



T 576.3 '887 MFN
R 7326 ej. 1 267
F 20-10-10

FACULTAD DE CIENCIAS BIOQUIMICAS Y FARMACEUTICAS

UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO

**ESTUDIOS DE LOCALIZACION Y HERENCIA DE GENES RELACIONADOS CON
LA APOMIXIS EN RAZAS TETRAPLOIDES DE *PASPALUM NOTATUM***

LIC. JULIANA STEIN

TESIS PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLOGICAS

DIRECTORES: DR. JUAN PABLO A. ORTIZ

DRA. SILVINA C. PESSINO

ROSARIO - ARGENTINA

2006



**Estudios de localización y herencia de genes relacionados con la apomixis en razas
tetraploides de *Paspalum notatum***

Juliana Stein

Licenciada en Biotecnología – UNR

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas, 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 los Laboratorios de Fisiología Vegetal y Biología Molecular, dependientes de la Facultad de Ciencias Agrarias – UNR, y en el Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE), Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Nordeste (UNNE), durante el período comprendido entre agosto de 2001 y febrero de 2006, bajo la dirección del Dr. Juan Pablo A. Ortiz y la Dra. Silvina C. Pessino.

Dr. Juan Pablo A. Ortiz

Dra. Silvina C. Pessino.....

.....

.....

.....

Defendida:de 2006.

Agradecimientos

Quiero agradecer especialmente a mis directores, el Dr. Juan Pablo Ortiz y la Dra. Silvina Pessino, por brindarme la oportunidad de trabajar junto a ellos y poder realizar este trabajo de Tesis. La guía y el apoyo permanente que me brindaron lograron despertar en mi un profundo interés en el tema de trabajo e involucrarme de lleno en la investigación científica. Valoro sobremanera la disposición de Juan y Silvina para discutir ideas y resultados y su permanente actualización en el tema de trabajo. El entusiasmo de Juan frente a todo tipo de resultados y circunstancias me enseñó que siempre hay un lado positivo.

Quiero expresar mi agradecimiento a el Ing. Agr. Camilo Quarin por su ayuda desinteresada en todo momento, por enseñarme a pensar y ver más allá de lo "molecular" y por brindarme un lugar de trabajo en el IBONE cada vez que fue necesario. Al Dr. Eric Martínez, quien me enseñó y realizó la clasificación citoembriológica de las plantas, por su disposición y colaboración permanente. A la Ing. Agr. Florencia Galdeano por ayudarme a realizar los preparados de meiosis y a Camilo por analizarlos y enseñarme a interpretarlos. A todos los integrantes de la Cátedra de Genética por su amistad y su hospitalidad cada vez que estuve en Corrientes.

Agradezco al Ing. Agr. Eligio Morandi por habernos brindado un ámbito de trabajo durante varios años junto a su grupo en el Laboratorio de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias, UNR. Resultan inolvidables los buenos momentos y lo asados compartidos con la gente de Fisisio, especialmente con los muchachos del "Bunker".

A la Dra. Mercedes Leiva y a la Dra. Hebe Bottai por haberme ayudado con el manejo estadístico de los datos.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Biología Molecular por la gran amistad que existe en el grupo. Especialmente a Lorena Siena por su colaboración incondicional en los diferentes experimentos.

A la ANPCyT por haberme otorgado una Beca de Formación de Postgrado (dentro del marco del subsidio PICT 99 N° 6134) y a la Fundación Antorchas por una Beca para Finalización de Doctorado, que financiaron mi mantenimiento durante el período 2001-2005.

Finalmente quiero agradecer a Daniel y a Santiago, mis dos amores, que me acompañan permanentemente con su apoyo, confianza y paciencia.

A todos, MUCHAS GRACIAS.

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

Artículos en revistas

Martínez EJ, Hopp HE, Stein J, Ortiz JPA and Quarin CL (2003) Genetic characterization of apospory in tetraploid *Paspalum notatum* based on the identification of linked molecular markers. *Molecular Breeding* 12 (4): 319-327.

Stein J, Quarin CL, Martínez EJ, Pessino SC and 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.

Martelotto LG, Ortiz JPA, Stein J, Espinoza F, Quarin CL and Pessino SC (2005) A comprehensive analysis of gene expression alterations in newly synthesized *Paspalum notatum* autotetraploid. *Plant Science*, 169: 211-220.

Martelotto LG, Stein J, Ortiz JPA, Lusardi M, Espinoza F, Quarin CL and Pessino SC (2006) Genome variation induced by a change of the ploidy level in *Paspalum notatum*. (enviado a publicación).

Stein J, Martínez EJ, Pessino SC, Rodríguez MP, Siena L, Quarin CL and Ortiz JPA (2006) Construction of genetic linkage maps of sexual and aposporous tetraploid *Paspalum notatum* with AFLP markers. (en preparación).

Presentaciones a Congresos y Reuniones Científicas

XXXI Congreso Argentino de Genética. La Plata. Argentina. Septiembre de 2002. Mapeo de la región genómica que incluye al control genético de la aposporía en razas tetraploides de *Paspalum notatum*. Stein Juliana, Ortiz Juan Pablo A, Martínez Eric J y Quarín Camilo L. (*presentación premiada como mejor trabajo en la sesión de Genética Molecular*).

VIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Carlos Paz. Córdoba. Argentina. Noviembre de 2002. Construction of a genetic linkage map of tetraploid apomictic *Paspalum notatum*. Stein Juliana, Pessino Silvina C, Martínez Eric J, Quarín Camilo L y Ortiz Juan Pablo A.

XXXII Congreso Argentino de Genética. Huerta Grande, Córdoba. Argentina. Septiembre de 2003. Herencia polisómica y apareamiento preferencial de cromosomas en la región relacionada con la aposporía en *Paspalum notatum*. Stein Juliana, Martínez Eric J, Pessino Silvina C, Quarín Camilo L y Ortiz Juan Pablo A.

XXXIII Congreso Argentino de Genética. Malargüe, Mendoza. Argentina. Septiembre de 2004. Mapa de ligamiento genético de *Paspalum notatum* tetraploide (apospórico) con marcadores de AFLP. Stein Juliana, Martínez Eric J, Quarín Camilo L, Pessino Silvina C y Ortiz Juan Pablo A.

Congresso Brasileiro de Genética. Florianópolis, Brasil. Septiembre de 2004. RFLP analysis of differentially expressed cDNA sequences from ovaries of sexual and apomictic *B. brizantha* in a segregant population of tetraploid *Paspalum notatum*. Cabral GB, Stein J, Carneiro VTC, Ortiz JPA.

Baires Biotec 2005, VI Simposio Nacional de Biotecnología - REDBIO Argentina. Buenos Aires, Argentina. Junio de 2005. Analisis integral de la respuesta del genoma y el transcriptoma ante un cambio en el nivel de ploidía de *Pasaplum notatum*. Luciano G Martelotto, Juan Pablo A Ortiz, Juliana Stein, Francisco Espinoza, Camilo L Quarin y Silvina C Pessino.

Baires Biotec 2005, VI Simposio Nacional de Biotecnología - REDBIO Argentina. Buenos Aires, Argentina. Junio de 2005. Determinación del origen sexual o asexual de progenies diploides de *Paspalum rufum* con marcadores de RAPD. Lorena A Siena, Juliana Stein, Camilo L Quarin y Juan Pablo A Ortiz.

4th International Symposium of Molecular Breeding for the Genetic Improvement of Forage Crops and Turf, Aberyswyth, Wales, UK. July 2005. A core AFLP map of aposporic tetraploid *Paspalum notatum* (Bahagrass). Ortiz JPA, Stein J, Martínez EJ, Pessino SC and Quarin CL.

INDICE

Indice	i
Abreviaturas, Símbolos y Anglicismos	v
Resumen	viii
I- Introducción	1
I.1- El género <i>Paspalum</i>	1
I.1.1- <i>Paspalum notatum</i> (Pasto horqueta, "Bahagrass")	2
I.1.2- Distribución, adaptación y centro de origen de <i>P. notatum</i>	3
I.1.3- Características genéticas de la especie	4
I.1.3.1- Conceptos generales sobre poliploidía	4
I.1.3.2- Citogenética y herencia en <i>P. notatum</i>	8
I.2- Apomixis	10
I.2.1- Definición del término apomixis	10
I.2.2- El proceso sexual	11
I.2.3- Diferentes tipos de apomixis	14
I.2.4- Rasgos distintivos del carácter apomixis	21
I.2.4.1- Apomixis y sexualidad	21
I.2.4.2- Apomixis y poliploidía	22
I.2.4.3- Apomixis y desarrollo del endosperma	24
I.2.4.4- Apomixis e "imprinting" genómico	25
I.2.4.5- Apomixis vs. embriogénesis somática	26
I.2.5- Importancia agronómica de la apomixis	26
I.2.6- Transferencia del carácter apomixis a especies de interés agronómico	27
I.2.7- La apomixis en <i>Paspalum notatum</i>	30
I.3- Control genético de la apomixis	32
I.3.1- Herencia de la apomixis en <i>Paspalum</i>	35

I.3.2- <i>Rol funcional de la poliploidía</i>	37
I.3.3- <i>Caracterización molecular de la apomixis</i>	39
I.4- Mapas de ligamiento genético	42
I.4.1- <i>Bases teóricas para la construcción de mapas de ligamiento genético</i>	45
I.4.2- <i>Construcción de mapas de ligamiento con marcadores de ADN</i>	50
I.4.3- <i>Mapeo en poliploides</i>	53
I.4.4- <i>Mapeo comparativo</i>	57
II- Objetivos	61
II.1- Objetivo General	61
II.2- Objetivos Específicos	61
III- Materiales y Métodos	63
III.1- Material vegetal	63
III.2- Observaciones citoembriológicas	64
III.3- Análisis citogenético	66
III.4- Estimación de la viabilidad de granos de polen	66
III.5- Extracción de ADN	67
III.6- Generación de marcadores moleculares	68
III.6.1- <i>Polimorfismos por amplificación al azar del ADN (RADP)</i>	68
III.6.2- <i>Polimorfismos en el largo los fragmentos de amplificación (AFLP)</i>	68
III.6.3- <i>Polimorfismos en el largo de los fragmentos de restricción (RFLP)</i>	70
III.7- Caracterización de los marcadores moleculares en la población de mapeo	74
III.8- Análisis de segregación y determinación del tipo de herencia (disómica/polisómica)	76

III.9- Construcción de mapas de ligamiento genético	78
III.10- Clonado de fragmentos de interés	81
IV- Resultados	82
IV.1- Caracterización de la población de mapeo <i>Paspalum notatum</i> a nivel tetraploide	82
IV.1.1- <i>Clasificación de los individuos F₁ según el modo de reproducción</i>	82
IV.1.2- <i>Segregación del carácter aposporía en la población</i>	87
IV.2- Caracterización citogenética y estudios de viabilidad del polen en Q4188 y Q4117	89
IV.2.1- <i>Análisis de apareamiento cromosómico</i>	89
IV.2.2- <i>Estudios de viabilidad de polen</i>	92
IV.3- Generación de marcadores moleculares y análisis de segregación en la población de mapeo	96
IV.3.1- <i>Marcadores moleculares</i>	96
IV.3.2- <i>Análisis de segregación</i>	99
IV.4- Determinación del tipo de herencia de las razas tetraploides de <i>P. notatum</i>	103
IV.5- Mapa de ligamiento genético de razas tetraploides de <i>Paspalum notatum</i>	108
IV.5.1- <i>Construcción del mapa marco de Q4188</i>	109
IV.5.2- <i>Construcción del mapa marco de Q4117</i>	115
IV.5.2.1- <i>Caracterización del grupo de ligamiento que incluye al control de la aposporía (grupo - apo)</i>	124
IV.5.2.2- <i>Clonado y secuenciación de marcadores ligados a la aposporía en P. notatum</i>	127
IV.5.3- <i>Determinación de cromosomas homólogos de Q4188 y Q4117 en base a marcadores de tipo puente alélico</i>	130
IV.5.4- <i>Mapeo de sondas de RFLP</i>	133
IV.5.5- <i>Mapeo de transcriptos de ARNm relacionados con la aposporía</i>	137

V- Discusión	141
V.1- Población de mapeo y segregación de la aposporía en <i>Paspalum notatum</i> tetraploide	141
V.2- Tipo de herencia en las razas tetraploides de <i>Paspalum notatum</i>	144
V.3- Mapas de ligamiento genético de razas tetraploides de <i>Paspalum notatum</i>	147
V.4- Caracterización del grupo de ligamiento donde se localiza el <i>locus</i> responsable de la aposporía	155
V.5- Revisión del modelo de herencia de la aposporía en <i>P. notatum</i>	164
 VI- Conclusiones	 169
 VII- Referencias	 172

ABREVIATURAS, SIMBOLOS Y ANGLICISMOS

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario

ADS: alelos en dosis simple

ADD: alelos en dosis doble

AFLP: polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados

AgNO₃: nitrato de plata

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

ARNasa: ribonucleasa

BSA: albúmina sérica bovina 1- acetilada

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

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

CSPD: disodio 3 - (4 - metoxispiro{1,2 - dioxetano - 3,2' - (5' - cloro) triciclo[3.3.1.1^{3,7}] decano} - 4 - yl) fenil fosfato.

CTAB: bromuro de cetiltrimetil amonio

°C: grados centígrados

HCl: ácido clorhídrico

H₂O_d: agua destilada

DIC: contraste de interferencia diferencial

Dig-dUTP: desoxiuridin trifosfato-digoxigenina

dNTPs: desoxinucleótidos trifosfato

DTT: ditioneitol

EDTA: ácido etilendiamino-tetracético

BrEt: bromuro de etidio

F₁: primera generación en un cruzamiento

gl: grados de libertad

gr/l: gramos por litro

KAc: acetato de potasio

M: molar

mA: miliamperes

mg: miligramo

mg/l: miligramos por litro

MgAc: acetato de magnesio

MgCl₂: cloruro de magnesio

ml: mililitro

mM : milimolar

N: normal

n: número cromosómico haploide de una especie

2n : número cromosómico diploide de una especie

NaOH: hidróxido de sodio

NaCl: cloruro de sodio

ng: nanogramos

NH₄OAc: acetato de amonio

nm: nanómetro ($1 \cdot 10^{-6}$ m)

PCR: reacción en cadena de la ADN polimerasa

pb: pares de bases

RAPD: polimorfismos por amplificación al azar del ADN

RFLP: polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción

SDS: sulfato de dodecil sódico

SSC: cloruro de sodio-citrato de sodio

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-(hidoximetil)-aminoetano

U: unidad de actividad enzimática

UBC: Universidad de la Columbia Británica

µg: microgramos ($1 \cdot 10^{-6}$ g)

µl: microlitro ($1 \cdot 10^{-6}$ l)

UV: ultravioleta

V: voltios

W: wats

x: número cromosómico básico de una especie

χ²: prueba de bondad de ajuste

RESUMEN

Estudios de localización y herencia de genes relacionados con la apomixis en razas tetraploides de *Paspalum notatum*

Paspalum notatum Flüge, es una gramínea forrajera nativa de las regiones subtropicales de Argentina, Brasil y Paraguay. Los citotipos diploides son autoincompatibles y de reproducción sexual, mientras que los poliploides (la mayoría de ellos tetraploides) son autofértiles y apomícticos apospóricos. La apomixis es una forma de reproducción asexual por semillas que conduce a la generación de progenies genéticamente idénticas a la planta madre. En la apomixis apospórica se forman sacos embrionarios a partir de células de la nucela cuyos núcleos no están reducidos ($2n$), y los embriones se desarrollan por partenogénesis sin que ocurra fecundación de la célula huevo. En general, este tipo de reproducción está siempre asociada a la poliploidía. En *P. notatum* la formación de la semilla requiere además la fusión de los núcleos polares con uno de los núcleos haploides del microgametofito para la generación del endosperma (seudogamia). Trabajos recientes determinaron que el carácter aposporia en la especie es controlado por un *locus* simple, dominante y con segregación distorsionada.

Los objetivos de este trabajo de Tesis fueron determinar el tipo de herencia presente en las razas tetraploides de *Paspalum notatum*, construir de un mapa de ligamiento genético completo de la especie, localizar en dicho mapa el *locus* responsable de la aposporia (apo-*locus*) así como otros genes involucrados con la expresión del carácter apomixis y realizar estudios estructurales y de mapeo comparativo del genoma de la especie.

Se generó una población de mapeo tipo F_1 de 113 individuos, segregante por el modo de reproducción, a partir del cruzamiento de una planta tetraploide completamente sexual (Q4188) (progenitor femenino) y un individuo natural apomíctico obligado (Q4117) (dador de polen). La clasificación de las progenies demostró que 15 plantas hijas eran apospóricas y 98 no apospóricas. Las observaciones de meiocitos en ambos progenitores revelaron alteraciones meióticas en el genotipo Q4117 que podrían corresponder a un re-arreglo cromosomal (por ej. una inversión) y una menor viabilidad de los granos de polen en comparación con el progenitor sexual. Los análisis citogenéticos y de segregación de los marcadores moleculares indicaron que ambos progenitores (sexual y apospórico), presentaban herencia polisómica y apareamiento al azar de cromosomas homólogos.

La construcción del mapa genético se basó en la utilización de marcadores de AFLP y la detección de alelos en dosis simples (ADS) segregantes desde ambos progenitores. Se obtuvo un total de 687 marcadores moleculares (667 AFLPs y 20 RFLPs), de los cuales 316 resultaron de origen materno, 266 paternos y 105 biparentales. Con la información de segregación de los marcadores de AFLP en dosis simples derivados de ambos progenitores se desarrollaron 2 mapas genéticos independientes (mapa materno y mapa paterno). El mapa del genotipo sexual (Q4188) consta de 26 grupos de ligamiento en fase de acoplamiento y tiene una longitud total de 1.590,6 cM, con una distancia promedio entre marcadores de 6,8 cM. El mapa del genotipo apospórico (Q4117) consta de 39 grupos de ligamiento en fase de acoplamiento y tiene una longitud total de 2.265,7 cM, con una distancia promedio entre marcadores de 12,4 cM. El carácter aposporia se asoció a uno solo de los grupos, denominado grupo-apo. Dentro de cada mapa se identificaron 7 y 12 grupos homólogos respectivamente, por análisis de marcadores ligados en fase de repulsión.

El grupo-apo quedó constituido por 25 *loci* distribuidos sobre unos 34 cM. Quince marcadores moleculares co-segregaron estrictamente ligados al carácter y otros 7 mostraron recombinantes cercanos que definen un bloque génico de aproximadamente 8 cM donde la recombinación está suprimida. Se determinó que esta región genómica en particular presenta herencia disómica con apareamiento preferencial de cromosomas. Los análisis de secuencia de dos de los marcadores ligados 100% a la aposporia (un AFLP y un RFLP) mostraron homología con elementos transponibles. La supresión de la recombinación detectada en el *apo-locus* podría estar afectando a un segmento cromosómico de gran tamaño que incluya varios genes.

Se localizaron en el mapa algunos transcriptos de ARNm específicos del modo de desarrollo de ovarios apospóricos y que pertenecen a la cascada de genes que se activan específicamente en este tipo de reproducción. En ningún caso resultaron asociados al grupo-apo por recombinación, lo que indica que no son los disparadores del carácter.

Los resultados presentados en esta tesis contribuyen a clarificar aspectos básicos relacionados con el modo de reproducción y la evolución del genoma de las especies de *Paspalum*. Los mismos pueden asimismo emplearse para el mejoramiento de las razas cultivadas, ya que proporcionan marcadores para la rápida discriminación de progenies sexuales y apomícticas y un marco genético donde localizar otros genes de importancia agronómica. La caracterización de la región genómica responsable de la aposporia sugiere que una estrategia de clonado posicional del/los gen/es disparadores de la apomixis sería dificultosa, dada la fuerte supresión de la recombinación observada en este *locus*. Sin embargo, el mapa provee la base para la asociación de marcadores GTM (gene targeted markers), provenientes de estudios de expresión de genes específicos de plantas apospóricas, a fin de detectar secuencias de genes candidatos que mapeen en la región del *apo-locus*.

I- INTRODUCCION

I.1- El género *Paspalum*

Paspalum es un género perteneciente a la familia de las gramíneas (subfamilia *Panicoideas*, tribu *Paniceas*) que comprende más de 400 especies (Chase 1929). Varios de sus integrantes constituyen importantes recursos forrajeros para las regiones tropicales y subtropicales de América, donde se encuentran ampliamente distribuidos, siendo particularmente abundantes en Brasil, este de Bolivia y nordeste de Argentina (Burton 1974). El género está conformado por especies diploides de reproducción sexual y poliploides sexuales o apomícticas (Quarin y Norrmann 1987; Quarin 1992). La poliploidía está presente en aproximadamente el 80 % de las especies, existiendo una gran variación en el nivel de ploidía que va desde 3x (Quarin y Lombardo 1986) hasta excepcionalmente 16x en *Paspalum floridanum* Michx. (Burton 1940). Se considera que aproximadamente la mitad de estos poliploides son tetraploides (Quarin 1992). En el género es común que muchas especies tetraploides apomícticas presenten razas coespecíficas diploides, autoincompatibles y de reproducción sexual (Quarin 1992). El gran número de especies que lo componen, la amplia distribución geográfica que presenta y las características en cuanto a calidad del forraje, palatabilidad y producción de materia seca, hacen del género *Paspalum* uno de los más importantes y promisorios para el desarrollo de cultivares forrajeros adaptados a las regiones

cálidas y templadas de América. Sin embargo, sólo unas pocas especies originarias han sido domesticadas y cultivadas hasta el presente. Se dispone de cultivares de *P. guenoarum* en Paraguay, *P. plicatulum* en Australia, *P. notatum* en Estados Unidos de Norteamérica (EEUU) y recientemente de *P. atratum* en EEUU, Argentina y Tailandia (Quarin CL, comunicación personal). Existe una enorme variación genética aún inexplorada en estas especies para mejorar la calidad forrajera y producción de materia seca. Asimismo, existen varias especies del género con un gran potencial agronómico que pueden desarrollarse si se genera información básica sobre su nivel de ploidía, modo de reproducción y características asociadas a calidad forrajera (Quarin CL, comunicación personal).

1.1.1- *Paspalum notatum* (Pasto horqueta, "Bahagrass")

En particular *Paspalum notatum* Flüggé, de nombre vulgar pasto horqueta o "bahagrass" (en inglés), es una especie rizomatosa distribuida desde México a Argentina que presenta varios niveles de ploidía y un sistema reproductivo complejo con citotipos diploides autoincompatibles de reproducción sexual y poliploides (3x, 4x, 5x) con reproducción apomíctica, seudógamos y autocompatibles (Quarin 1992, Tischler y Burson, 1995) (Figura 1). Aproximadamente el 98% de los poliploides son tetraploides, siendo los triploides y pentaploides excepcionales (Tischler y Burson, 1995; Pozzobon y Valls, 1997). La forma natural de reproducción más frecuente en la especie es la apomixis gametofítica de tipo apospórica. La apomixis es una forma de reproducción asexual por semillas, que genera progenies genéticamente idénticas a la planta madre (Nogler 1984a). En este sistema de reproducción un embrión se desarrolla por partenogénesis a partir de una célula no reducida del óvulo que puede tener orígenes variados (ver ítem 1.2.3).



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

I.1.2- Distribución, adaptación y centro de origen de *P. notatum*

Las razas tetraploides de *P. notatum* Flüge constituyen una variedad botánica típica conocida con el nombre vulgar de pasto horqueta tetraploide. Se distribuyen en tierras abiertas, sabanas y pasturas hasta 2.000 metros sobre el nivel del mar desde México central hasta el noreste de Argentina (Chase 1929). El pasto horqueta tetraploide es el principal constituyente de los campos naturales del sur de Brasil, Paraguay, noreste de Argentina y Uruguay. Asimismo, ha sido introducido en Estados Unidos y otros países alrededor del mundo (Gates et al. 2004).

La forma diploide (*P. notatum* var. *saurae* Parodi), variedad botánica típica conocida como pasto horqueta diploide (*Pensacola bahiagrass* en EEUU), es nativa de las cuencas de los ríos Paraná y Uruguay en el noreste de Argentina. Luego de ser introducida accidentalmente a principios del siglo veinte en Florida, es hoy una de las forrajeras cultivadas más importantes de los estados del golfo en el sur de los Estados Unidos. Las

poblaciones diploides naturales son poco frecuentes y están restringidas a los suelos sueltos los márgenes de los ríos Uruguay, Paraná y sus afluentes y en las planicies arenosas de las islas del río Paraná. La búsqueda del centro de origen de *Pensacola bahiagrass* condujo al Prof. G. Burton a descubrir una gran población natural del citotipo que cubría la isla Berduc, en la Pcia. de Santa Fe (Burton 1967). En dicha isla se encontró la totalidad de la variación genética observada en los Estados Unidos para la especie cultivada (y naturalizada). Otra gran población del citotipo diploide, con una gran variación genética, fue encontrada en Cayastá, a 70 Km al noreste de la ciudad de Santa Fe, alrededor de las ruinas del sitio donde la ciudad fue fundada originalmente. Como los biotipos diploides de *P. notatum* var. *saurae* son nativos de esta región y debido a que los estudios citogenéticos sugieren que las razas de tetraploides fueron originadas por autoploidización y comparten juegos de cromosomas homólogos con los diploides, la región es considerada el centro de origen de la especie (Forbes y Burton 1961; Gates et al. 2004).

I.1.3- Características genéticas de la *Paspalum notatum*

I.1.3.1- Conceptos generales sobre poliploidía

Se considera que un individuo es diploide cuando su dotación autosómica normal está compuesta por dos juegos homólogos de x cromosomas cada uno. Dentro de cada uno de los juegos, los x cromosomas son todos diferentes entre sí y no pueden reagruparse en grupos inferiores. El número x de cromosomas se conoce como “número básico”. El conjunto de los x cromosomas es llamado genomio. Por extensión, el número cromosómico de un individuo diploide es $2x$ (Lacadena 1988).

Se denominan poliploides aquellos individuos cuya dotación autosómica normal está compuesta por más de dos genomios o juegos completos de cromosomas. Los poliploides se pueden clasificar de acuerdo al origen de los genomas que los componen en:

a) **autopoliploides**, cuando los genomios componentes provienen de la misma especie (homólogos) y se los denomina tri, tetra, ...*n-ploides* de acuerdo con el número de x cromosomas que presenten sus células somáticas (3, 4.... n juegos). Sus números cromosómicos serán $3x$, $4x$... nx , siendo x el número básico antes definido. Se denominan **homólogos** a los cromosomas provenientes de los diferentes genomios que se aparean durante la meiosis. En plantas, los autopoliploides se pueden originar por duplicación genómica, ausencia de reducción gamética o poliespermia. La duplicación somática puede ocurrir en el cigoto o en embriones jóvenes, generando un esporofito completamente poliploide. Este fenómeno puede inducirse mediante experimentos de golpe de calor en los cuales los embriones son expuestos brevemente a altas temperaturas. La duplicación somática también puede darse en tejidos meristemáticos de esporofitos jóvenes o adultos lo que genera quimeras mixoploides. Tales células poliploides ocasionalmente inician un crecimiento nuevo, especialmente en heridas o tumores, y son fuentes potenciales de tallos poliploides. Una segunda fuente importante de formación de poliploides involucra la ausencia de reducción gamética, o restitución nuclear meiótica, durante la micro y megasporogénesis. Este proceso genera gametas no reducidas, también conocidas como gametas $2n$, las cuales contienen el conjunto completo de cromosomas somáticos. La unión de gametas reducidas con gametas no reducidas (puente triploide), o de dos gametas $2n$, puede generar embriones poliploides. Por su parte, la poliespermia, es decir la fecundación de un huevo por más de un núcleo espermático, ha sido descripta en varias especies de plantas (Ramsey y Schermske 1998).

b) **alopoliploides**, cuando los genomas que componen el poliploide provienen de dos o más especies diploides diferentes. Se pueden originar por la duplicación cromosómica de híbridos interespecíficos o intergenéricos o por la autopoliploidización y posterior cruzamiento de los autotetraploides de especies diferentes. Puede ocurrir que no se hayan encontrado o estén extinguidas las especies diploides ancestrales que intervinieron en la formación del aloploide. Se denominan **homeólogos** a los cromosomas de los diferentes genomas que se originaron a partir de un cromosoma ancestral común (Lacadena 1988).

