reports*, 7, 42450.
- Singh VK, Jain M (2015) Genome-wide survey and comprehensive expression profiling of *Aux/IAA* gene family in chickpea and soybean. *Frontiers in Plant Science* 6: 1-15.
- Sneath PH, Sokal RR. (1973). Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification.
- Sorrells ME, La Rota M, Bermudez-Kandianis CE, Greene RA, Kantety R, Munkvold JD, Miftahudin, Mahmoud A, Ma X, Gustafson PJ, Qi LL, et al. (2003): Comparative DNA sequence analysis of wheat and rice genomes. *Genome Res* 13: 1818-1827.

- Spillane C, Curtis MD, Grossniklaus U. (2004). Apomixis technology development—virgin births in farmers' fields?. *Nature biotechnology*, 22(6), 687-691.
- Spoto NL, Siena LA, Stein J, Pessino SC, Ortiz JPA. (2016). Caracterización molecular de genes de PPlasas asociadas a la apomixis en *Paspalum notatum*. ISBN 978-987-4055-04-0, 385-386.
- Stein J, Quarín CL, Martínez EJ, Pessino SC, Ortiz JPA (2004) Tetraploid races of *Paspalum notatum* show polysomic inheritance and preferential chromosome pairing around the apospory-controlling *locus*. *Theoretical and Applied Genetics* 109: 186-191.
- Stein J, Pessino SC, Martínez EJ, Rodríguez MP, Siena LA, Quarín CL, Ortiz JPA (2007) A genetic map of tetraploid *Paspalum notatum* Flügge (bahiagrass) based on single-dose molecular markers. *Molecular Breeding* 20: 153-166.
- Szemenyei H, Hannon M, Long JA (2008) *TOPLESS* mediates auxin-dependent transcriptional repression during Arabidopsis embryogenesis. *Science* 319: 1384-1386.
- Tabata R, Ikezaki M, Fujibe T, Aida M, Tian CE, Ueno Y, Yamamoto KT et al. (2010) Arabidopsis *AUXIN RESPONSE FACTOR6* and *8* regulate jasmonic acid biosynthesis and floral organ development via repression of class 1 *KNOX* genes. *Plant and Cell Physiology* 51: 164-175.
- Tadele Z, Bartels D (2019) Promoting orphan crops research and development. *Planta* 250: 675-676.
- Tan X, Calderon-Villalobos LIA, Sharon M, Zheng C, Robinson C V., Estelle M, Zheng N (2007) Mechanism of auxin perception by the *TIR1* ubiquitin ligase. *Nature* 446: 640-645.
- Tarchini R, Biddle P, Wineland R, Tingey S, Rafalski A. (2000). The complete sequence of 340 kb of DNA around the rice *Adh1–Adh2* region reveals interrupted colinearity with maize chromosome 4. *The Plant Cell*, 12(3), 381-391.
- Tashiro T, Ishida A, Hori M, Igisu M, Koike M, Méjean P, Komiya, T, et al. (2017). Early trace of life from 3.95 Ga sedimentary rocks in Labrador, Canada. *Nature*, 549(7673), 516-518.
- Teotia S, Tang G. (2015). To bloom or not to bloom: role of microRNAs in plant flowering. *Molecular plant*, 8(3), 359-377.
- Tester M, Langridge P. (2010). Breeding technologies to increase crop production in a changing world. *Science*, 327(5967), 818-822.
- Theologis A, Huynh TV, Davis RW (1985) Rapid induction of specific mRNAs by auxin in pea epicotyl tissue. *Journal of Molecular Biology* 183: 53-68.
- Tilman D, Balzer C, Hill J, Befort BL. (2011). Global food demand and the sustainable intensification of agriculture. *Proceedings of the national academy of sciences*, 108(50), 20260-20264.
- Tischler CR, Burson BL (1995) Evaluating different bahiagrass cytotypes for heat tolerance and leaf epicuticular wax content. *Euphytica* 84: 229-235.
- Tiwari SB, Hagen G, Guilfoyle TJ (2004) Aux/IAA Proteins Contain a Potent Transcriptional Repression Domain. *Plant Cell* 16: 533-543.

- Trenner J, Poeschl Y, Grau J, Gogol-Döring A, Quint M, Delker C (2017) Auxin-induced expression divergence between *Arabidopsis* species may originate within the TIR1/AFB-AUX/IAA-ARF module. *Journal of Experimental Botany* 68: 539-552.
- Ueta R, Abe C, Watanabe T, Sugano SS, Ishihara R, Ezura H, Osakabe Y, Osakabe K (2017) Rapid breeding of parthenocarpic tomato plants using CRISPR/Cas9. *Scientific Reports* 7: 1-8.
- Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG (2012) Primer3-new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* 40: 1-12.
- Urbani MH, Acuña CA, Doval DW, Sartor ME, Galdeano F, Blount AR, Quesenberry KH et al. (2017) Registration of 'Boyero UNNE' Bahiagrass. *Journal of Plant Registrations* 11: 26-32.
- Van Dijk P, Van Damme J (2000) Apomixis technology and the paradox of sex. *Trends in Plant Science*. 5(2), 81-84.
- 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 Dijk P. (2009). Apomixis: Basics for non-botanists. In *Lost sex* (pp. 47-62). Springer, Dordrecht.
- Vanstraelen M, Inzé D, Geelen D (2006) Mitosis-specific kinesins in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science* 11: 167-175.
- Vanstraelen M, Van Damme D, De Rycke R, Mylle E, Inzé D, Geelen D. (2006). Cell cycle-dependent targeting of a kinesin at the plasma membrane demarcates the division site in plant cells. *Current Biology*, 16(3), 308-314.
- Vielle-Calzada JP, Nuccio ML, Budiman MA, Thomas TL, Burson BL, Hussey MA y Wing RA (1996) Comparative gene expression in sexual and apomictic ovaries of *Pennisetum ciliare* (L.) Link. *Plant Molecular Biology* 32: 1085-1092.
- Vijverberg K, Ozias-Akins P, Schranz ME. (2019). Identifying and engineering genes for parthenogenesis in plants. *Frontiers in plant science*, 10, 128.
- Vo KTX, Kim CY, Chandran AKN, Jung KH, An G, Jeon JS (2015) Molecular insights into the function of ankyrin proteins in plants. *Journal of Plant Biology* 58: 271-284.
- Von Behrens I, Komatsu M, Zhang Y, Berendzen KW, Niu X, Sakai H, Taramino G, Hochholdinger F (2011) Rootless with undetectable meristem 1 encodes a monocot-specific AUX/IAA protein that controls embryonic seminal and post-embryonic lateral root initiation in maize. *Plant Journal* 66: 341-353.
- Vos JW, Safadi F, Reddy ASN, Hepler PK. (2000). The kinesin-like calmodulin binding protein is differentially involved in cell division. *The Plant Cell* 12: 979-990.
- Wang J, Yan DW, Yuan TT, Gao X, Lu YT (2013) A gain-of-function mutation in *IAA8* alters *Arabidopsis* floral organ development by change of jasmonic acid level. *Plant Molecular Biology* 82: 71-83.

- Wang JJ, y Guo HS. (2015). Cleavage of *INDOLE-3-ACETIC ACID INDUCIBLE28* mRNA by microRNA847 upregulates auxin signaling to modulate cell proliferation and lateral organ growth in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 27(3), 574-590.
- Wang X, Xu Y, Zhang S, Cao L, Huang Y, Cheng J, Wu G et al. (2017) Genomic analyses of primitive, wild and cultivated citrus provide insights into asexual reproduction. *Nature Genetics* 49: 765-772.
- Wang Y, Deng D, Bian Y, Lv Y, Xie Q (2010) Genome-wide analysis of primary auxin-responsive *Aux/IAA* gene family in maize (*Zea mays*. L.). *Molecular Biology Reports* 37: 3991-4001.
- Weijers D, Benkova E, Jäger KE, Schlereth A, Hamann T, Kientz M, Wilmoth JC et al. (2005) Developmental specificity of auxin response by pairs of *ARF* and *Aux/IAA* transcriptional regulators. *EMBO Journal* 24: 1874-1885.
- Weijers D, Wagner D (2016) Transcriptional Responses to the Auxin Hormone. *Annual Review of Plant Biology* 67: 539-574.
- Willemse MTM, Van Went JL. (1984). The female gametophyte. In *Embryology of angiosperms* (pp. 159-196). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Williams L, Carles CC, Osmon, KS, Fletcher JC. (2005). A database analysis method identifies an endogenous trans-acting short-interfering RNA that targets the Arabidopsis *ARF2*, *ARF3*, and *ARF4* genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(27), 9703-9708.
- Williams WM, Williamson ML, Real D. (2011). *Paspalum*. In *Wild crop relatives: Genomic and breeding resources* (pp. 197-216). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Wu J, Peng Z, Liu S, He Y, Cheng L, Kong F, Wang J, Lu G (2012) Genome-wide analysis of *Aux/IAA* gene family in *Solanaceae* species using tomato as a model. *Molecular Genetics and Genomics* 287: 295-311.
- Wu W, Liu Y, Wang Y, Li H, Liu J, Tan J, Ma H, et al. (2017). Evolution analysis of the *Aux/IAA* gene family in plants shows dual origins and variable nuclear localization signals. *International journal of molecular sciences*, 18(10), 2107.
- Würschum T, Groß-Hardt R, Laux T (2006) *APETALA2* regulates the stem cell niche in the Arabidopsis shoot meristem. *Plant Cell* 18: 295-307.
- Xie E, Li Y, Tang D, Lv Y, Shen Y, Cheng Z (2019) A strategy for generating rice apomixis by gene editing. *Journal of Integrative Plant Biology* 61: 911-916.
- Xie R, Pang S, Ma Y, Deng L, He S, Yi S, Lv Q, Zheng Y (2015) The *ARF*, *AUX/IAA* and *GH3* gene families in citrus: genome-wide identification and expression analysis during fruitlet drop from abscission zone A. *Molecular Genetics and Genomics* 290: 2089-2105.
- Xu T, Wen M, Nagawa S, Fu Y, Chen JG, Wu MJ, Perrot-Rechenmann C et al. (2010) Cell surface- and Rho GTPase-based auxin signaling controls cellular interdigitation in Arabidopsis. *Cell* 143: 99-110.

- Xu X, Jiang CZ, Donnelly L, Reid MS (2007) Functional analysis of a RING domain ankyrin repeat protein that is highly expressed during flower senescence. *Journal of Experimental Botany* 58: 3623-3630.
- Yamada-Akiyama H, Akiyama Y, Ebina M, Xu Q, Tsuruta SI, Yazaki J, Sugita SI, et al. (2009). Analysis of expressed sequence tags in apomictic guineagrass (*Panicum maximum*). *Journal of plant physiology*, 166(7), 750-761.
- Yamamuro C, Zhu JK, Yang Z. (2016). Epigenetic modifications and plant hormone action. *Molecular plant*, 9(1), 57-70.
- Young BA, Sherwood RT, Bashaw EC. (1979). Cleared-pistil and thick-sectioning techniques for detecting aposporous apomixis in grasses. *Canadian Journal of Botany*, 57(15), 1668-1672.
- Yu F, Shi J, Zhou J, Gu J, Chen Q, Li J, Cheng W et al. (2010) *ANK6*, a mitochondrial ankyrin repeat protein, is required for male-female gamete recognition in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 22332-22337.
- Yu H, Soler M, Clemente HS, Mila I, Paiva JAP, Myburg AA, Bouzayen M et al. (2015) Comprehensive genome-wide analysis of the *Aux/IAA* gene family in eucalyptus: Evidence for the role of *EgrIAA4* in wood formation. *Plant and Cell Physiology* 56: 700-714.
- Yuan X, Zhang S, Qing X, Sun M, Liu S, Su H, et al., Li X. (2013). Superfamily of ankyrin repeat proteins in tomato. *Gene*, 523(2), 126-136.
- 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.
- Zhang B, Peng Z. (2000). A minimum folding unit in the ankyrin repeat protein p16 (INK4). *J Mol Biol* 299: 1121-1132.
- Zhang G, Chen M, Chen X, Xu Z, Guan S, Li LC, Ma Y et al. (2008). Phylogeny, gene structures, and expression patterns of the ERF gene family in soybean (*Glycine max L.*). *Journal of experimental botany*, 59(15), 4095-4107.
- Zhang D, Wan Q, He X, Ning L, Huang Y, Xu Z, Liu J, Shao H (2016) Genome-wide characterization of the ankyrin repeats gene family under salt stress in soybean. *Science of the Total Environment* 568: 899-909.
- Zhang H, Scheirer D, Fowle W, Goodman H. (1992). Expression of antisense or sense RNA of an ankyrin repeat-containing gene blocks chloroplast differentiation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 4: 1575-1588.
- Zhao H, Guo M, Yan M, Cheng H, Liu Y, She Z, Lai L et al. (2020) Comparative Expression Profiling Reveals Genes Involved in Megasporogenesis. *Plant physiology* 182: 2006-2024.
- Zhou Y, Lu D, Li C, Luo J, Zhu BF, Zhu J, Shangguan Y et al. (2012) Genetic control of seed shattering in rice by the *APETALA2* transcription factor *Shattering Abortion1*. *Plant Cell* 24: 1034-1048.

- Zilli AL, Acuña CA, Schulz RR, Brugnoli EA, Guidalevich V, Quarín CL, Martínez EJ (2018) Widening the gene pool of sexual tetraploid bahiagrass: Generation and reproductive characterization of a sexual synthetic tetraploid population. *Crop Science* 58: 762-772.
- Zühl L, Volkert C, Ibberson D, Schmidt A. (2019). Differential activity of F-box genes and E3 ligases distinguishes sexual versus apomictic germline specification in *Boechera*. *Journal of experimental botany*, 70(20), 5643-5657.
- Zuloaga F., Morrone O. (2005). Revisión de las especies de *Paspalum* para América del Sur austral. Missouri Botanical Garden.
- Zilli AL, Brugnoli EA, Marcón F, Billa MB, Ríos EF, Martínez EJ, Acuña CA (2015) Heterosis and expressivity of apospory in tetraploid bahiagrass hybrids. *Crop Science* 55: 1189-1201.

VIII- ANEXO

Tabla VIII.1. Proteínas empleadas para la identificación de secuencias pertenecientes a la subfamilia ANK-TPR expresadas durante el desarrollo reproductivo de *P. notatum*.