Independientemente de su condición genética diploide o poliploide, en el ciclo vital de los organismos con reproducción sexual se distinguen dos fases: la fase diploide (o no reducida), caracterizada porque las células contienen todos los juegos de cromosomas aportados por los gametos, y la fase haploide (o reducida) en la que la constitución cromosómica de la célula es equivalente al contenido gamético (n), es decir, sólo tiene la mitad de la dotación, siendo n = número de cromosomas en la gameta. Si el organismo es diploide, el complemento gamético será el genomio típico de la especie ($n = x$), pero si el organismo es poliploide el complemento gamético estará formado por varios genomios (por ejemplo, en un tetraploide $n = 2x$) (Lacadena 1988).

El comportamiento de los cromosomas durante la meiosis tiende a ser diferente en los auto y aloploides. En un autotetraploide, por ejemplo, los cromosomas homólogos se encuentran por cuadruplicado y por lo tanto más de dos cromosomas pueden aparearse en las mismas zonas originando diferentes configuraciones de multivalentes durante la profase I. Cuando se forman bivalentes, el cromosoma elegido para el apareamiento suele ser cualquiera de los homólogos al azar, de manera que en cada meiosis existe la misma probabilidad de que se apareen como bivalentes cualquiera de los homólogos. La constitución genética de los gametos formados dependerá de la formación de multivalentes y posterior segregación

anafásica de los mismos, de manera que las segregaciones geno- y fenotípicas serán diferentes de las mendelianas típicas de los organismos diploides. Este comportamiento peculiar de los autopoliploides se denomina herencia polisómica (Lacadena 1988, Qu y Hancock 2001). Sin embargo, en el largo plazo luego de constituido el autopoliploide, se observan a veces sectores del genoma que tienden a presentar “apareamiento diferencial” o sea, los homólogos que se aparean como bivalentes son siempre los mismos cromosomas. Es decir, existe un proceso gradual de diploidización del genoma, que puede avanzar hasta convertir un autopoliploide en un poliploide ancestral (o paleopoliploide) (Ramsey y Schermeske 1998).

En el caso de los alopoliploides, el comportamiento meiótico inicial de los cromosomas está directamente influenciado por el grado de homología entre los genomas de las diferentes especies que lo forman. En un alopoliploide obligado durante la meiosis se formarán bivalentes entre cromosomas homólogos dando lugar a una segregación genética igual a los diploides que se conoce como herencia disómica (Lacadena 1988). Sin embargo, a menudo se observa formación de multivalentes o de bivalentes al azar en los alopoliploides, debido a que la homología entre cromosomas homeólogos lo permite. A estos alopoliploides que presentan herencia disómica parcial, se los conoce con el nombre de alopoliploides segmentales. Estos poliploides también sufren procesos de diploidización que comienzan temprano durante la formación del alopoliploide con una eliminación rápida de secuencias específicas del genoma, y sigue luego en forma gradual (revisado en Wendel 2000).

De lo anterior se deduce que entre los extremos formados por los auto y alopoliploides obligados existe una gran variedad de situaciones en las que puede observarse una combinación de herencia tipo disómica y polisómica (más allá de cual haya sido el origen del poliploide) que corresponde al grado de homología y/o diferenciación en los genomas que halla alcanzado la especie en particular, desde segmentos cromosómicos hasta cromosomas

enteros (Lacadena 1988).

I.1.3.2- Citogenética y herencia en *P. notatum*

Paspalum notatum Flüggé tiene un número básico de cromosomas $x = 10$. Los citotipos diploides presentan un número $2n = 2x = 20$ y los tetraploides $2n = 4x = 40$ (Burton 1940). La ocurrencia de citotipos triploides $2n = 3x = 30$ y pentaploides $2n = 5x = 50$ es muy baja en la naturaleza pero se han podido obtener experimentalmente plantas con $2n = 5x = 50$ y $2n = 6x = 60$ polinizando tetraploides apomícticos con polen de plantas de 20 y 40 cromosomas, respectivamente. Los $5x$ y $6x$ se originarían como producto de la fecundación de sacos embrionarios no reducidos con gametas de 10 o 20 cromosomas ($2n + n$ o híbridos B_3) (Burton 1948a; Martínez et al. 1994). Se han obtenido también plantas de 40 y 80 cromosomas por duplicación del complemento cromosómico con colchicina a partir de razas diploides (Forbes y Burton 1961; Quarin 1999).

En *P. notatum*, los estudios citológicos clásicos de Forbes y Burton (1961) involucrando plantas autotetraploides sexuales inducidas, tetraploides naturales apomícticos e híbridos de individuos sexuales por apomícticos a nivel tetraploide, indicaron que la autoploidía es el origen más probable de las razas tetraploides. Las observaciones realizadas mostraron asociaciones cromosómicas multivalentes, principalmente cuadrivalentes, en las meiosis de todas las accesiones evaluadas, en rangos de 2 a 10 cuadrivalentes por célula madre del polen (Forbes y Burton 1961, Fernandes et al. 1973). Además, los híbridos triploides obtenidos de cruzamientos entre el diploide y accesiones tetraploides mostraron hasta 10 trivalentes por microsporocito, sugiriendo una completa homología entre el juego cromosómico aportado por la madre diploide y los dos juegos cromosómicos provistos por el padre tetraploide (Forbes y

Burton 1961). Resultados similares fueron observados por Quarin et al. (1984), quienes propusieron la hipótesis que *P. notatum* es un complejo agámico con varios niveles de ploidía originados por autoploidía.

La determinación precisa del tipo de herencia (disómica o polisómica) en *P. notatum* es crítica para establecer la filogenia de la especie y desarrollar estrategias adecuadas de mejoramiento. Asimismo, un tipo de segregación disómico o tetrasómico llevaría al planteamiento de distintas hipótesis para el estudio de la herencia del carácter apomixis. Se considera que las relaciones de segregación de marcadores moleculares son el método más exacto conocido actualmente para determinar el tipo de herencia e inferir por lo tanto el origen del poliploide, con relaciones mayoritarias de segregación polisómicas y disómicas sugiriendo auto y aloploidía, respectivamente (Soltis y Riesenberg 1986, Krebs y Hancock 1989, Qu y Hancock 1995). La comparación entre la proporción de marcadores en dosis simple vs. dosis doble (da Silva et al. 1993, Qu y Hancock 1995) y la relación entre el número de marcadores en fase de repulsión vs. fase de acoplamiento (Sorrells 1992, Wu et al. 1992) también han sido propuestos como métodos para determinar el tipo de herencia (ver ítem I.4.3). Dichos estudios determinaron el tipo de herencia presente en *Saccharum spontaneum* (da Silva et al. 1993), *Vaccinium darrowi* (Qu y Hancock 1995) y *Paspalum simplex* (Pupilli et al. 1997).

I.2- Apomixis

I.2.1- Definición del término apomixis

La apomixis es un modo de reproducción asexual (agámica), por semillas, que conduce a la generación de progenies genéticamente idénticas a la planta madre (Nogler 1984a). El término apomixis deriva del griego “apo” que significa falta o ausencia, y “mixis” que significa unión o mezcla, haciendo referencia a la falta de unión de gametas de origen sexual. La apomixis fue descrita por primera vez en 1841 en la planta australiana *Alchornea ilicifolia* por J. Smith cuando un ejemplar femenino de esta especie dioica (llevado a los Kew Gardens de Londres desde Asia) creciendo en forma aislada floreció y produjo semillas en abundancia. Paradójicamente, los primeros experimentos con plantas apomícticas fueron realizados en forma involuntaria por Gregor Mendel, quien utilizó cruces entre especies del género *Hieracium* para intentar confirmar los resultados obtenidos con sus famosos estudios sobre la herencia de arvejas de jardín. Mendel describió la curiosa situación de que en sus experimentos obtenía progenies F_1 segregantes y numerosas F_2 no segregantes. El investigador atribuyó erróneamente la falta de segregación observada en estas poblaciones a una “frecuente autopolinización”. Hoy se sabe que muchas especies de este género son apomícticas (Asker y Jerling 1992).

La apomixis ha sido observada en al menos 400 especies de plantas que abarcan 35 familias diferentes, siendo muy común en las Gramineae, Compositae, Rosaceae y Rutaceae (Hanna y Bashaw 1987). Se considera que la apomixis ha evolucionado como un sistema de reproducción alternativo a la sexualidad a través de la reformulación de los programas de

desarrollo del ovario (Grimanelli et al. 2001). Por esto, para determinar sus características con precisión es necesario compararlo con el sistema de reproducción sexual de las angiospermas.

1.2.2- El proceso sexual

La sexualidad en las angiospermas comprende la alternancia cíclica entre los estados de esporofito (la planta misma, $2n$) y gametofito (el grano de polen y el saco embrionario, n). La meiosis que ocurre en las flores posibilita la recombinación y reducción del contenido genético y da lugar a la formación de las esporas femeninas (megásporas) en el ovario y masculinas (microsporas) en las anteras. 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 comienza con la división mitótica de los productos de la meiosis hasta la celularización y maduración (diferenciación) del saco embrionario (megagametofito). En el ovario, una célula especializada de la nucela denominada célula arqueosporial o célula madre de la megáspora, se divide por meiosis para formar cuatro megásporas reducidas (n), o en algunos casos puede arrestarse la división resultando en la formación de una díada de células. Dependiendo del patrón de formación de la pared celular, la megaesporogénesis se clasifica en tres patrones basados en el número de núcleos de megásporas que van a participar en la formación del megagametofito: monospórica, bispórica o tetraspórica. Los sacos monospóricos se forman a partir de una sola megáspora uninucleada, en los bispóricos la megáspora funcional es binucleada y en el caso de los sacos tetraspóricos los cuatro productos de la meiosis participan en la formación del saco (Huang y Russell 1992). La megaesporogénesis monospórica que resulta en la formación de sacos embrionarios de tipo *Polygonum* es la más ampliamente distribuida estando presente en aproximadamente

el 70% de las angiospermas y es el proceso que se describe a continuación. Como se mencionó anteriormente, luego de la meiosis se forman 4 megásporas reducidas, tres de las cuales degeneran. La restante, que ocupa la posición chalazal constituye la megáspora funcional y por mitosis (proceso de megagametogénesis) desarrolla el saco embrionario (Reiser y Fischer 1993). El mismo está formado por 8 núcleos haploides (n) contenidos en 7 células: la ovocélula, dos sinérgidas, una célula central binucleada y tres antípodas (Figura 2). En las gramíneas en particular, el aparato oosférico formado por la ovocélula, rodeada por dos sinérgidas está situado en el extremo micropilar del óvulo, sitio por donde ingresa el tubo polínico en el momento de la fecundación. En el extremo opuesto denominado chalazal, se encuentra un gran número de antípodas que puede variar de 6 o 7 hasta varias decenas (Maheshwari 1978).

En las anteras, la meiosis sucede en los microesporocitos o células madre de las micrósporas, dando origen a cuatro micrósporas. Cada micróspora desarrolla un grano de polen con una célula vegetativa y otra generativa, producto de la división mitótica del núcleo haploide. La célula generativa se divide una vez más para originar dos células espermáticas (Figura 2). En las Gramíneas, esto último ocurre generalmente después de la germinación del tubo polínico.

La formación de la semilla requiere un proceso de doble fecundación (Figura 2). El polen germina sobre el estigma de la flor desarrollando un tubo polínico que crece por el estilo y entra al óvulo a través de la apertura micropilar. Los núcleos espermáticos ingresan al saco embrionario después de la penetración del tubo polínico a través de una sinérgida. Uno de los núcleos espermáticos (n) se fusiona con la ovocélula (n) para dar origen al cigoto ($2n$), a partir del cual desarrollará el embrión. El otro gameto masculino se fusiona con los núcleos polares para originar el endosperma ($2n + n$) (adaptado de Russel 1993).

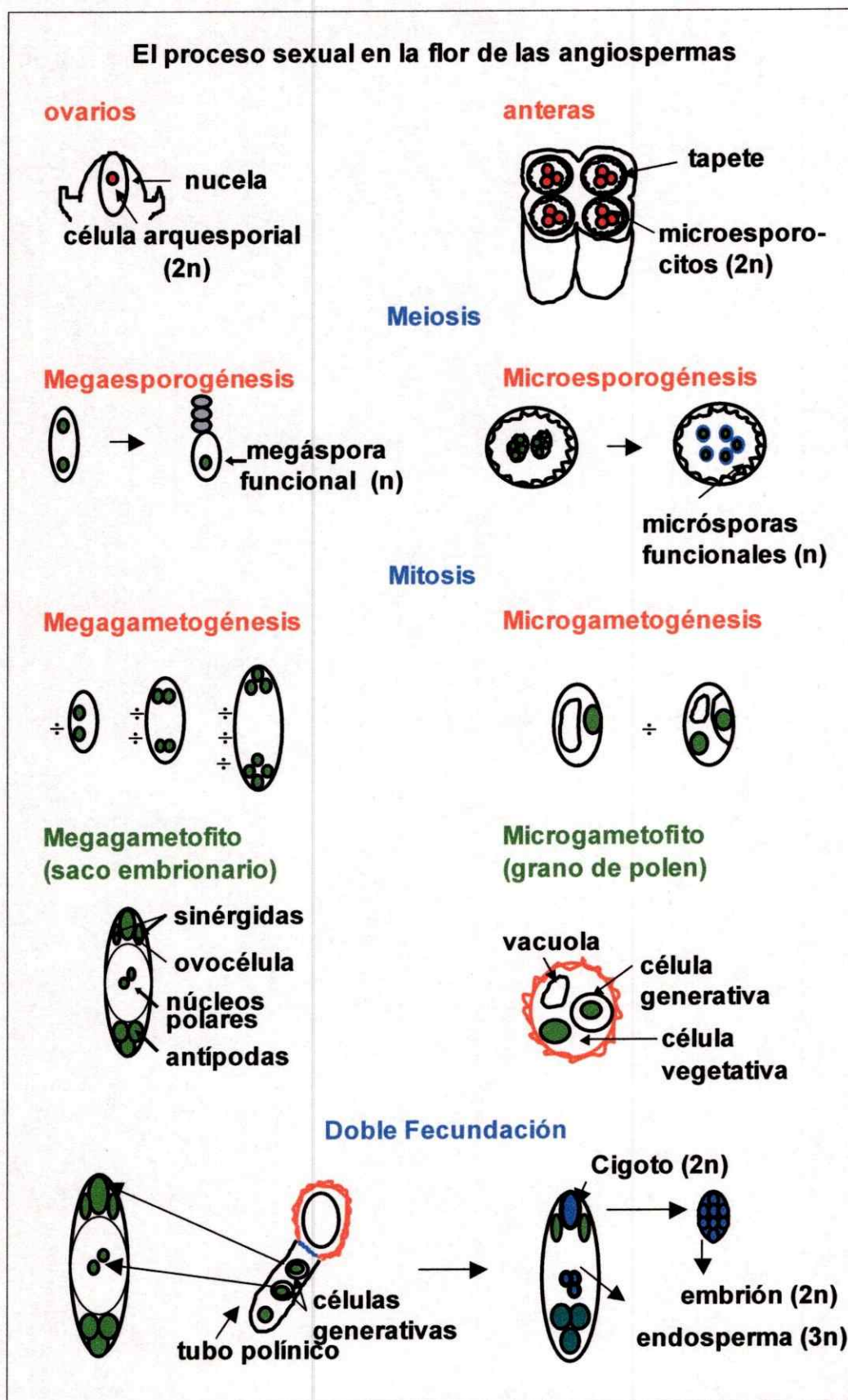


Figura2: esquema mostrando el proceso de reproducción sexual en una planta angiosperma: desarrollo de un saco embrionario de tipo *Polygonum* en el ovario, formación de los granos de polen en las anteras, doble fecundación y desarrollo del embrión. ÷: indican números de divisiones mitóticas.

De esta manera la reducción meiótica se complementa con la fecundación que reestablece el número cromosómico diploide de la especie. Así, la fusión de dos gametos haploides únicos derivados de la distribución al azar del material genético durante las meiosis femenina y masculina resulta en la generación de progenies genéticamente diversas.

1.2.3- *Diferentes tipos de apomixis*

La apomixis elude la ruta sexual evitando la reducción meiótica y la fecundación. La ovocélula desarrolla un embrión que contiene exactamente el mismo genotipo que la planta que lo origina. El carácter presenta formas diferentes y parece haber surgido varias veces en forma independiente durante la evolución (Grimanelli et al. 2001). Nogler (1984a) dividió a la apomixis en dos mecanismos distintos para la generación de los embriones de origen asexual: la ruta esporofítica y la ruta gametofítica.

En la ruta esporofítica, también llamada **embrionía adventicia**, los embriones somáticos se originan directamente a partir de células de la nucela o de los tegumentos del óvulo, sin que se forme un saco embrionario (Koltunow et al. 1995). Comúnmente se forman embriones múltiples (esporofíticos) que comparten el óvulo junto con el embrión de origen sexual y que utilizan su endosperma para desarrollarse (Figura 3). Las células nucelares destinadas a formar embriones son morfológicamente distinguibles de las otras células nucelares normales por tener un núcleo grande y un citoplasma denso. Se desconocen el mecanismo fisiológico y el momento en el cual se determina el destino de estas células para que se transformen en iniciales embrionarias (Koltunow 1993). Las células nucelares iniciales son similares a la ovocélula en cuanto al potencial de desarrollo pero no están contenidas en una estructura de megagametofito, sino que están adyacentes a un saco embrionario meiótico

(de tipo sexual) y rodeadas por otras células nucleares. Esta forma de apomixis es típica en los cítricos, los cuales representan un sistema modelo para estudiar el proceso (Koltunow 1993).

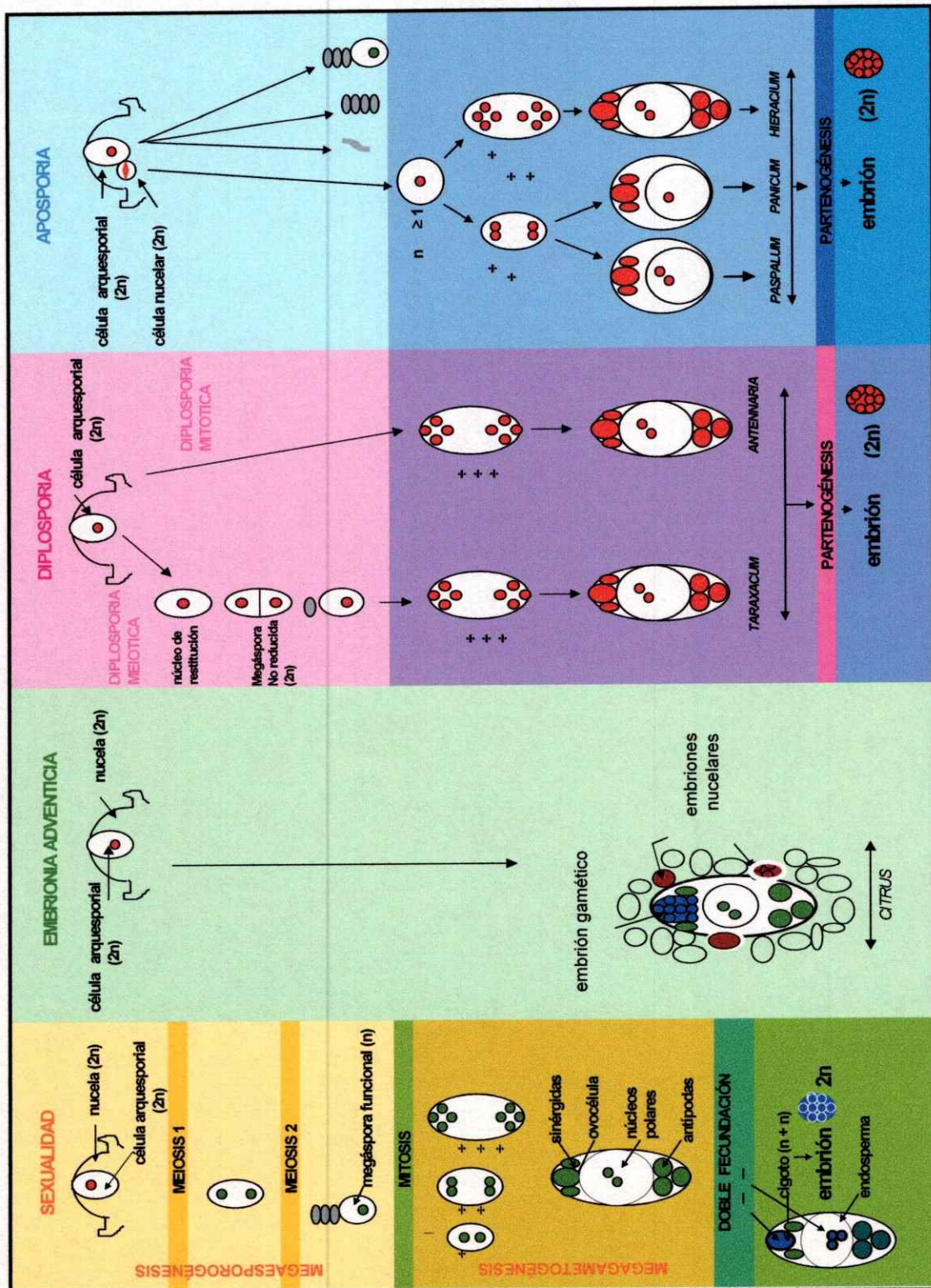


Figura 3: esquema mostrando una comparación de los modos de reproducción sexual y apomítico. Dentro de la apomixis se distinguen la ruta esporfítica (embriónia adventicia) y la ruta gametofítica (diplosporia y aposporia). +: indica número de divisiones mitóticas.

En la **apomixis gametofítica** se forma un saco embrionario no reducido a partir del cual se desarrolla el embrión sin fecundación. Se denomina apomeiosis al proceso que permite que surjan estos sacos embrionarios no reducidos. De acuerdo con el origen de la célula que genera al saco embrionario y al embrión, la apomixis gametofítica se subdivide en dos grupos: diplosporía y aposporía.

a) **Diplosporía:** los sacos embrionarios se generan a partir de la célula madre de la megáspora directamente por mitosis (tipo *Antennaria*) o luego de una falla en la meiosis (tipo *Taraxacum*). Los sacos embrionarios diplospóricos conservan la estructura típica de los sacos de origen meiótico de tipo *Polygonum*, generalmente con siete células y ocho núcleos (Savidan 2000). En la diplosporía mitótica, forma más ampliamente difundida, la célula madre de la megáspora no inicia la meiosis, sino que después de una larga interfase, se produce un crecimiento celular acompañado por una profunda vacuolización, seguido de tres mitosis sucesivas que dan origen a un saco embrionario maduro compuesto por ocho núcleos (todos no reducidos) (Nogler 1984a) (Figura 3). En la diplosporía meiótica de tipo *Taraxacum*, la célula madre de la megáspora inicia la profase meiótica, pero a consecuencia de una *asinapsis* parcial o total, la mayoría o la totalidad de los cromosomas permanecen sin aparearse en forma de univalentes. Estos univalentes no migran hacia los polos. Por el contrario, restituyen el núcleo (núcleo de restitución) en el centro celular y luego, uniéndose a las fibras del huso se separan en sus cromátidas en una división ecuacional dando origen a dos núcleos no reducidos. La posterior citocinesis origina una díada de megásporas, citológicamente no reducidas. Generalmente, en la célula del extremo chalazal de la díada, se producen tres mitosis consecutivas para formar un saco embrionario octo-nucleado (Figura 3). La formación del núcleo de restitución ocurre únicamente en la meiosis femenina (Nogler 1984a). Existen descritos otros dos tipos de diplosporía meiótica, tipo *Ixeris* y tipo *Allium*,

pero son mucho menos frecuentes que el tipo *Taraxacum* (Nogler 1984a, Sávidan 2000). En las plantas diplospóricas el proceso sexual se ve completamente comprometido ya que es la misma célula madre de la megáspora la que sufre la modificación. Sin embargo, existen individuos diplospóricos facultativos en los cuales algunos óvulos siguen la ruta sexual y otros la diplospórica.

b) **Aposporía:** los sacos embrionarios no reducidos son generados por mitosis a partir de células somáticas del óvulo, generalmente provenientes de la nucela (Figura 3). Los sacos embrionarios apospóricos tienen una constitución distinta y muy variable tanto en taxones diferentes como dentro de un mismo taxón. Pueden presentar distintas morfologías: tipo *Hieracium* (Rosenberg 1908 y 1930), tipo *Panicum* (Warmke 1954), además de algunas variantes típicas del género *Paspalum* (Quarin y Burson 1991). Las células nucelares iniciales de la aposporía poseen un núcleo grande y un citoplasma denso al igual que las células que se diferencian como células arquesporales. A diferencia de la diplosporía, en los óvulos de las plantas que presentan aposporía pueden coexistir el proceso sexual y el apomítico al mismo tiempo. Observaciones citológicas de diferentes especies apospóricas mostraron que las células iniciales apospóricas pueden diferenciarse de la nucela próxima a las células arquesporales en cualquier estadio de la megasporogénesis o megagametogénesis (Figura 4). Cuanto más temprano ocurre esta diferenciación, es más probable que el proceso sexual sea inhibido (Nogler 1984a). El desarrollo de los sacos embrionarios apospóricos es más rápido que el de los sexuales posiblemente por no estar demorados por la división meiótica. En general, el desarrollo de los sacos embrionarios meióticos queda detenido en el estadio de célula arquesporial o en el de megáspora y los productos del proceso sexual degeneran (Koltunow 1993) (Figura 3). En la aposporía tipo *Hieracium*, la formación del saco se produce después de tres divisiones mitóticas, originándose ocho núcleos que se distribuyen

hacia ambos polos, conformando una estructura similar a los sacos embrionarios de tipo *Polygonum* de las especies sexuales. La diferencia con este último reside en que cada núcleo no está reducido (Figura 3). Los sacos embrionarios tipo *Panicum* se forman a partir de células de la nucela del óvulo, mediante dos mitosis consecutivas, dando origen a solo cuatro núcleos, los cuales se distribuyen hacia un solo polo. Los sacos están constituidos por dos sinérgidas, la ovocélula y una célula central con un solo núcleo polar, careciendo de antípodas (Figura 3). La apomixis apospórica está ampliamente distribuida entre las Gramíneas. Muchas gramíneas tropicales y subtropicales poseen el tipo *Panicum* de desarrollo de saco embrionario; mientras otras tantas de clima templado poseen sacos embrionarios del tipo *Hieracium* (Savidan 2000). En las especies apospóricas del género *Paspalum* los sacos son similares a los de tipo *Panicum* pero tienen una célula central con dos y a veces tres núcleos polares (Quarin CL, comunicación personal) (Figura 3).

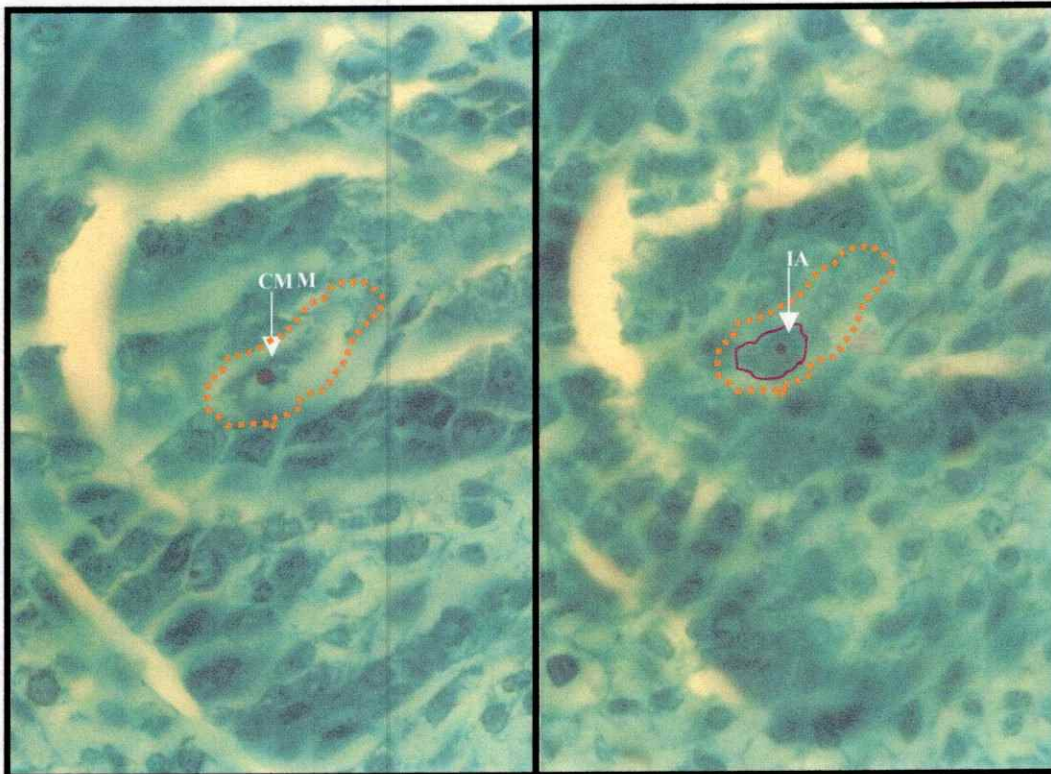


Figura 4: fotografía tomada al microscopio óptico de dos cortes consecutivos de un óvulo de *Paspalum notatum* apomíctico en estado muy joven (antes de la meiosis femenina), teñido con safranina-fast green. En el corte de la izquierda se ve la célula madre de la megáspora (CMM) completa, con su típica forma alargada, mucho más grande que las de la nucela, y con su núcleo y nucleolo. En el corte siguiente se ve una célula nucelar de citoplasma más teñido que las restantes y nucleolo bien notable (Célula inicial de saco apospórico = IA), ubicada sobre la CMM. En este caso en particular, la diferenciación de la célula nucelar como IA es anterior a la meiosis de la CMM.

Los sacos embrionarios, tanto diplospóricos como apospóricos, contienen la ovocélula ($2n$), a partir del cual se desarrolla directamente el embrión por partenogénesis sin que exista fecundación. Así, la ausencia de reducción se complementa con la partenogénesis. Sin embargo, no necesariamente se anula la fecundación de los núcleos polares. Aunque en algunos casos el endosperma puede desarrollarse en forma autónoma (*Erigeron* o *Taraxacum*), en muchas especies (la mayoría de las gramíneas tropicales como *Panicum*, *Pennisetum*, *Tripsacum* o *Paspalum*) es necesario que una gameta masculina se fusione con el/los núcleos polares de la célula central para formar el endosperma. Este proceso es

conocido como pseudogamia. La falla en el desarrollo del endosperma es una de las causas de la ausencia de formación de semillas apomícticas en muchas ocasiones (Quarin 1999).

La apomixis gametofítica ha sido más profundamente estudiada que la apomixis esporofítica, principalmente por ser el tipo presente en la gramíneas, donde muchas especies de valor agronómico presentan este modo de reproducción. Aunque durante los últimos diez años ha habido un gran progreso en el entendimiento y dilucidación de las bases celulares y moleculares de la apomixis, los genes disparadores del carácter aún no se han podido identificar. Una de las teorías sobre el origen de este tipo de reproducción, basada en datos genéticos, sugiere que las especies apomícticas derivan de antecesores sexuales que sufrieron un número limitado de mutaciones en la vía del desarrollo del gametofito femenino (revisado en Nogler 1984a, Koltunow 1993, Grimanelli et al. 2001 y Grossniklaus et al. 2001a). Los genes involucrados son aún desconocidos pero se han propuesto modos de acción posibles. En la reproducción sexual, la meiosis está activamente regulada en determinados puntos de control cuya función es asegurar que los eventos futuros no sucedan antes que los previos hayan sido completados satisfactoriamente. Una de las hipótesis supone que en la diplosporía se induce una salida heterocrónica (a destiempo) de la meiosis que afecta el desarrollo normal de la esporogénesis. Sin embargo, las funciones básicas requeridas para la misma *per se* (el potencial para la meiosis femenina) permanecerían inalteradas (Grimanelli et al. 2003). Así, en la diplosporía la progresión en la formación de la espora, la célula huevo y el embrión sufre alteraciones respecto a la vía sexual, posiblemente debido a una falla en los puntos de control. Por el contrario, en las plantas apospóricas son las células somáticas de la nucela las que se diferencian a espora (sin pasar por una meiosis) y sufren los procesos post-meióticos de gametogénesis. Esto implica que la primer consecuencia de la aposporía es un cambio en el destino celular de algunas células del tejido nucelar.

Consecuentemente se propone que la aposporia y la diplosporia se basan en mecanismos diferentes. Se puede considerar que ambas imitan las diferencias observadas entre mutantes heterocronicos y homeoticos: en la diplosporia se altera el destino celular dentro de dominios temporales (es heterocronica) mientras que en la aposporia se cambia el destino celular dentro de dominios espaciales (similar a lo que ocurre en los mutantes homeoticos) (Grimanelli et al. 2003). En el otro extremo, se considera a la partenogenesis como una consecuencia pleiotropica de la apomeiosis (Nogler 1984a, Grossniklaus et al. 2001a).

1.2.4- Rasgos distintivos del carácter apomixis

1.2.4.1- Apomixis y sexualidad

En general se considera que la apomixis no afecta la formación del microgametofito y que la meiosis ocurre normalmente en las anteras generando granos de polen viables portadores de gametas reducidas (Nogler 1984a). Esto hace que las plantas apomicticas puedan transmitir el carácter vía polen y ser utilizadas en cruzamientos únicamente como progenitores masculinos. Sin embargo, análisis recientes en *P. notatum* (Martínez et al. 2001; esta Tesis, ver más adelante) y *Erigeron annuus* (Noyes y Reiseberg 2000) muestran que la transferencia del carácter vía polen se desvía significativamente de las proporciones mendelianas esperadas. Esto sugiere una letalidad parcial posiblemente asociada a las gametas que transmiten el/los factor/res determinantes del carácter.

La apomixis y la sexualidad no son procesos mutuamente excluyentes ya que pueden aparecer simultáneamente sacos reducidos (meióticos) y no reducidos (apomeióticos) en una misma planta, en una misma inflorescencia y aún en un mismo óvulo (Harlan et al. 1964).

Como criterio general se considera como apomítico a cualquier individuo que tenga la capacidad de generar progenies por apomixis (independientemente del grado de expresión del carácter). Así, una planta apomítica capaz de generar al menos una parte de su progenie por medios sexuales se conoce como facultativa. Las progenies de los genotipos apomíticos facultativos pueden segregarse como clases maternas ($2n + 0$) y aberrantes o fuera de tipo que provienen de reproducción sexual (Asker y Jerling 1992). Dentro de los individuos aberrantes pueden encontrarse: 1) híbridos BII ($n + n$) que resultan de la unión de dos gametas reducidas, 2) híbridos BIII ($2n + n$) que se originan por la fecundación de una ovocélula no reducida por un grano de polen reducido y 3) haploides ($n + 0$) generados por partenogénesis a partir de la ovocélula reducida (Savidan 2000). La apomixis es considerada obligada cuando el 100 % de las progenies son de origen materno.

En general en las gramíneas la apomixis es de tipo obligado, o con escasa proporción de reproducción sexual. Por esto, el mejoramiento genético y la generación de nuevas variedades quedan restringidos en muchos casos a la selección y multiplicación de genotipos superiores tomados en las poblaciones naturales. Esto dificulta la incorporación de caracteres deseables a cultivares agrónomicamente adaptados y ha llevado a algunos autores a considerar a este tipo de reproducción como un cuello de botella infranqueable para el mejoramiento.

1.2.4.2- Apomixis y poliploidía

La apomixis gametofítica está siempre asociada a la poliploidía. Se han descrito algunos casos excepcionales de diploides naturales que presentan este tipo de reproducción pero no pertenecen a la familia de las gramíneas (Asker y Jerling 1992; Savidan 2000) y además, estudios posteriores que involucraron repeticiones de los análisis de algunas de esas

excepciones cuestionaron estos hallazgos (Holm y Ghatnekar 1996; Holm et al. 1997). Sin embargo, la embrionía adventicia es común en plantas diploides, tales como *Citrus*, *Nothoscordum*, *Sarcococca*, y *Euphorbia* (Gustafsson 1946).

Una característica común en la apomixis gametofítica es que las especies forman complejos agámicos, grupos en los cuales biotipos sexuales y apomícticos se encuentran representados en distintos niveles de ploidía. En la mayoría de los casos, los citotipos diploides son sexuales y los poliploides (tri, tetra o pentaploides) son apomícticos. Estos complejos agámicos se consideran estructuras reproductivas complejas y evolucionadas donde la sexualidad permite la generación de nuevos genotipos y la apomixis la propagación clonal muy eficiente de las combinaciones genéticas superiores. Existen evidencias que sugieren que la diversidad generada a niveles de ploidía bajos puede ser impulsada hacia los niveles poliploides por eventos sucesivos de hibridaciones $2n + n$ (Daurelio et al. 2004).

Por otro lado, en varios citotipos diploides de *Paspalum* (Norrman et al. 1989; Quarin et al. 1989; Quarin y Norrman 1990) y de *Brachiaria decumbens* (Naumova et al. 1999) se ha descrito la presencia ocasional de sacos embrionarios apospóricos junto a los sacos embrionarios meióticos normales. Estas observaciones indican que la apomeiosis sería funcional a nivel diploide al menos en algunos individuos de estas gramíneas. Sin embargo, nunca se confirmó que la apomixis (apomeiosis + paternogénesis + pseudogamia) se expresara efectivamente en estas especies diploides. Análisis genéticos realizados recientemente empleando distintas progenies del genotipo diploide Q3754 de *P. rufum* determinaron que todos los individuos filiales se originaron a partir de gametas maternas reducidas, a pesar de presentar entre un 8 - 26% de sacos embrionarios apospóricos (Siena et al. 2005).

1.2.4.3- Apomixis y desarrollo del endosperma

El endosperma es igualmente importante para el desarrollo de las semillas generadas tanto por la vía sexual como por la apomítica, pero la formación del mismo difiere significativamente entre ambos procesos. Como se mencionó anteriormente, en algunas especies apomíticas el endosperma se desarrolla en forma autónoma (partenogénicamente) sin fecundación y en otras depende de la fecundación de los núcleos polares de la célula central del gametofito (seudogamia). En ambos casos existen diferencias con respecto a la contraparte sexual en las contribuciones relativas de los genomas materno y paterno al endosperma. En un diploide sexual, el endosperma es triploide, compuesto por dos genomas maternos y uno paterno (2m:1p), mientras que, por ejemplo, en un apomítico típico tetraploide autónomo la relación es 8m:0p (la célula central tiene dos núcleos no reducidos) y en uno tetraploide seudógamo es 8m:2p (la célula central tiene dos núcleos no reducidos y la gameta masculina tiene uno reducido). En muchas plantas (por ejemplo, la mayoría de los cereales) una relación constante y determinada entre los genomas materno y paterno en el endosperma (2m:1p) es crítica para el desarrollo de las semillas. En las especies apomíticas seudógamas este requerimiento se alcanza en algunos casos por modificaciones en la gametogénesis o fecundación (*Panicum* y *Dichanthium*) o bien parece estar relajado en otros (*Paspalum* y *Tripsacum*). En *Panicum* la célula central del saco embrionario apospórico (tipo *Panicum*) tiene un solo núcleo no reducido (4x), por lo tanto el endosperma que se generará luego de la fecundación por un núcleo espermático (2x) tendrá una relación 4m:2p, o sea 2m:1p (Savidan 2000). En *Dichanthium* que presenta sacos embrionarios apospóricos tipo *Hieracium*, la relación de balance endospermico 2m:1p también se mantiene, pero en este caso lo que sucede es que los dos núcleos polares (4x, cada uno) son fecundados por las dos

células espermáticas ($2x$, cada una) generando un endosperma $8m:4p$. (Savidan 2000). En *P. notatum* tetraploide apospórico se determinó una insensibilidad al balance endospermico, ya que se pueden formar semillas viables por autopolinización (balance endospermico $8m:2p$) y por polinización cruzada intra o interespecífica con genotipos de diferente nivel de ploidía, desde $2x$ hasta $8x$ (cuyos balances endospermicos varían desde $8m:4p$ hasta $8m:1p$) (Quarin 1999). Resultados similares se obtuvieron en *Tripsacum dactiloides* (tetraploide, diplospórico) (Grimanelli et al. 1997). Las bases genéticas de la respuesta del balance endospermico son aún desconocidas, pero está claro que representan un aspecto esencial de la apomixis gametofítica (Grimanelli et al. 2001).

1.2.4.4- Apomixis e "imprinting" genómico

El "imprinting" genómico se refiere a la expresión uniparental específica de genes y resulta en la diferenciación funcional de los genomas materno y paterno (Reik y Walter 2001). En los mamíferos el *imprinting* genera que el genoma materno y paterno sean complementarios para genes que son esenciales para el desarrollo del embrión asegurando de esta manera la presencia de ambos genomas en el cigoto. La ocurrencia de la apomixis en plantas sugiere que la presencia del genoma paterno no es un requerimiento absoluto para el desarrollo del embrión (Grimanelli et al. 2001). Estudios recientes en *Arabidopsis thaliana* demostraron que de 20 genes analizados en la semilla (embrión o endosperma) durante los primeros días luego de la fecundación, ninguno correspondió al complemento genético paterno indicando que las primeras etapas del desarrollo estarían exclusivamente bajo control materno (combinación del almacenamiento de productos maternos en la gameta e *imprinting* genómico) (Vielle- Calzada et al. 2000). Esto sugiere que en los individuos apomícticos los

procesos fundamentales del desarrollo temprano del embrión serían similares a los que suceden en las plantas sexuales. Las diferencias en el desarrollo de la semilla entre especies sexuales y apomícticas radicarían en la regulación de la activación de los correspondientes programas de desarrollo y no en los programas en sí mismos (Grimanelli et al. 2001).

1.2.4.5- *Apomixis vs. embriogénesis somática*

En general, existen por lo menos tres diferencias en el desarrollo que permiten distinguir a los embriones originados por apomixis de aquellos provenientes de embriogénesis somática: i) la formación del embrión apomíctico ocurre dentro de estructuras diferenciadas, ii) los embriones apomícticos se forman directamente a partir de una célula localizada en, o cercana a una estructura gametofítica, sin pasar por una fase de callo, lo que en general es necesario para la embriogénesis somática (con la excepción de los casos de embriogénesis directa) y iii) el patrón de formación del embrión en las especies apomícticas es indistinguible del que ocurre en las especies sexuales más cercanas, lo que no siempre es el caso para la embriogénesis somática (Koltunow 1993).

1.2.5- *Importancia agronómica de la apomixis*

La apomixis constituye un carácter de gran interés para la agricultura. Las potenciales ventajas de la manipulación de este tipo de reproducción han sido ampliamente discutidas por varios autores (Bashaw 1980, Savidan 1986, Hanna y Bashaw 1987, Savidan y Dujardin 1992, den Nijs y van Dijk 1993, Jefferson 1994, Hanna 1995, Koltunow et al. 1995, Vielle Calzada

et al. 1996a). Savidan (2000) describió como las principales ventajas de la apomixis las siguientes características: a) facilidad y eficiencia en el desarrollo, multiplicación y mantenimiento de genotipos híbridos superiores, ya que una planta que posea el carácter puede convertirse inmediatamente en un cultivar estable, b) facilidad para producir semilla pura de alta calidad sin requerimiento de aislamientos y c) facilidad y eficiencia en el desarrollo y aplicación de nuevos procedimientos de mejoramiento. Además, la manipulación de carácter facilitaría el uso de transformantes considerando que una planta apomíctica transgénica inmediatamente fijaría los genes introducidos y se convertiría en cultivar luego de multiplicarse (Vielle -Calzada et al. 1996a).

Aunque desde el punto de vista del mejoramiento genético la apomixis puede considerarse como un sistema que restringe la recombinación genética, el carácter representa ventajas que atraen el interés de los mejoradores. Estas ventajas residen en la posibilidad de: generar nuevos híbridos intergenéricos e interespecíficos (sin las constricciones que implica la meiosis), multiplicar sus semillas fácilmente, disminuyendo sus costos de producción y mantener líneas puras sin aislamiento físico. Por último, existe un interés de los agricultores de áreas marginales en el carácter, quienes podrían utilizar sus propias semillas (no segregantes) en sucesivos ciclos de cultivo. Estas características hacen que la transferencia de la apomixis a especies como los cereales (especialmente maíz y arroz), el girasol o la papa sea un objetivo de gran importancia agronómica y un enorme beneficio potencial.

1.2.6- Transferencia del carácter apomixis a especies de interés agronómico

La obtención de nuevos cultivos apomícticos implica que la meiosis femenina debe estar bajo un control inducible, que el embrión se debe desarrollar a partir de una célula

materna genéticamente inalterada y que el endosperma debe ser compatible. Asimismo, se debería lograr la expresión del carácter a nivel diploide (Grossniklaus et al. 2001a).

Básicamente se consideran tres grupos generales de procedimientos para la potencial transferencia de la apomixis a especies sexuales: i) la hibridización clásica entre una planta sexual y un pariente apomíctico natural cercano; ii) la iniciación de la expresión de la apomixis por experimentos de bloqueo de genes (mutantes T, etiquetado transposicional, mutagénesis); iii) la transformación de cultivares sexuales con genes que controlan la expresión del carácter. Las dos primeras metodologías ya fueron intentadas (con un grado variable de éxito) mientras que la tercera todavía continúa siendo hipotética.

Los primeros experimentos dirigidos a introducir la apomixis a través de cruces fueron realizadas cerca de 40 años atrás por D.F. Petrov, quien realizó hibridaciones de razas tetraploides de maíz y *Tripsacum dactyloides* (que presenta apomixis de tipo 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 retrocruces son completamente machoestériles, 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 es el fuerte requerimiento de una relación 2:1 en el número de genomas haploides maternos y paternos que contribuyen a la formación del endosperma. Estos problemas han demorado el progreso de la introducción de la apomixis en maíz en los últimos años y constituyen el obstáculo más importante que presenta esta estrategia. En cambio, la apomixis ha sido transferida exitosamente al mijo por un programa de mejoramiento iniciado al final de los 70 y que es considerado el más avanzado de su clase (Hanna et al. 1993). Se han obtenido individuos apomícticos parcialmente macho fértiles pero

que producen un número bajo de semillas viables, probablemente debido a problemas asociados con el desarrollo del endosperma (Morgan 1998).

Los intentos para generar mutantes apomícticas inactivando genes de la sexualidad por etiquetado transposicional o mutagénesis (Walbot 1992) no han tenido éxito aún en recrear el carácter, sin embargo permitieron la identificación en *Arabidopsis thaliana* de varios genes involucrados en el control de etapas particulares de su desarrollo. Los tres genes FIS (del inglés, *fertilization independent seed*): *FIS2*, *FIE* (*fertilization independent endosperm*) y *MEA* (*MEDEA*), reprimen la formación del endosperma en ausencia de fecundación (Grossniklaus et al. 2001b). Los análisis de secuencias de estos genes mostraron que *MEA* y *FIE* tienen similitud estructural y funcional con proteínas del grupo *polycomb* (PcG) y *FIS2* codifica una proteína "zincfinger" (dedo de Zn). Las proteínas del grupo PcG (en animales) forman complejos multiméricos que regulan la expresión de genes por modulación de la estructura altamente organizada de la cromatina y algunos miembros también están involucrados en el control de la proliferación celular. En *Drosophila*, una proteína dedo de Zn está implicada en las etapas tempranas de formación del complejo PcG. La similitud de *MEA*, *FIE* y *FIS2* con dichos genes y el fenotipo común de los mutantes *mea*, *fie* y *fis2* (desarrollan el endosperma sin fecundación), sugiere que en plantas estas proteínas forman complejos tipo *Pc* y que regulan genes que controlan la proliferación celular durante el desarrollo de la semilla. Asimismo, se demostró que *MEA* y posiblemente *FIS2* estén regulados por "imprinting" genómico, es decir, sólo los alelos maternos se expresan luego de la fecundación (Grossniklaus et al. 2001b, Berger 2003).

La transformación genética de cultivares sexuales con genes que controlan el inicio de la apomixis es aún hipotética, ya que la identificación de los genes específicos que disparan el carácter no se ha logrado. Estudios genéticos y moleculares realizados en varias especies

indican además que el *locus* en el que se encuentran el/los factores determinantes de la aposporia y displosporia sería una estructura compleja que probablemente contiene varios genes asociados por función y aislados por recombinación (Grimanelli et al. 1998a, Ozias-Akins et al. 1998, 2003, Pupilli et al. 2001, Martínez et al. 2003, Stein et al. 2004). Esta característica dificulta la identificación de secuencias nucleotídicas únicas y anticipa dificultades a la hora de transformar individuos sexuales en apomícticos utilizando vectores portadores de genes candidatos.

1.2.7- *La apomixis en Paspalum notatum*

El carácter apomixis está muy difundido en el género *Paspalum* e incluye un importante número de especies de interés agronómico. La mayoría de ellas son apospóricas, siendo la diplosporia infrecuente (Bonilla y Quarín 1999). *Paspalum notatum*, en particular, forma un complejo agámico con citotipos diploides de reproducción sexual y poliploides (tetraploides en su mayoría) apospóricos. Los citotipos diploides presentan sacos embrionarios meióticos de tipo *Polygonum* produciendo exclusivamente un saco por óvulo (Figura 5a-b). Las razas tetraploides presentan sacos embrionarios apospóricos, de estructura globular, conteniendo una ovocélula acompañada por una o dos sinérgidas y una célula central binucleada. Esta última característica es importante porque debido a la pseudogamia, la relación genómica materna/paterna del endosperma en las semillas tetraploides es 4/1 (madre $2n +$ padre n). Los nucleolos en la célula central tienen un volumen que supera en dos veces o más al volumen del nucleolo de la ovocélula (Quarín y Burson 1991). La célula central está constituida en un 70 u 80 % por espacio vacuolar. La característica más notable de estos sacos es la ausencia de antípodas (Norrman et al. 1989; Quarín y Burson 1991) (Figura 5c-d).



Figura 5: fotografías de dos cortes seriados de ovarios de *Paspalum notatum* teñidos con safranina-fast green. (a) óvulo conteniendo un saco embrionario meiótico proveniente de un genotipo tetraploide apomítico facultativo (Q3664) y (c) óvulo conteniendo dos sacos embrionarios apospóricos proveniente de un genotipo tetraploide apomítico obligado (Q4117). (b) y (d) esquemas de reconstitución. o: ovocélula, s: sinérgida, np: núcleos polares, a: antípoda.

Se ha analizado embriológicamente una colección muy importante de ecotipos tetraploides apomíticos y en prácticamente todos ellos se encontró un grado variable de sexualidad residual (Altamiranda 1983). En las plantas apomíticas se pueden distinguir cuatro tipos de óvulos: a) con un saco meiótico, b) con un saco meiótico y uno o varios apospóricos (sacos mixtos), c) con sacos apospóricos únicamente y d) con saco embrionario abortado (sin desarrollo).

No se ha descrito la presencia de plantas tetraploides completamente sexuales de *P. notatum* en la naturaleza, pero sí se las ha obtenido experimentalmente mediante tratamientos con colchicina de diploides o por cruzamientos entre apomíticos facultativos generados artificialmente y tetraploides naturales (Forbes y Burton 1961; Quarin et al. 1984; Quarin et al. 2001). Como ejemplos de materiales disponibles de este tipo pueden citarse a los genotipos Q4188 y Q4205 ambos obtenidos en el Instituto de Botánica del Nordeste (Quarin et al. 2003).

Como se mencionó anteriormente, en *P. notatum* diploide se ha observado un porcentaje bajo de óvulos (entre 0,4 –1,3 %) con sacos embrionarios mixtos. Asimismo, se han obtenido tetraploides apospóricos a partir de diploides sexuales por técnicas de cultivo *in*

vitro asociadas a tratamientos con colchicina (Quarin y Bovo 1995; Quarin et al. 2001). Los resultados de estos estudios indican que los genes responsables de la apomixis estarían presentes a nivel diploide y solo se expresarían a nivel poliploide (ploidía-dependientes). Esta dependencia de la poliploidía puede involucrar alternativamente: a) efectos de dosaje que actúan sobre un *locus* secundario que requeriría una dosis mayor del alelo para regular la expresión del *locus* que gobierna el carácter (Quarin et al. 2001) (ver ítem 3.4); b) efectos epigenéticos que afecten la región genómica responsable de la aposporia u otra que controla su expresión (Pessino SC y Ortiz JPA, comunicación personal).

I.3- Control genético de la apomixis

La apomixis es un carácter heredable (Nogler 1984a). En los últimos años varios autores discutieron el mecanismo de regulación genética en diferentes especies (Nogler 1984a, Asker y Jerling 1992, Mogie 1992, Koltunow 1993, Pessino et al. 1999, Savidan 2000, Grimanelli et al. 2001, Ozias-Akins et al. 2003). A pesar de su amplia distribución en las angiospermas, la apomixis no es muy común en los cultivos mayores o en sistemas modelos. Esta condición forzó a que los estudios en este campo deban ser realizados en especies que son comúnmente poliploides, altamente heterocigotas y con poca caracterización genética. La disección del carácter es por lo tanto dificultosa y compleja (Stebbins 1950, Nogler 1984a). Los estudios de herencia sólo son posibles si pueden cruzarse individuos completamente sexuales (naturales o generados artificialmente) utilizados como madres con apomícticos obligados como dadores de polen. La progenie F_1 segregante debe ser examinada por métodos citoembriológicos y clasificada de acuerdo al modo de reproducción. Alternativamente, el

análisis de progenies para detectar variaciones morfológicas o con marcadores moleculares, puede ser usado como indicador del modo y grado de reproducción apomíctica de los genotipos parentales (Ortiz et al. 1997, Ortiz y Pessino 2002). Otro método de clasificación utilizado se basa en realizar análisis de progenies por citometría de flujo, midiendo el contenido de ADN en las semillas maduras (Matzk et al. 2000). Comparando el valor C (en pg de ADN) del embrión y del endosperma se puede deducir la vía reproductiva que dio origen a la semilla considerada, por ejemplo un tetraploide sexual estaría representado por $4C+6C$, un apomíctico seudógamo por $4C+10C$ y uno autónomo por $4C+8C$ (Cáceres et al. 2001).

Los primeros análisis genéticos de la apomixis se llevaron a cabo en *Hieracium* (género con especies apospóricas) donde se determinó que el carácter posee un control genético simple dominante (Ostenfeld 1910, Christoff 1942). Estos resultados han sido actualmente confirmados en un análisis exhaustivo de diferentes tipos de progenies segregantes en *H. aurantiacum* (Bicknell et al. 2000). Al mismo resultado se llegó con los géneros apospóricos de *Hypericum* (Noack 1939), *Potentilla* (Christoff y Papisova 1943), *Sorbus* (Liljefors 1955), *Malus* (Sax 1959) y *Beta* (Cleij et al. 1976). Debido a la complejidad del carácter, varios estudios se concentraron en la herencia de la apomeiosis, a través del análisis embriológico de progenies obtenidas a partir de diferentes cruzamientos. En los géneros apospóricos de *Ranunculus* (Nogler 1984b), *Panicum* (Savidan 1982), *Pennisetum* (Sherwood et al. 1994), *Brachiaria* (do Valle et al. 1994) y *Paspalum* (Martínez et al. 2001) y en los géneros diplospóricos de *Tripsacum* (Leblanc et al. 1995), *Erigeron* (Noyes y Reiseberg 2000) y *Taraxacum* (Van Dijk y Bakx-Schotman 2004), se determinó que tanto la aposporia como la diplosporia parecen estar controladas por uno o unos pocos genes de herencia simple dominante. En *Ranunculus* y en *Panicum*, en los mismos experimentos se determinó que la

apomeiosis y la partenogénesis co-segregaban estrictamente, sugiriendo que estos dos componentes de la apomixis están bajo el mismo control genético o bien que la partenogénesis es una consecuencia pleiotrópica de la apomeiosis (Nogler 1984a, Savidan 2000). Sin embargo, en algunas especies como *Erigeron annuus* (Noyes y Reisenberg 2000), *Taraxacum officinale* (Van dijk et al. 1999) y *Hypericum perforatum* (Matzk et al. 2001) se ha informado que la apomeiosis y la partenogénesis segregan independientemente.