Nombre del <i>Locus</i>	Especie	Dominios conservados	Referencia
LOC_Os01g07640	<i>Oryza sativa</i>	ANK-TPR	Huang et al., 2009
LOC_Os01g07980		ANK-TPR	
LOC_Os02g29130		ANK-TPR	
LOC_Os02g29140		ANK-TPR	
LOC_Os02g29160		ANK-TPR	
LOC_Os02g29190		ANK-TPR	
LOC_Os03g42350		ANK-TPR	
LOC_Os03g47620		ANK-TPR	
LOC_Os03g47640		ANK-TPR	
LOC_Os03g47650		ANK-TPR	
LOC_Os03g47670		ANK-TPR	
LOC_Os03g47686		ANK-TPR	
LOC_Os03g47720		ANK-TPR	
LOC_Os05g01310		ANK-TPR	
LOC_Os08g13640		ANK-TPR	
LOC_Os09g03630		ANK-TPR	
LOC_Os09g03680		ANK-TPR	
LOC_Os09g03750		ANK-TPR	
LOC_Os12g40770*		ANK-TPR	
LOC_Os12g43840		ANK-TPR	
LOC_Os12g43940	ANK-TPR		
Zm00001d030982	<i>Zea Mays</i>	ANK-TPR	Jiang et al., 2013
Zm00001d011102		ANK-TPR	
AT3G04710	<i>Arabidopsis thaliana</i>	ANK-TPR	Becerra et al., 2004

* *locus* presente en el segmento del cromosoma 12 de arroz flanqueado por los marcadores C996 y C1069 (Hojsgaard et al., 2011).

Tabla VIII.2. Proteínas de arroz empleadas para la identificación de secuencias con dominio Aux/IAA expresadas durante el desarrollo reproductivo de *P. notatum*.

Nombre del Locus (<i>Oryza sativa</i>)	Gen	Dominio conservado	Referencia
LOC_Os01g08320	<i>Os/AA1</i>	AUX/IAA	Jain et al., 2006
LOC_Os01g09450	<i>Os/AA2</i>	AUX/IAA	
LOC_Os01g13030	<i>Os/AA3</i>	AUX/IAA	
LOC_Os01g18360	<i>Os/AA4</i>	AUX/IAA	
LOC_Os01g48450	<i>Os/AA5</i>	AUX/IAA	
LOC_Os01g53880	<i>Os/AA6</i>	AUX/IAA	
LOC_Os02g13520	<i>Os/AA7</i>	AUX/IAA	
LOC_Os02g49160	<i>Os/AA8</i>	AUX/IAA	
LOC_Os02g56120	<i>Os/AA9</i>	AUX/IAA	
LOC_Os02g57250	<i>Os/AA10</i>	AUX/IAA	
LOC_Os03g43400	<i>Os/AA11</i>	AUX/IAA	
LOC_Os03g43410	<i>Os/AA12</i>	AUX/IAA	
LOC_Os03g53150	<i>Os/AA13</i>	AUX/IAA	
LOC_Os03g58350	<i>Os/AA14</i>	AUX/IAA	
LOC_Os05g08570	<i>Os/AA15</i>	AUX/IAA	
LOC_Os05g09480	<i>Os/AA16</i>	AUX/IAA	
LOC_Os05g14180	<i>Os/AA17</i>	AUX/IAA	
LOC_Os05g44810	<i>Os/AA18</i>	AUX/IAA	
LOC_Os05g48590	<i>Os/AA19</i>	AUX/IAA	
LOC_Os06g07040	<i>Os/AA20</i>	AUX/IAA	
LOC_Os06g22870	<i>Os/AA21</i>	AUX/IAA	
LOC_Os06g24850	<i>Os/AA22</i>	AUX/IAA	
LOC_Os06g39590	<i>Os/AA23</i>	AUX/IAA	
LOC_Os07g08460	<i>Os/AA24</i>	AUX/IAA	
LOC_Os08g01780	<i>Os/AA25</i>	AUX/IAA	
LOC_Os09g35870	<i>Os/AA26</i>	AUX/IAA	
LOC_Os11g11410	<i>Os/AA27</i>	AUX/IAA	
LOC_Os11g11420	<i>Os/AA28</i>	AUX/IAA	
LOC_Os11g11430	<i>Os/AA29</i>	AUX/IAA	
LOC_Os12g40890*	<i>Os/AA30</i>	AUX/IAA	
LOC_Os12g40900	<i>Os/AA31</i>	AUX/IAA	

* locus presente en el segmento del cromosoma 12 de arroz flanqueado por los marcadores C996 y C1069 (Hojsgaard et al., 2011).

Tabla VIII.3. Miembros de la familia ANK-TPR detectados mediante búsquedas BLASTP en la base de datos global del transcriptoma de *P. notatum*.

Query	Subject (<i>P. notatum</i>)	% ID	Largo de Alineamiento	e-value	Score
LOC_Os01g07640	-	-	-	-	-
LOC_Os01g07980	isotig19073	68,38	253	5e ⁻⁹⁴	340
LOC_Os02g29130	-	-	-	-	-
LOC_Os02g29140	-	-	-	-	-
LOC_Os02g29160	-	-	-	-	-
LOC_Os02g29190	-	-	-	-	-
LOC_Os03g42350	-	-	-	-	-
LOC_Os03g47620	-	-	-	-	-
LOC_Os03g47640	-	-	-	-	-
LOC_Os03g47650	-	-	-	-	-
LOC_Os03g47670	-	-	-	-	-
LOC_Os03g47686	-	-	-	-	-
LOC_Os03g47720	-	-	-	-	-
LOC_Os05g01310	isotig32130	82,3	452	0.0	685
LOC_Os08g13640	-	-	-	-	-
LOC_Os09g03630	-	-	-	-	-
LOC_Os09g03680	-	-	-	-	-
LOC_Os09g03750	-	-	-	-	-
LOC_Os12g40770*	isotig32953	60,57	421	2e ⁻¹³¹	465
	isotig35667	60,6	368	7e ⁻¹¹⁶	417
LOC_Os12g40780	isotig32953	58,08	413	2e ⁻¹²⁸	455
	isotig35667	57,5	360	2e ⁻¹⁰⁷	386
LOC_Os12g43840	-	-	-	-	-
LOC_Os12g43940	-	-	-	-	-
Zm00001d030982 (ZmANK7)	isotig32953	56,73	459	4e ⁻¹³⁵	478
Zm00001d011102 (ZmANK61)	isotig32130	88,55	454	0	777
AT3G04710	isotig32130	59,87	446	3e ⁻¹⁴¹	498

* locus presente en el segmento del cromosoma 12 de arroz flanqueado por los marcadores C996 y C1069 (Hojsgaard et al., 2011).

Tabla VIII.4. Miembros de la familia Aux/IAA detectados mediante búsquedas BLASTP en la base de datos global del transcriptoma de *P. notatum*.

Query (Oryza sativa)	Subject (<i>P. notatum</i>)	% ID	Largo de Alineamiento	e-value	Score
LOC_Os01g08320 (OsIAA1)	isotig37255	73,04	204	8e ⁻⁶⁸	253
LOC_Os01g09450 (OsIAA2)	-	-	-	-	-
LOC_Os01g13030 (OsIAA3)	-	-	-	-	-
LOC_Os01g18360 (OsIAA4)	-	-	-	-	-
LOC_Os01g48450 (OsIAA5)	isotig39351	76,12	201	3e ⁻⁷¹	265
LOC_Os01g53880 (OsIAA6)	isotig23440	63,38	325	7e ⁻⁹⁹	357
LOC_Os02g13520 (OsIAA7)	isotig38167	58,63	278	2e ⁻⁶⁴	243
LOC_Os02g49160 (OsIAA8)	-	-	-	-	-
LOC_Os02g56120 (OsIAA9)	isotig45013	59,04	188	1e ⁻⁴⁹	192
LOC_Os02g57250 (OsIAA10)	isotig22414	76,5	234	7e ⁻⁹⁰	327
LOC_Os03g43400 (OsIAA11)	isotig22209	59,14	279	8e ⁻⁷³	270
	isotig22208	56,22	249	8e ⁻⁵⁷	216
LOC_Os03g43410 (OsIAA12)	isotig37906	61,83	241	4e ⁻⁶¹	231
LOC_Os03g53150 (OsIAA13)	isotig22775	69,92	236	1e ⁻⁶¹	238
	isotig22774	70,25	242	3e ⁻⁶³	233
LOC_Os03g58350 (OsIAA14)	isotig12494	63,13	179	6e ⁻⁴⁷	183
LOC_Os05g08570 (OsIAA15)	-	-	-	-	-
LOC_Os05g09480 (OsIAA16)	isotig21828	52,57	253	8e ⁻⁴⁴	173
LOC_Os05g14180 (OsIAA17)	isotig05557	71,54	260	8e ⁻⁹¹	330
	isotig05558	71,54	260	8e ⁻⁹¹	330
	isotig05559	71,54	260	8e ⁻⁹¹	330
LOC_Os05g44810 (OsIAA18)	isotig34296	55,18	328	2e ⁻⁸¹	299
LOC_Os05g48590 (OsIAA19)	isotig35347	65,96	282	1e ⁻⁸⁷	319
LOC_Os06g07040 (OsIAA20)	-	-	-	-	-
LOC_Os06g22870 (OsIAA21)	isotig36834	76,32	266	7e ⁻⁹²	333
LOC_Os06g24850 (OsIAA22)	-	-	-	-	-
LOC_Os06g39590 (OsIAA23)	isotig36601	73,2	194	2e ⁻⁵⁵	211
LOC_Os07g08460 (OsIAA24)	isotig08196	61,95	205	4e ⁻⁵⁵	211
	isotig08195	63,29	207	1e ⁻⁵⁵	212
LOC_Os08g01780 (OsIAA25)	isotig35504	51,5	266	3e ⁻⁵⁵	211
LOC_Os09g35870 (OsIAA26)	-	-	-	-	-
LOC_Os11g11410 (OsIAA27)	-	-	-	-	-
LOC_Os11g11420 (OsIAA28)	-	-	-	-	-
LOC_Os11g11430 (OsIAA29)	-	-	-	-	-
LOC_Os12g40890 (OsIAA30)*	isotig33023	73,29	277	3e ⁻⁸⁴	308
LOC_Os12g40900 (OsIAA31)	-	-	-	-	-

* *locus* presente en el segmento del cromosoma 12 de arroz flanqueado por los marcadores C996 y C1069 (Hojsgaard et al., 2011).

Tabla VIII.5. Miembros de las subfamilias AP2-like y BBM detectados mediante búsquedas BLASTP en la base de datos global del transcriptoma de *P. notatum*.

Query	Subject (<i>P. notatum</i>)	Isoforma base SEX	Isoforma base APO	% ID	Alineamiento	e- value	Score
AtAP2-like AAC13770.1	isotig06879	isotig08400	isotig32043	85,64	188	5e-86	279
	isotig06878	isotig08399		77,84	176	5e-63	219
	isotig31692	isotig10774	isotig12508	70,09	224	2e-74	248
	isotig23310	isotig06560	isotig22288	77,84	194	4e-74	244
	isotig23311	isotig06559		65,57	212	4e-62	206
	isotig42974	-	isotig37097	75,68	185	8e-75	239
RcAP2 XP_024182693.1	isotig06879	isotig08400	isotig32043	85,64	188	5e-86	279
	isotig06878	isotig08399		77,84	176	5e-63	219
	isotig31692	isotig10774	isotig12508	70,09	224	2e-74	248
	isotig23310	isotig06560	isotig22288	77,84	194	4e-74	244
	isotig23311	isotig06559		65,57	212	4e-62	206
	isotig42974	-	isotig37097	75,68	185	8e-75	239
AHAP2 AAL57045.2	isotig06879	isotig08400	isotig32043	85,64	188	5e-86	279
	isotig06878	isotig08399		77,84	176	5e-63	219
	isotig31692	isotig10774	isotig12508	70,09	224	2e-74	248
	isotig23310	isotig06560	isotig22288	77,84	194	4e-74	244
	isotig23311	isotig06559		65,57	212	4e-62	206
	isotig42974	-	isotig37097	75,68	185	8e-75	239
APL25 B8AVJ9.1	isotig06879	isotig08400	isotig32043	85,64	188	5e-86	279
	isotig06878	isotig08399		77,84	176	5e-63	219
	isotig31692	isotig10774	isotig12508	70,09	224	2e-74	248
	isotig23310	isotig06560	isotig22288	77,84	194	4e-74	244
	isotig23311	isotig06559		65,57	212	4e-62	206
	isotig42974	-	isotig37097	75,68	185	8e-75	239
SiAP2-like XP_022684171.1	isotig06879	isotig08400	isotig32043	85,64	188	5e-86	279
	isotig06878	isotig08399		77,84	176	5e-63	219
	isotig31692	isotig10774	isotig12508	70,09	224	2e-74	248
	isotig23310	isotig06560	isotig22288	77,84	194	4e-74	244
	isotig23311	isotig06559		65,57	212	4e-62	206
	isotig42974	-	isotig37097	75,68	185	8e-75	239
BnBBM2 AAM33801.1	isotig19745	isotig10031	Isotig07752	67,63	173	3e-71	244
	isotig07297	isotig17661	Isotig06736	66,84	190	5e-69	238
	isotig07295		Isotig06737	66,84	190	5e-69	238
	isotig36244	isotig34537	Isotig04886	67,63	173	4e-66	225
	isotig07776	isotig26993	Isotig31357	66,48	179	8e-65	224
	isotig38642	isotig31532	Isotig26057	61,62	185	2e-54	191
AtBBM AAM33803.1	isotig19745	isotig10031	Isotig07752	67,63	173	5e-71	243
	isotig07297	isotig17661	Isotig06736	69,4	183	3e-69	238
	isotig07295		Isotig06737	69,4	183	3e-69	238

	isotig36244	isotig34537	Isotig04886	68,79	173	4e-67	228
	isotig07776	isotig26993	Isotig31357	67,04	179	3e-65	226
	isotig38642	isotig31532	Isotig26057	61,08	185	1e-54	192
PsASGR-BBML1 EU559277.1	isotig19745	isotig10031	Isotig07752	67,05	176	4e-67	232
	isotig07297	isotig17661	Isotig06736	67,04	179	5e-63	220
	isotig07295		Isotig06737	67,04	179	5e-63	220
	isotig36244	isotig34537	Isotig04886	65	180	5e-62	213
	isotig07776	isotig26993	Isotig31357	55,51	227	2e-59	209
OsBBM1 KAB8114989.1	isotig19745	isotig10031	Isotig07752	67,05	176	4e-67	232
	isotig07297	isotig17661	Isotig06736	67,04	179	5e-63	220
	isotig07295		Isotig06737	67,04	179	5e-63	220
	isotig36244	isotig34537	Isotig04886	65	180	5e-62	213
	isotig07776	isotig26993	Isotig31357	55,51	227	2e-59	209
OsBBM1 EAY86677.1	isotig19745	isotig10031	Isotig07752	67,05	176	4e-67	232
	isotig07297	isotig17661	Isotig06736	67,04	179	5e-63	220
	isotig07295		Isotig06737	67,04	179	5e-63	220
	isotig36244	isotig34537	Isotig04886	65	180	5e-62	213
	isotig07776	isotig26993	Isotig31357	55,51	227	2e-59	209
OsBBM1 KAB8114989.1	isotig19745	isotig10031	Isotig07752	67,05	176	4e-67	232
	isotig07297	isotig17661	Isotig06736	67,04	179	5e-63	220
	isotig07295		Isotig06737	67,04	179	5e-63	220
	isotig36244	isotig34537	Isotig04886	65	180	5e-62	213
	isotig07776	isotig26993	Isotig31357	55,51	227	2e-59	209