Asimismo, los análisis genéticos determinaron que la región genómica asociada con la apomeiosis en *Panicum maximum* (Savidan 1981), *Brachiaria* (do Valle et al. 1994), *Paspalum simplex* (Pupilli et al. 1997), en híbridos interespecíficos de *Pennisetum* (Ozias-Akins et al. 1998) y en *Tripsacum* (Grimanelli et al. 1998a) se transmite de acuerdo a un tipo de herencia polisómica (tetrasómica). Sin embargo, en *Cenchrus ciliaris* la aposporia mostró una forma de herencia disómica (Jessup et al. 2002).

Un estudio reciente realizado en *Poa pratensis* en el que se incluyeron varias poblaciones segregantes originadas por cruzamientos entre individuos apomícticos obligados y sexuales; apomícticos facultativos y autofecundaciones, propone un modelo de herencia complejo en el cual 5 genes mayores controlarían la apomixis en la especie y la aposporia y partenogénesis segregarían en forma independiente. Los factores responsables del carácter fueron definidos como: iniciador de la aposporia [*apospory initiator gene* (Ait)], inhibidor de la aposporia [*apospory preventer gene* (APV)], desarrollador de la megáspora [*megaspore development gene* (Mdv)], iniciador de la partenogénesis [*parthenogenesis initiator gene* (Pit)] e inhibidor de la partenogénesis [*parthenogenesis preventer gene* (Ppv)]. De acuerdo a este modelo, diferencias en la expresividad así como entre las interacciones entre ellos serían los responsables de la herencia y la amplia variación en la expresividad del carácter (Matzk et al 2005).

Este nuevo modelo de herencia compleja desafía el concepto clásico en el cual un factor Mendeliano simple sería el responsable del carácter. Asimismo, impone una nueva mirada a las estrategias de transferencia de la apomixis a especies sexuales por medio de técnicas de ingeniería genética debido a que sería necesario manipular simultáneamente varios factores que segregan en forma independiente.

I.3.1- *Herencia de la apomixis en Paspalum*

Los primeros estudios de herencia de la apomixis en *Paspalum* los realizaron Burton y Forbes (1960). En dicho trabajo se propuso que el carácter en *Paspalum 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 sexuales inducidas (diploides duplicados) y apomíticas naturales. La clasificación reproductiva de los individuos segregantes se realizó mediante pruebas de progenies (unas 10 plantas por individuo) por caracteres morfológicos con respecto al genotipo materno. Si bien este primer trabajo intentó proponer un modelo de herencia, el sistema experimental empleado presentaba importantes limitaciones en cuanto a la clasificación de los individuos filiales y por consiguiente en la estimación de las proporciones de segregación de plantas sexuales y apomíticas. Por ejemplo el reducido número de individuos segregantes no permite diferenciar entre una planta sexual y otra apomítica facultativa con alta expresión de la sexualidad. Por otro lado, los autores consideraron que los autotetraploides obtenidos por inducción con colchicina de diploides sexuales eran completamente sexuales, cuando ahora se sabe que pueden obtenerse individuos apomíticos facultativos por este tratamiento (Quarin et al. 2001). Estas restricciones hicieron que en los últimos años fuera necesario replantear el

estudio de la herencia del carácter empleando nuevas técnicas embriológicas y moleculares. Un segundo antecedente de estudios sobre el control genético de la aposporía en *Paspalum* se basó en el desarrollo de una población segregante por el modo de reproducción obtenida a partir de un cruzamiento entre un individuo tetraploide sexual autoincompatible de *P. ionanthum* usado como progenitor femenino y uno apomítico facultativo de *P. cromyorrhizon* como dador de polen (Martínez et al. 1999). Los genotipos parentales y las progenies segregantes fueron clasificadas de acuerdo a su modo de reproducción en no apospóricas y apospóricas por análisis embriológicos, usando la técnica de observación de sacos embrionarios por clarificado de ovarios (Herr 1971). En base a los resultados obtenidos los autores plantearon dos modelos posibles que explicarían el control genético de la aposporía en las especies de *Paspalum*: a) un modelo de dosaje génico que suponía que la aposporía requería de al menos dos dosis de un alelo recesivo junto con una del alelo salvaje, siendo los genotipos homocigotas recesivos inviables, o alternativamente, b) un modelo que planteaba un gen dominante, que resultaba letal cuando estaba en doble dosis en las gametas (Martínez et al. 1999). Este trabajo constituyó el fundamento del modelo aceptado actualmente en el cual, empleando cruzamientos intraespecíficos y euploides (entre dos genotipos del mismo nivel de ploidía) en razas tetraploides de *Paspalum notatum*, se determinó que la aposporía se comporta como un carácter simple dominante y se trasmite a la progenie de manera no-mendeliana debido a una distorsión en la relación de segregación, probablemente asociada a un efecto pleiotrópico letal con penetrancia incompleta o a un factor letal parcial ligado que afecta a las gametas masculinas (Martínez et al. 2001). En este trabajo, los genotipos utilizados como progenitores sexual y apomítico (femenino y masculino, respectivamente) fueron analizados exhaustivamente por citoembriología y por pruebas de progenies usando marcadores moleculares (Ortiz et al. 1997). Asimismo, los

híbridos obtenidos fueron confirmados por análisis moleculares y clasificados, por el modo de reproducción, por observación de al menos 60 sacos embrionarios de cada planta (Ortiz et al. 1997, Martínez et al. 2001).

Distorsiones asociadas a la segregación de la apomeiosis han sido descriptas también en híbridos de maíz-*tripsacum* (Grimanelli et al. 1998b), en cruzamientos recíprocos entre mijo perla sexual (*Pennisetum glaucum*) e híbridos apomícticos de *Pennisetum* (*P. glaucum* x *P. squamulatum*) (Roche et al. 2001) y en *Erigeron annuus* (Noyes y Reiseberg 2000) sugiriendo un patrón general de distorsión en la transmisión del carácter en varias especies.

El modelo genético más simple propuesto para especies tetraploides de *Panicum*, *Brachiaria*, *Paspalum* y *Tripsacum* supone que la constitución genética de las plantas sexuales sería de tipo nuliplejo (aaaa) mientras que los individuos apomícticos serían simplejos (Aaaa) para un hipotético alelo A, dominante y responsable de la apomixis. Si bien este modelo simple ha posibilitado importantes avances en el estudio del carácter, está claro que no puede generalizarse y que en muchos casos no permite explicar los resultados experimentales obtenidos.

1.3.2- Rol funcional de la poliploidía

Como se mencionó anteriormente, la apomixis gametofítica se expresa en individuos poliploides. Los estudios pioneros de Nogler (1982) en *R. auricomus* demostraron que individuos diploides obtenidos por desarrollo partenogenético de ovocélulas reducidas de tetraploides apomícticos o por cultivo de anteras (dihaploides), eran capaces de reproducirse por apomixis. Resultados similares se confirmaron asimismo en otras especies (Bicknell 1997, Kojima y Nagato 1997). Sin embargo, nunca se pudo observar apomixis en diploides cigóticos

(obtenidos por fusión entre gametas haploides). Estos resultados llevaron a Nogler a proponer que en *Ranunculus auricomus* el alelo dominante A (responsable de la aposporía) no puede ser transmitido a través de gametas haploides, con lo cual la apomixis nunca se encontraría en diploides naturales. Su hipótesis (sin describir mecanismos posibles) se basó en que el alelo responsable de la apomixis (A) sería letal en ausencia del alelo recesivo (a). Estudios realizados por Bicknell et al. (2000) en *Hieracium piloselloides* indicaron que la apomixis podía transmitirse tanto por gametas haploides como diploides, siendo la letalidad post-cigótica la causa de la ausencia de apomixis a nivel diploide.

Todos estos resultados sugieren que la relación entre poliploidía y apomixis es más bien estructural que funcional ya que el alelo determinante de la apomixis estaría ausente en plantas diploides (Grimanelli et al. 2001). Sin embargo otras evidencias sugieren que la duplicación de los genomas cumpliría un rol funcional para la expresión de la apomixis. Se han propuesto dos modelos posibles. El modelo de la “regulación por ploidía” (Quarin et al. 2001) postula que los alelos de algunos genes involucrados en la reproducción se expresan diferencialmente dependiendo del nivel de ploidía. Según esta hipótesis, aún cuando el alelo determinante de la apomixis (A) está presente a nivel diploide, éste no puede expresarse en forma efectiva, ya que para ello se requiere la existencia de un “entorno” poliploide. No es que el alelo A se requiera en más de una dosis, está repetidamente probado que la apomixis es dominante y que plantas poliploides de constitución genética Aaaa son apomícticas. Lo que sucedería es que simplemente A no puede expresarse a niveles diploides porque: a) está bajo el control genético de un *locus* secundario B, que sufre efecto de dosaje o control epigenético regulado por ploidía, o b) está él mismo bajo el control de factores epigenéticos regulados por ploidía. Este modelo se basa en resultados experimentales obtenidos en *P. notatum* (Quarin y Bovo 1995, Quarin et al. 2001) y en *P. hexastachyum* (Quarin y Hanna 1980) donde se

demonstró que los los alelos determinantes de la apomixis existirían en las plantas sexuales a nivel diploide pero la apomixis sólo se expresa en sus tetraploides derivados por duplicación con colchicina. Por otro lado, el modelo de la “asincronía” (Carman 1997) postula que la hibridación de dos ecotipos con conductas reproductivas divergentes generaría un aloploiploide con expresión asincrónica de los genes específicos de la meiosis y gametogénesis, que eventualmente conduciría a una expresión ectópica de la gametogénesis sin la participación de la meiosis. Sin embargo, Savidan (2000) critica las evidencias en las que el Carman basó el modelo y sugiere que se deberían realizar nuevos experimentos para generar nuevos híbridos artificiales que expresen la apomixis y demostrar que el carácter sea heredable.

1.3.3- Caracterización molecular de la apomixis

Tradicionalmente los análisis citoembriológicos de las plantas madres y las pruebas de progenies por caracteres morfológicos o isoenzimáticos han sido las metodologías más usadas para el estudio de la apomixis. En los últimos años la utilización de marcadores moleculares ha aportado nuevas herramientas para el estudio y seguimiento del fenómeno (revisado en Pessino et al. 1999). La tecnología de marcadores moleculares y los procedimientos de biología molecular han generado una cantidad considerable de conocimiento nuevo sobre las bases moleculares de la apomixis que puede ser útil para el aislamiento de los genes que controlan el carácter. Marcadores moleculares ligados a la aposporia fueron detectados en *Pennisetum* (Ozias-Akins et al. 1993 y 1998), *Cenchrus* (Gustine et al. 1997, Roche et al. 2001, Jessup et al. 2002), *Brachiaria* (Pessino et al. 1997 y 1998) y *Paspalum* (Pupilli et al. 2001, Martínez et al. 2003), y a la diplosporía en híbridos de maíz-*Tripsacum* (Leblanc et al.

1995, Grimanelli et al. 1998a) y *Taraxacum* (Vijverberg et al. 2004). Los mismos han sido utilizados para la identificación de las regiones genómicas específicas responsable del carácter en cada caso.

En varias especies los resultados obtenidos apuntan al hecho que tanto la aposporia como la diplosporia parecen estar controladas por un *locus* único que podría comprender un grupo de genes ligados y coadaptados que funcionan como una sola unidad genética y que se transmiten juntos a causa de una fuerte supresión de la recombinación (Grimanelli et al. 1998a, Grossniklaus et al. 2001, Ozias-Akins et al. 2003, Pupilli et al. 2004, Stein et al. 2004).

En *Pennisetum squamulatum*, sobre un total de 4000 marcadores de RAPD, 12 cosegregaron estrictamente con la apomixis detectando una región hemicigota, con supresión de la recombinación, que estaba presente solo en los individuos apomícticos y que fue denominada “región genómica específica de la aposporia” (ASGR, del inglés “*apospory specific genomic region*”) (Ozias-Akins et al. 1998). Varios de estos marcadores fueron luego probados en *Cenchrus ciliaris* obteniéndose resultados similares en esta especie (Roche et al. 1999). Estos resultados fueron corroborados en trabajos posteriores del mismo grupo por experimentos de hibridación *in situ* utilizando sondas fluorescentes (FISH) (generadas a partir clones de BACs positivos para los marcadores ligados al carácter) que mostraron que la ASGR se localiza en un solo cromosoma en una posición telomérica en *Pennisetum* y centromérica en *Cenchrus* (Roche et al 2002, Goel et al. 2003). Estudios más recientes de mapeo físico de alta resolución utilizando la misma técnica permitieron definir en ambas especies las distancias físicas entre los marcadores que no recombinan y caracterizar más profundamente la región (Akiyama et al. 2004 y 2005).

Se han realizado una serie de estudios tendientes a la identificación de genes cuya expresión se activa o se reprime específicamente en la flor durante el desarrollo del

megagametofito no reducido, utilizando la técnica de exposición diferencial. Los mismos han informado el aislamiento de transcritos de mRNA específicos del desarrollo apospórico en varias especies de gramíneas. Vielle-Calzada et al. (1996b) informaron que un gen (*Pcs-2*) se expresa sólo en ovarios sexuales mientras otros dos (*Pca-2* y *Pca-3*) lo hacen exclusivamente en ovarios apomícticos de *Pennisetum ciliare* conteniendo gametofitos femeninos celularizados. Estos transcritos no presentaron homologías con genes incluidos en los bancos de datos. Por otro lado, Chen et al. (1999) informaron la expresión de *asg1* (gen específico de la apomixis 1) en primordios florales de una accesión apomíctica de *Panicum maximum* asociada temporalmente con la aparición de las células iniciales de la aposporia. La secuencia de *asg1* es similar a varios genes específicos de la semilla o el embrión de diferentes especies vegetales, entre ellos *rd22* (un gen expresado en semillas e inducido por sequía en *A. thaliana*), *grp* (un gen que codifica una proteína rica en glicina de la pared celular de ovarios de *Phaseolus vulgaris*), *usp* (un gen que codifica a una proteína de semilla de *Vicia fava*), *plyg1* (un gen que codifica a un precursor de la cadena beta de poligalacturonasa de *Lycopersicum esculentum*) y *adr6p* (un gen regulado negativamente por auxina de *Glycine max*). La homología de secuencia con todos estos genes es altamente significativa por lo que los autores interpretaron que *asg1* podría cumplir una función nueva dentro del complejo de formación del embrión y la semilla, relacionada con la aparición de las iniciales de la aposporia (Chen et al. 1999). Pessino et al. (2001) compararon la expresión de genes en flores (conteniendo ovarios con sacos embrionarios completamente celularizados) de genotipos sexuales y apomícticos de *Paspalum notatum*. Se identificó una familia de transcritos de expresión aumentada en genotipos apomícticos. Esta familia se denominó *arpl* (gen que codifica a la proteína relacionada a la apomixis 1). Inicialmente no se hallaron homologías significativas en las bases de datos, pero una búsqueda más reciente permitió detectar que

arp1 es homólogo a dos ESTs de maíz relacionadas con la cinesina KatD de *A. thaliana*. KatD es una proteína motora del citoesqueleto que se expresa exclusivamente en tejido floral y cuya función no está aún definida. Además se identificaron un gen que codifica para una proteína SGT (small glutamine rich tetratricopeptide protein) y uno para una aldehído deshidrogenasa, que están presentes sólo en plantas apomícticas. Otros tres genes presentes en plantas sexuales no presentaron homología con secuencias de genes conocidos (Silvina Pessino, comunicación personal). Por otra parte en *Brachiaria brizantha*, se encontraron genes diferencialmente expresados en plantas apospóricas que son similares a miosina, una exonucleasa de la superfamilia RecB, una quinasa MAP, una acuaporina, una factor translocador de proteínas y la proteína ribosomal 60S (Rodrigues et al. 2003). En un trabajo más reciente, Albertini et al. (2004) aislaron 55 genes de expresión diferencial en flores de genotipos sexuales y apospóricos de *Poa pratensis*. Entre los genes aislados por los autores se encuentra una cinesina, coincidiendo con lo reportado en *Paspalum*, y otros genes relacionados con la recepción y transducción de señales hormonales y el control de la estructura del citoesqueleto.

Los análisis de expresión de esta clase pueden conducir a la identificación y el clonado de genes involucrados en las primeras etapas del desarrollo apomíctico y eventualmente al aislamiento del disparador mismo de la apomixis.

I.4- Mapas de ligamiento genético

En 1913 Alfred Sturtevant generó el primer mapa genético de *Drosophila melanogaster* usando seis marcadores morfológicos (factores) (Sturtevant 1913). Años más

tarde Karl Sax (1923) demostró que existía ligamiento genético entre un locus que gobernaba un carácter cualitativo (color de semilla) y otro que gobernaba un carácter cuantitativo (tamaño de semilla) en *Phaseolus vulgaris*. A partir de estos estudios pioneros, los marcadores genéticos han evolucionado desde una gran variedad de marcadores morfológicos, isoenzimáticos hasta los actuales marcadores de ADN. Los marcadores morfológicos son fáciles de monitorear pero tienen la desventaja de que son afectados por el ambiente, algunos pueden recién evidenciarse tardíamente durante el desarrollo. Pero lo que hace más restrictiva su utilidad es que son limitados en número. Además, un marcador morfológico puede tener un efecto pleiotrópico sobre otros caracteres de interés o ser deletéreo. Por otro lado, es muy difícil obtener individuos que acumulen un gran número de marcadores para utilizarlos como progenitores de cruzamientos y obtener poblaciones segregantes (Young 1994). Los marcadores isoenzimáticos si bien aumentan en algo el número de *loci* a evaluar, presentan limitaciones similares a las mencionadas para los morfológicos (Andersen y Lübberstedt, 2003).

Con el advenimiento de los marcadores moleculares de ADN estas limitaciones han sido resueltas. Estos marcadores derivan de pequeñas regiones de ADN que muestran polimorfismo de secuencia entre individuos dentro de una especie. Las diferentes metodologías de generación de marcadores moleculares como por ejemplo RFLP (polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción) (Botstein et al. 1980), RAPD (polimorfismos por la amplificación al azar del ADN) (Williams et al. 1990), AFLP (polimorfismos en el largo de los fragmentos de amplificación) (Vos et al. 1995), SSR (polimorfismos en la amplificación de secuencias repetidas) (Litt y Luty 1989) y otros, permiten la generación de miles de marcadores anónimos fenotípicamente neutros que han posibilitado la construcción de mapas de ligamiento de numerosas especies de plantas,

generando marcos genéticos para el estudio de caracteres simples y complejos. Asimismo, el desarrollo de mapas de ligamiento ha hecho posible la disección y etiquetado de caracteres de importancia económica en varios cultivos. La información que contienen estos mapas puede utilizarse para correlacionar marcadores moleculares con un fenotipo determinado en una población segregante, los que potencialmente luego podrían utilizarse para selección asistida en un programa de mejoramiento de la especie (Ribaut y Hoisington 1998). Hoy en día los marcadores genéticos se usan tanto en investigación básica como en mejoramiento vegetal, en la caracterización de germoplasma, aislamiento de genes, introgresión asistida de caracteres y protección de variedades.

Dentro de las gramíneas se han desarrollado mapas de ligamiento genético de arroz (Mc Couch et al. 1988, Causse et al. 1994, Kurata et al. 1994, <http://rgp.dna.affrc.go.jp>), maíz (Helentjaris et al. 1986, Burr et al. 1988, <http://www.maizegdb.org>), trigo (Devos et al. 1992, 1993, Van Deynze et al. 1995), cebada (Graner et al. 1994), avena (Rayapati et al. 1995), sorgo (Chittenden et al. 1994), caña de azúcar (da Silva et al. 1993, Garcia et al. 2006) y varias pasturas forrajeras como *Paspalum notatum* diploide (Ortiz et al. 2001), *Pennisetum glaucum* (Devos et al. 1995), *Setaria italica* (Wang et al. 1998a), *Cenchrus ciliaris* (Burrow et al. 2001), *Poa pratensis* (Poceddu et al. 2002), *Panicum maximum* (Ebina et al. 2005) y *Panicum virgatum* (Missaoui et al. 2005). Los primeros mapas que se construyeron fueron en base a marcadores de RFLP. Si bien el desarrollo de este tipo de marcadores requiere de materiales y metodologías más complejas que los marcadores basados en PCR (mayores cantidades de ADN, utilización de radioactivos, mantenimiento de los clones) y son los únicos que permiten realizar estudios de mapeo comparativo entre diferentes especies, inclusive las poco relacionadas (ver punto I.4.4). En cuanto a los marcadores de AFLP, son muy eficientes para el mapeo ya que se puede generar un alto número de marcadores en poco tiempo. Tienen la

ventaja de que no se necesita conocimiento previo de secuencia para su implementación, y con una sola reacción de amplificación se evalúan varias regiones genómicas simultáneamente y por lo tanto son más efectivos en la cobertura y representación del genoma. Se han desarrollado mapas en base a marcadores de AFLP de numerosas especies de gramíneas cultivadas incluyendo sorgo (Boivin et al. 1999), *Lolium perenne* (Bert et al. 1999), *Poa pratensis* (Porceddu et al. 2002), *Festuca pratensis* (Alm et al. 2003), *Panicum maximum* (Ebina et al. 2005) y *Festuca arundinacea* (Saha et al. 2005).

I.4.1- Bases teóricas para la construcción de mapas de ligamiento genético

Brevemente, los cromosomas eucariotas están constituidos por una única molécula de ADN cuyo largo es constante dentro de la especie y variable entre cromosomas. Normalmente contienen alrededor de 10^7 - 10^8 pares de bases y múltiples sitios de inicio de la replicación (Kearsey y Pooni 1996). Consecuentemente, los genes y los marcadores genéticos se localizan en una sola dimensión y en posiciones particulares a lo largo de la molécula. El mapeo genético consiste en determinar la posición relativa de un determinado número de *loci* a lo largo del cromosoma y de esa manera ordenarlos unos en relación a otros (Kearsey y Pooni 1996). El ordenamiento se basa en la estimación de la frecuencia de ocurrencia de recombinación e intercambio de material genético entre cromosomas homólogos durante la profase I de la meiosis, eventos evidenciados a través de la formación de quiasmas.

La presencia de un quiasma en un cromosoma en particular implica que ha ocurrido un intercambio de material genético entre cromosomas homólogos, haciendo que la mitad de las gametas de esa meiosis sean de tipo recombinante y la otra mitad de tipo parental para los *loci* involucrados. Se dice que un cromosoma que presenta un solo quiasma tiene en promedio una

longitud de 50 centiMorgans (cM), unidad de mapeo establecida en honor al genetista Thomas Hunt Morgan. En muchas especies se puede contar el número total de quiasmas en los núcleos (en células madre del microesporocito) y luego calcular el promedio de quiasmas por núcleo. Por extensión, un cromosoma con un promedio de 2,5 quiasmas por meiosis, se dice que tiene una longitud total de 125 cM (2,5 x 50 cM). En muchas especies, en base a observaciones durante la meiosis, se puede establecer el promedio de formación de quiasmas por cromosoma (c). Se desprende de esto que conociendo el número haploide de cromosomas (n), la distancia total del mapa de la especie puede calcularse como $c \times n \times 50$ cM. Esta regla es importante ya que provee al genetista una guía de la extensión total del mapa que debe ser cubierta (Kearsy y Pooni 1996).

Los mapas de ligamiento genético se construyen examinando las frecuencias recombinación de determinados *loci* en las progenes de un cruzamiento, que es consecuencia de la formación de quiasmas entre ellos, y estableciendo las posiciones relativas de los mismos en los cromosomas. Dos genes muy cercanos en el mismo cromosoma no segregarán independientemente durante la meiosis. Esta relación se denomina “ligamiento” y explica la aparición de combinaciones genéticas parentales en mayor frecuencia de lo esperado según la segunda Ley de Mendel o ley de la segregación independiente. Dos *loci* ligados pueden ser separados por un entrecruzamiento durante la meiosis. La recombinación entre ellos se identifica por la presencia de gametas que contienen los *loci* recombinados y esas gametas se reconocen por los fenotipos/genotipos de las progenes. La frecuencia de estas gametas es una estimación de la frecuencia de recombinación entre ambos *loci* (Suzuki et al. 1996, Kearsy y Pooni 1996).

Se define como unidad de mapeo (cM) a la distancia entre 2 *loci* (o marcadores) para los cuales se observa un recombinante cada cien productos de la meiosis (equivalente a una

frecuencia de recombinación $r = 1\%$). Cuanto más cercanos están dos *loci* en un mismo cromosoma, menor será la probabilidad de formación de quiasmas entre ellos y de que segreguen independientemente. Si dos *loci* están lo suficientemente cerca como para que sólo pueda formarse un quiasma entre ellos, la frecuencia de recombinación (r) será igual a la distancia en centiMorgans (cM). Cuando la distancia entre los marcadores es tal que se pueden formar dos o más quiasmas entre ellos, las distancias relativas se distorsionan y no puede emplearse directamente el porcentaje de recombinación para estimar posiciones relativas. Se puede demostrar que la frecuencia de recombinación en estos casos puede resultar también en promedio 50% (Russel 1996). Esto indica que si bien la distancia de mapeo aumenta linealmente con el número de quiasmas, la frecuencia de recombinación alcanza un máximo (50%) (Russell 1996). Para contemplar estos problemas, se diseñaron dos funciones de mapeo que corrigen los valores de recombinación observados por la probabilidad de que existan quiasmas múltiples, siendo las dos más comunes Haldane (1919) y Kosambi (1944). Haldane asume que la probabilidad de que se dé ninguno, uno o más quiasmas en un dado intervalo tiene una distribución de Poisson (los quiasmas son eventos independientes y al azar). Kosambi, por el contrario, considera un cierto grado de interdependencia para la formación de los mismos. Este último algoritmo tiene en cuenta el efecto de interferencia, que indica que un segundo quiasma no va a ocurrir por debajo de una distancia fija -15, 20 cM- hacia ambos lados del primero. Si bien ambas funciones permiten transformar los valores de la frecuencia de recombinación (r) a valores de distancia de mapeo en cM, por lo general, la mayoría de los mapas que se publican actualmente se basan en la función de Kosambi (1944). La transformación de los valores de r en R , hace que las distancias genéticas en unidades de mapeo sean magnitudes aditivas.

El desarrollo de un mapa de ligamiento genético de una especie en particular, requiere

la generación de una población segregante (población de mapeo). Varios factores deben tenerse en cuenta para la elección del tipo y tamaño de la población, siendo el más importante el objetivo del proyecto como por ejemplo: generar un mapa marco de la especie, identificar y orientar marcadores moleculares ligados a genes de interés para clonado posicional, identificar factores asociados a caracteres cuantitativos (QTLs), monitorear *loci* de resistencia a enfermedades para piramidarlos en un único fondo genético y otros. Establecido el objetivo, se debe realizar la elección de los progenitores para el cruzamiento, determinar con qué clase de población segregante trabajar y qué generaciones se utilizarán para los análisis fenotípicos y/o genotípicos (Young 1994).

Se requiere que entre los progenitores exista suficiente polimorfismo a nivel de secuencia de ADN como para facilitar la identificación de marcadores informativos (segregantes). Las especies de polinización cruzada en general presentan un alto nivel de polimorfismo y prácticamente cualquier cruzamiento de individuos no relacionados provee una cantidad suficiente de *loci* polimórficos para iniciar un proyecto de mapeo. Sin embargo, en las especies autóгамas el nivel de polimorfismo es relativamente bajo y usualmente deben seleccionarse progenitores poco relacionados e incluso recurrir a cruzamientos interespecíficos (Young 1994).

Una vez elegidos los progenitores, las poblaciones de mapeo más simples para monitorear las frecuencias de recombinación entre pares de marcadores son aquellas generaciones derivadas de una F_1 clásica ya que solo dos alelos están segregando por *locus* y la distribución de los mismos en los cromosomas parentales (fase de ligamiento) es conocida o puede determinarse con relativa facilidad. Las poblaciones más usadas son F_2 , retrocruzas (BC), líneas recombinantes endocriadas (RILs) y líneas doble haploides (DH), siendo las F_2 completamente clasificadas las más informativas (Kearsey y Pooni 1996). Las fórmulas

generales para calcular las frecuencias de recombinación en cada una de las poblaciones segregantes se describen en Allard (1960). Las F_2 y BC son las más fáciles de generar para la mayoría de las especies de plantas.