Secuencias

>isotig17384

CCGCTTCCAAAACCCCTCGCCTCCGCCGTGCGCGTTGCGAATCGCGATGGCACCAGCCCTCAAACCCCTCGGACTCCGACGT
CGCCGTGCGCTCCTGGCCGCCGGCGCCGGCAACCTCCACCTCCTTAAGATGATTGCGAACAAAGGTGAACCTGCGGGAA
GTCAAGGACGACGAGGGCCTGAACGCGCTCCACCACGCCGCGCTGAATGGTCATCTGGAGGTCTGCAGGTTCTGGTGG
AGGAATCGGGGATCGATGTCAACTCCACATCCGGGAGGGGAAACGCCAATCCACTACGCCGCGGCTGGAGGAGACGTTCCG
AGTCTCGGGTACCTCCTCGACCGCGGTGGTACCAGCAATCCAAGACTCCAGGGGGGgATCCACGCCACTCCACGATG
CAGCTGTGCACGGGCACTGCGAGGCTGTGAGGCTGTGAGGCTGTCCAGGGTGTGATGTGGACCAGCCAGTTGTCTGTGG
GACGGCGCTCCACTCTGCTGCCGCCATTGCCAATGATATGGTTATCAAGATCCTGCTGGAGCACGGTGTGACCCCAACA
GTTTTCCACAATATCTTCCACTGATGGTGGCATGCACCGCGAAGTCATTGAAATGCATGAAGTACTGGTTGAGGCTGGT
GCTGATGTGAACTACATATGTCCCAGTGGACCATCCATTTTGACGGCGCGCAGCTGACCAAGGTTAACTGACATTGTCAAT
TCTTGTAGATGCTGGAGCTGATCCTAACATTGCCGACAAGGATGGCATTCCCATCATGGCAGCAGCAGCTAAGGAACA
TCGTGAGCTTGTGGAAATCTTTTTCTCGGACAAAGACIGATTCCAGACGTGCCAGATTGAGCATCGATGGGATTATTTTcA
CTGTGAAATACCGAAGGTTCCAGCCTCAGGAGCCGgTGGGAAAaCAACTAGCTGATGCAAAGTCACGAGCAAAGGAAGCAT
TTGCAAATGGGGATTTCTCTATGCAGCCTATTTTTATGAGCAGGCAATCAGGATAGACCCACTCAATGCCACCTATTTGC
CAACCGGAGTTTATGCTGGCTGCGTCTAAGAGAAGGGgAGAACGCTTTGAAAGATGCTCaGGATTGCAAAGCCTTGCCTCC
TGATTGGgCAAAGGCATGGTACCCTGAGGGTCCGCTCTAAGCTTGTGAAGAACTACAAAGGGCAGGTTGATGCTATTTTC
AGGAGCTCTCAAGCTTGACCCTACAAATGACGATATCAAGAAAGCATTGAGGGAGGCCATGGAGTCTATGAGGAATGCTGG
CCATAGTGGAGGACAAACCCCTTGAGCTGTGAACATGGGTGTGATGCTGATGCTGTGAACATGCTGCTGCAAAGACT
AGTTTGAAGCTTATCGAGTTTTTtGTAAATGTTCTGTGGCTGCTTGTGACCTTCTTATGCAGGGCACATGCGATGTATTGG
ATTGAACTAGTTCTGTAATGTTTTGAACACTTTCTAGGAAGCGGACcTGCTGTCCTCATCAAATATTAGCGGTGTCTACTCAT
ATTAGCggtgttccaagttgatcatgaatttgcagcatgcagatgctgaatcttaagggaatgaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaataa
aaaaaaaaaagaaaaaaaaaaaaaaaaaagaaaaataaanaanaanaanaa

>isotig20818

caacagttattatctgcattactgcaaaaggagcaagCAgtGTATATATCTACAGTACTggctcaatccAGAGTacagccATGCATCCTGCGTAATA
AGcgTACAGATcGCCACAAAaCACATTACTCATCAGTCATCAAAAAGAGCCAAcActcaagctacatattgtaagttcAGtcttgaagcagca
cggTGGGGCTACAGTATATCCTACGGAGGACTATTAACAACAAGATACGTGAAAGGACACAGCAATTCAGAGTTCTGTTGTTC
CGCAGGACGAGAAGAACAACCTTCAAAGGATCAATGGCCTCCCTTAAAGCTTTCTTGTATCTCGTCCGCTCACAGGGTCAAGTTT
CAGTGCCTGTGTGAATGCATCGACTGCCcTTTGTAGTTCTTCAGCAAGCTGAGAGCTGCTCCCTCACGGTACCAGCCTT
CGACCAATGAGGACGCATCATTTTGCCTCTTGTAGCATCTAACAGAGCTCTGTCCCTTCTCTCAACCGCAACCAGCATAGG
CTCCGGTTGGCAAGCAAGTGGCGTCAAGTGGATCTTCTCCATTGCCATGCAGTAGAAGTAAATTGCTGCAAGATACTCT
CCCTTTGCAAAAGCTTCCCTTCTTGTGATTtGGCATCAGCTACCTTTTTtCTGCCATAGCTGCATCCTGAACCCCTGAAACG
CAGAAATTTCACTACTGCTAATTTCCCATCAACGCTCCAGTCTGGCAGATATGGAATCGTCTTGTCTTAGGAAGTAGAATTT
CAACAAGTTCCGCTTGTCTATGAACCTGCTCGCAAAATTTGGGATATGCCCATCCTCGTCCGCAATGTTAGGATCAGCTC
CAGCCTCTAGCAAAAacTTGACAATGTCAGTTAaGCCATCATCAACTGCCTCCATTTAAaTGGTTGgTCCAGAGGGGCTTATA
TAATTAACaTCAGCCcAGCCTCAACCAGCAGCTTCATGCATTTCAAGGACTGCCACAACACGCCATCATGATGGTGGAAA
AAaCATGATTGACAACCTTGTGTGATCAGCACCATGTTCCGACAGGATCTTGACAACCTGATCCTGGTCTTATGACGAGC
CAAGTgAAGCGCGCTCCACAGATAAATTGAGCGGATcACATCAACACCCCTTGGAGAGCAGCTTACAGCATCACAAT
GGCTCGCTCGGCCGCTCATGCAGCGCGTGGAGCCCCTGGAGTCAGGCGTCCCGGGTCCACGCCATGGTCAAGAAG
GTACCTCA

>isotig20570

CTGGAGGtCTgCAAGTTCTCGTGgTGAATCGGGGCTCGAtgTCAaCGgCACCGACGACGATGGACGCACGCCGATCGCCc
TcGCCGCGGCTGAGGGgAAGGTGAGCGTCTGGTGTACCTTTGGgCGCCGGCGGCGACCCAGCGGTGCCGACGCTGA
CGgCGcACGCCGCTGCACCGTGCgCGGAGCAGGTCACCACGAGGCTGTAAGACTACTGCTGTCCAAGGGTGTGTATG
TGGATACCTTCCACCCTCGTATGGATCGCCGCTGCACATGACTATAGCCAAGGACCATGATCAGGCTCTGAAAGTCTTGC
TGGAGCACGGCGCTGATGTGAACAGAGTTATTCTTATGATGTTGACACCCTCGTATGGCAGGTTGGGTACGCTCCTGGA
AATGCATGAAGCTATTGGTTGAGGCTGGTGTGATTTGAATTTAGAAGTCCATTGCGACCAACCGCTTAAATGAAGGCTGC
TGCTGCTGGATTTACCGACGTTGTCAAGTTCTTGTGATGAGGCTGGAGCTGACCCTAACATTTTTGATGAGTTTGGAAAAaT
GCAATCATGGTTGCAGCAGACAAAGGGCTACGTGATGTTGTTGAAATTTCTTTCTTGGACAAAGCcAATCGCATATGTGC
CCAATGGAGGTTGATGTGAACAGAGTTATTGAAATCATGTTGACACCCTCGTATGGATGATGGATGAGGTTGGGTACGCTCCTGGA
GGAAAaAAAGCATTGCAAAAGGGGAATACTTTTTCAGCAATGTACTTGTATACAACGGCTATGTTCAAACATCCACTTGTATGC
TACCTTGTCTTCCAACAGAAGCCTATGTTGGCTgCGTATGGGAGATGGAAtGAAAGCTCTGTTAGATGCTCAGAAGTCAAAA
ATGTTGCGTCTCATTGGTCCAAGGCATGGTACCCTGAaGGTGCAGCTCTCAGCTTGTGAAGAAGTACGAAGGAGCGGCT
AATGCTTTTGCAGAAGCCTGAAGTTTACCCTGAGAATGACGAGCTCAAGACAGCGTTAAGGGAGGCCATTGAGGCTCTC
ACGTCGGATGCTCGCTCcTAATAAGACAACCCCTTGGAGCAGCGCTGCTACATCTTGGATATCAATATAGGgCCTATAcTTATAT
GTGTAATGACAGCATAATGcTGCAGCAGTATTTCTGTGCTATGCTTACTGGTTAATCTTTTGCATGAACCTCTATGTTTT
GCGGCTTCTGTAAAGCGCACTTAGGGAAGTATGATATGGTACTATTTATGCTTAaATTtCC

>isotig10153

gtccaaaaggccaatagccccctagAGAAgGCTTGGAGCCcTcCGCTCCGCCACCGCCGTCGCGATGGCACCAGCCCTCCAGACCCTCG
CACTTGGACGTGCGCGTACAGGCGCCATCGACGGCAACCTCCACCTTCTCAAGAAGgTGGCGAGCCGGGTGG
ACTTGGCGGATGCCAAGGACGCCGGGCGGAGCGCCCTGCACCTCGCCGCGGCGAATGGCCACCTCGACGTCTGCAGGT
TCCTGGTGGAGGAGCTGGGGTTCGgTGTCAACTCCaCCTGCGCCGAGGGCGgTCGCCGgTCTCTACGCCGCGCCcAAC
GGGAGGAGAGCGTCTTGGAGTACCTCATCGACCAGCGGCGCCAGCCAGGGATGCCTGACTCAAAGGTCCGCCACTCGC
TGCATCAcCGGCGAGCAAGGGcACTGCGAGGCTgTGAGgCTGCTGCTGTCCAAGggTGTGATGTGGaTCCCGTTTTTGG
TCATGGGACCCCGCTGCACTtGGCcTTGGCCATTctcAACGAtcaCGATCAGATTGTCAAGATCCTGCTGGAGCATGGCGCGG
ACCCcAaTAAGGTTTTCAATGCCTTCTCGCCACTCGCATTGGCATGCTGTGGGTATTCTTtGAAATGCATGAAGTACTGGTT
GAGGCTGGAGCTGATGTAACCTTCAATGTCCTCACTGAGAGATCCATTTAATGGTGGCGgTTaATGgTGGCAGCTTCAAGCAGATC
cGTCAAGTTCTTGTAGAGaCTGGAGCTGATCCTAaCGTTcCTGACacaGGATGgCCAAcTCCcAATCATGTTAGCAGCAgATC
ATAACATCGTGAAGTGTGGAAaTTCTTTTTCTCATACAAGACCGATtCCAGTTGTCCAGATTGGAGCATCGATGGGATT

ACTGTAGCTATGAAATCCATaAAATCCAaGCCTCAGGTGTCAGTGGaAAAACAGGTAGCTGATCTGAAaTCAACAAGGAAAGG
AAGCAATTTGCAAGAGGGGACTACCTCTTTTCATCCTATATCTATAGGAAGGCAATGGAGGAAGATCCACTiGATGCcACCTTG
TTTGCTAACcGGAGCCTATGCTGGTTGCGGCTGAGAGAAGGGGAAaCAAGCTCTGTTAGACGCTCGACAGTGCCGAATTATG
TGTCTCGTTGGTCAAAGGCATGGTACCGTGAGGGCGCGGCTCTCAGCTiACTGAAGGATTACAAGGGgCGGTTGATTCA
TTCATGCAAGCACTGCATCTTGACCCTGCGAGTGATGAGA

>isotig10154

cagaaggcttGAgccttcgctgtccgccaccgtcgggatggcaccggccTccagAccGTCGCACttggaCGTCGccGTCGCGCTCCAGGccGCCAccg
AcggCGaccTccGccatcTcaaGaaGatggcgagccgggtggacttgcgggaccgccacggaCGccgggCTGagcgcctgcacctgccggcccaatgggcca
ccctcggaggtctcaagttcctggtggaggaattggggtcgtgtcaactccacctgcgacgcagggcaggtccgggtccTTcacgccgcgaccaacgggaggggagtagcgttt
gactcttgaggtacctcatcgaccggcgccgggaccagggatgctTgACTCcAAGGGCGcCACCgCgcTGCATTGCGCAGCaGAGgAAGGGCaC
TGTGaGgCAgtGAGACTaCTTCTGTCCAAGGgtGTTGATGTGGATCCCGTGTTCGTCATGGGaCCCCGCTGCACCTTGCCAT
TctAACGAtcaCGATCAGATTGTCAAGATCCTGCTGGAGCATGGCGCGGACCCcAaTAAGGTTTCCAATGCCTTCTCGCCACT
CGCATTGGCATGCTGTGGTATTCTtGAAATGCATGAAGCTACTGGTTGAGGCTGGCGCTGATGTAACCTTCATATGTCCC
ACTGGAGAATCCATTTAATGGTGGCGtTtATGgTgGCTCCaCaGACATcGTCaAGTTCTTGCTAGAGaCTGGAGCTGATCCT
AaCGTTcCTGACacaGGATGgCCAAcTCCcAATCATGTTAGCAGCAgATATAAACATCGTGAGCTTGTTGGAaTTCTTTTTCT
CATACAAGACCGGATiCCAGTTGTTCCAGATTGGAGCATCGATGGGATTACTGTAGCTATGAAATCCATaAAATCCAaGCCTCA
GGTGTCACTGGaAAAACAGGTAGCTGATCTGAAaTCAACAAGGAAAGGAAGCATTGCAAGAGGGGACTACCTCTTTTCATC
CTATATCTATAGGAAGGCAATGGAGGAAGATCCACTiGATGCcACCTTGTTTGTAAcGGAGCCTATGCTGTTGCGGGCTG
AGAGAAGGGGAaCAAGCTCTGTTAGACGCTCGACAGTGCCGAATTATGTGCTCTCGTTGGTCAAAGGCATGGTACCGTGAG
GGCGCGCTCTCAGCTiACTGAAGGATTACAAGGGgCGGTTGATTcATTcATGCAAGCACTGCATCTTGACCCTGCGAGT
GATGAGA

>isotig11445

GCGAATCGCGATGGCACCGGCCCTCAAAaCCcCGGACTCCGACGTCGCCGTCGCGCTCCTGGCCGCCGGCGCCGGCAAC
CTCCACCTCCTcAAGATGATTGCGAACAAGGTGAACCTGCGGGaAGTCAAGGACGACGAGGGCCTGAACGCGCTCCACCA
CGCCGCGCTGAATGGTCATCTGGAGGTCTGCAGTTCTGGTGGAGGAATCgGGGATCgATGTCAACTCCACATCCGGGA
GGGGaACGCCAATCCACTACGCCCGCGGCTGGAGGAGACGTTCCGAGTCTCGGGTACCTCCTCGACCGCGGTGGTGACCC
AGCAATCCAAGACTCCAGGGGGgATCCACGCCACTCCACGATGCAGCTGTGCACGGgCACTGCGAGGCTGTGAGGCTGC
TGCTGTCCAAGGGTGTGATGTGGACCAGCCAGTTGTCTGTGGACGGCGCTCCACTCTGCTGCCGCCATTTCCAATGATA
TGTTATCAAGATCCTGCTGGAGCACGGTCTGACCCCAACAAGTTTTTCCACAATATCTTCCcActGAtGGTGGCAcGCACC
GCGAAGTCATTGAAATGCATGAAGCTACTGGTTGAGGCTGGTGTGATGTGAACACTACATATGTCCCAGTGGACCATCCATT
TTGACGGCGGCAGCTGACCAAGGTTAACTGACATTGTCAAATCTTGCTAGATGCTGGAGCTGATCCTAACATTGCCGAC
AAGGATGGCACATTTCCCATCATGgCAGCAGCAGCTAAGGAACATCGTGAGCTTGTTGGAaTTCTTTiCCTCGGACAAGAC
CGATTCCAGACGTGCCAGATTGGAGCATCGATGGGATTAATTTCACTGTGAAATACCGAAGGTTCCAGCCTCAGGAGCCgG
TGGGAAAACAAGTACTGATGCAAAGTACGAGCAAAGGAAGCATTGCAAATGGGGATTTCTCTATGCAGCCTATTTTTA
TGAGCAGGCAATCAGGATAGACCCACTCAATGCCACTTATTTGCCAACCGAGTTTATGCTGGCTGCGTCTAAGAGAAGGG
GAGAACGCTTTGAAAGATGCTCGGGATTGCAAAGCCTTGCCTCTGATTGGGCAAAGGCATGGTACCGTGAGGGTGCCTC
TCTAAGCTTGTGAAAGAActACAAGGGGCGAGTTGATGCAATTTTCAGGAGCTCAAGCTTGACCCATACAATGACGATATC
AAGAAAGCATTGAGGGAGGCCATGGAGTCTATGAGGAATGCTGGCCATAGTGGAggaccaaacccttgagctgtgaacatgggtgtgatact
gcatgtagctgtgaacAtgctgctcaagactagttgaaactgtatcgagttttgtgaaatgttctgtgctgctgtgaccttctatgagggcaccatgcatgattgattgaaCT
agttctgtaattgttgaacactttaggaagcggactgtctctcatcaataTTAGCGgtGtCAcCatATTAGCggTGTccaagttgactatgaattgcatgcat
gcccagatgctgacttgggaTGAAGTAGTCTCGCTCCTGTGTTGGCTAGAGCTCAACTTCAAGTGCATTGTTAGTCTAGACTCTA
GagggtcATGTTGCCATTTCTTTTGTGGTTCTGGTGTTCATATTGTTCTAAT

>isotig11446

GCGAATCGCGATGGCACCGGCCCTCAAAaCCcCGGACTCCGACGTCGCCGTCGCGCTCCTGGCCGCCGGCGCCGGCAAC
CTCCACCTCCTcAAGATGATTGCGAACAAGGTGAACCTGCGGGaAGTCAAGGACGACGAGGGCCTGAACGCGCTCCACCA
CGCCGCGCTGAATGGTCATCTGGAGGTCTGCAGTTCTGGTGGAGGAATCgGGGATCgATGTCAACTCCACATCCGGGA
GGGGaACGCCAATCCACTACGCCCGCGGCTGGAGGAGACGTTCCGAGTCTCGGGTACCTCCTCGACCGCGGTGGTGACCC
AGCAATCCAAGACTCCAGGGGGgATCCACGCCACTCCACGATGCAGCTGTGCACGGgCACTGCGAGGCTGTGAGGCTGC
TGCTGTCCAAGGGTGTGATGTGGACCAGCCAGTTGTCTGTGGACGGCGCTCCACTCTGCTGCCGCCATTTCCAATGAT
ATGTTATCAAGATCCTGCTGGAGCACGGTGTGCTGACCCCAACAAGTTTTTCCACAATATCTTCCcActGAtGGTGGCAcGCACC
GCGAAGTCATTGAAATGCATGAAGCTACTGGTTGAGGCTGGTGTGATGTGAACACTACATATGTCCCAGTGGACCATCCATT
TTGACGGCGGCAGCTGACCAAGGTTAACTGACATTGTCAAATCTTGCTAGATGCTGGAGCTGATCCTAACATTGCCGAC
AAGGATGGCACATTTCCCATCATGgCAGCAGCAGCTAAGGAACATCGTGAGCTTGTTGGAaTTCTTTiCCTCGGACAAGAC
CGATTCCAGACGTGCCAGATTGGAGCATCGATGGGATTAATTTCACTGTGAAATACCGAAGGTTCCAGCCTCAGGAGCCgG
TGGGAAAACAAGTACTGATGCAAAGTACGAGCAAAGGAAGCATTGCAAATGGGGATTTCTCTATGCAGCCTATTTTTA
TGAGCAGGCAATCAGGATAGACCCACTCAATGCCACTTATTTGCCAACCGAGTTTATGCTGGCTGCGTCTAAGAGAAGG
GGAGAACGCTTTGAAAGATGCTCGGGATTGCAAAGCCTTGCCTCTGATTGGGCAAAGGCATGGTACCGTGAGGGTGCCT
CTCTAAGCTTGTGAAAGAActACAAGGGGCGAGTTGATGCAATTTTCAGGAGCTCTCAAGCTTGACCCATACAATGACGATAT
CAAGAAAGCATTGAGGCCTGTTCTCGTTTTCTTACTGTTCTCAGCTGTCTAACTGAGTTATTTATCCTTGCGAAAACATTA
ACATCCGCATCCTAGCATTGAGGCACTATTTGGCATGAATCGATATATGTGAATGGCATTITTAATAAGCCTTTiATTCCTGAA
ACTTGcAGGGAGGCCATGGAGTCTATGAGGAATGCTGGCCATAGTGGAGGACCAACCCTTGAGCTGTGAACATGGGTGT
G

>isotig20350

CTCGACTCCGCCCGCCGCCGCCGCCGCCGCTTCTCTCATGGCCGCCGAAGGAGACGCCCGCGCTGCCCTCTCAGCTC
GGAACAAGGTGCAGGCCiTCCTCGAGTCTGCGCGAGCTGGAGACCTCAAcTCCCTCCAGAACCTCGCCCGCGGCTCGAC
GAGGACgGCACgGGCGcCGCTCCGTGCGCGGCGGCTGCGCGACGCCAACAAAGCGCACCGCGCTGCACCTCGCCCGG
CGCGAGGGCCGCACCGACGTCTGCCGTTCTCATCGACAACCTCCGTCTCCCGCTCGACCCAAAGGACGATGATGGCG
AGACTCCAATCATCCATGCTACGCGCCAGGGCCATCTGCACACCGCCGAGTACCTCCTTGACCGTGGAGCCGATCCTTCC

GTCGCTACCAACCTAGGAGCCACTGCGCTACACCATGCCGACAGGAATAGGGAACACGGAGCTCATGAAGCTTCTTCTCGC
 CAAGGGAGTCGACGTCGAGTCCGAAAGCGAcGCCGGCACTCCCCTTGTATGGGCTGCTGGTCATGCCAGCAGGATGCaG
 TCAAACCTTCTACTTCAACACAATGCTAAGCCAAATACTGAAAACCGCTGATGGTGTACACAGCATTGTTATCTGCTGTTGCTGC
 GGGTTCCCTCCCATGCCTGGAGCTTCTAATTGAGGCAGGTGCGAACCCAAATATCAAGGCTGGTGGAGCAACICCATTTGCA
 TATTGCTGCAGATAGTGAAATATAGAAGTAGTCAAAATGCTTAAAGCTGGAGGTGACCCAAATATCTGCGATGATGAT
 GGACTAAAACCAATTCAGGTCGCCGCTTGGAGCAATAACCGCGAAGTTGTGGAACCTTCTTCTGCCAGTAACATcCCCAATTC
 CAGGTGTTTTCAAACCTGGAGTGCAGATGGAATTATAGAACACACGCTGGCTAAAGCATCTGAGGaaAAAGTCTCAATTGAAGG
 AAGCGTCACTCTGAAATCAGGCAGATCGCAACCTGTTGAGGTGTCATCCGAAGCAAAAACAAAGATCCTTGAAGCCAAAT
 CAAGGGGTGATGATGCCTTCAGAAGAAAGGACTACCTTGTAGCAGTGGATGCTTACACTCAGGCTACAGAGCTGGACCCAA
 ATGACCGCAGAGTGTCTCAAACAGAAGCCTGTGTTGGCTGCGGGCAGGCCAAGCTGAACGTGCTCTGGAGGATGCAAAA
 GCGTGCCGAGCATTGAGGCCGGATTGGGCGAAAGCTTGTACAGGGAAGGTGCAGCCAGCCCTGTTACAGAGGTTTTG
 AGGAAGCTGCAAAATGCCTTCTATGAGGGCGTCAACTTGTAGCCAGAGAACAAGAGCTAGTCAGCGCCTTCAAGGAGGCC
 GTCGAAGCCGGGAGGAAGTTCCATGGTGTGGACAAGCCGAATCAGACACAATGAGACGACAGCTGTTTGGTGGATCGAGC
 CTGTACTGTTTTGATTACGAGGAGGAAGTCTAGCTGATGAGCAGAAACGTTTGTAGTGGGAATTGATGGTGGAGAACTCA
 TGTTGGACGGGAGAAATTCGAAGCCTGtGAATTTCCAAATTTTGTGTGGCTGTGTCATTGGTTGTGGCCaTgTtATTAGA
 TTGGTTAAGCAATGAAAGTAGGTTTTCAACTCATTGTACCGCTCGCTTGTGGTGGCCGATCTTTTGGTTGAACAGAGTA
 GCATATCATTCCGaaGAGACGG

>isotig15263

gggATGGAGAGCGTCTTGGAGtATCTCATCGACCgcgggcCTGACCCAgGGATGCcGGACTCCATgGGCTGCACGCCGCTGCAT
 TACGCGGCAGAGGAAGGGCACTGCGAGTCTGCGAGGACACTGCTGTCCAAGGGTGTGATGTGGACCCGctTCATATTTTT
 GGGaCCCCGCTGcACTGGGCCaCTGCACTGGGCCATTGCCGCGACcaggatCAagTTATCAAGATCCTGCTGGAGCGTGGT
 GCAGacCCCAACaAGTTTTGtGATGCCTTCTACCACTCGGATTGGCGTGTGCAGAGGTTCCtGaAATGCATGAAGCTACT
 GCATGAGGCTGtGCTGATGTGaATTTGAGATATCCCAcTGGAGATACCGTTTTAAtGACgGCAATTGATGGtggCctcACTGAC
 aTTGTCAAGTTTTGCTAGAGGCTGGAGCTGATCCTAACATTGCCGATGAGGATGGGCATATCCCAATAATTTGCCGAGCAG
 TTCATGaGCAACGCGAACTTGTGAAATTCTACTTCTAAGACAAGACCGATTcCATATGTGCCAGaCtGgAGCGTTGATgGG
 ATaATTAGCAGTATGaAATTTCTGCGTTTCAGGGTTCAGGATGCAGCTATGGCAgaaAAAAGGTAGCTGATGCCAAATCACAa
 gGaAgGGaCGCTTTTGCaaaGGGAGAGTATCTTGCAGCAATTTACTTCTACTGCTGGCAATGGAGaAAGATCCACTTGACG
 CCACCTTGCCTGCCAAcCGGAGCCTATGcIGGtGCGGTTGAGAGAAGGGGACAGAGCTCTGTTAGATGCTCAAGAGTGCaA
 AATGATGCGTcCTCATTGGTGAAGGCGTGGTACCCTGAGGGAGCAGCTCTCAGCTTGTGAAGAACTACaaagggg