En las especies de polinización cruzada donde no se dispone de líneas homocigotas para la generación de híbridos F_1 , cualquier individuo puede considerarse un F_1 y su progenie obtenida por autofecundación, la F_2 . Alternativamente, el individuo puede cruzarse de manera controlada con otro y se obtendrá una población, con dos o más alelos (hasta cuatro en un diploide) segregando por *locus*. Este tipo de cruzamiento (llamado pseudo-retrocruza) puede representar una F_2 , un Bc_1 o ambos tipos de poblaciones simultáneamente. La distribución de los alelos en los genotipos parentales debe inferirse a partir de los datos de segregación de la progenie. Esta complejidad del análisis está compensada por la ventaja derivada del gran número de marcadores que segregan en estos cruzamientos (Kearsey y Pooni 1996).

La principal desventaja de las poblaciones F_2 , BC y pseudo-retrocruza es que son efímeras (a menos que se trate de especies perennes con reproducción vegetativa). Esta limitación puede parcialmente superarse por poda, cultivo de tejidos y agrupamiento de las F_3 (para cada F_2) para disponer de una mayor fuente de material vegetal para el aislamiento de ADN. Sin embargo, es prácticamente imposible medir caracteres en diferentes localidades, en diferentes momentos del año. La mejor solución a este tipo de problemas es la creación de líneas recombinantes endocriadas que proveen una fuente continua de material vegetal para el mapeo (Burr y Burr 1991). Las RILs se generan por descendencia de semilla única de las plantas F_2 , por al menos 5 o 6 generaciones. Cada línea así obtenida contiene una combinación diferente de las combinaciones meióticas de los progenitores originales. La totalidad de las líneas endocriadas recombinantes derivadas de una población F_2 original, proveen las bases para el análisis de ligamiento. Asimismo, debido a que durante la generación de las líneas

intervienen varias meiosis, aumenta la posibilidad de obtener recombinantes entre *loci* cercanos. Otro tipo de poblaciones inmortales lo constituyen las líneas doble haploides (DH). Las mismas se generan mediante el cultivo *in vitro* de anteras conteniendo granos de polen uninucleados para generar plantas (esporofitos) haploides. Posteriormente, en forma espontánea o por tratamientos químicos con colchicina se obtienen las líneas DH. Las DH son también apropiadas para el mapeo ya que poseen varias de las ventajas de las RILs. Sin embargo, no es posible obtener estos dos tipos de poblaciones en todas las especies (Young 1994).

La resolución de un mapa y la habilidad para determinar el orden de los marcadores en el mismo dependen entre otras cosas del tamaño de la población de mapeo: cuanto más grande es la población es posible obtener mayor resolución. Técnicamente el tamaño de una población está limitado por el número de semillas disponibles o por el número de muestras de ADN que razonablemente pueden procesarse (Young 1994).

I.4.2- Construcción de mapas de ligamiento con marcadores de ADN

La teoría en la que se basa el análisis de ligamiento con marcadores de ADN es idéntica a la del mapeo con marcadores genéticos clásicos, aunque la diferencia en el número de marcadores de ADN que se analizan genera una complejidad adicional. En la mayoría de los casos, la determinación del orden de marcadores ligados se basa en el método de máxima similitud, es decir, el orden de marcadores que abarca la menor distancia y requiere la menor cantidad de entrecruzamientos entre marcadores (Mather 1957). Actualmente, existen paquetes de programas de computación que permiten el análisis simultáneo de muchos marcadores en un gran número de individuos: identifican los grupos de cosegregación,

estiman las frecuencias de recombinación entre los marcadores ligados, asignan el mejor orden y estiman la distancia (cM) de los marcadores que componen un grupo. Entre ellos los más citados en la literatura son el: Mapmaker (Lander et al. 1987) y Joinmap (Stam 1993). Los cálculos probabilísticos que realizan tienen la misma lógica que las funciones de mapeo en pruebas de dos o tres puntos pero son más poderosos, porque al tratarse de una prueba multipunto, permiten minimizar los errores debidos a dobles entrecruzamientos e interferencias. Los algoritmos matemáticos para detectar ligamiento entre dos *loci* se basan en el "LOD score" (Mapmaker) o el método de los mínimos cuadrados (Joinmap). El LOD score se define como: el logaritmo en base diez del cociente entre la probabilidad de que dos *loci* estén ligados para un dado valor de recombinación, sobre la probabilidad de que ambos *loci* no estén ligados y hallan co-segregado por azar. Por ejemplo, un LOD score = 3.0 para un par de genes indica que es 1000 veces más probable que los genes estén ligados a que no lo estén (Lincoln et al. 1993).

Idealmente, en un individuo diploide el número de grupos de ligamiento en el mapa debería ser igual al número de cromosomas en las gametas (n), pero es posible que marcadores que corresponden al mismo cromosoma aparezcan en grupos separados por no haberse detectado *loci* intermedios. Esto es una indicación de que la cobertura del genoma aún no es completa. A medida que se incorporan más marcadores la distancia total va a igualar al valor predicho por la frecuencia de quiasmas. Asimismo, las distancias genéticas tienen errores estándar que dependen del tamaño y tipo de población utilizada. Un valor de frecuencia de recombinación p tiene un error estándar de $\sqrt{p(1-p)/N}$ donde N es el tamaño de la población (Kearsey y Pooni 1996).

Muchas veces resulta interesante describir las distancias entre marcadores en un mapa genético no sólo en unidades de mapeo (cM), sino por su distancia física real en pares de bases

(pb). Esto es necesario cuando se intenta el clonado posicional de una secuencia nucleotídica específica (gen). Es conocido que la distribución de los quiasmas no es uniforme a lo largo de los cromosomas y además varía entre especies, por lo tanto los mapas de ligamiento genético frecuentemente no se corresponden exactamente con los mapas físicos. En general, la recombinación está inhibida cerca de los centrómeros, telómeros, en las regiones heterocromáticas y regiones incorporadas de especies relacionadas. Esto tiene consecuencias que se reflejan en los mapas de ligamiento como condensación de marcadores en determinadas regiones (por ejemplo, centrómeros y telómeros) y marcadores separados por distancias apreciables (brazos cromosomales) aún luego de haber saturado el mapa con varios cientos de marcadores. A pesar de la distribución no homogénea de marcadores en términos de frecuencia de recombinación, es probable que la distancia física entre ellos sea mucho más uniforme (Young 1994).

Así, una vez obtenido un mapa de ligamiento es interesante compararlo con el cariotipo para asignar los grupos de ligamiento a cada cromosoma. El método más común para relacionar marcadores de ADN con cromosomas específicos es el uso de aneuploides (monosómicos y / o trisómicos) y líneas de sustitución (Young 1994). Asimismo, se pueden realizar estudios de mapeo físico de alta resolución por hibridación *in situ* de sondas fluorescentes (FISH) sobre complementos cromosómicos en diferentes estadios de la mitosis o de la meiosis (Akiyama et al. 2004 y 2005). La posición y distancia entre las sondas hibridadas puede compararse con las distancias genéticas que presentan los marcadores en el mapa de ligamiento. Otros métodos para relacionar mapas físicos y genéticos se basan en el desarrollo de mapas físicos a partir de clones de BACs (revisado en Zhang y Wing 1997). Entre ellos se puede mencionar al método de caracterización basado en la restricción ("*restriction-based fingerprinting method*"). En primer lugar se seleccionan al azar un número alto de clones de

BACs y se los digiere con enzimas de restricción. Los productos de la digestión, previamente marcados, se separan en geles de secuencia y los resultados se procesan con programas de computación específicos que realizan la reconstrucción de los mapas de restricción de cada clon de BAC simultáneamente y luego los agrupan en diferentes “contigs”. La hibridación de marcadores de interés sobre el ADN de los *contigs* permite correlacionar la posición de los mismos dentro de los BACs con la distancia genética que muestran en el mapa de ligamiento (Tao et al. 2001, Zhang y Wu 2001, Tao et al. 2002).

La unidad de mapa genético varía en número de nucleótidos según la especie, el cromosoma y la localización dentro del mismo cromosoma. Aproximadamente, 1 cM equivale a 1 Mpb (1 millón de pares de bases) en humanos y a 750 kpb en plantas superiores (Lincoln et al. 1993). Como se mencionó anteriormente, la forma clásica de estimar el largo de los genomas (G) se basa en los conteos de quiasmas por cromosoma durante la meiosis. No siempre la interpretación de estos estudios es sencilla por lo que se han diseñado metodologías alternativas para estimar el largo de los genomas a partir de los datos genéticos de mapas de ligamiento parciales o incompletos, por ejemplo el método de los momentos (Hulbert et al. 1988), el método de los momentos modificado por Chakravarti (Chakravarti et al. 1991) y el método de máxima similitud (Chakravarti et al. 1991).

1.4.3- Mapeo en poliploides

Los métodos estadísticos para la construcción de mapas de ligamiento genético fueron desarrollados en principio para especies diploides por lo que los mapas de especies como tomate, maíz y arroz fueron los primeros que se generaron. Sin embargo, la mayoría de las especies cultivadas de importancia agronómica son poliploides. La construcción de mapas de

ligamiento genético resulta complicada cuando se trata de especies poliploides (Ripol et al. 1999). En el caso del trigo y de la papa (ambos poliploides) se realizaron primero los mapas de las especies diploides relacionadas (Kam-Morgan y Gill 1989, Bonierbale et al. 1988). En las tritíceas, se mapearon una gran cantidad de sondas a nivel diploide y luego se infirieron sus posiciones relativas en el mapa del hexaploide (Sorrells 1992). Sin embargo, no existen especies diploides relacionadas para todos los poliploides.

El mapeo en poliploides es mucho más complicado por varias razones: a) hay un número mayor de genotipos segregantes, por ejemplo si se trata de un genotipo autotetraploide con cuatro alelos por locus que forma bivalentes durante la meiosis, cuando se lo hibrida con una sonda de simple copia se esperan 19 genotipos posibles segregando en la descendencia generada por autofecundación; b) puede ocurrir co-migración de fragmentos que tengan peso molecular similar y distinta secuencia; c) la constitución genómica (origen auto o alopoliploide) de muchas especies no es conocida, haciendo difícil determinar los patrones de herencia; d) es complicada la caracterización fenotípica debido a la presencia de fragmentos múltiples (Wu et al. 1992, Sorrells 1992).

Una estrategia para simplificar el mapeo en poliploides es analizar la segregación de marcadores (RFLP, AFLP, RAPD) por presencia / ausencia en la población. Un fragmento que está presente en dosis simple y que por lo tanto segrega en una relación 1:1 (presencia : ausencia) en las gametas de un individuo se denomina alelo en dosis simple (ADS). Un ADS en un autopoliploide es equivalente a un simplexo (Aaaa, en caso de tetraploidía) o a un *locus* heterocigota en uno de los juegos diploides en un alopoliploide. En ambos casos la relación de segregación del ADS en un cruzamiento Aaaa x aaaa, es 1:1 (Aaaa:aaaa) (Wu et al. 1992). De esta forma, es posible identificar exactamente el genotipo (para ese determinado *locus*) de cada progenie.

El primer paso para la construcción de un mapa genético usando este método es determinar la dosis de cada marcador basándose en la relación de segregación, por medio de una prueba de Chi cuadrado (χ^2). Posteriormente, los marcadores en dosis simple se ordenan formando grupos de ligamiento en fase de acoplamiento (grupos de co-segregación). Finalmente, se deben agrupar los grupos individuales en sus respectivos homólogos. Esto se puede realizar por diferentes métodos: mapeo de sondas de RFLP que reconocen múltiples ADS (da Silva et al. 1993), mapeo de alelos en doble dosis o superiores (Ripol et al. 1999) o el análisis de marcadores ligados en fase de repulsión (Qu y Hancock 2001).

Como se mencionó anteriormente (ítem I.1.3.1) las especies autoploides presentan herencia polisómica, es decir, los cromosomas homólogos dentro de un mismo grupo se aparean al azar durante la meiosis. Por otro lado, las especies aloploides presentan herencia disómica y por lo tanto la genética es similar a la de los diploides excepto por los múltiples genomas.

La estimación del ligamiento, en un poliploide (auto o aloploide) entre dos ADS en fase de acoplamiento es idéntica que para un diploide. En cambio, si los ADS están en fase de repulsión, la estimación del ligamiento será igual que para los diploides sólo si el poliploide muestra herencia disómica (aloploides). En caso de herencia polisómica (autoploides), los ligamientos en fase de repulsión son muy difíciles de detectar ya que la chance de apareamiento entre los cromosomas homólogos que llevan los *loci* ligados es $1/(h-1)$ (h = número de homólogos en el grupo), resultando en una menor probabilidad de que se produzca recombinación entre ellos (Wu et al. 1992). En aloploides la recombinación entre marcadores ligados en repulsión depende sólo del evento de entrecruzamiento, mientras que en los autoploides la recombinación observada (R) está compuesta por la recombinación debida a la segregación independiente (R_i) de los cromosomas que llevan los marcadores

ligados en fase de repulsión y al entrecruzamiento (R_c) [$R = R_i + R_c$] (Qu y Hancock 2001). El valor mínimo de R para un verdadero autopoliploide es R_i , [$R_i = (h-2)/2(h-1)$] y para todo par de marcadores ligados en repulsión R_i va a ser mayor que R_c [$R_c = r_2/(h-1)$, donde r_2 es la distancia genética entre los marcadores ligados $r_2 = (h-1) R - R_i$]. R_i es un valor fijo que depende del nivel de ploidía, [para un autotetraploide $R_i = 0,333$ (Wu et al. 1992)], mientras que R_c es un parámetro variable que depende de la distancia genética. Además, a medida que aumenta el nivel de ploidía la máxima fracción de recombinación detectable para alelos en repulsión decrece ya que se incrementa la frecuencia esperada de R_i (Wu et al. 1992, Sorrells 1992).

Debido a esta gran diferencia en la capacidad de detección de ligamientos en fase de repulsión entre alo y autopoliploides, se espera una relación entre el número de ligamientos en repulsión vs. acoplamiento de 1:1 o 0-0,25:1 en caso de herencia de tipo disómica o polisómica, respectivamente (Wu et al. 1992, Qu y Hancock 2001). Por esto, los valores de recombinación (R) en un autopoliploide pueden utilizarse como indicadores de la presencia de apareamiento preferencial entre cromosomas homólogos dentro de cada grupo (Qu y Hancock 2001). Si para un par de genes ligados en fase de repulsión de un autopoliploide $R < R_i$ ($r_2 < 0$), significa que ambos cromosomas se aparean más frecuentemente el uno con el otro, que con el resto de los cromosomas del grupo homólogo (para más detalles ver Materiales y Métodos).

El método de mapeo basado en marcadores ADS ha sido utilizado para la construcción de los mapas de ligamiento de caña de azúcar (da Silva et al. 1993, Garcia et al. 2006), *Prunus serasus* (Wang et al. 1998b), papa (Li et al. 1998), alfalfa (Brower y Osborn 1999), rosa (Rajapakse et al. 2001), frutilla (Lerceteau-Köler et al. 2003), *Panicum maximum* (Ebina et al. 2005) y *Panicum virgatum* (Missaoui et al. 2005).

I.4.4- Mapeo comparativo

La familia botánica de las gramíneas (Poaceae) comprende más de 10.000 especies que parecen haberse originado unos 66 millones de años en el período Cretáceo tardío. A pesar de la amplia diversidad generada por modificaciones evolutivas que permitieron la radiación de las especies en el planeta, existe una consistencia sorprendente en la arquitectura corporal de las plantas que componen esta familia. Así, las similitudes genéticas subyacentes documentadas por Vavilov (1940) van encontrando explicación a medida que aumenta el volumen de información molecular disponible (Van Deynze et al. 1998).

El mapeo comparativo estudia el alineamiento de los mapas genéticos de especies que poseen marcadores en común. Los mapas comparativos proveen información de la evolución cromosómica y permiten identificar en las distintas especies fenotipos equivalentes controlados por genes ortólogos (*loci* génicos conservados que surgen de un ancestro común y que han evolucionado en especies diferentes). Durante los últimos 15 años los estudios de mapeo comparativo en gramíneas han demostrado que el contenido y orden génico están altamente conservados en la familia (Ahn et al. 1993, Moore et al. 1993, Devos y Gale 1997). Estos análisis revelaron que los cromosomas de este grupo de especies pueden describirse sobre la base de 19 segmentos cromosómicos del genoma de arroz (Moore et al. 1995a y 1995b) y que los genomas de varias especies de gramíneas puede reconstruirse en base a duplicaciones y reordenamientos de estos bloques génicos (como si fuesen bloques de "lego"). Esta característica hace que, al menos en teoría, sea posible identificar genes en especies de genoma grande y complejo a partir de la información generada en especies de genoma más pequeño y mejor caracterizado (ej. arroz) teniendo en cuenta las relaciones de sintenia entre las mismas (Moore 1995, Moore et al. 1995a).

El uso de marcadores moleculares de RFLP ha sido la herramienta fundamental para desarrollar los mapas comparativos de arroz, maíz, las Triticáceas, sorgo, avena, caña de azúcar y varias pasturas forrajeras. Una ventaja de estos marcadores es que son co-dominantes (se observan todos los alelos involucrados en el heterocigota), son multialélicos y en consecuencia, poseen un alto índice de información genética. Los estudios comparativos se vieron favorecidos por los esfuerzos combinados para desarrollar sondas de RFLP "ancladas" de trigo, cebada, avena, maíz y arroz que generaran buenas señales de hibridación en la varias especies de gramíneas. Las sondas consisten en clones de ADNc que fueron seleccionados a partir de genotecas de varias especies. Deben ser de bajo número de copia en arroz y sus posiciones genómicas deben estar establecidas en arroz y maíz o trigo. Se seleccionó una cantidad de sondas tales que el genoma de arroz se encuentre uniformemente cubierto (Van Deynze et al. 1998). Muchas sondas de RFLP que se encuentran mapeadas en posiciones ortólogas corresponden a marcadores anónimos (aunque en especies como arroz y maíz actualmente se conoce la identidad de cada uno de los clones mapeados: <http://www.rgp.or> - http://www.maizegdb.org/mnl/70/probe_bank.html). Se ha detectado ortología entre especies usando sondas correspondientes a genes mayores, por ejemplo el gen de la enzima ramificante III del almidón (Harrington et al. 1997) y el gen de resistencia a roya (Asnaghi et al. 2000). Asimismo, cuando se analizaron QTLs que gobiernan caracteres importantes por ejemplo: vernalización, floración, altura de la planta, enanismo y dehiscencia se observó ortología entre arroz, maíz y trigo (revisado por Devos y Gale 1997).

El desarrollo de genotecas en YAC y BAC principalmente de diferentes gramíneas ha permitido el aislamiento y secuenciación de fragmentos largos de ADN (100 - 500 kb). Esto permite estudiar tanto la conservación del orden génico o microcolinealidad, a nivel de sub-megabase, como también la organización de los genes en genomas de diferente tamaño.

Estudios recientes indican que la microcolinealidad de genes está menos conservada entre especies debido a rearrreglos y deleciones de baja escala. Las inversiones, translocaciones e inserciones detectadas en la organización de los cromosomas de las distintas especies en algunos casos son indicativos de los mecanismos evolutivos involucrados en la especiación en gramíneas. Consecuentemente, no está muy claro aún si la técnica de aislar genes de especies con un genoma grande (trigo, maíz) a partir de uno pequeño usado como modelo (arroz) es lo suficientemente robusta en todos los casos como para justificar el inicio de estrategias de clonado posicional a partir de la información que generan. Es muy posible que el grado de colinealidad entre los genomas dependa en gran medida de la región analizada (Devos et al. 2000, Keller y Feuillet 2000, Bennetzen y Ramakrishna 2002, Feuillet y Keller 2002).

Respecto al mapeo comparativo específico de las especies apomícticas, los estudios de sintenia demostraron que la región determinante de la aposporia muestra homología en *Cenchrus ciliaris* con una región del grupo de ligamiento D de sorgo (Burrow et al. 2001), en *Brachiaria sp.* con el brazo corto del cromosoma 5 de maíz y 2 de arroz (Pessino et al. 1997 y 1998) y en *Paspalum simplex* con la región telomérica de los brazos largos de los cromosomas 2 y 12 de arroz (Pupilli et al. 2001 y 2004). Asimismo, por mapeo comparativo usando marcadores de RFLP se determinó la conservación de la región determinante de la aposporia en tres especies apomícticas de *Paspalum* (*P. simplex*, *P. notatum* y *P. malacophyllum*) (Pupilli et al. 2004). Un mapa genético completo a nivel diploide (citotipos sexuales), que comprende los 10 grupos de ligamientos básicos de *Paspalum notatum* ha sido generado con marcadores de RAPD, RFLP y AFLP (Ortiz et al. 2001). Asimismo, en *Cenchrus ciliaris* tetraploide apospórico se desarrolló un mapa genético preliminar basado en marcadores de RFLP (utilizando sondas homólogas y heterólogas) (Burrow et al 2001). Recientemente se ha desarrollado un mapa de *Panicum maximum* tetraploide apospórico en

base a marcadores de RAPD y AFLP (Ebina et al. 2005). Por lo tanto, hasta el momento el único antecedente de mapas de ligamiento genético de especies apomícticas que permitan realizar estudios comparativos es el de *Cenchrus ciliaris*.

II- OBJETIVOS

II.1- Objetivo general

El objetivo general del presente trabajo de Tesis fue la caracterización del genoma de *Paspalum notatum* en base a la construcción de un mapa de ligamiento genético a nivel tetraploide para la realización de estudios de localización y herencia de genes relacionados con la apomixis en la especie.

II.2- Objetivos específicos

- 1) Generar un número suficiente de marcadores de AFLP para cubrir en forma completa el genoma de *Paspalum*.
- 2) Determinar el tipo de herencia (disómica/tetrasómica) presente en las razas tetraploides de *P. notatum*, especialmente para el sector genómico que incluye al *locus* responsable de la aposporia.
- 3) Construir el mapa de ligamiento genético de razas tetraploides de *Paspalum notatum*.

- 4) Localizar el grupo de ligamiento que contiene el *locus* determinante de la aposporía en la especie.
- 5) Localizar en el mapa genético marcadores de RFLP heterólogos ligados a la aposporía para realizar análisis comparativos de la región.
- 6) Localizar en el mapa genético transcritos de ARNm que se expresan específicamente durante el desarrollo apomítico.
- 7) Localizar un grupo de marcadores de RFLP, elegidos sistemáticamente sobre todo el genoma, para comparar su estructura con la observada en el nivel diploide y en otras especies de gramíneas.

III- MATERIALES Y METODOS

III.1- Material vegetal

El material vegetal utilizado corresponde a una población F_1 de *Paspalum notatum* tetraploide ($2n=4x=40$) segregante por el modo de reproducción, desarrollada por el Ing Camilo L. Quarín y colaboradores en el Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE) - Facultad de Ciencias Agrarias, UNNE, Corrientes, Argentina. Como progenitor femenino se utilizó una planta experimental tetraploide sexual (Q4188) y como planta dadora de polen un genotipo apomítico obligado (Q4117) colectado de una población natural del estado de Rio Grande do Sul, Brasil. La planta Q4188 se originó a partir de un cruzamiento entre las plantas Q3664 x Q3853 (Quarín et al. 2003). Q3664 es un tetraploide experimental generado en Tifton (Georgia, EEUU) por cruzamientos controlados entre un tetraploide sexual inducido por colchicina a partir de *P. notatum* var *saurae* ($2x$) y un tetraploide apomítico de estigmas blancos. Q3664 tiene estigmas blancos y es apomítico facultativo (produce 70% de sacos embrionarios meióticos y 15% de sacos apospóricos) (Quarín et al. 1984; Ortiz et al. 1997). La accesión Q3853 es un tetraploide apomítico nativo del sur de Brasil. El modo de reproducción de Q4188 fue estudiado por métodos citoembriológicos y moleculares, determinándose que sólo produce sacos embrionarios de tipo meióticos y progenies de origen

sexual (Quarin et al. 1984; Ortiz et al. 1997). Asimismo, el genotipo Q4117 fue clasificado como apomítico obligado debido a que genera sólo sacos embrionarios de tipo apospórico y progenies de tipo materno (Martínez et al. 2001; Ortiz et al. 1997).

Los cruzamientos entre Q4188 x Q4117 se realizaron entre los meses de noviembre y diciembre de 2001, previa emasculación de las flores del progenitor femenino empleando una cámara húmeda artificial según lo descrito por Burton (1948b). Las progenies F₁ fueron germinadas en placas de Petri con arena luego de pasar por un tratamiento térmico de 40° C durante 12 hs. Las plántulas obtenidas fueron transferidas a macetas con una mezcla de arena y tierra y posteriormente establecidas en parcelas experimentales de la cátedra de Genética y Fitotecnia de la FCA-UNNE. Los clones obtenidos de rizomas de los genotipos progenitores se encuentran además cultivados en macetas bajo condiciones de invernadero.

Los individuos F₁ fueron clasificados de acuerdo a su modo de reproducción en apomíticos (generan sacos embrionarios de tipo apospórico) o sexuales (producen exclusivamente sacos embrionarios meióticos) usando los marcadores moleculares de RAPD UBC243-377 y UBC259-1157, previamente detectados como completamente ligados al carácter aposporía en una población derivada de los mismos genotipos parentales (Martínez et al. 2003) así como también por análisis citoembriológicos al momento de la antesis (ver ítem siguiente).

III.2- Observaciones citoembriológicas

Para clasificar los individuos de la población F₁ de acuerdo a su modo de reproducción se realizaron observaciones de los sacos embrionarios al momento de la antesis. En las

mismas se empleó la técnica de clarificado de ovarios y observación de los sacos embrionarios por microscopía de contraste de interferencia diferencial (Herr 1971). Se cosecharon inflorescencias en anthesis de cada planta, se las fijó en FAA (etanol 70%, formaldehído y ácido acético glacial, en relación 18:1:1) por 24 horas y se las conservó en etanol 70% a 4° C hasta su estudio. De cada racimo se separaron aproximadamente 20 espiguillas bajo la lupa y se realizó la disección de los ovarios que fueron incubados en ácido láctico puro durante 24 horas y transferidos por otras 24 horas a solución clarificadora (ácido láctico, hidrato de cloral, fenol, aceite de clavo y xilol, en relación 2:2:2:2:1). Se analizó un promedio de 20 ovarios por planta y se evaluó la presencia de (a) sacos embrionarios meióticos (SEM): formados a partir de la división reduccional de la célula arqueosporial y caracterizados por la presencia de un aparato oosférico en el extremo micropilar (una ovocélula, dos sinérgidas), una célula central con dos núcleos polares y varias antípodas en el extremo chalazal del óvulo, (b) sacos embrionarios apospóricos (SEA): originados a partir de células nucelares no reducidas y caracterizados por poseer en un extremo una ovocélula, dos sinérgidas, una célula central muy vacuolizada, con dos núcleos polares y ausencia de antípodas, (c) sacos embrionarios mixtos (SEMX): óvulos conteniendo sacos meióticos y apospóricos, (d) sacos embrionarios inmaduros (SEI): sacos en formación (meióticos o apospóricos) que no han completado su desarrollo normal al momento de la observación, (e) sacos embrionarios ausentes (SEa): no se observa saco embrionario desarrollado o en formación.

III.3- Análisis citogenético

Se recolectaron inflorescencias inmaduras (espiguillas blanquecinas dentro del tallo principal) de los progenitores sexual Q4188 y apomítico Q4117 y se fijaron por 24 horas en una solución de etanol absoluto:ácido láctico (5:1) para estudiar el comportamiento de los cromosomas durante la meiosis. Luego se transfirieron a una solución de etanol 70% y se conservaron a 4 °C. Bajo la lupa se separaron las espiguillas del raquis y se disectaron las anteras. Las células madre del polen fueron analizadas en preparados obtenidos por aplastamiento y tinción con Carmin acético (Carmin 10 mg/ml, ácido acético 45%) y hechos permanentes con Terpentina de Venecia de acuerdo a lo descripto por Quarin et al. (1984).