>isotig15264

gggATGGAGAGCGTCTTGGAGtATCTCATCGACCgcgggcCTGACCCAgGGATGCcGGACTCCATgGGCTGCACGCCGCTGCAT
 TACGCGGCAGAGGAAGGGCACTGCGAGTCTGCGAGGACACTGCTGTCCAAGGGTGTGATGTGGACCCGctTCATATTTTT
 GGGaCCCCGCTGcACTGGGCCaCTGCACTGGGCCATTGCCGCGACcaggatCAagTTATCAAGATCCTGCTGGAGCGTGGT
 GCAGacCCCAACaAGTTTTGtGATGCCTTCTACCACTCGGATTGGCGTGTGCAGAGGTTCCtGaAATGCATGAAGCTACT
 GATCGAGGCTGtGCTGATGTGaATTTGAGATATCCCAcTGGAGATACCGTTTTAAtGACgGCAATTGATGGtggCctcACTGAC
 aTTGTCAAGTTTTGCTAGAGGCTGGAGCTGATCCTAACATTGCCGATGAGGATGGGCATATCCCAATAATTTGCCGAGCAG
 TTCATGaGCAACGCGAACTTGTGAAATTCTACTTCTAAGACAAGACCGATTcCATATGTGCCAGaCtGgAGCGTTGATgGG
 ATaATTAGCAGTATGaAATTTCTGCGTTTCAGGGTTCAGGATGCAGCTATGGCAgaaAAAAGGTAGCTGATGCCAAATCACAa
 gGaAgGGaCGCTTTTGCaaaGGGAGAGTATCTTGCAGCAATTTACTTCTACTGCTGGCAATGGAGaAAGATCCACTTGACG
 CCACCTTGCCTGCCAAcCGGAGCCTATGcIGGtGCGGTTGAGAGAAGGGGACAGAGCTCTGTTAGATGCTCAAGAGTGCaA
 AATGATGCGTcCTCATTGGTGAAGGCGTGGTACCCTGAGGGAGCAGCTCTCAGCTTGTGAAGAACTACaaagggg

>PnANK-TPR1 isotig19073

ATRQATPCTGCLVRPGYQSPEPRGDRGDPRLRLAHQHPVHRPPGVPKASEDTRGKRTGEIPAPFSFLAKLCLFTRTIEATQARLP
 ERGAMNRRGQARREATAAPFVYCRSTTDGNSENGLLKAAALDGDLDGRIKGIIRKLGEMENGGRLAVKSFHKDGFLLHCAACQGH
 LEVCKLVEELGCDPNMEAAACEGLFKGGTFFMASAQSDDISTVKYLLDHDGADLMKADIKGCTVLHHAVSAGSCKVTEFLLSKGIP
 VDIDCGHGTPLYHAATNEQDKTLKILLDHHANPNAILCGAGTPLLSSLVYHSLKCMKLLIKAGADVNGKGSILTPLLFATQNGGYTD
 FVRLLLKAGANPNISDDLGRPLIELAAIRECKEEIEMLLPLTSPIPNIQNWSDVGVISYAKSKNEKPLDKGQVDRRKGIKSKANLAF
 KRKDYGVALKCYTLAINIEPDAMLYSNRSLCKLRMGDGEALSDAYLCRMMRPDWAKACYREAAAHMILKEYKQAYDALLNAQK
 LDPGNDEIERELRKAMELMNISPAED*

>PnANK-TPR2 isotig32130

LDSAAAAAAAAASLMAAEGDAAAAALSARNKVQAFLESARAGDLNSLQNLAAALDEDGTGAASVAAAVRDANKRTALHFAAREGRT
 DVCRLFDLNLRLPVDPKDDDDGETPLIHATRQGHLLHTAEYLLDRGADPSVATNLGATALHHAAGIGNTELMKLLAKGVDVESESDA
 GTPLVWAAGHAQQDAVKLLQLHNAKPNTENADGVTALLSAVAAGSLPCLELLIEAGANPNIKAGGATPLHIAADSGNIEVVKLLK
 AGGDPNICDDDDGLKPIQVAAWSNNREVVELLVPTSPIPGVSNWSADGIIHTLAKASEEKSQLEASSLKSQRSQPVEVSSEAK
 QRSLEAKSRGDDAFRRKDYLVAVDAYTQATELDPNDATVLSNRSLCWLVRAGQAERALEDKACRALRPDWAKACYREGAAQR
 LLQRFEEAANAFYEGVQLEPENKELVSAFREAVEAGRKFHGVDPKPNQQT*

>PnANK-TPR3 isotig32953

PLPKSPPPSPPLRIAMAPASKPSDSVAVALLAAGAGNHLKMIANKVNLREVKDDEGLNALHHAALNGHLEVCVFLVEESGIDV
 NSTSGRGTPIHYAAAGGDVRLVGLYLLDRGGDPAIQDSRGGSTPLHDAAVHGHCEAVRLLLSKGVVDVQPSCRGTLHSAAAIAN
 DMVIKILLEHGADPNKFFHNIFPLMVACTAKSLKCMKLLVEAGADVNYICPSGPSILTAAADQGLTDIVKFLLDAGADPNADKDGTF
 PIMAAAAKEHRELVEILFPRTTRIPDVPDWSIDGIIFTVKYRRFQPQEPVKGQLADAKSRAKEAFANGDFLYAAYFYEQAIRIDPLNA
 TLFANRSLCWLRLREGENALKDARDCKALRPDWAKAWYREGASLSLLKNYKGAVDAFSGALKLDPTNDDIKKALREAMESMRN
 AGHSGGPNP*

>PnANK-TPR4 isotig35667

LEVCKFLVVEGLDVGNTDDDGRTPIALAAAEKGVSVLVYLLGAGGDPVAVPDADGATPLHRAAEHGHHEAVRLLLSKGVVDVDTF
 HPRHGSPLHMTIAKDHDQALKVLEHAGADVNRVILHMLTPLVMACWVRSWKCMKLLVEAGADLNFRSPFGPTALMKAAGFT
 DVVKFLEAGADPNIFDEFKGNMVAADKGLRDVVEILFPWTKPIAYVFNWSDVGIIFMKSEFFNDMDEADAKRQGNKAFKGE

YFSAMYLYTTAMFKHPLDALLSNRSLCWLRMGDMKALLDAQNCKMLRPHWSKAWYREGAALSLLKNYEGAANAF AEALKFD
PENDELKTALREAI EALTS DARS*

>isotig18298

ATCTATTTCTCTCCATTATTTCCATTGCATTGCGATGCGTTGGCGTTGCAAGCCAAGAACACCAACCAGCgaCGAAGCAGC
CAAGCAGGGAGGCTAGCAAGCAGAAGGGGCGGTGCGAGGATCGGAGGTGGATTGCTTGAGCAATGGCGACGACGGGCCT
GGGGTTCGAGGAGACGGAGCTCCGGCTGGGCCTGCCCGCGGCGGCGGCGGGGGAGGAGAGGGGCGAGGGCAGG
AGTCTCTCCGGCAAGCGGGGCTTCGCCGAGACCATCGACCTCaaCTGAAGCTGGAGCtGGCGGCCGTGGTGGTGAACGA
GGAGGATGAGGCGGCGGCGGAGGACGGTGCACGGGTGGTGGCGTGGCCGCCCGCCGCGGACGGAGGAATCGTCCC
CCACCGCGGCCGGAAGATGAAGAGGTCCCCGAGCCAGTGCAGCGTCTGACCCGCCGCCGCCAGCCGACCCCG
CCGAGAAGCCGCGCGCCCAAGGCTCAGGTGGTGGGATGGCCGCCGGTGGCGTCTTCCGGAAGAATCATGTCCGT
GCAGTCCGAGAAAGGCGCCGCGGCAAGGACGCCGACGCGCAAGTCCAGCTCGCCGGCGGCCGCCGCTTTGTCAA
GGTGAGCTTGACGGCGCGCCGTACCTGCGCAAGGTGGACCTCAAGATGTACAAGAGCTACCAGGACCTGTCCAAGGCG
CTCGAGAAGATGTTCACTCTCCATCGGAAGCTGTGGTCTCAGGGGATGAACGGCATGAACGAGAGCAAGCTGGT
GGATCTGCTCAACGGCTCTGAGTACGTGCCGACCTACGAGGACAAGGACGGCGACTGGATGCTCGTCCGCGACGTGCCG
TGGGAGATGTTCTCGAATCGTGCAAGCGCTTCGGATCATGAAAGGATCAGAAGCCATTGGCCTCGCACCAAGGGCCAT
GGAGAAATGCAAGAACAGAAGCTGAGGAGAAGATGGGCGACGCATGCATCTGAATTATTCTGAGTACCATGGATCTCATCG
GATGCAAGAAGGACCACAGCCTCCACAGCTCTGCTCGTCTGTATCATACTCGTCCCTGTGTTCTCCAAGCCTCTACTAC
CACCTCTGATAATATCAGTGGAGTCATTTGGTGTGTCAACTGCCTATCTGTTCCAGTGAGTCAAGACAGATCAGTCA
GTGTTCCAGTCTGTCATATATACTTCTACTACGAAAGAGAGAAGCCATGAACGTGACCTGTCCTATAACAGCTGCTC
TTTTGCTCTACCTGTTCCCTTTTTTCCACAAAATGCAAAGGCACCCCTGCTCCTAATCAATCAAGGGGGCTCTTTTGCATCTT
GTCGATCAAAAGTTGTTTAAATTAATATTACCATGGTGTGCCACTGGGACAAAATAATTGTTGCAGGCTGTTAAAAAGCTGTAT
TGTATTATCATCTCCTCTCCCTTCTTTGTTCTTTACCATATTGGTGTAACTGTTCCATGCAGTAGCTAGGATTACAAA
CTCCATGATGAAAGATATTGAGATGCCTTGTGTTGTGgTG

>isotig06658

GCGGTATATATGTTACAGGCTTACTTTACAGGGTAGCGATAAATTGAACTTAACAAACATTGCTATGATACAGAGGGGAGCAG
AAGCGAGCGTGTCCATATATATCCTTGCATGCAGTTAATAGCCGGACGCTTTGCATCGCCTTCTCGATCAGCAACTGTTCT
TGCACTTGTCCATCGCCCTCGGCGCGAGTCCGACGGCTTCGATCCTTTATGATCCGGAGGCGCTTGCACGACTCCACG
AACATGTCCCAGGGGACGTGCGCGACGAGCATCCAGTCGCCCTGCTTGTCTCTGACGTGGGCACGTACTCGGAGCCGC
TGAGCAGGTCCGCGAGCTTGGTCTCGTTATGCCCTTATCCCTGCGACCCGACGCTGCCGATGGAGAAGGAGCTGAAC
ATCTTCCAGCTTGGACAGCTCCTGTGATGCTCCCGTCCCTCAGGTCCACCTTGCAGTCCAGTCCGCGCGCCGCTC
CATGCTCACCTTACCACAgCGCCGCGCCGGCGCCGGCGGCGGACCTGCTGCCGTCTGCTGCTTGTGCGCTCCGCC
TTCTGCTGAGACGACGACTGGACGGCGAGGATGTTCTTGGGAACGACCGGACGGGCGGCCAGCCACCGCCTGCGCCT
TGGGTGCGCGAGGCTTATCGGGGTCCGGCTGCGCGCGCGGCTGACCACGCTGCTCTGGCTCGGCGACCTCTTCATGGT
ACCTGCGCCGCGCCGCGCGGCTGCTGCCGACGGCGACGACAGTGGCGCCGTGGCGGGGACGAGGACGACGGCGTCCG
CGGCCGCTGCCTTTGCTCCTCTCTTCCACAGGGTGTATGTGCCGCGGcGATGACGCGGACGCGCGCTGCTCCAGCTT
AGCTTCAGGTCTGATGGTCTCCTCGAAACCCCGTCTCCTCGCCGCGCGGCGTCCCGCGCTCGCTGCCGCGCCGGCA
GGCCGAgCGGAGCTCGGTCTCCTCGAAACCCGAGGCCCGCCATTAGTGTCTCTCTCAATGCGCGCGCGGCGAGATAGA
GTGGCTTTGCTTTTTGATTATGAGAACACAGACACAGACACAGGCCGGCCGGCAGCAGGATGCAGCAaCGCA

>isotig06657

GCGGTATATATGTTACAGGCTTACTTTACAGGGTAGCGATAAATTGAACTTAACAAACATTGCTATGATACAGAGGGGAGCAG
AAGCGAGCGTGTCCATATATATCCTTGCATGCAGTTAATAGCCGGACGCTTTGCATCGCCTTCTCGATCAGCAACTGTTCT
TGCACTTGTCCATCGCCCTCGGCGCTGAACAAAaTCAACATAGACCAGACAGCCAAAGCGCGCATCATCTCGTTAGCATCA
GGTATTCAGTtCAGAActTCAGATGAGCAAAAAGACAGTGTGCAATTTTTTtGGATGCAGCAATTGAGCATGCAGTACTG
ACCGAGTCCGACGGCTTcGATCCTTTATGATCCGGAGGCGCTTGCACGACTCCACGAACATGCTgCAAAATTTCCCGAGG
AAAGAGAAGAAATAGATGCACGGTGAGGAGAACTGATATTTGTcGTGAGTGTGCGCGGGCGGGTGGCGGCGGCGCTTA
CTCCCAGGGGACGTGCGCGACGAGCATCCAGTCCGCTCTTGTCTCTGACGTGGGCACGTACTCGGAGCTGCTGAGC
AGGTCCGCGAGCTTGGTCTCGTTATGCCCTTATCCCTTCCAGTCCCGACCCCGACGCTGCCGATGGAGAAGGAGCTGAACATCTT
CTCCAGCGCTTGGACAGCTCCTGGTAGCTCCCGTACGTCTCAGGTCCACCTTGCAGGATACGGCGCGCGCTCCATGC
TCACCTTACCACAgCGCCGCGCCGGCGCCGGGAGGACCTGCTGCCGTCTGCTTGTGCGCTCCGCCCTTCTGC
TGAGACGACGACTGGACGGCGAGGATGTTCTTGGGAACGACCGGACGGGCGGCCAGCCACCGCCTGCGCCTTGGGT
GCGCGAGGCTTATCGGGGTCCGGCTGCGCGGCGGCGGTTGACCACGCTGCTCTGGCTCGGCGACCTTTCATGGTACCTG
CGCCGCGCGCGGCGGCTGCTGCCGACGGCGACGACAGTGGCGCCGTGGCGGGGACGAGGACGACGGCGTCCGGCGCC
GCTGCCTTGTCTCCTCTTCCACAGGGTGTATGTGCCGCGGcGATGACGCGGACGCGCGCTGCTCCAGCTTACGCTT
CAGGTGATGGTCTCCTCGAAACCCCGTCTCCTCGCCGCGCGGCGTCCCGGCGTCTGCTGCCGCGCGCGGCGAGGCC
GAgCGGAGCTCGGTCTCCTCGAAACCCGAGGCCCGCCATTAGTGTCTCTCTCAATGCGCGCGCGGCGAGATAGAGTGGC
TTTGTCTTTTGATTATGAGAACACAGACACAGACACAGGCCGGCCGGCAGCAGGATGCAGCAaCGCA

>isotig21549_sex

CTCCTACACCcACCCTGCAACCCcAAATCTCCAGCGCGGAGACGAGCAGAGACCCAAGAAGAAGACGAAGCAAGCAAGC
AGAAGCTTAGCTAGCTAGCGGTGGAGCTGCCACGGCCAGAGAGGCGACGACGGCCGCGACAGGCTAGCCGACCAGCA
GCTAGCTAGCTCCCGCGGAGCCGATGGCTGGCGCGGACGTGCAGCTCGGGACGGAGCTCCGGCTCGGCCTGCCGGGAG
GAGGCGCCGAGGCGGCCAAGGCCGGAAGAGGGTTTCAGGACACCATCGACCTCAAGCTGAAGCTGCCACCGCCG
GCATGCGAGGAAGCCCGCCGCTCAAGCCGGAGCCCGCCCGAGAAGGCAAAAGAGGCCCGcGAGGCGCCGGACGCT
GATGCCGAGAAGCCACCAGCACCAAGGCACAAGCTGTGGGTTGGCCACCAGTCCGATACATCCGAGGAACGTCATGAC
CGTCCAATCTGTGAAGAGCAAGAAGGAAGAAGAACTGAGGAGAACAGTCCGCTGTTACAGCCGCGCAACAGCTCTG
CCTTCGTGAAGGTCAGCATGGAGGTCGCGCTACCTACGCAAGGTGGACCTGAAGATGTACGACAGCTACAAGGACCTC

>isotig08582_apo

CcAcTCCTACACCCACCACTGCAACCCCAATCTCCAGCGCGGAGACGAGCAGAGACCCAAGAAGAAGACGAAGCAAGC
AAGCAGAAGCTTAGCTAGCTAGCTAGCGGTGGAGCTGCCACGGCCAGAGAGGGCGACGACGGCCGCGACAGGCTAGCCGACC
AGCAGCTAGCTAGCTCCcGCGGAGCCGATGGCTGGCGCCGACGTCGACGTCGGGACGGAGCTCCGCGCTCGGCCTCCGG
GAGGAGGCGCCGAGGCGGCCAAGGCCGGAAGAGGGGTTTCGAGGACACCATCGACCTCAAGCTGAAGCTGCCACCG
CCGGCATGGAGGAAGCCGCCCGCTCAAGCCGAGCCGCGCCGAGAAAGGCAAAGAGGCCCGCGGAGGCGCCGGAC
GCTGATGCCGAGAAGCCACCAGCACCCAAGGCACAAGCTGTGGTTGGCCACCAGTCCGATCATAACCGCAGGAACGTCAT
GACCGTCCAATCTGTGAAGAGCAAGAAGGAAGAAGAACCTGAGAAGCAACAGTCCGCTGTTACAGCCGGCAGCAACAGCT
CTGCCCTTGTGAAGGTCAGCATGGACGGTGCCTGACCTACGCAAGGTGGACCTGAAGATGTACgACAGCTACAAGGAC
CTCTCCATTGCTCTGAAGAAGATGTTCACTACCTTCGCCACAACCTGGGAAATTGGTTGATCCAGTGAGCGGTGCTGATGTT
GTCACACTTATGAAGACAAAGATGGCGACTGGATGCTTGGTGGTATGTTCCGTGGGAGATGTTTGTGAGTCATGCAAG
CGCCTGAGGATCATGAAGATTCTGAAGCCATTGGTCTTGCACCAAGAGCCAAGGACAAGTGAAGAACAAGAGCTGAACA
AGATGCAGTGTAAAGACGCTGCACATTGTGTCATAAGAATGGTGCCTTGCAGTATGCTACGGTTTTTCTAGAAATATAATG
TTTTAATTACTAGTTGGAGGGAGAGCTGTCTTGTCAATTTGTTTATGGACCAGAAGCAATAATCTATCTGTGTGTAGCTGGA
TTGGTGTATGTGATGTCCCTACTGTGTGCCAGAATCTACTTGGCGATTTTATCCACTGTTGTTAATCAAGCTTGTGTG
ATTGTTAAGTAAAGGGCATCAATGAGACTATTATTATTATGGTACCTTGTAAAGTTAACCTGTTTGTaATTGTCAaTACAATATT
TGGCAAt

>isotig33023

MATTGLGFEETELRLGLPGGGGGGGGEGEGRSSSGKRGFAETIDLKLEPAAVVVNEEDEAAAEDGATGGGVAAAAATEES
SPTAAGKMKRSPSQSSVVTAAAQPDPAEKPRAPKAQVVGWPPVRSFRKNIMSVQSEKGGADADGDKSSSPAAAAFVKVS
LDGAPYLRKVDLKMYSYQDLKALEKMFSSFTIGSCGSGQGMNGMNETKLDLLNGSEYVPTYEDKDGDWMLVGDVPWEMFV
ESCKRLRIMKGSEAIGLAPRAMEKCKNRS*

>isotig22209

MAGLGFEEELRLGLPGGGSDAGDAAAARKRGFEETIDLKLEQPASASSAAHHPVEEEEQEAAAADAVVLPATAPLSSPA
AAAAGGGAGTMRSPSQSSVVTAAAQPDPKPRAPKAQAVGWPPVRSFRKNILAVQSSSQKGGGDKDDGSRSSGAGAAAL
VKVSMGDGAPYLRKVDLRTYGSYQELSKALEKMFSSFSIGSCGSGQGMKGMNETKLDLLSGSEYVPTYEDKDGDWMLVGDVPW
DMFVESCKRLRIMKGSEAVGLAPRAMDKCKNSC*

>isotig22208

MAGLGFEEELRLGLPGGGSDAGDAAAARKRGFEETIDLKLEQPASASSAAHHPVEEEEQEAAAADAVVLPATAPLSSPA
AAAAGGGAGTMRSPSQSSVVTAAAQPDPKPRAPKAQAVGWPPVRSFRKNILAVQSSSQKGGGDKDDGSRSSGAGAAAL
VKVSMGDGAPYLRKVDLRTYGSYQELSKALEKMFSSFSIGSCGSGQGMKGMNETKLDLLSGSEYVPTYEDKDGDWMLVGDVPW
E*

>isotig22774

MAGADVDTGTELRLGLPGGGAEAAKAAKRGFEDTIDLKLELPTAGMEEAAAVKPEPAAEKAKRPAEAPDADAEPKPPAPKAQAVG
WPPVRSYRRNVMTVQSVKSKKEEPEKQQSAVTAGSNSSAFVKVSMGDGAPYLRKVDLKMYSYKDLKALKMFSTFATTGNN
MNEGKLVDPVSGADVVTYEDKDGDWMLVGDVPWEMFVESCKRLRIMKSSEAIGLAPRAKDKCKNKS*

>isotig22775

MAGADVDTGTELRLGLPGGGAEAAKAAKRGFEDTIDLKLELPTAGMEEAAAVKPEPAAEKAKRPAEAPDADAEPKPPAPKAQAVG
WPPVRSYRRNVMTVQSVKSKKEEPEKQQSAVTAGSNSSAFVKVSMGDGAPYLRKVDLKMYSYKDLKALKMFSTFATTGKL
VDPVSGADVVTYEDKDGDWMLVGDVPWEMFVESCKRLRIMKSSEAIGLAPRAKDKCKNKS*

>isotig36834

LSHPHQTHELSISQETSSPSLSASSWELDPSPQRTRDFRSWYACGVWLDMAAPPQERDYIGLSPAAAATELRLGLPGTEDAEG
GAAAAGTPLTLELLPKGGAKRGFADAIVRREAAARGKAPAEDEEDKKAQAPAAKAQVVGWPPIRSRYRKNMTAMNQPTLKS
DEVEAKQELVHDCLYVKVSMGDGAPYLRKVDLKYKYNKELSLALEKMFSCFTVGHDESTGKSGREGQSDCRLMDLKNGT
TYKDKDGDWMLVGDVPWRMFTGSCRRLRIMKGSDAVGLAPRTSEKSKHGN*

>isotig05559

SSPLSPLPHAQTTTPYLPHPSVHVLPLMSPPLELDYIGFSPPPAAAADAAEDLKGTTELRLGLPGSESPDRRVAATTATLDLLP
AKGAKRGFSDEAPPPSPAATAGKGGKVAEEEDDKAAATQPAAKAQVVGWPPIRSRYRKNLATTQLKGSKEDAEAKQGQFL
YVKVSMGDGAPYLRKIDLKTYKYNKDLSTALEKMFSGFSTGKDGLSEYCKDGEYVLTIEDKDGDWMLVGDVPWEMFADSCRRLR
IMKGSDAIGLAPRAADKSKNRN*

>isotig05557

SSPLSPLPHAQTTTPYLPHPSVHVLPLMSPPLELDYIGFSPPPAAAADAAEDLKGTTELRLGLPGSESPDRRVAATTATLDLLP
AKGAKRGFSDEAPPPSPAATAGKGGKVAEEEDDKAAATQPAAKAQVVGWPPIRSRYRKNLATTQLKGSKEDAEAKQGQFL
YVKVSMGDGAPYLRKIDLKTYKYNKDLSTALEKMFSGFSTGKDGLSEYCKDGEYVLTIEDKDGDWMLVGDVPWEMFADSCRRLR
IMKGSDAIGLAPRAADKSKNRN*

>isotig05558

SSPLSPLPHAQTTTPYLPHPSVHVLPLMSPPLELDYIGFSPPPAAAADAAEDLKGTTELRLGLPGSESPDRRVAATTATLDLLP
AKGAKRGFSDEAPPPSPAATAGKGGKVAEEEDDKAAATQPAAKAQVVGWPPIRSRYRKNLATTQLKGSKEDAEAKQGQFL
YVKVSMGDGAPYLRKIDLKTYKYNKDLSTALEKMFSGFSTGKDGLSEYCKDGEYVLTIEDKDGDWMLVGDVPWEMFADSCRRLR
IMKGSDAIGLAPRAADKSKNRN*

>isotig37255

SARSPARSPTRRRRAPAMSVETERSSSTESSAASGIDFEDTALTTLRLPGSAAAAAASSSSSSPAPFPDADRKRASDADRSSPLAA
ADADASADEAPAPKARVVGWPPVRSYRKNALADAAGASSRAGKRAAKFVKVAVDVGAPYLKVDLEAYAGYDQLLRALQDKFFS
HFTIRKFADDERKLVDAVNGTEYVPTYEDKGDWMLVGDVPMKMFVETCQRLRLMKSSSEAVNLAPRAAR*

>isotig39351

RAAALHSSSSSSSPAPRLTLRLGLPGSESPARDRDDVAAALSLGPLHSLPKLPAAPTCAASAKRAFPPPAHRTGAGAKASDDK
QASHAAPPAKAQVVGWPPVRYRKNLTLAAASASKSKAPAEGAAASGGGGPMYVKVSMGAPYLKVDIGMYSSYEDLSVAL
EKMFSCFIAGQSGLCKSSSKDRLNNGSNADAVQDSEYVLTIEDKADWMLVGDLPWDLFTTICRKLKIMRGSDAVGIAPRTIEQT
GQNK*

>isotig35347

RLHTSSPNEPTNKKRRPLAALAWLHHLHASPSRVRLPPPASPMLPPEARDDYIGLGGAGAGASSCCSSSSSSSGEGGAGPHLALR
LGLPGSDSPGRGADVDAALTLGPAPPPRGGAKRGFEDSLDRSAVKRDAADGAGGGVRAEGMGVAETAAAGAPRAAKAQ
VVGWPPVRSYRKNLTLAATATPKGEDEGRSEAGCCYVKVSMGAPYLKVDLKYSSYEDLSIGLEKMFSCFITGKNSSCKPSR
KERLTDGSRADALQDQEYVLTCEDKDADWMLVGDLPWDLFTTTCRKLRLMRGSDAAGMAPRSLEQIGRKN*

>isotig08196

TKFLSSSSSIASVHPPSSSLSVSSRTGKLASLSISELLSPMEIDADNLSATELRLGLPGTSSGDDGCWQKKPSLPGVGGTKRAL
DDTRSEASGTSPAGTAADDDHDATAAPAKAVVGWPPVRYRKNLTFQAAAAAKKAEPQQQGGGGGLYVKVSMGAPYLK
VDLRLMYKGYRELRDALDLFTKSSAGAAADGGDQQQHAVAYEDKGDMLVGDVPWDMFVSSCKKLRLMKGSEAR*

>isotig08195

MEIDADNLSATELRLGLPGTSSGDDGCWQKKPSQPGVGGTKRALDDTRSEASGTSPAAAGAAADDDHDATAAPAKAVVGWPP
VRYRKNLTFQAAAAAKKAEPQQQGGGGGLYVKVSMGAPYLKVDLRLMYKGYRELRDALDLFTKSSAGAAADGGDQQ
HAVAYEDKGDMLVGDVPWDMFVSSCKKLRLMKGSEAR*

>isotig20433

MSEEPARSSTESSAASSGLDFEDTALTTLRLPGSAAADRSPRASHAPPSPKAQVVGWPPVPRNRRNALPRSKFVKVAVAGAPY
QRKVDLEAYAGYQQLLAALQDMFTSHFTVRRVGDDEEMELVDVSGVEYVPTYEDKGDWMLVGDVPMFVACQRLRLMK
SSEVVNLAPRDAQ*

>isotig36601

MSTATANSAASPAVSGLDYDDTALTALPGSSSAADRNRKRAADHDDKPPSPKARAVGWPPVRYRNRNALRDDEAKLVKAVDVG
APYLKVDLAHHDGYAALLRALHAMFASCLHADGAARKLVDAATGAEYVPTYEDKGDWMLVGDVPMFVDSCKRIRLMKSS
EAVNLSPRTSR*