III.4- Estudios de viabilidad de granos de polen

Se cosecharon inflorescencias en estado de antesis de cada progenitor (Q4188 y Q4117), se las fijó en FAA (etanol 70%, formaldehído y ácido acético glacial, en relación 18:1:1) por 24 horas y se los transfirió a etanol 70% para su conservación a 4 °C. Se analizaron 10 flores de cada genotipo. Bajo la lupa se disectaron las tres anteras de cada flor sobre un portaobjeto y se las coloreó con una gota del reactivo de Alexander (Alexander 1980), donde se las disgregó a fin de liberar los granos de polen. El colorante tiñe de manera diferencial los granos de polen viables (rojos) y los no viables (translúcidos y verdes). Los datos de viabilidad de polen obtenidos para cada genotipo fueron evaluados estadísticamente haciendo una prueba de comparación de medias utilizando el programa Statgraphic 5.0.

III.5- Extracción de ADN

La extracción del ADN genómico de las plantas experimentales se realizó según la técnica descrita por Shagai-Maroo et al. (1984) con la siguiente modificación: se congelaron en N₂ líquido aproximadamente 6 grs de tejido fresco de hoja, disgregándose los luego mecánicamente en mortero hasta obtener un polvo fino. Cada muestra fue transferida a un tubo de polipropileno de 50 ml conteniendo 20 ml de buffer de extracción (Tris-HCl 100 mM pH 7,5; NaCl 700 mM; EDTA 50 mM pH 8,0; CTAB 2% p/v y 2- mercapto etanol 140 mM) e incubada a 65 °C durante una hora con agitación. Se agregaron 10 ml de cloroformo, se mezcló durante 10 min, se centrifugó a 5000 g por 10 min y se recuperó la fase acuosa. Luego de una segunda purificación con cloroformo, se agregó un volumen de isopropanol frío a la fase acuosa obtenida (para precipitar el ADN) y se incubó a -20 °C por 16 h. El ovillo de ADN precipitado en solución fue recogido con una varilla de vidrio, lavado 20 min en una solución de etanol 76 %, acetato de sodio 0,2 M , secado al aire y resuspendido en 700 µl de buffer TE (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1mM; pH 8,0). Cada muestra fue incubada con 5 µl ARNasa (10 mg/ml) a 37 °C durante 1 hora y posteriormente re-precipitada con 5% v/v de NaCl 5M y un volumen de isopropanol. Finalmente, se centrifugó a 10.000 g por 20 min, se lavó el precipitado con etanol 70%, se secó y disolvió en 500 µl de agua destilada estéril. Las muestras de ADN se cuantificaron por espectrofotometría a 260 nm y se estimó la pureza de la extracción empleando el índice de la relación de absorbancias a 260 nm/280 nm. La integridad de las muestras se determinó por electroforesis en geles de agarosa al 0,8% (Sambrook et al. 1989).

III.6- Generación de marcadores moleculares

III.6.1- Polimorfismos por amplificación al azar del ADN (RADP)

Las reacciones de amplificación para obtener los marcadores de RAPD (Williams et al. 1990) se realizaron según lo descrito por Martínez et al. (2003) en un volumen final de 25 μ l conteniendo 20 ng de ADN, 30 ng de cebador, buffer de PCR 1X (Promega), $MgCl_2$ 1,5 mM, dNTPs 100 μ M y Taq polimerasa 1U (Promega), en al menos dos experimentos independientes. Las condiciones de reacción consistieron en una etapa inicial de desnaturalización de 1 min a 93 °C seguida de 45 ciclos de 1 min a 93° C, 1 min a 36 °C, 2 min a 72 °C y 5 min finales de elongación a 72 °C. Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador MJ Research, Inc. PTC-100 Programmable Thermal Controller. Los productos de PCR 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 2 % p/v en TAE 1X. Luego de 4 horas de electroforesis a 40 V, los geles se tñieron con solución de bromuro de etidio (10 μ g/ml) y se visualizaron usando un transiluminador UV. Los resultados fueron documentados con un sistema de fotografía digital Kodak C290.

III.6.2- Polimorfismo en el largo los fragmentos de amplificación (AFLP)

Los marcadores de AFLP se generaron según la técnica descrita por Vos et al. (1995) con la siguiente modificación: se digirieron 600 ng de ADN genómico de cada individuo con 5 U de *MseI* y *EcoRI* en un volumen final de 40 μ l conteniendo buffer OPA 1X (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, acetato de magnesio 10 mM, acetato de potasio 50 mM), DTT 5mM y BSA 50

ng/ μ l, a 37 °C durante 2 horas. Luego de la digestión se agregaron a cada tubo 10 μ l de una mezcla conteniendo: 5 pmoles de adaptador *EcoRI*, 50 pmoles de adaptador *MseI* (Key Gene), 1U de ADN ligasa T4 (promega), ATP 1 mM, OPA 1X, DTT 5 mM y albúmina sérica bovina (BSA) 50 ng/ μ l. La ligación de los adaptadores se realizó a 37° C por 3 horas. La pre-amplificación de las muestras se realizó en un volumen final de 25 μ l conteniendo 2 μ l de la mezcla de ligación, 1,2 ng/ μ l de cada cebador conteniendo una base selectiva en el extremo 3' (*EcoRI*+A y *MseI*+A), (Key Gene), dNTPs 0,2 mM, Taq polimerasa 1U (Promega), MgCl₂ 1,5 mM y buffer de PCR 1X (Promega). Las reacciones de amplificación incluyeron una etapa de desnaturalización inicial de 30 s a 94 °C seguida de 20 ciclos de 30 s a 94° C, 30 s a 60 °C, 1 min a 72 °C y 5 min finales de elongación a 72 °C. Los productos de PCR se diluyeron 1/10 en una solución compuesta por Tris-HCl 10 mM pH 8,0 y EDTA 0,1 mM [solución de trabajo de ADN pre-amplificado (pre-AFLP WS)]. Las amplificaciones selectivas se realizaron utilizando 47 combinaciones de cebadores *EcoRI* – *MseI*, en un volumen final de 10 μ l conteniendo 2 μ l de pre-AFLP WS, 1,2 ng/ μ l de cada cebador *EcoRI* +3 y *MseI* +3 (tomados de la serie KeyGene, AFLP Protocol for Public Release, Version 2.0, Netherlands, 1994), dNTPS 0,2 mM, Taq polimerasa 0,5U (Promega), MgCl₂ 1,5 mM y buffer de PCR 1X (Promega). Las condiciones de amplificación incluyeron una desnaturalización inicial de 30 s a 94 °C, un ciclo de 30 s a 94° C, 30 s a 65 °C, 1 min a 72 °C, seguido de 12 ciclos iguales donde la temperatura de anillado fue disminuyendo 0,7 °C por ciclo hasta llegar a 56 °C y 22 ciclos finales de 30 s a 94° C, 30 s a 56 °C, 1 min a 72 °C con una elongación de 5 min a 72 °C. 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), denaturalizados a 96 °C por 5 min y sembrados en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 5%



576.3 Ste
7326 ej 1
20.10.10

(acriamida:bisacrilamida (19:1) 5%, TBE 0,5X, urea 7,5 M). La electroforesis se realizó empleando un equipo de secuenciación Gibco-BRL modelo S2, USA a 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. 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 glaciar 10% v/v), seguido de 3 lavados en H₂O de 2 min cada uno e incubación en solución de tinción (AgNO₃ 1 g/l, formaldehído 0,1% v/v) por 30 min. Luego se lavó por 10 s en H₂O y se reveló con solución desarrolladora (carbonato de sodio 30 g/l, formaldehído 0,1% v/v, tiosulfato de sodio 2 mg/l) preenfriada, deteniéndose la reacción con agregado de la solución fijadora. Los geles se lavaron exhaustivamente con agua y se tomaron los datos directamente sobre el vidrio luego del secado en estufa a 37 °C por al menos 2 hs. Los marcadores de AFLP fueron nombrados con la sigla "exmx", siendo ex y mx los cebadores correspondientes a los extremos *EcoRI* y *MseI* utilizados para las diferentes amplificaciones y una letra final que corresponde a la posición relativa en el gel comenzando por las más cercanas al sitio de siembra.

III.6.3- Polimorfismos en el largo de los fragmentos de restricción (RFLP)

Los marcadores de RFLP se generaron de acuerdo a lo descrito por Ortiz et al. 1997, con algunas modificaciones: 30 µg de ADN genómico de cada muestra fueron digeridos con 2,5 U/µg de ADN con las enzimas *EcoRI*, *HindIII* o *PstI* (Promega). Las muestras fueron sembradas en geles de agarosa al 0,8% y resueltas a 80 mA por 6 h. Luego de la electroforesis, los geles se incubaron 30 min en una solución conteniendo NaOH 0,4 N y NaCl 0,6 M a fin de

desnaturalizar el ADN, seguido de 30 min en solución de neutralización (Tris-HCl 0,5 M pH 7,5; NaCl 1,5 M). La transferencia a filtros de nylon (Hybond N, Amersham) se realizó por capilaridad empleando una solución de SSC 10X (Sambrook et al. 1989) y el ADN fue fijado a los mismos por exposición a luz UV por 3 minutos e incubación a 80°C por 2h.

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

i) Selección de clones: Se utilizaron sondas (a) homólogas de *P. notatum* (clones de cDNA correspondientes a transcritos de ARNm obtenidos por experimentos de representación diferencial entre ovarios de flores apospóricas y no apospóricas al momento de la antesis) (Pessino et al. 2001 y otros no publicados) y (b) heterólogas de maíz (serie de la Universidad de Missouri-Columbia, USA), arroz (serie rz, del conjunto anclado de la Universidad de Cornell, USA y clones del New Landmarker Set del Rice Genome Research Program, Japón) y *Brachiaria* (clones correspondientes a transcritos de ARNm obtenidos por exposición diferencial de ovarios de un genotipo 2x sexual y un 4x apomíctico de *B. brizantha*) (Rodrigues et al. 2003). La marcación de las sondas se realizó por PCR en un volumen final de 100 µl conteniendo dig-dUTP 2,5 µM (5%), [dATP, dGTP, dCTP] 50 µM, dTTP 47,5 µM, los

cebadores superior e inferior del M13, 0,2 μ M de cada uno, Taq polimerasa 1U (Promega), $MgCl_2$ 2 mM, buffer de PCR 1X (Promega), glicerol 15% y 10 ng de ADN plasmídico. La incorporación del nucleótido marcado se verificó por electroforesis en geles de agarosa al 1,5% de una alícuota de los productos de amplificación. Los ADN marcados muestran un retraso en la movilidad electroforética con respecto a los mismos fragmentos amplificados sin marcar. La concentración de las sondas se estimó por comparación de la intensidad de las bandas con un marcador de concentración conocida incluido en el gel de acuerdo a lo descrito en Sambrook et al. (1989).

ii) Condiciones de hibridación: Las sondas se diluyeron en solución de hibridación (SSC 5X, SDS 0,02%, S-lauril sarcosina 0,1%, reactivo de bloqueo 0,5%, pH 7,5) hasta una concentración de 50 ng/ml. Los filtros se pre-hibridaron 2 horas y las hibridaciones se realizaron a 65°C (sondas homólogas) o a 60°C (sondas heterólogas) durante 18 h. Los filtros se lavaron dos veces durante 5 min en SSC 2X; SDS 0,1% a temperatura ambiente y dos veces 15 min en SSC 0,25X; SDS 0,1% a 60 °C - 65 °C con fuerte agitación. Junto con los filtros experimentales se hibridaron controles en forma de puntos o gotas conteniendo 1, 5, 50 y 100 pg del fragmento de ADN correspondiente a la sonda previamente desnaturalizado para determinar la sensibilidad del experimento (control de hibridación).

iii) Detección de los fragmentos hibridados por el método no radioactivo: la detección del ADN hibridado se realizó a temperatura ambiente, con agitación e incluyó: un lavado de 5 min en solución de lavado (ácido maleico 0,1 M, NaCl 0,15 M, Tween 20, pH 7,5), 30 min en solución de bloqueo (ácido maleico 0,1 M, NaCl 0,15 M, reactivo de bloqueo 1% p/v, pH 7,5), 30 min en solución de anticuerpo anti-Dig conjugado (anticuerpo diluido 1:10.000 en solución de bloqueo), dos lavados de 15 min cada uno en solución de lavado y 10 min en solución de detección (Tris-HCl 0,1 M pH 9,5, NaCl 0,1 M, $MgCl_2$ 0,05 M). La incubación de los filtros

con el sustrato quimioluminiscente (CSPD) se realizó por 5 min, en oscuridad y con agitación. Las membranas se envolvieron con nylon transparente y previo a exponerlas a la placas radiográficas se las incubó 10 min a 37 °C, temperatura óptima de la fosfatasa alcalina, para aumentar la eficiencia de la reacción. Los filtros se expusieron a placas radiográficas X-Omat (Kodak) por 2-24 h y fueron revelados en un cuarto oscuro con soluciones comerciales de revelador y fijador hasta la aparición de bandas. La observación y el análisis de los marcadores de RFLP se realizaron mediante la exposición de las placas a un transiluminador de luz blanca. Junto a los filtros experimentales se procesaron controles de hibridación y de detección (conteniendo 0,5, 5, 10 y 20 pg de la sonda utilizada en cada caso).

Las membranas se re-utilizaron entre 2 y 3 veces. Las sondas fueron eliminadas del filtro mediante dos lavados de 7 min a 37 °C en NaOH 0,2 M, SDS 0,1% seguidos de un lavado final en SSC 2X, luego de lo cual fueron conservadas en buffer TE a 4° C hasta la próxima hibridación.

La selección de los clones informativos (aquellos que revelaron polimorfismos entre los progenitores) se realizó en filtros de aproximadamente 6 x 10 cm conteniendo el ADN de los genotipos parentales digerido con *EcoRI*, *HindIII* y *PstI*. Los clones que revelaron bandas diferenciales entre los progenitores con al menos una de las enzimas, fueron utilizados en los experimentos de mapeo. Los filtros de mapeo conteniendo ADN de los progenitores y de 80 individuos de la población (digeridos todos con la misma enzima de restricción, (*EcoRI*, *HindIII* o *PstI*) se prepararon y procesaron según lo descripto anteriormente.

III.7- Clasificación de los marcadores moleculares en la población de mapeo

Debido a que la población de mapeo fue generada a partir del cruzamiento de dos genotipos parentales altamente heterocigotas, los marcadores moleculares derivados de la meiosis materna y paterna fueron analizados por separado. Se confeccionaron dos archivos de datos conteniendo los resultados de segregación de los marcadores en la población de mapeo. Un archivo contenía exclusivamente los datos de segregación del progenitor femenino (maternos) y otro los del progenitor masculino (paternos). Aquellos marcadores segregantes presentes en ambos progenitores se consideraron como puentes alélicos (Ritter et al. 1990) y fueron incluidos en un primer momento en un archivo independiente. Los valores de segregación de cada marcador que mostró polimorfismo entre los progenitores fue examinado mediante una prueba de χ^2 (a un $p > 0,01$) confrontando los valores observados contra los valores esperados de las distintas combinaciones alélicas posibles para cada uno de los progenitores o ambos en caso de herencia polisómica o disómica (Tabla 1). Los alelos en dosis simple (ADS, Aaaa) son aquellos marcadores presentes en uno de los genotipos parentales y ausentes en el otro que segregan en una relación 1:1 en la población, cualquiera sea el nivel de ploidía y el tipo de herencia del organismo (Wu et al. 1992). En un tetraploide (como es el caso de *P. notatum*) los únicos marcadores en dosis múltiple presentes en uno de los genotipos parentales que segregarán en la población son los alelos en dosis doble (ADD, AAaa) ya que los marcadores que tengan las otras dos configuraciones posibles (AAAa y AAAA) estarán presentes en todos los individuos F_1 . La relación de segregación cromosómica de un ADD será 5:1 en caso de autotetraploidía y 3:1 o 1:0 en caso de alotetraploidía (Lacadena 1988, ver más adelante). Asimismo, se evaluó la presencia de marcadores con segregación distorsionada, cuyos valores de presencia/ausencia no se ajustaron a ninguna de

las hipótesis esperadas ($\chi^2 > 7$; $p < 0,01$). Finalmente, también se determinó la presencia de marcadores segregantes desde ambos genotipos. Las relaciones de segregación esperadas para estos marcadores se muestra en la Tabla 1. Se denominaron como marcadores de tipo puente alélico a aquellos que se encuentran en dosis simple en los dos genotipos parentales y cuya segregación esperada es 3:1 para ambos tipos de herencia (Ritter et al. 1990).

Tabla 1: Segregaciones esperadas de marcadores maternos o paternos (ADS y ADD) y marcadores comunes (presentes en ambos genotipos parentales) en la población de mapeo tanto para auto como para alotetraploidía (herencia tetrasómica y disómica, respectivamente).

Tipo de marcador	Configuración parental	Tipo de herencia	Relación de segregación (presencia:ausencia)		
Materno (1/0) ^a o Paterno (0/1) ^b	ADS ^d	Aaaa x aaaa	Tetrasómica Disómica	1:1 1:1	
	ADD ^e	AAaa x aaaa	Tetrasómica Disómica	5:1 3:1 o 1:0 ^h	
		ADT ^f / ADC ^g	AAAa x aaaa / AAAA x aaaa	Tetrasómica Disómica	1:0 1:0
	Materno/Paterno (1/1) ^c	Puente alélico	Aaaa x Aaaa	Tetrasómica Disómica	3:1 3:1
			AAaa x Aaaa	Tetrasómica Disómica	11:1 7:1 o 1:0 ^h
AAaa x AAaa			Tetrasómica Disómica	35:1 15:1 o 1:0 ^h	

a: marcadores presentes en el genotipo materno y ausentes en el paterno

b: marcadores presentes en el genotipo paterno y ausentes en el materno

c: marcadores presentes en ambos genotipos

d: alelos en dosis simple

e: alelos en dosis doble

f: alelos en dosis triple

g: alelos en dosis cuádruple

h: relaciones de segregación esperadas según que los alelos estén en cromosomas homeólogos u homólogos.

III.8- Análisis de segregación y determinación del tipo de herencia (disómica/polisómica)

Los datos de segregación de los marcadores de cada genotipo parental fueron analizados independientemente y sólo se consideraron aquellos marcadores presentes en un progenitor y ausentes en el otro y viceversa. El tipo de herencia (disómica o polisómica) de la especie se estudió mediante los siguientes análisis genéticos:

a) estudios de segregación de marcadores en dosis doble (ADD). Estos marcadores (AAaa) segregarán en una relación 5:1 en caso de herencia polisómica y no segregarán o mostrarán una relación de 3:1 en el caso de herencia disómica, dependiendo si los fragmentos amplificados están en cromosomas homólogos u homeólogos, respectivamente (Wu et al. 1992).

b) determinación de la proporción del número de ligamientos en fase de repulsión vs. acoplamiento en base a marcadores en dosis simples (ADS). Se espera una relación entre el número de ligamientos en repulsión vs. acoplamiento de 1:1 o 0-0,25:1 en caso de herencia de tipo disómica o tetrasómica, respectivamente (Qu and Hancock 2001). Para obtener los valores de los pares de marcadores ligados en fase de repulsión, los datos de segregación de los ADS fueron recodificados (se invirtieron) y se combinaron con los datos directos en un mismo archivo de acuerdo a Al Janabi et al. (1993). El conjunto de datos se sometió a un análisis de ligamiento de pares utilizando el programa Mapmaker 3.0 a un LOD score de 3,0 y $\theta = 0,39$ [máxima distancia en la que es posible detectar ligamientos en repulsión en un autotetraploide con una población de 113 individuos (Wu et al. 1992)] para identificar pares de marcadores directos e invertidos ligados (ligamientos en repulsión) (Al Janabi et al. 1993). La ocurrencia de apareamiento al azar o apareamiento preferencial de cromosomas se estimó en base a los parámetros descritos en Qu y Hancock (2001) para el análisis de *loci* ligados en fase de

repulsión. Brevemente, la estimación de la recombinación entre marcadores ligados en fase de acoplamiento es similar para auto y aloploidios (Wu et al. 1992). Sin embargo, este parámetro para marcadores ligados en fase repulsión difiere significativamente en caso de auto o aloploidía. En aloploidios la recombinación entre marcadores ligados en repulsión depende sólo del entrecruzamiento entre las cromátidas no hermanas, mientras que en los autoploidios la recombinación observada (R) está compuesta por la recombinación debida a la segregación independiente (R_i) de los cromosomas que llevan los marcadores ligados en fase de repulsión y al entrecruzamiento que pudiera ocurrir entre ellos (R_c). La frecuencia de apareamiento entre cromosomas homólogos que llevan los marcadores ligados en repulsión es $1/(h-1)$, donde h es el número de homólogos en el grupo, por lo tanto la recombinación debida a la segregación independiente es $R_i = (h-2)/2(h-1)$. La recombinación resultante de un evento de entrecruzamiento es $R_c = r_2/(h-1)$, donde r_2 es la distancia genética entre los marcadores ligados [$r_2 = (h-1) R - R_i$]. Sumando, la recombinación observada para dos marcadores ligados en fase de repulsión en caso de autoploidía se define como: $R = R_i + R_c = (h-2)/2(h-1) + r_2/(h-1)$. El valor mínimo de R para un verdadero autoploide es R_i , y para todo par de marcadores ligados en repulsión R_i va a ser mayor que R_c . R_i es un valor fijo que depende del nivel de ploidía (para un autotetraploide $R_i = 0,333$) (Wu et al. 1992), mientras que R_c es un parámetro variable que depende de la distancia genética entre los *loci* considerados. Los valores de R pueden usarse como indicadores de apareamiento preferencial de cromosomas. Si $R < R_i$, r_2 asume un valor negativo [r_2 puede variar entre -1 y $0,5$ (Qu and Hancock 2001)], lo que es indicativo de apareamiento preferencial entre cromosomas homólogos. Si $R > R_i$ ($r_2 > 0$) se asume que la asociación de cromosomas durante la meiosis es totalmente al azar.

III.9- Construcción de mapas de ligamiento genético

La estrategia utilizada para el desarrollo de un mapa de ligamiento a nivel tetraploide de *P. notatum* se basó en la identificación y mapeo de marcadores ADS, segregantes de cada uno de los progenitores de la población de mapeo de acuerdo a lo descrito previamente por Grattapaglia and Sederoff (1994). Los datos de segregación de cada genotipo parental se analizaron independientemente y se construyeron dos mapas de ligamiento, correspondientes a cada uno de los progenitores. Los mapas marcos se establecieron considerando solamente las siguientes configuraciones alélicas: Aaaa x aaaa (presencia de banda en Q4188 y ausencia en Q4117) y aaaa x Aaaa (presencia de banda en Q4117 y ausencia en Q4188) para el desarrollo de los mapas materno y paterno, respectivamente. En ambos casos en una segunda etapa se consideraron también los marcadores distorsionados ya que la aposporia y un grupo importante de marcadores presentaron ese tipo de segregación.

El análisis de ligamiento se realizó utilizando el programa de mapeo Mapmaker 3.0 (Lander et al. 1987) codificando los datos genéticos de los marcadores ADS como "F₂-retrocruza" (opción *F₂ backcross*), donde la presencia o ausencia de un determinado marcador indica heterocigosis u homocigosis respectivamente. Las unidades de mapeo en cM derivaron de la función de Kosambi (1944). El procedimiento de construcción de los mapas fue realizado en dos etapas, primero se establecieron los grupos de ligamiento de marcadores ligados en fase de acoplamiento (grupos de co-segregación) y luego los grupos de co-segregación fueron asignados a grupos de homólogos basándose en la detección de ligamientos en fase de repulsión.

Para el establecimiento de los grupos de co-segregación, el conjunto de datos de cada progenitor se sometió a un análisis de ligamiento utilizando el programa Mapmaker 3.0 a un

LOD score de 6,0 – 4,0 y $\theta = 0,39$. Posteriormente se disminuyó el valor de LOD score a 3,0 para examinar si había asociación entre los extremos de los diferentes grupos de co-segregación obtenidos. Se aceptó ligamiento entre éstos cuando un marcador de un grupo estaba ligado a más de uno de otro grupo. Una vez definidos los grupos de co-segregación se asignaron marcadores a cada uno a valores estándares de LOD = 3,0 y $\theta = 0,30$ (comando "assign"). El mejor orden de los marcadores dentro de cada grupo se determinó usando las funciones del programa "compare" (para grupos de hasta 5 marcadores), "order" (para grupos con más de 5 marcadores) y "ripple" (para verificar el orden establecido). Se empleó asimismo el comando "error detection on" para detectar los posibles errores debidos a doble entrecruzamiento. Una vez establecido el ordenamiento más probable se fijó un marco (comando *framework*) para cada grupo. Luego, se incorporaron los datos de los marcadores distorsionados a los archivos de datos y los mismos fueron asignados a los grupos preestablecidos a un LOD score = 3,0 y $\theta = 0,30$. Finalmente, se disminuyó el LOD score a 2,0 para analizar el ligamiento de los marcadores que hasta el momento no habían sido asignados a ninguno de los grupos de co-segregación obtenidos.

La detección de grupos de homólogos se realizó re-codificando los datos de presencia/ausencia de todos los marcadores, incluyendo estos datos en el archivo original y detectando marcadores ligados en fase de repulsión (Qu and Hancock 2001) (ver más arriba). Aquellos grupos que presentaron marcadores ligados en repulsión se consideraron homólogos y se los designó con el número del grupo correspondiente seguido de una letra para diferenciar los homólogos dentro del grupo.

Finalmente, se realizó un análisis de ligamiento entre los grupos establecidos y los marcadores de tipo puente alélico [presentes en ambos progenitores que segregaron en una relación de 3:1 (presencia/ausencia)] empleando el programa Joinmap 1.4 (Stam 1993). Este

programa permite el cálculo de ligamientos y frecuencias de recombinación a partir de varios tipos de segregación y la combinación de la información de ligamiento de poblaciones diferentes, para la construcción de mapas integrados sobre la base de un número mínimo de *loci* compartidos. El mismo estima las distancias de mapeo para un dado grupo de marcadores por el método de los mínimos cuadrados (Stam 1993). Los datos de segregación de los marcadores tipo puente alélico (3:1) se agregaron a los archivos que se utilizaron para la construcción de los mapas marco paterno y materno. Se realizó un análisis de ligamiento de a pares a LOD score 3,0 en ambos casos y se determinó la asociación entre los marcadores puentes alélicos con marcadores ADS y distorsionados. Las posiciones relativas de cada marcador tipo puente dentro de cada grupo de co-segregación se determinaron utilizando Joinmap 1.4.

Se estimó el largo del genoma esperado, $E(G)$, para los mapas materno y paterno de *Paspalum notatum* por el método del momento (Hulbert et al. 1988) modificado por Chakravarti et al. (1991) de acuerdo a la ecuación: $E(G) = [n(n-1)d] / k$; donde n es el número de marcadores en el mapa, d es la mayor distancia en cM observada entre dos *loci* a un dado LOD score y k es en número de pares de marcadores ligados a ese LOD score. Se consideraron los parámetros en cada caso a valores de LOD score de 2.0 y los valores de d y k se obtuvieron directamente del archivo generado por Mapmaker 3.0. La cobertura del genoma se estimó como la proporción del largo de recombinación experimental obtenido (suma de los grupos de ligamiento) sobre el largo teórico estimado del genoma $[E(G)] \times 100$.

III.10- Clonado de fragmentos de interés

Las bandas de interés correspondientes a marcadores de AFLP fueron cortadas del gel con un bisturí, eluidas en acetato de sodio 0,5 M; EDTA 1 mM pH 8,0 (Sambrook et al. 1989), reamplificadas usando la combinación de cebadores de AFLP original y clonadas en el vector comercial pGEMT-easy (Promega). Los clones obtenidos fueron secuenciados contratando el servicio de secuenciación de la Universidad de Maine, Maine EEUU y el de Macrogen Inc., Corea.

IV- RESULTADOS

IV.1 - Caracterización de la población de mapeo *Paspalum notatum* a nivel tetraploide

IV.1.1- Clasificación de los individuos F_1 según el modo de reproducción

Como resultado del cruzamiento entre los progenitores de la población de mapeo Q4188 (tetraploide sexual de origen experimental) y Q4117 (tetraploide apomíctico natural) se obtuvo una población F_1 de 115 individuos de los cuales 113 fueron híbridos (ver más adelante). Dos plantas derivaron de la autopolinización del genotipo materno y por lo tanto se descartaron para los posteriores análisis. La población se encuentra establecida en el IBONE desde septiembre de 2001 donde es mantenida con cortes y desmalezados según corresponda.