>isotig37906

EKLAITVPEQTHRQVTFYGGGSHVDNMETVVGDLMATELRLGLPGTAGDSQPPQMRAPSTPRGKRTCTTDAVAEDAAAAA
AEEAASNNRDVEAAPPAAKAPVVGWPPVRSYRKSFCVQQAATTNTKQSKQLAANKKEEAAAPSGGNTTAASAATTAGAAAA
GGSFVKVSMGAPYLKVDLRLMYKGYRELRLEAMFVSSNNSGGANLSEFAVTYQDKGDMLVGDVPFEMFTGTCKKLRLM
KRSEATGLGGSARQ*

>isotig21828

MAWRGRLGEPGDTGLELSLGLPAYFAKPSGLDTAGEESGDAAPPLALRAAKGSDGSKARAARPASAAPVVGWPPVRSFRRNL
ASSRPSQSSSAHHQDGGDAAKGGGERGAHKGGGLGLFVKINMDGVPIGRKVDLRAVSGYAELSAAVGKLFRLAAQRDPS
AAAAAGSRRCGEEAEAEAGEPVIIGDYTLVYEDDEGDRVLVGDVPWEMFVATAKRLRVLKASDLPASSLRAGGGRKRAAAD*

>isotig23440

GGGGVFWSAFERVSSPPRTSPMGDSKERAALLRLLDLIPDGKQWNASGAESAGRSRNAGFGSEEDRELELKLGLPGLVVEET
AAVPRDEGVQREPPVLSLGCCEPLKPMVNTATAGTKRGFLDTIEAKTEGCDGQKQAGAGCGNELALENLTTASERKKGCC
APTPQHAPPATVRSRPAQGRGSSAPVVGWPPVRSFRRNLAHGSSSKQSTEPQRGEASMKELACKKNPLVKINMDGPIGRKV
DLAAYDSYERLSLAVKELFHGFLEAQKDLSSVESTQLGADEKIFSQLLDGSGEYTLVYEDNEGDRMLVGDVPWNVVFVSTAKRLR
VLRSELSHGLAGVAPRRVPNC*

>isotig38167

RAYKESQPAHDDLQCTHAVSLELVGGDPPGGEQLELGGVEMGDAAESSKAALHNWMEGSPAPASDQDDEEKGLQLSLGLP
GAGGGGGGGAAAGWRTAAARDKEKHAADVSSMLSLGYSAAAFSPCSRGRAGKSPAAAAENALASTNNVSQTRSPNTPVIG
WPPVVRTFRRNLATSSKVSLEHQNGKKAAPKEETTKRAFVKINMDGPIGRKIDLNALDSYDKLSLTVDKLFRGLAAQQEPIVAG
TNECPREEVEISGLLDGTGEYTLVYEDYEGDRVLVGDVPWGCFLQ*

>isotig45013

MELELALAPPNAHRPVISHLADELSSSSSDSSSRGKRGFGEAFQDATLPLFDDGSSCGGNKKPLVWPPVSSARSRARGGGCA
ANYVKVKEGDAIGRKVDLSLHASYYDILLATLGRMFPTSNQDDNNETGSSTSHLVVTYEDGEGDWMLVGDVPWDDFARSVK
RLKILG*

>isotig22414

PKHTLPRAKKQSSEMRGGGGPTAAFISGEPPEAAAAEEVEENSGGEEEEEEQEQEDDELELGLCLGSKKQQQTPSPAPC
 RILTARDLQPGALSPDSSVSSSSPAAGAAAASKRAKAEAPPNATTSPTGTVASGHPQSFVGVVWPPPIRTFRMNNLNFQAKDNASE
 VGAKKADESMDQKDEESEKKGRVVGWVKVNMGDGDIIGRKVDLNAHRSYKTLASALELMFMKPSIGLCTSSSAKSLNLENSS
 EYQLTYEDRDGDWMLVGDVPWEMFVGSVKRLKIMRTSDANDLGRPFQGVHRTAACTRGR*

>isotig12494

ASQAFSRARFRSRLPLVSSSSGGIVIASRPASSSVAIPASCIDPLRRVAAMV/MEMMIDAELRLGPPGCDVTVVQPARKKPASAA
 KRPSVVRSEASGTDDHDDASPASKVQVVGWPPVVRAYRKNAFHAAEAASARTTAKKGEQGGGLYVVKVMSMDGAPYLRKVLDL
 TYGGYRELRLDALDVLFGCFSSSSADGGGGGCGFAIAYEDKDGDLMLAGDVPWDMFICSCKKLIRMRGSEAR*

>isotig34296

QLSPRLLQRPPSSSHSHGLTQRFLSSSGRCCSVRSASTMEEGSGRERAQPTPQLLNLRDEREWKAIGEEGGGGRRGSSRTTGP
 DAAEDSKLELKLGLPGVHDDERAPGPGKEKMDQEQEEESCTALSGLCFSSPSQSKLAASAATATAGAKRGFLATVGGAKPAG
 CSQRQQQDREGCGDGLTLGGENMAGERKKGCCPPSSSHEDSAAGLVRSSRGTVPPVVGWPPVRSFRRLNTNVSSSKQSPQ
 HNDEAGDKAKLTGKRSTLIKINMDGIPIGRKIDLAAYDNYQLSSAVQDLFRGFLECTNAPKDLACSEIGDQGVGKIFSGLLDGTG
 EYTLIYEDNEGGRTLVLGGLPWNVVFVSTARRLRVMKSELPHGLIKTASGRADH*

>APO_Q4117_a

GGTGGACCTCAAGATGTACAAGAGCTACCAGGACCTGTCCAAGGCGCTCGAGAAGATGTTTCAGCTCCTTCACCATCGGTA
 CGTAGTTACGTACGTAATTAATTATTACCATTTCTCTACAAAATAAATTAATCATGCATGGATTTTTCTAATTAATAATTAATC
 AAAAATTAGAGAGTGCCAAACCAAGTAGTAGCTGCAATTGTGCATGTTGGGTAACAGACTGCAGATTAGTGGGCAAATCTT
 TCTTGTTCGACTTTAATTTGCAGCTTATTATTAGTTATTTCCACATGAATGAAATACTATATAGTTTGCTCATGAAATCTTT
 ATATAAAAAGAGTACTAACTAACTTGAAGTACTCATATTACCAGTGGACTCCTCCTCCATTGTGTTGTGTATATAAATTTGC
 ACACGTTGGGTATGTAGAGCTTATGATTGCATTATTGGCATTTCGCATGTGTGGTGGTGGTCCACATGTGGTTTTCGCCAGT
 GCGCGCTCCATGATTTGCATCCTTGGTAGGTGTCCGCCATAGCTGGCATAAGTCCGCTGTCCCTCCAACACCGAGATGG
 CGGACCGATCGAGTATCTTCTCCGGCGCCCTTTCTTCGCTCCTTGTGCGCGCTGCCTGTGAGCAACTACATGCATGTG
 TAGCTCATGATCATGTGTGCACGCTTCTTCAGTCAGTACGCTCCATCGGCGGCAGCTGGTCCGTCGGATCCATCATTACCA
 TGTGCTGTTTCGCGCCTTGAATCTTCCATGTCTAAACTAATCCACGTTTCATCGGCTGCACATATCTTATAGCTGCAG
 AAAAGGGAGCTGTTGCTGTTGCTCTGCACCAACCGTGCATGGATTTGTTAAAAATAGTATATATGGATTTGATGGATCATT
 CATATCGAGCTATACCATAGCAGCTTTGACGCTTGTCTTGGTAcggtggaacgctcgtagagtagcgggctcaacaccctcgtatcgtgaagaat
 ttcaaaatgtatactctcgtatcgtcagATTGTTTCCAGTTGCAGAGAGTTATATTATCCAGTACAGTAGTTAACCTTGACTTGGATTCAGA
 ATCGACTTGCTGATTATGTGTTAAATTTCTGGCAGGAAGCTGTGGGTCCTCAGGGGATGAACGGCATGAACGAGAGCAAG
 CTGGTGGATGCTCAACGGCTCTGAGTACGTGCCGACCTACGAGGACAAGGACGGCGACTGGATGCTCGTCCGCGACG
 TGCCGTGGGAGTGAGCACACACAGCTTCTCCTTCTTCATGCATGCATGAATCCCTATGCTCTGAAAAAATACAGTATG
 TGCGTCGATATGGTCGTCAGTTCTTCTCATCTGGAAATCTCGTCTCATTTCAGGATGTTGTCGAATCGTGAACGCCCTT
 CGGATCATGAAAGGATCAGAAGCCATTGGCCTCGGTGAGTGGATTATTGATATAAATAATGCTATAAAAAATAAAGTTTCAGATG
 AAATTTTGTAGGCTGCTAGCAACTTAATCTGGAGAGATGCTGCATAACAACAGTGACACTCAGTCATTTTATATCCGTGACT
 TTGATTTTTTTTTCAGCACCAAGGGCCATGGAGAAATGCAAGAACAGAAGCTGAGGAGAAGATGGGCGACGCATGCATCTGA
 ATATTCTGAGTACCATGGATCTCATCGGATGCAAGAAGGACCAAGCCACAGCTCTGCTCGTCTCTGTATCATACTCG
 TCCCTGTGTTCTCAAGCCTCTACTACCACCTCTGATAATACAGTGGAGTCATTTTGGTGTGTCAACTGTCCTATCTGTTT
 CAGTGAGTCAGTAAGACAGTCAGTCAGTGTTCGAGTCTCATCTTGTATATATACTTCTACTACGAAAGAGAGAAGCCATGA
 A

>SEX_Q4188_a

GGTGGACCTCAAGATGTACAAGAGCTACCAGGACCTGTCCAAGGCGCTCGAGAAGATGTTTCAGCTCCTTCACCATCGGTA
 CGTAGTTACGTACGTAATTAATTATTATTACCATTTCTCTACAAAATAAATTAATCATGCATGGATTTTTCTAATTAATAATTA
 ATCAAAAATTAGAGAGTGCCAAACCAAGTAGTAGCTGCAATTGTGCATGTTGGGTAACAGACTGCAGATTAGTGGGCAAAT
 CTTTCTGTTTGCACCTTAATTTGCAGCTTATTATTAGTTATTTCCACATGAATGAAATACTATATAGTTTGCTCATGAAATTC
 TTTATATAAAAAGAGTACTAACTAACTTGAAGTACTCATATTACCAGTGGACTCCTCCTCCATTGTGTTGTGTATATAATT
 TGCACACGTTGGGTATGTAGAGCTTATGATTGCATTATTGGCATTTCGCATGTGTGGTGGTGGTCCACATGTGGTTTTCGCC
 AGTGGCGCGCTCCATGATTTGCATCCTTGGTAGGTGTCCGCCATGGCTGGCATAAGTCCGCTGTCCCTCCAACACCGAGA
 TGGCGGACCGATCGAGTATCTTCTCCGGCGCCCTTTCTCCTCCTTGTGCTGCCGCTGCCTGTGAGCAACTACATGCAT
 GTGTAGCTCATGATCATGTGTGCACGCTTCTTCAGTCAGCTAGCTCCATCGGCGGCAGCTGGTCCGTCGGATCCATCATT
 CCATGTGCTGTTGTCGCGCCTTGAATCTTCCATGTCTAACTAATCCGCGTGTTCATCGGCGTGCACATATCTTATGGCTG
 CAGAAAAGGGAGCTGTTGCTGTTGCTCTGCACCAACCGTGCATGGATTTGTTAAAAATAGTATATATGGATTTGATGGATC
 ATTTCCATATCGAGCTATACCATAGCAGCTTTGACGCTTGTCTTGTGTTACGTTGGAACGCTCGTATAAAACCGGCTcAACAC
 CCTCGATCTGGAAGAAATTTCCAAAATGTATACTCTCGATCGTCAAGTTGGTTGCGAGTTGCAGAGATTATATTATACAGTAC
 AGTAGTTAACTTGACTTGGATTGAGAATCGACTTGTGATTATGTGTTTTAATTTCTGGCAGGAAGCTGTGGTCTCAGG
 GGATGAACGGCATGAACGAGAGCAAGCTGGTGGATCTGCTCAACGGCTCTGAGTACGTGCCGACCTACGAGGACAAGGA
 CGGCGACTGGATGCTCGTCCGCGACGTGCCGTGGGAGTGAGCACACACAGCTTCTCCTTCTTCATGCATGCATGAATT
 CCTATGCTCTGAAAAAATACAGTATGTGCGTGCATACGGTGTGTCAGCTTCTCCTCATCTGGAATCTCGTCTCATTTCAG
 GATGTTGCTCGAATCGTGAACGCCCTTCGGATCATGAAAGGGTCAGAAGCCATTGGCCTCGGTGAGTGGATTATTGATAT
 AATAATGCTCAAAAAATAAAGTTCCAGATGAAATTTGTAGGCTGCTAGCAACTTAATCTGGAGAGATGCTGCAGAACAACA
 GTGACACTCAGTCAATTTTATATCCGTGACTTTGATTTTTTTTTTTCAGACCAAGGGCCATGGAGAAATGCAAGAACAGAAG
 CTGAGGAGAAGATGGGCGACGCATGCATCTGAGTTATTCTGAGTACCATGGATCTCATCGGATGCAAGAAGGACCACAGC
 CTCCACAGCTCTGCTCGTCTCTGTATCATACTCGTCCCTGTGTTTCTCAAGCCTCTACTACCACCTCCTGATAATATCAGTG
 GAGTCATTTTGGTGTGTCAACTGTCTATCTGTTCCAGTGTGTCAGTCAAGACAGTCAGTCAGTGTTCGAGTCTCATCTTGT
 ATATATACTTCTACTACGAAAGAGAGAAGCCATGAA