El modo de reproducción de las plantas experimentales se determinó en primer lugar por medio de análisis moleculares, en los cuales se emplearon 2 cebadores de RAPD [UBC 243 (5'GGGTGAACCG3') y UBC 259 (5'GGTACGTACT3')] que generan marcadores completamente ligados a la aposporía. Estos marcadores fueron identificados previamente en otra población de *P. notatum*, obtenida a partir de los mismos progenitores (Q4188 y Q4117) (Martínez et al. 2003). En octubre de 2001 se recolectó material vegetal y se realizó la extracción de ADN genómico de la totalidad de los individuos de la población (Figura 6). Las muestras fueron ensayadas con los cebadores de RAPD UBC 243 y UBC 259 y se determinó

la amplificación de los fragmentos de 377 bp (UBC243-377) y 1157 bp (UBC259-1157) correspondientes a los marcadores asociados al modo de reproducción. (Figura 7). La presencia o la ausencia de los marcadores se utilizó como criterio de clasificación de los híbridos en apospóricos o no-apospóricos (sexuales), respectivamente. Como resultado de este análisis en la totalidad de la F_1 , 98 plantas fueron clasificadas como sexuales y 15 como apospóricas.

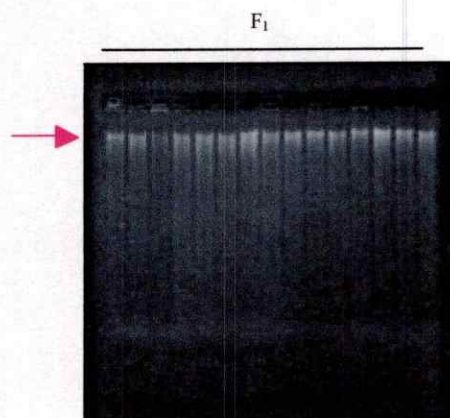


Figura 6: ADN genómico de *P. notatum*. El gel de agarosa 0,8 % teñido con bromuro de etidio donde se muestran las bandas de alto peso molecular (indicadas por la flecha) correspondientes a los ADN genómicos de 15 plantas de la población de mapeo. Las muestras de ADN se extrajeron por el método de Saghai – Maroof et al. (1984).

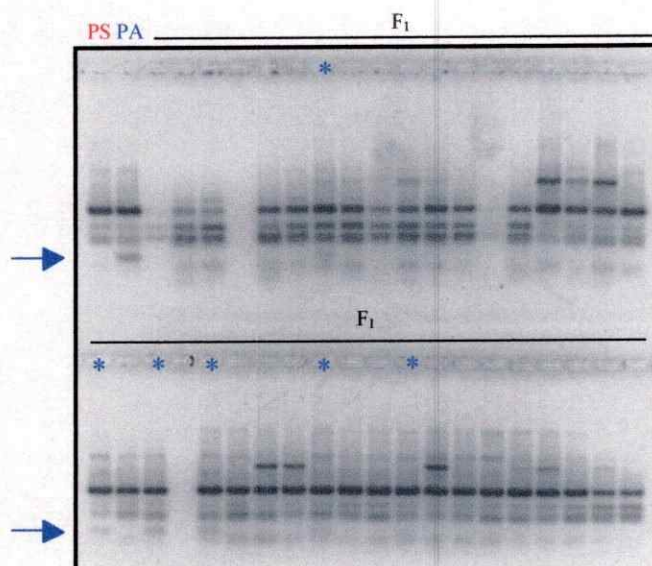


Figura 7: Clasificación de los individuos de la población de mapeo con el marcador UBC 243-377. Gel de agarosa 2,5% teñido con bromuro de etidio mostrando productos de amplificación obtenidos con el cebador UBC 243 para los ADN genómicos de Q4188 (PS), Q4117 (PA) y 38 individuos F_1 . Las flechas indican la banda correspondiente al marcador UBC243-377. El mismo está presente en el progenitor masculino y en algunas progenies (marcadas con asteriscos) que se clasificaron como apospóricas.

La clasificación de las plantas F_1 se realizó también por observaciones citoembriológicas. Este análisis sólo puede llevarse a cabo cuando las mismas están en floración, período que abarca desde enero a abril de cada año. En febrero de 2002, se realizaron las observaciones de los sacos embrionarios en anthesis (Figura 8). Como se mencionó anteriormente, en *Paspalum notatum* es relativamente simple distinguir los sacos embrionarios apospóricos de los meióticos ya que los primeros no poseen antípodas, son más irregulares con respecto a su forma, pueden encontrarse sacos múltiples (más de un saco por ovario en combinación con otros sacos apospóricos o con uno meiótico) y presencia de proembriones. Como criterio de clasificación se consideraron apospóricos tanto a los individuos con presencia de sacos apospóricos únicamente como a los que tenían sacos meióticos y apospóricos (mixtos). Se consideró como no apospórica (sexual) a toda planta que no presentó la capacidad de formar sacos embrionarios apospóricos o mixtos (solamente mostraba sacos de tipo meiótico).

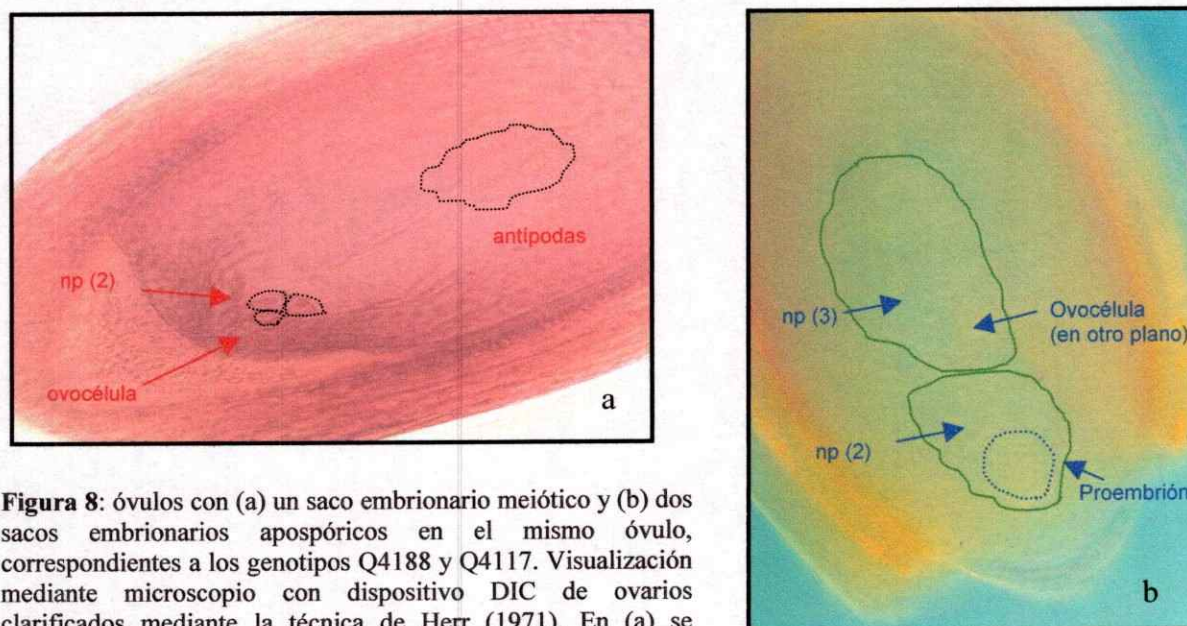


Figura 8: óvulos con (a) un saco embrionario meiótico y (b) dos sacos embrionarios apospóricos en el mismo óvulo, correspondientes a los genotipos Q4188 y Q4117. Visualización mediante microscopio con dispositivo DIC de ovarios clarificados mediante la técnica de Herr (1971). En (a) se observa la ovocélula y los 2 núcleos polares (np) de la célula central hacia el extremo micropilar y las antípodas hacia el extremo chalazal. En esta fotografía no se visualizan los nucleolos de las sinérgidas por estar en otro plano). En (b) se observan los 2 núcleos polares y la ovocélula en uno de los sacos y los tres núcleos polares y un pro-embrión en el otro saco. Los sacos apospóricos no presentan antípodas. (x 240).

Se analizaron en total 35 plantas F₁, incluyendo las 15 que fueron clasificadas como apospóricas en los análisis de RAPD y 20 plantas al azar de las 98 restantes. Se adoptó este criterio teniendo en cuenta resultados previos (Martínez et al. 2003), que demostraron que los marcadores moleculares de UBC 247-377 y UBC 259-1157 son consistentes para la clasificación por el modo de reproducción y el tiempo y labor que consume la clasificación citoembriológica. En la Tabla 2 se presentan los resultados obtenidos por ambas metodologías.

Tabla 2: Clasificación de una muestra de individuos de la población de mapeo derivada del cruzamiento entre Q4188 x Q4117 por medio de marcadores de RAPD y observaciones citoembriológicas.

Marcadores		Planta N°	Ovarios analizados	Porcentaje de óvulos con				
Ligados UBC243 -377	UBC259 -1159			SEM	SEI	SEa	SEMX	SEA
No	No	2	20	80.0	15.0	5.0	-	-
No	No	7	20	90.0	10.0	-	-	-
No	No	8	20	70.0	20.0	10.0	-	-
Si	Si	9	20	-	-	-	10.0	90.0
Si	Si	19	20	20.0	-	-	-	80.0
Si	Si	20	20	-	-	-	5.0	95.0
No	No	21	20	55.0	20.0	25.0	-	-
Si	Si	23	20	-	-	-	15.0	85.0
No	No	26	20	90.0	5.0	5.0	-	-
Si	Si	27	20	5.0	-	-	15.0	80.0
No	No	30	19	79.0	16.0	5.0	-	-
Si	Si	31	No floreció					
No	No	36	20	85.0	10.0	5.0	-	-
No	No	38	20	55.0	10.0	35.0	-	-
No	No	39	40	82.5	7.5	10.0	-	-
Si	Si	40	20	20.0	-	-	10.0	70.0
No	No	41	20	65.0	5.0	30.0	-	-

Marcadores Ligados		Planta N°	Ovarios analizados	Porcentaje de óvulos con				
UBC243 -377	UBC259 -1159			SEM	SEI	SEa	SEMIX	SEA
No	No	45	18	83.0	-	17.0	-	-
No	No	48	20	85.0	5.0	10.0	-	-
Si	Si	51	20	-	40.0	20.0	-	40.0
No	No	60	20	50.0	25.0	25.0	-	-
Si	Si	63	20	-	-	-	5.0	95.0
Si	Si	65	20	5.0	-	-	30.0	65.0
Si	Si	67	20	15.0	-	-	15.0	70.0
No	No	70	20	90.0	10.0	-	-	-
Si	Si	71	20	-	-	-	10.0	90.0
Si	Si	74	20	20.0	-	10.0	5.0	65.0
No	No	78	20	75.0	15.0	10.0	-	-
No	No	79	21	29.0	33.0	38.0	-	-
Si	Si	86	20	10.0	-	5.0	5.0	80.0
No	No	95	20	85.0	5.0	10.0	-	-
No	No	99	21	71.0	5.0	24.0	-	-
No	No	102	20	95.0	5.0	-	-	-
No	No	105	20	90.0	5.0	5.0	-	-
Si	Si	112	20	-	-	5.0	-	95.0

SEM = Saco embrionario meiótico.

SEI = Saco embrionario inmaduro o poco desarrollado.

SEa = Saco embrionario ausente.

SEMIX = Saco embrionario mixto.

SEA = Saco embrionario apospórico.

De la tabla anterior se deriva que se observó la presencia de sacos embrionarios de tipo apopóricos o mixtos en 14 de los 15 individuos clasificados como apospóricos con los marcadores de RAPD. Un individuo (n° 31), no se pudo clasificar por citoembriología ya que no floreció, sin embargo se lo consideró apospórico por presentar los dos marcadores de RAPD y un número considerable de marcadores que se detectaron ligados a la apomixis posteriormente en este trabajo de Tesis. Los resultados obtenidos indicaron una correlación

exacta entre ambas metodologías de clasificación para los 35 individuos estudiados, considerándose por lo tanto, que la población de mapeo de *P. notatum* de 113 híbridos presenta 98 plantas sexuales y 15 apospóricas.

IV.1.2- Segregación del carácter aposporía en la población

Los estudios de herencia de la aposporía en *P. notatum* fueron realizados sobre una población segregante por el modo de reproducción cuyos progenitores fueron también los genotipos Q4188 y Q4117 utilizados en este trabajo de Tesis (Martínez et al. 2001). El modelo propuesto se basa en que el carácter está controlado por un gen dominante presente en dosis simple con distorsión de la segregación (Martínez et al. 2001). La constitución genética de los progenitores sexual y apomítico para dicho *locus* sería nuliplexo (aaaa) y simplexo (Aaaa), respectivamente. La relación de segregación esperada para un carácter en esta condición en la población de mapeo sería entonces de 1:1 sexual vs. apomítico (Figura 9).

<p>Q4188 Sexual progenitor femenino: PS Genotipo aaaa Gametas: aa</p>	<p>Q4117 Apomítico progenitor masculino: PA genotipo Aaaa Gametas: 1/2 aa y 1/2Aa</p>									
<table border="1" style="border-collapse: collapse; margin: auto;"> <tr> <td style="padding: 5px;"></td> <td style="text-align: center; padding: 5px;">PS</td> <td style="text-align: center; padding: 5px;">1</td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">PA \</td> <td style="padding: 5px;">1/2 aa</td> <td style="padding: 5px;">aaaa 1/2</td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">1/2</td> <td style="padding: 5px;">Aa</td> <td style="padding: 5px;">Aaaa 1/2</td> </tr> </table>			PS	1	PA \	1/2 aa	aaaa 1/2	1/2	Aa	Aaaa 1/2
	PS	1								
PA \	1/2 aa	aaaa 1/2								
1/2	Aa	Aaaa 1/2								
<p>Segregación esperada: 1(aaaa):1(Aaaa)</p>										

Figura 9: Modelo de segregación esperada para un alelo simple dominante (A) responsable de la aposporía en la población de mapeo tetraploide.

Como se mencionó en el ítem anterior, 98 plantas F₁ se clasificaron como sexuales y 15 como apospóricas, resultando en una relación de segregación igual a 6,5:1 no apospóricas (sexuales) vs. apospóricas (apomícticos). El carácter en estudio mostró una fuerte desviación de la relación esperada para un alelo en dosis simple ($\chi^2_{1:1} = 60,96$, $p < 0,01$) en concordancia con lo observado previamente por Martínez et al (2001), aunque en este caso la disminución en el número de progenies apospóricas obtenidas fue mayor. Estos resultados confirman la distorsión de la segregación observada en la transmisión de la aposporia en la especie por las gametas masculinas y la presencia de algún factor letal (a nivel gamético o cigótico) asociado al carácter.

Los resultados presentados en los ítems IV.1.1 y IV.1.2 fueron publicados en Martínez et al. 2003 y en Stein et al. 2004.

IV.2- Caracterización citogenética y estudios de viabilidad del polen en Q4188 y Q4117

Debido a la fuerte distorsión de la segregación en el carácter aposporia observada en la población de mapeo, se realizaron estudios de apareamiento de cromosomas durante la meiosis y de viabilidad de polen a fin de detectar posibles causas del fenómeno.

IV.2.1- Análisis de apareamiento cromosómico

Las observaciones de las meiosis durante la microsporogénesis de Q4188 y Q4117, revelaron que en ambas plantas los 40 cromosomas se asocian formando principalmente cuatri y bivalentes en la diacinesis de la profase I. En Q4188, un promedio de 43.6 % (rango 20-80%) de los cromosomas formó cuatrivalentes y en Q4117 un 49 % (rango 10-80%). En la Tabla 3 se muestra el promedio de las configuraciones de cromosomas formando univalentes (I), bivalentes (II), trivalentes (III) y cuatrivalentes (IV) por célula madre del polen (CMP) (Figura 10a-c). La proporción de univalentes presentes en las CMP de ambos genotipos fue diferente, mostrando el progenitor sexual 7 células conteniendo univalentes por cada 26 CMP (26,9%) (Figura 7 a) y el apomítico 2 células conteniendo univalentes por cada 36 CMP (5,5%). A pesar de que en anafase I la mayoría de las células mostró una distribución regular de cromosomas (Figura 10d) se detectó la presencia de cromosomas retrasados en ambos genotipos. En Q4188 el 30,7% de las células en anafase I tenía uno o dos cromosomas retrasados, lo que coincide con la cantidad de meiocitos con univalentes (26,9%) que se observaron en diacinesis de la profase I (Tabla 3). En Q4117 el 44,4% de las células mostró cromosomas retrasados en anafase I. Esta proporción fue inesperada ya que sólo unos pocos meiocitos mostraron univalentes (5,5%). Los patrones de retraso observados en Q4117

fueron: un bivalente retrasado en la placa ecuatorial (Figura 10e), dos cromosomas simples enfrentados cara a cara (figura 10g) y menos frecuentemente dos cromosomas unidos por un puente de cromatina (Figura 10f). Interesantemente, en la planta apomítica los cromosomas retrasados simples en anafase I siempre se posicionaron cara a cara, indicando una separación demorada, mientras que en la planta sexual los univalentes retrasados estaban localizados aleatoriamente en el citoplasma (Figura 10h). En telofase I ambas razas mostraron dos grupos de cromosomas aglutinados en los polos (Figura 10i). Sin embargo, en el 26,9% de los meiocitos de Q4188 y en el 35,3% de los de Q4117 se observaron uno o dos micronúcleos. En este último caso, algunos de los micronúcleos resultaron extremadamente pequeños, sugiriendo que pudieron haberse originado a partir de fragmentos cromosómicos (Figura 10j). La presencia de puentes de cromatina con fragmentos acompañantes es una evidencia indirecta de inversiones cromosómicas (Brown 1972).

Tabla 3: Comportamiento meiótico de los cromosomas en razas tetraploides de *Paspalum notatum* ($2n = 4x = 40$): Q4188, progenitor femenino de reproducción sexual y Q4117, progenitor apomítico dador de polen.

Genotipo	N° de CMP analizadas	Promedio de asociaciones cromosómicas por CMP en diacinesis de la profase I				% CMP con univalentes en diacinesis de la profase I	% de CMP con 1 o 2 retrasados en anafase I ^a	% de CMP con micronúcleos en telofase I ^a
		I	II	III	IV			
Q4188 Sexual	26	0,5	9,8	0,1	4,9	26,9	30,7	26,9
Q4117 apomítico	36	0,08	11,2	0,05	4,36	5,5	44,4	35,3

a: se observó un mínimo de 20 células

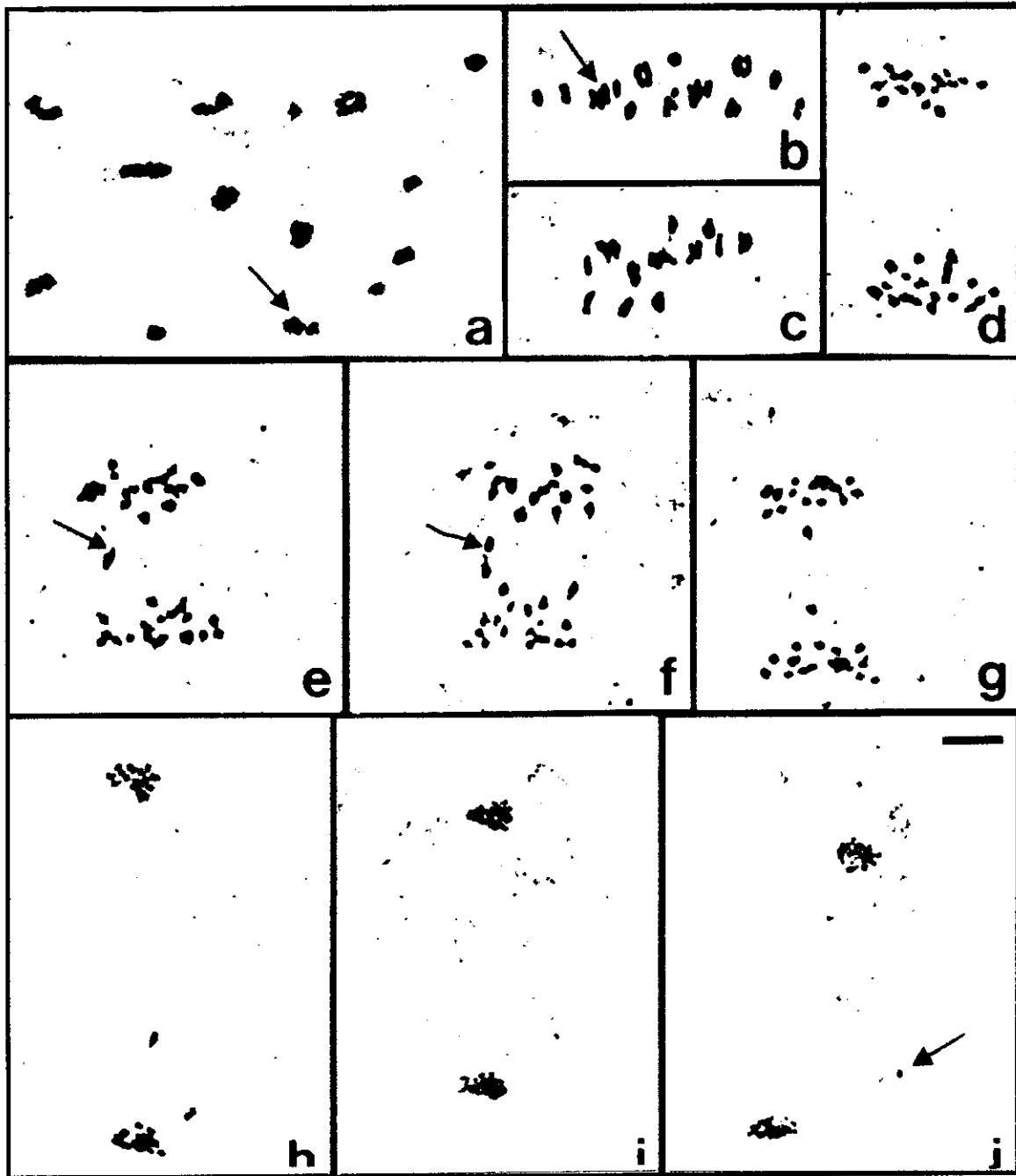


Figura 10: meiosis en las razas tetraploides sexual (Q4188) y apomítica (Q4117) de *Paspalum notatum*. (a) diacinesis en Q4188 (sexual) con 1 I + 4 II + 1 III (flecha) + 7 IV. (b-g) Q4117 (apomítico). (b) metafase I con 12 II + 4 IV, la flecha indica tres bivalentes juntos. (c) metafase I con 4 II + 8 IV. (d) anafase I tardía. (e) anafase I con un bivalente retrasado (flecha). (f) anafase I con un puente (flecha). (g) anafase I con dos cromosomas retrasados enfrentados cara a cara. (h) telofase I Q4188 (sexual) con dos cromosomas retrasados. (i-j) Q4117 (apomítico). (i) telofase I regular. (j) telofase I con un micronúcleo de cromatina retrasado (flecha). Barra = 10 micrones.

IV.2.2- Estudios de viabilidad de polen

La distorsión de la segregación observada en la transmisión de la aposporía en esta población de mapeo y en otras de la misma especie (Martínez et al. 2003), así como la observación de la posible presencia de inversiones o alteraciones cromosómicas durante la microsporogénesis de la raza apospórica, podrían estar asociadas (entre otras hipótesis) a una disminución en la viabilidad del polen en el genotipo apomíctico. Para analizar esta posibilidad se comparó el porcentaje de granos de polen no viable en ambos genotipos, Q4188 (sexual) y Q4117 (apomíctico). Se utilizó la tinción de Alexander (1980) que permite distinguir entre granos de polen vivos y muertos. El reactivo de Alexander está compuesto por: verde de malaquita que reacciona con la celulosa de la pared del polen y fuccina ácida que reacciona con el protoplasma otorgándole un color púrpura. Los granos de polen abortados no contienen protoplasma y por ende se ven verdes translúcidos al microscopio óptico, mientras que los no abortados se tiñen de color rojo intenso (mezcla del protoplasma púrpura y la pared verde) (Figura 11).

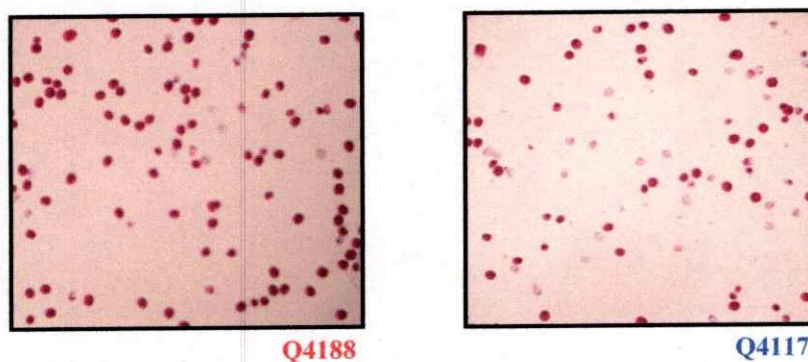


Figura 11: muestras de polen de Q4188 y Q4117 teñidas con la coloración de Alexander

Se analizó el contenido de polen de 10 flores de cada genotipo según se indica en Materiales y Métodos. De cada preparado se contaron 5 campos y dentro de cada campo 4 cuadrantes analizándose en total 24.888 y 21.976 granos de polen del genotipo sexual y apomítico, respectivamente. Los datos de las observaciones realizadas se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4: conteo de granos de polen teñidos con el colorante de Alexander en Q4188 y Q4117.

Flor N°	Q4188 (sexual)			Q4117 (apomítico)		
	Viable	No viable	Fracción No v ^a	Viable	No viable	Fracción No v ^a
1	2335	663	0,22	1272	1093	0,46
2	2270	584	0,20	1090	776	0,42
3	2362	565	0,19	1813	717	0,28
4	2199	697	0,24	1079	628	0,37
5	2323	671	0,22	1323	907	0,41
6	2060	755	0,27	1225	883	0,42
7	1722	492	0,22	1679	808	0,32
8	1773	623	0,26	1271	805	0,39
9	1170	338	0,22	1377	742	0,35
10	1026	260	0,20	1382	1106	0,44
Total	19240	5648	-	13511	8465	-

a: fracción de granos de polen no viables de cada flor calculada como = (no viables) / (viables + no viables).

El conjunto de datos se analizó calculando la fracción de granos de polen no viables de cada flor de cada genotipo (columnas identificadas en rojo y azul en la Tabla 4) y comparando los datos obtenidos bajo un modelo de dos muestras independientes. Los resultados se muestran gráficamente en la figura 12.

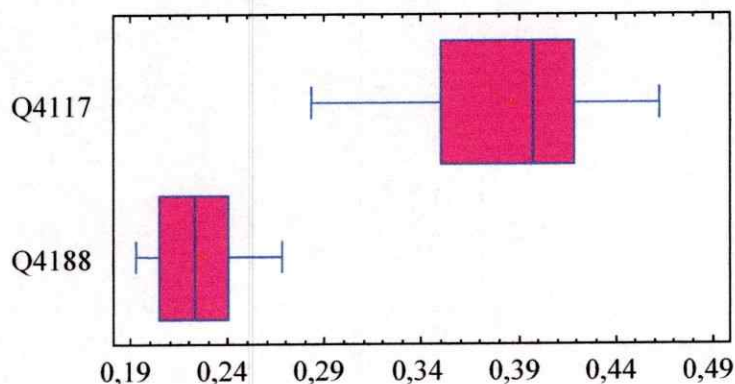


Figura 12: diagrama de cajas y bigotes mostrando la fracción de granos de polen no viables en los genotipos Q4117 y Q4188.

Las flores de Q4188 presentaron en promedio un 22,6 % de polen no viable y las de Q4117 un 38,6 % (Figura 10).