>APO_Q4117_b

GGTGGACCTCAAGATGTACAAGAGCTACCAGGACCTGTCCAAGGCGCTCGAGAAGATGTTTCAGCTCCTTCACCATCGGTA
 CGTAGTTACGTACGTAATTAATTATTATTACCATTCTCTACAAAATAAATTAATCATGCATGGATTTTTCTAATTAATAA
 ATCAAAAATTAGGGAGTGCCAAACCAAAGTAGTAGCTGCAATTGTGCATGTTGGGTAACAGACTGCAGATTAGTGGGCAA
 TCTTTCTGTTTGCACCTTAATTTGCAGCTTATTATTAGTTATTTCCACATGAATGAAATACTATATAGTTTGCTCATGAAATT
 CTTTATATAAAAAGAGTACTAATACTTGTAAAGTAGTCATATTACCAGTGGACTCCTCCTCATTGTGTTGTGTATATAAT
 TTGCGCACGTTGGGTATGTAGAGCTTATATGATTGCATTATTGGCATTTCGCATGTGTGGTGGTGGTCCACCATGTGGTTTCGC
 CAGTGGCGCGCTCCATGATTTGCATCCTTGGTAGGTGTCCGCCATGGCTGGCATAGTGTCTGTCCCTCCAACACCGAG
 ATGCGGACCGATCGAGTATCTCTTCTCCGGCGCCCTTTCTCGTCTCTTGTGCGCGCTGTGAGCAACTACATGCAT
 GTGTAGCTCATGATCATGTGTGCACGCTTCTTCAGTCAGCTAGCTCCATCGGCGGCAGCTGGTCCGGTCCGCATCCATCATT
 CCATGTGCTGTTGCTGCGCCTTGAATCTTCCATGTCTAACTAATCCACGTGTTTCATCGGCGTGCACATATCTTATAGCTG
 CAGAAAAGGGAGCTGTTGCTGTTGCTGTTGCTCTGCACCAACCGTGCATGGATTTGTTAAAAATAGTATATATGGATTTGA
 TGGATCATTTCATATCGAGCTATACCATAGCAGCTTTCGACGCTTCTTCTTGTACGTTGGAACGCTCGTATAAAACCGGC
 cAACACCCTCGATCTGGAAGAAATTTCCAAAATGTATACTCTCGATCGTCAGTTGGTTGCAGTTGCAGAGAGTTATATTATA
 CAGTACAGTAGTTAACCTTGACTTGGATTGAGAATCGACTTGTGATTATGTGTTAAATTTCTGGCAGGAAGCTGTGGGT
 CTCAGGGGATGAACGGCATGAACGAGAGCAAGCTGGTGGATCTGCTCAACGGCTCTGAGTACGTGCCGACCTACGAGGA
 CAAGGACGGCGACTGGATGCTCGTGGCGACGTGCCGTGGGAGTGAGCACACACACAGCTTCTCCTTCTTCATGCATGCA
 TGAATCCCTATGCTCTGAAAATCTTCTCCTCATCTGGAAATCTTCTCATTTCAGGATGTTGCTCGAATCGTGAACGCGC
 TTCGGATCATGAAAGGGTCAAGGCCATTGGCCTCGGTGAGTGGATTATTGATATAATAATGCTACAAAATAAAGTTCAAG
 TGAATTTTGTAGGCTGCTAGCACTTAATCTGGAGAGATGCTGCAGAACACAGTGACACTCAGTCATTTTCATATCCGTG
 ACTTTGATTTTTTTTTTTCAGCACCAAGGGCCATGGAGAAATGCAAGAACAGAAAGCTGAGGAGAAGATGGGCGACGCATGC
 ATCTGAATTATTCTGAGTACCATGGATCTCATCGGATGCAAGAAGGACCACAGCCTCCACAGCTCTGCTCGTCTCTGTATCA
 TACTCGTCCCTGTGTTCTCCAAGCCTCTACTACCCTCCTGATAATATCAGTGGAGTCATTTTGGTGTGCAACTGCTCTAT
 CTGTTCCAGTGAGTCAGTAAGACAGTCAGTCAGTGTTCGAGTCTCATTTGTATATATACTTCTACTACGAAAGAGAGAAG
 CCATGAA

>isotig19745

MVESEVGVNIGKRMEEGKAAGESGDEGKIERSPSINLNTVPAAVEAIGTQENGETNGAVVSAAKDAGAGKAGQSGVDYQEKL
 PKCEQVDYSEAECEDAENPAKKAALVTLVGNEDCGDVERAQLVTVVKDEPADDIGDCINPVTVAEYGEVKSAVGASAGTS
 AVRPAATTRSSSFHGVTRHRWSGKYEHLWDSSCRVEGRRRKGKQVYLGSYDTEEKAAARAYDVAALKYWGQNTKLNFPVSQY
 GKELEDIRDLSREECVTYLRSSCFSRGASIRYRVTRRQKDRWQARIGLVAGTRDIYLGTFKTEEEAAEAYDIAAIEIRGNNAV
 TNFDRSNYCDKGMHCIEGEGRLRLASKPE*

>isotig07295

MAKPRKTSAAAAAANSNSGNNAAGDLAARVVKPRTRKSVPRESQSRSSVYRGVTRHRRTGRFEAHLWDKNSWNESQNKKG
 KQVYLGAYDDEEAAARAYDLAALKYWGPDITLNFASAYEEMKEMEGQSREEYIGSLRRKSSGFSRGSVSKYRGVARHHHNGR
 WEARIGRVFGNKYLGLTYATQEEAAMAYDMAAIEYRGLNAVTFNFDLSRYIKWLRPGADGVAQAAAAQNPMLGGLAQQQLQP
 PAADAVDGAFAQLRAEFPLPPRSSLGHTPTTSALLQSPKFKEMIERTSAAESVGATTTSPSSPSPSPSPSPMPEQQQATS
 RDSGGTSPQCSFPEDIQTFGGCEDVAGVGVVDVDFGDLAAYASPAHFELD*

>isotig07297

MAKPRKTSAAAAAANSNSGNNAAGDLAARVVKPRTRKSVPRESQSRSSVYRGVTRHRRTGRFEAHLWDKNSWNESQNKKG
 GKQVYLGAYDDEEAAARAYDLAALKYWGPDITLNFASAYEEMKEMEGQSREEYIGSLRRKSSGFSRGSVSKYRGVARHHHNG
 RWEARIGRVFGNKYLGLTYATQEEAAMAYDMAAIEYRGLNAVTFNFDLSRYIKWLRPGADGVAQAAAAQNPMLGGLAQQQLQP
 PPAADAVDGAFAQLRAEFPLPPRSSLGHTPTTSALLQSPKFKEMIERTSAAESVGATTTSPSSPSPSPSPSPMPEQQQAT
 SRDSGGTSPQCSFPEDIQTFGGCEDVAGVGVVDVDFGDLAAYASPAHFELD*

>isotig36244

RARRKSGPRDPSQSRSSAYRGVTRHRRTGRFEAHLWDKDNARGARNKKGKQVYLGAYDDEEAAARAHLAALKYWGPGTVL
 NFPLCGYEEELKEMEAQPREYIGSLRRRSGFSRGSVSKYRGVARHHHNGRWEARIGRVLGNKYLGLTFATQEEAAVAYDIAA
 IEHRLNAVTFNFDISLYVDHWHRRQRQGPAGDDSLHIMDDAPTVPFSLPDDMLECAASATTIGLGETSGGAADFHKGEGHLLHQ
 TTFPLGTSQLPDQMPPAPAPVLAQAGGVAHHHLLPFSPRHPQFLTNGGDPGTAAGGLSLGIGGAGGGGGHWPPLQHQQQ
 DGAPALCSFPDDVQTFDFLENDMSFTADVDTFLFGDLSAYAAPMFQIDLVD*

>isotig06879

PARRLPAPPPRRGPAAKKSRRGPRSRSSQYRGVTFYRRTGRWESHWDGCKQVYLGFDTAHAAARAYDRAAIKFRGVADIN
 FSLEDYEDDMKQMQMGNLSKEEFVHVLRRQSTGFPRGSSKYRGVTLHKCGRWEARMQFLGKQVYVYLGFDTEEEAARAYDRA
 AIKCNKDAVTFNFDPSIYAELEPAASTGGGGGGDEHNLDSLSSAGNKRGTLLDGDDETSQDRVPMAFDLWQTAPPRT
 KAKFDASSKQPMPPAPAPVLAQAGGVAHHHLLPFSPRHPQFLTNGGDPGTAAGGLSLGIGGAGGGGGHWPPLQHQQQ
 RLHISWGSAGGGTWPPLPPPTAAATAAAASSRFPFVTAQGPSWAQKNGFHSARPT*

>isotig06878

MASLCSNAGIAASRSIWWSSIHLHLVHTHPYLGTPRRYQSAGAFSALRFLAHKWLDEFAGGFDTAHHAAARAYDRAAIKFRGVEA
 DINFSLEDYEDDMKQMQMGNLSKEEFVHVLRRQSTGFPRGSSKYRGVTLHKCGRWEARMQFLGKQVYVYLGFDTEEEAARAY
 DRAAIKCNKDAVTFNFDPSIYAELEPAASTGGGGGGDEHNLDSLSSAGNKRGTLLDGDDETSQDRVPMAFDLWQTAPP
 RSTKAKFDASSKQPMPPAPAPVLAQAGGVAHHHLLPFSPRHPQFLTNGGDPGTAAGGLSLGIGGAGGGGGHWPPLQHQ
 QQRLHISWGSAGGGTWPPLPPPTAAATAAAASSRFPFVTAQGPSWAQKNGFHSARPT*

>isotig31692

MVLDLNVASPADSGTSSSSVLNSADGGFRFGLLGSPADDEDCSGEMAPAASSGFMTQRQLFPPPTPPPEPEPAAAPVPVWQPR
 RAEDLLVAQRPVATAAAKTRRGPRSRSSQYRGVTFYRRTGRWESHIWDCGKQVYLGGFDTAHAARAYDRAAIKFRGLEADI
 NFSLGDYEDDLKQMRNWTKEEFVHILRRQSTGFARGSSKYRGVTLHKCGRWEARMGQLLGKKYIYLGFLDSEVEAARAYDRAA
 LRFNGREAVTNFEPSSYNAGDALPNTETEAIAADADAVDLDLRISQPNVQDTRKDNLAGLPTCDSPESSNTMSAQPMSSSSPWP
 VYRQSPAVPSHHQLLYSSASHGHGFFPNHQERPMERRPEAGAQPFPPTWAWQMCGSPHMLHQSAASSGFSTAAAGPNGGV
 PLPSHPRAQFPIHQVFFP*

>isotig23310

EGCSSTSPPIVTRQLFSPASDGSSPPPPPPLEVAVPWVRRADLGASAASQGAVLVPAPPSPAAAAGKKRRRGPRSRSSQY
 RGVTFYRRTGRWESHIWDCGKQVYLGGFDTAHSAAARAYDRAAIKFRGLDADINFQLKDYEDDLKQMRNWSKEEFVQILRRQST
 GFARGSSKYRGVTLHKCGRWEARMGQLLGKKYIYLGFLDTEIAARAYDRAAIRFNGPDAVTNFDSSSYDDGDVPLPPEIEKDVV
 DADILDNLKISQPNVHDSKSDGILTGFLSFCFPEASSSVSQPISPQWPVHPHSTSVPYASRPGFFVNREAPMEERRPEPPP
 GPQSFPAAWAWMQGYAPALLPTTAASSGFSTVAGAAATTHGVPPPPSGPRQFAFAGNQLRFPPTA*

>isotig23311

EGCSSTSPPIVTRQLFSPASDGSSPPPPPPLEVAVPWVRRADLGASAASQGAVLVPAPPSPAAAAGKKRRRGPRSRSSQY
 RGVTFYRRTGRWESHIWDCGKQVYLGELRF*

>PnAP2L_Q4117_APO

TGGCAGCTCCAAGTACAGAGGCGTCACGCTCCACAAGTGCGGGAGGTGGGAGGCGCGCATGGGCCAGTTCCTCGGCAAG
 AAGTATGGCGCTCCCCGCCGATCACCCCAATTCCTTTCTCCCTTCTGCCCAACCGGCATCCACCACCCCTCGTCTTT
 CCTCATCCTCAATTCCTCATCAACAGCATCGTCCGATATTCAGGATAGCTGTCACTTCCGATCTGCAGGTACGTCTACTTG
 GGGCTGTTGACACCGAGGAGGAAGCTGCCAGGTAAAATAATTGGACCGCACTGTGCCGTTGCTCGCGAGGCGTTTTGCG
 GAGAGGTGCGGAACAACACTGCGCGCCAGCAGGCAGCAGAGCGCCCTCTAGTCTACCTCTGATTGATGATGATGATGCCC
 CGTGTCTGCGGGATTAATAAATTGTCGGGTGTGCACTGCAGGGCGTACGACCGCGCGGCCATCAAGTGCAACGGCAAGGA
 CGCGGTGACAAACTTCGATCCCAGCATTTACGCCGAGGAGCTCGAGCCGGCGGGTTCGTTTTCTGCGCTGCCCGGCC
 GATACAGGCATGCATCTCTGTTTCATCTCTGACGTGACGACGGCCCGCTGTTTCGCTGCGTGACGCGTGCACGGCGCGC
 GCGCGCGCGCGGACGAGCACAACCTTGACCT

> PnAP2L_Q4188_SEX

GGCAGCTCCAAGTACAGAGGCGTCACGCTCCACAAGTGCGGGAGGTGGGAGGCGCGCATGGGCCAGTTCCTCGGCAAGA
 AGTATGGCGCTCCCCGCCGATCACCCCAATTCCTTTCTCCCTTCTGCCCAACCGGCAACCACCACCCCTCGTCTTTT
 CCCATCCTCAATTCCTCATCAACAGCATCGTCCGATATTCAGGATGGCTGTCACTTCCGGTCTACAGGTACGTCTACTTGG
 GGCTGTTGACACCGAGGAGGAAGCTGCCAGGTAAAATAATTGGACCGCACTGTGCCGTTGCTCGCGAGGCGTTTTGCGG
 AGAGGTGCGGAACAACACTGCGCGCCAGCAAGCAGCAGAGCGCCCTCTAGTCTAACCTCTGATTGATGATGATGATGCCC
 CGTGTCTGCGGGATTAATAATTGTCGGGTGTGCACTGCAGGGCGTACGACCGCGCGGCCATCAAGTGCAACGGCAAGGACG
 CGGTGACAAACATCGATCCCAGCATTTACGCCGAGGAGCTCGAGCCGGCGGGTTCGTTTTCTGCGCTGCCCGGCCGAT
 ACAGGCATGCATCTCTGTTTCATCTCTGACGTGACGACGGCCCGCTGTTTCGCTGCGTGACGCGTGCACGGCGCGCGC
 GCGGACGCGCGGCGACGAGCACAACCTTGACCTAA