Se probó el supuesto de normalidad de la variable en estudio para los dos genotipos mediante el test de Shapiro Wilk (Shapiro y Wilk 1965), no rechazándose la hipótesis nula en ambos casos (valor de probabilidad asociada para Q4117 = 0,89 y para Q4188 = 0,46). Previo a realizar una prueba de comparación de medias, se realizó una prueba de comparación de desviaciones estándares y se rechazó la hipótesis nula, obteniéndose un valor de probabilidad asociada de 0,022. A continuación se compararon las fracciones promedio de los granos de polen no viables para ambos genotipos. La prueba utilizada fue la basada en la variable *t* de Student. El valor de la variable *t* resultó igual a 8,39, $p < 0,0001$, rechazándose en consecuencia la hipótesis nula (la conclusión es idéntica a la obtenida al aplicar el test de Mann Whitney). Los resultados obtenidos indican que el promedio de granos de polen no viables difiere significativamente entre los genotipos sexual (Q4188) y apomíctico (Q4117).

Este hallazgo podría justificar al menos en parte la distorsión de la segregación del carácter aposporia observada en este cruzamiento. Una posible causa de la menor viabilidad del polen de Q4117 en relación a Q4188 podría deberse a las alteraciones meióticas observadas en el genotipo apomítico. Parte de las gametas recibirían cromosomas fragmentados y/o complementos incompletos lo cual las convertiría en inviables.

Los resultados presentados en el ítem IV.2.1 fueron publicados en Stein et al. 2004.

IV.3 - Generación de marcadores moleculares y análisis de segregación en la población de mapeo

IV.3.1- Marcadores moleculares

La construcción del mapa de ligamiento genético y la determinación del tipo de herencia de las razas tetraploides de *Paspalum notatum* se basaron principalmente en datos genéticos obtenidos con marcadores moleculares de AFLP. Asimismo, se consideró un menor número de marcadores de RFLP. Los AFLP se generaron según se detalla en Materiales y Métodos utilizando como revelado el método de tinción con nitrato de plata. En primer lugar se ensayaron combinaciones de cebadores con el ADN de los genotipos parentales (Q4188 y Q4117) y se seleccionaron aquellas que mostraron buenos patrones de amplificación para emplearlos con toda la población. De las 47 combinaciones ensayadas 15 (32 %) no amplificaron o dieron un patrón de amplificación inespecífico (chorreado). El resto (32 combinaciones, 68 %) generaron un promedio de 52 fragmentos de amplificación por combinación, permitiendo la evaluación en conjunto de unos 1.664 marcadores (*loci*). En la Figura 13 se muestran geles de poliacrilamida teñidos con nitrato de plata donde se observa el producto de dos amplificaciones selectivas obtenidos con la combinación de cebadores e40m43 y e32m44.

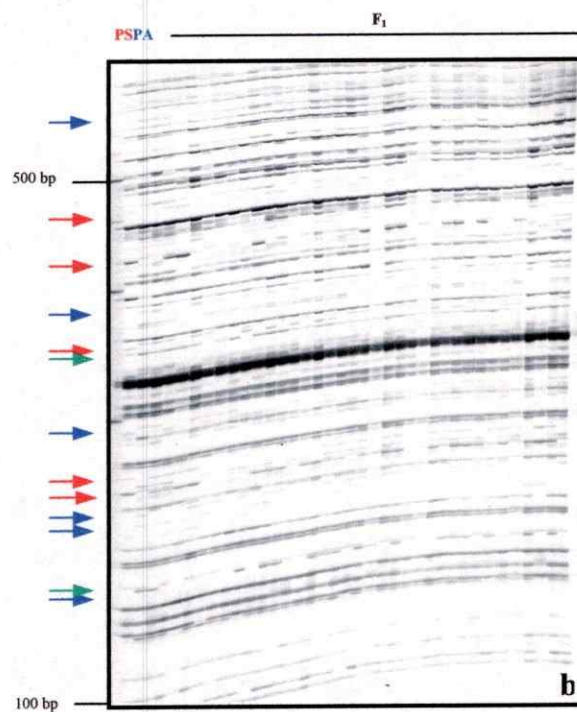
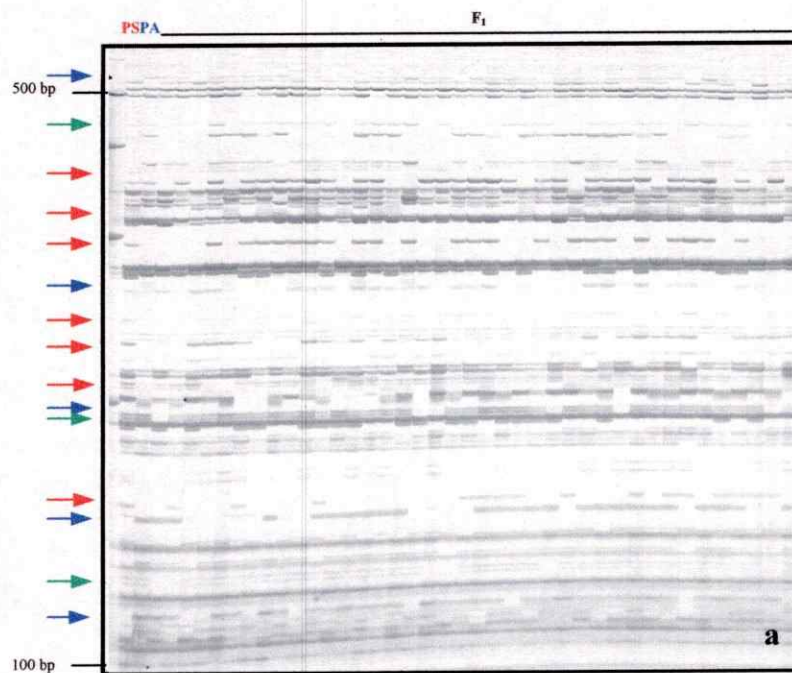


Figura 13: Marcadores de AFLP generados en la población de mapeo usando dos combinaciones diferentes de cebadores: (a) e40m43 y (b) e32m44. PS: progenitor sexual, Q4188. PA: progenitor apomítico, Q4117. Las flechas rojas, azules y verdes indican los marcadores maternos, paternos y maternos/paternos analizados, respectivamente.

Los marcadores de RFLP se generaron por hibridación con sondas homólogas o heterólogas (de arroz, maíz y *Brachiaria*) marcadas con dig-UTP y utilizando la técnica de detección no radiactiva, según se describe en Materiales y Métodos. En primer lugar se realizó una selección de sondas informativas utilizando filtros con ADN de los genotipos parentales digerido con al menos tres enzimas de restricción (Figura 14a, ver Tablas 14 y 17 en ítems IV.5.4 y IV.5.5 para más detalles). De las 49 sondas analizadas, 18 (37%) no hibridaron o mostraron una señal muy débil probablemente debido a una baja homología con el genoma de *P. notatum*, 3 (6%) hibridaron en forma inespecífica, 16 (33%) resultaron monomórficas entre los genotipos parentales y 12 (24%) evidenciaron polimorfismos entre el genotipo sexual y el apomítico con al menos una de las enzimas de restricción. Los clones que revelaron bandas diferenciales entre los progenitores fueron los seleccionados para los posteriores experimentos de mapeo. En promedio cada clon reveló 2,5 bandas permitiendo la evaluación de alrededor de 35 *loci*. En la Figura 14b se observan los resultados de un experimento de RFLP donde el ADN de *P. notatum* fue digerido con *Hind*III e hibridado con el clon de arroz R202.

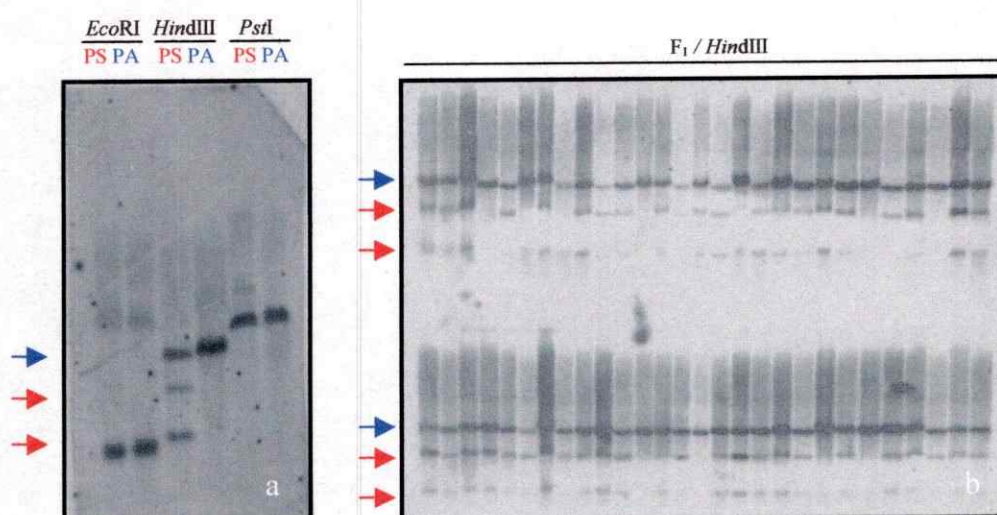


Figura 14: Hibridación del clon R202 con: a) ADN de Q4188 (PS) y Q4117 (PA) digeridos con tres enzimas de restricción. Se seleccionó para el mapeo la combinación de la sonda con *Hind*III. b) una muestra de individuos F_1 digeridos con *Hind*III. Las flechas indican los marcadores polimórficos específicos de cada progenitor, en rojo se indican los maternos y en azul los paternos.

IV.3.2- Análisis de segregación

Debido a que la población de mapeo es una familia tipo F_1 derivada del cruzamiento de dos genotipos tetraploides altamente heterocigotas, se esperaban distintas configuraciones alélicas para los diferentes *loci* examinados (Ritter et al. 1990). Los marcadores de AFLP se analizaron con los datos obtenidos de la totalidad de la población (113 individuos), mientras que la segregación de los marcadores de RFLP se analizó empleando una muestra de entre 60-80 individuos. Para cada combinación de cebadores (y para cada combinación enzima/sonda) se determinó la presencia de: a) *marcadores maternos*, fragmentos segregantes provenientes exclusivamente del progenitor femenino (sexual, Q4188), b) *marcadores paternos*, fragmentos segregantes provenientes exclusivamente del progenitor apomíctico (Q4117) y c) *marcadores maternos/paternos*: fragmentos segregantes provenientes de ambos genotipos parentales. En la Tabla 5 se muestra el número de marcadores maternos, paternos y maternos/paternos de AFLP y RFLP obtenidos en la población de mapeo.

Tabla 5: Tipos de marcadores moleculares de AFLP y RFLP generados en la población de mapeo de *Paspalum notatum* tetraploide.

Tipo de marcador	AFLP	RFLP	Total
Materno	307	9	316
Paterno	257	9	266
Materno/Paterno	103	2	105
Total	667	20	687

En promedio se obtuvieron 10 marcadores maternos, 8 paternos y 3 maternos/paternos por cada combinación de cebadores de AFLP. Asimismo, se obtuvo un promedio de 1

marcador materno y 1 paterno por cada combinación de enzima/sonda en los experimentos de RFLP.

La presencia de al menos 10 bandas segregantes de la planta dadora de polen, Q4117, en los individuos de la población confirmó el origen híbrido de 113 de los 115 individuos F₁. Dos de las progenies (las plantas n° 61 y 91) no mostraron ninguno de los 10 marcadores paternos analizados en este caso, indicando que se habrían originado por autofecundación de la planta Q4188 a pesar de la emasculación de las anteras previo al cruzamiento. Por lo tanto, estas plantas fueron descartadas de los análisis posteriores.

Se determinó la configuración alélica de cada *locus* comparando la segregación observada de los mismos con la segregación cromosómica esperada tanto para herencia tetrasómica como disómica, por medio de una prueba de χ^2 con una probabilidad asociada $p > 0,01$ (ver Tabla 1 en Materiales y Métodos). De acuerdo a esto, los 316 marcadores maternos y los 266 paternos fueron clasificados como alelos en dosis simple (Aaaa, ADS) o alelos en dosis doble (AAaa, ADD). En la Tabla 6 se muestran los resultados obtenidos y se indica la segregación y el número de marcadores presentes para cada tipo de segregación. En total, 51 marcadores (16 maternos, 35 paternos) mostraron distorsión de la segregación debido a que no se ajustaron a ninguno de los valores esperados.

Tabla 6: Relaciones de segregación observadas para los 316 marcadores maternos y los 266 paternos analizados en la población de mapeo.

Marcador	Segregación de marcadores					Dist. ^a
	ADS	ADD				
	1:1	5:1	5:1/3:1 ^b	3:1	1:0	
Maternos	259	6	23	12	-	16
Paternos	177	12	27	15	-	35

a: marcadores con segregación distorsionada.

b: marcadores que ajustan simultáneamente a las dos relaciones de segregación.

En la Figura 15 se muestra el histograma de las frecuencias de presencia correspondientes a todos los marcadores analizados. En la misma se puede observar que la distribución de las relaciones de segregación de los marcadores en los dos genotipos parentales presenta un pico en la clase 0,45-0,49, correspondiente a marcadores en dosis simple (0,5 es la segregación esperada para ADS). Como puede observarse ambas distribuciones presentan además hacia la derecha, un grupo de menor cantidad de marcadores que representaría a los marcadores en dosis doble ya que 0,83 (5/6) y 0,75 (3/4) son las relaciones de segregación esperadas para ADD en caso de herencia tetrasómica y disómica, respectivamente. Por otro lado, la distribución de los marcadores correspondientes a Q4117 muestra un tercer pico posicionado en la clase 0,1-0,14 que representa a los marcadores distorsionados detectados en dicho genotipo y que representa un 13,1% del total de los *loci* analizados.

En la Tabla 7 se muestran los datos de segregación de los 105 marcadores moleculares presentes en ambos genotipos y que segregan en la población. Sesenta marcadores ajustaron a una relación 3:1 correspondiente a configuraciones del tipo Aaaa en ambos progenitores, 6 resultaron distorsionados y el resto presentó relaciones de segregación para configuraciones AAaa x Aaaa (o viceversa) y AAaa x AAaa (ver Tabla 1 en Materiales y Métodos) que en todos los casos ajustaron para los dos tipos de herencia posibles: 11:1/7:1 y 35:1/15:1, según sea el tipo de herencia polisómica/disómica, respectivamente.

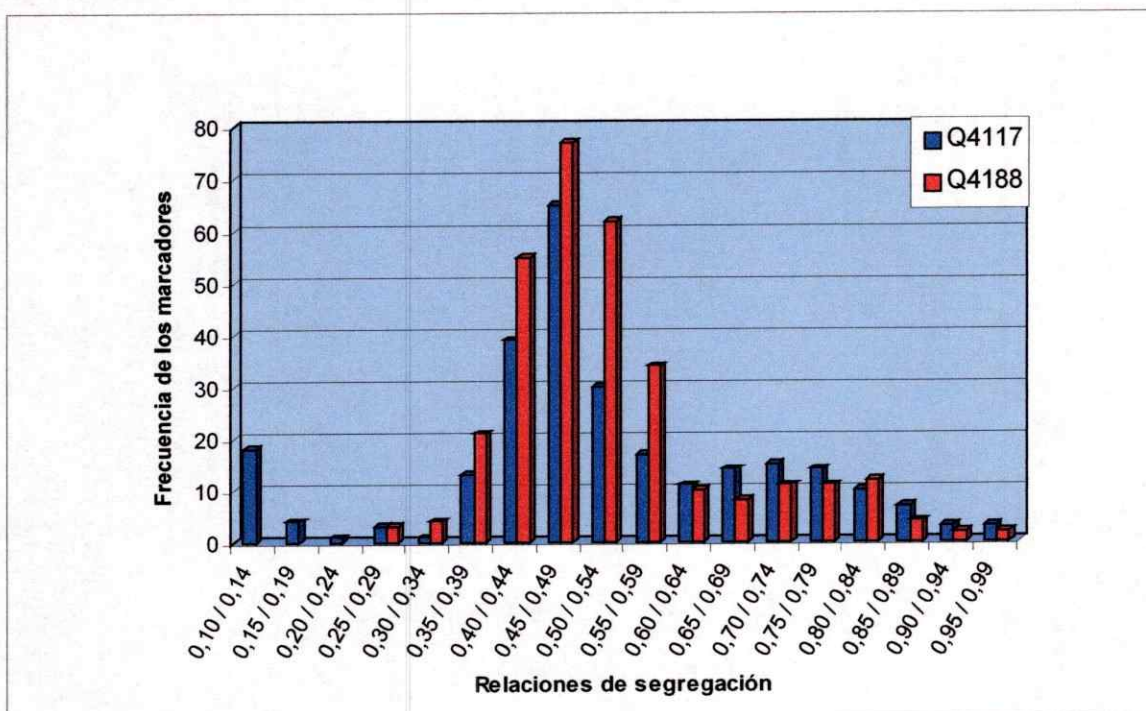


Figura 15: Relaciones de segregación observadas para los marcadores maternos y paternos analizados.

Tabla 7: Relaciones de segregación observadas para los 105 marcadores segregantes desde los dos genotipos Q4188 y Q4117 en la población de mapeo.

Marcador	Segregación de marcadores		
	3:1	(11:1 / 7:1) + (35:1 / 15:1)	Dist.
Maternos / Paternos	60	39	6

Parte de los resultados presentados en los ítems IV.3.1 y IV.3.2 fueron publicados en Stein et al. 2004.

IV.4- Determinación del tipo de herencia de las razas tetraploides de *Paspalum notatum*

Se realizaron análisis de segregación de los marcadores moleculares con el objetivo de aportar pruebas genéticas para determinar tipo de herencia (polisómica o disómica) presente en las razas tetraploides de la especie en estudio. Los datos correspondientes a cada genotipo parental (Q4188 y Q4117) se analizaron por separado y se efectuaron dos estudios independientes en cada caso según se detalla en Materiales y Métodos:

- a) se examinaron las relaciones de segregación de los marcadores ADD, siendo la relaciones esperadas de 5:1 y 3:1 indicativas de herencia polisómica (posible indicador de autoploidía) o disómica (posible indicador de aloploidía), respectivamente,
- b) se determinó el número de marcadores ADS ligados en fase de repulsión vs. fase de acoplamiento, considerando a las relaciones 0-0,25:1 y 1:1 como indicativas de herencia polisómica y disómica, respectivamente.

a) Se analizaron los resultados obtenidos con 32 combinaciones de cebadores de AFLP. Del total de fragmentos obtenidos, 39 marcadores maternos y 54 paternos segregaron como alelos en dosis doble (ADD). De ellos, 6 y 12 marcadores ajustaron exclusivamente a una relación de segregación 5:1 en Q4188 y en Q4117, respectivamente (Tabla 6). Otro grupo de 48 marcadores (21 maternos y 27 paternos) segregó con valores que ajustaron a la relación 5:1 pero que no se pudieron distinguir estadísticamente de la relación 3:1 debido al tamaño de la población. Todos estos marcadores indican que ambas razas sexual y apomíctica presentan herencia de tipo polisómica (son autoploides). Se detectaron, sin embargo, 12 marcadores maternos y 15 paternos que segregaron exclusivamente en una relación 3:1, lo que corresponde a una herencia de tipo disómica. Estos datos considerados globalmente están de

acuerdo con la hipótesis de que *Paspalum notatum* es un autotetraploide en origen pero que algunos sectores del genoma ya han sufrido diploidización y se aparean en forma preferencial, presentando herencia disómica.

b) Por otra parte, la proporción relativa de marcadores ligados en fase de acoplamiento vs. repulsión en cada genotipo por separado, se estimó combinando los datos de segregación directos e invertidos de los marcadores ADS en un solo archivo y buscando pares de marcadores directos e invertidos ligados, usando el programa Mapmaker 3.0. El archivo materno contenía datos de 506 *loci* y el paterno de 340. Los datos se sometieron a un análisis de ligamiento de dos puntos (LOD score = 3,0, $\theta = 0,39$) obteniéndose un total de 51 y 23 pares de marcadores ligados en fase de repulsión en Q4188 y en Q4117, respectivamente. La Tabla 8 muestra un resumen de los resultados obtenidos y en las Tablas 9 y 10 se detallan los pares de marcadores ligados en fase de repulsión detectados en ambos genotipos. Así, la relación del número de pares de marcadores ligados en fase de repulsión vs. acoplamiento fue de 0,04:1 (51/1277) y de 0,11:1 (23/208) en los genotipos materno y paterno, respectivamente. Estos valores son indicativos de herencia polisómica (tetrasómica) para ambas razas tetraploides sexual y apomíctica de *P. notatum*, lo que confirma la hipótesis formulada a partir de los datos de segregación de los ADD. Asimismo, los valores de recombinación de los pares ligados en repulsión en ambos genotipos no difirió significativamente del R_i esperado para este nivel de ploidía (33,30 cM) indicando una asociación general al azar de cromosomas homólogos durante la meiosis para la especie. Sin embargo, como se verá más adelante (ítem IV.5.2.1) el sector que controla la apomixis se aparean en forma preferencial (herencia disómica), mostrando nuevamente que *P. notatum* es un autotetraploide con una herencia polisómica general y con algunas regiones diploidizadas.

Tabla 8: resultado de los análisis de ligamiento para detectar marcadores ligados en fase de repulsión en Q4188 y Q4117.

Genotipo	Análisis de dos puntos		Lig. Rep. vs.
	LOD score = 3.0 θ = 0.39		Lig. Acop.
	Pares en acoplamiento	Pares en repulsión	
Q4188	1277	51	0,04:1
Q4117	208	23	0,11: 1

Tabla 9: Marcadores ligados en fase de repulsión en *Paspalum notatum* tetraploide sexual (Q4188). Solamente se analizaron los datos de los 259 marcadores ADS.

Pares de marcadores ligados en Q4188	Theta	LOD	cM ^a	r ₂ ^b
e34m32a - e34m36g	0,30	3,36	34,98	0,050
e36m38c - e33m42e	0,31	3,29	37,04	0,112
e36m38c - e33m33h	0,30	3,79	35,09	0,054
e33m32a - e34m36m	0,31	3,51	36,66	0,101
e32m35f - e37m44b	0,30	3,86	35,22	0,058
e32m36b - e39m42i	0,26	5,90	28,67	-0,139
e32m36e - e39m42i	0,29	4,61	32,48	-0,025
e39m42i - e41m36l	0,30	3,86	35,22	0,058
e39m42i - e41m36n	0,32	3,17	38,15	0,145
e39m42i - e41m41f	0,32	3,10	38,10	0,144
e39m42i - e42m37g	0,29	4,61	32,48	-0,025
e39m42i - e42m37h	0,31	3,51	36,66	0,101
e39m42i - e35m33a	0,32	3,17	38,15	0,145
e39m42i - e32m39g	0,32	3,37	37,12	0,115
e39m42i - e34m41g	0,31	3,29	37,04	0,112
e39m42i - e34m41n	0,31	3,50	35,99	0,081
e39m42i - e32m44e	0,32	3,16	37,53	0,127
e40m43c - e33m33d	0,32	3,04	38,65	0,160
e40m43g - e34m41m	0,28	4,80	31,32	-0,060
e37m41a - e33m33h	0,31	3,51	36,66	0,108
e37m41a - e32m44g	0,28	4,64	31,70	-0,048
e34m39e - e34m41m	0,31	3,50	35,99	0,081
e35m40f - e34m41m	0,28	4,55	32,29	-0,030
e41m36b - e44m38d	0,32	3,17	38,15	0,145
e41m44j - e34m41m	0,29	4,39	32,68	-0,019
e41m44m - e32m39a	0,29	4,16	33,67	0,011
e39m39c - e44m38n	0,32	3,04	38,65	0,160
e40m39i - e34m41m	0,28	4,19	32,06	-0,037
e42m37c - e33m33h	0,28	4,77	32,11	-0,036

Pares de marcadores ligados en Q4188	Theta	LOD	cM ^a	r ₂ ^b
e42m37f - e34m41m	0,27	5,39	29,65	-0,109
e34m36n - e33m42e	0,28	5,02	31,18	-0,064
e34m36n - e33m33h	0,27	5,18	30,82	-0,074
e33m42e - e44m38g	0,31	3,71	35,65	0,070
e33m42e - e32m39d	0,29	4,31	33,26	0,001
e33m42e - e34m41j	0,27	5,22	30,00	-0,099
e33m42e - e34m41l	0,29	4,39	32,68	-0,019
e44m38g - e33m33h	0,32	3,17	38,15	0,145
e44m38g - e32m44g	0,31	3,50	35,99	0,081
e33m33d - e34m41j	0,30	4,01	34,08	0,023
e33m33d - e34m41l	0,31	3,29	37,04	0,112
e33m33h - e34m41f	0,32	3,10	38,10	0,144
e33m33h - e34m41j	0,28	4,55	32,29	-0,030
e33m33h - e34m41l	0,30	3,79	35,09	0,054
e44m41h - e33m38i	0,30	3,57	35,41	0,063
e42m42f - e33m38i	0,29	4,23	33,83	0,016
e42m42g - e34m41m	0,29	4,16	33,67	0,011
e33m38h - e33m38i	0,29	4,61	32,48	-0,025
e33m38i - e34m41c	0,28	4,80	31,32	-0,059
e33m38i - e32m44d	0,29	4,24	33,08	-0,006
e32m39i - e34m41m	0,29	4,39	32,68	-0,019
e34m41k - e34m41m	0,29	4,39	32,68	-0,019

a: distancia en centiMorgan, calculada según la función de Kosambi.

b: $r_2 = (h - 1) (R - Ri) / 100$, siendo $h = 4$ y $Ri = 33,30$ para un autotetraploide (Qu y Hancock 2001).

Tabla 10: Marcadores ligados en fase de repulsión en *Paspalum notatum* tetraploide apomictico (Q4117). Solamente se analizaron los datos de los 177 marcadores ADS.

Pares de marcadores ligados en Q4117	Theta	LOD	cM ^a	r ₂ ^b
e32m32d - e34m43h	0,31	3,57	36,10	0,028
e32m32f - e44m38p	0,32	3,10	38,10	0,048
e32m32f - e33m33c	0,32	3,10	38,10	0,048
e32m33a - e34m43h	0,27	5,22	30,00	-0,033
e33m33c - e35m33c	0,29	4,17	32,89	-0,004
e32m33g - e34m41a	0,30	3,50	34,50	0,012
e34m32c - e44m41d	0,30	3,15	34,48	0,012
e36m38b - e42m37f	0,32	3,02	38,04	0,047
e36m38b - e32m44h	0,31	3,36	35,75	0,024
e32m35b - e39m42c	0,31	3,51	36,66	0,033
e39m42g - e42m42i	0,32	3,17	38,15	0,048
e34m39e - e41m41n	0,31	3,51	36,66	0,033
e41m36d - e41m41n	0,32	3,17	38,15	0,048

Pares de marcadores ligados en Q4117	Theta	LOD	cM ^a	r ₂ ^b
e41m41l - e41m41m	0,31	3,17	38,15	0,048
e41m41m - e41m41n	0,28	5,02	31,18	-0,021
e42m37d - e42m42i	0,30	4,00	34,80	0,015
e42m37f - e42m42b	0,31	3,64	36,21	0,029
e33m42c - e35m33g	0,32	3,17	38,15	0,048
e34m43g - e32m44k	0,30	3,79	35,09	0,018
e44m38p - e42m42g	0,32	3,17	38,15	0,048
e33m33c - e32m39e	0,31	3,71	35,65	0,023
e44m41a - e34m41h	0,32	3,01	37,38	0,041
e42m42b - e32m44h	0,32	3,16	37,53	0,042

a: distancia en centiMorgan, calculada según la función de Kosambi.

b: $r_2 = (h-1)(R-R_i)/100$, siendo $h = 4$ y $R_i = 33,30$ para un autotetraploide (Qu y Hancock 2001).

Parte de los resultados presentados en el ítem IV.4 fueron publicados en Stein et al. 2004.

IV.5- Mapa de ligamiento genético de razas tetraploides de *Paspalum notatum*

El desarrollo de mapas en especies autopoliploides debe realizarse siguiendo varias etapas obligatorias: i) se determina la dosis alélica de cada marcador, b) se seleccionan marcadores en dosis simples cuya segregación por presencia/ausencia es siempre 1:1, c) se realiza un análisis de ligamiento y se determinan los grupos de co-segregación a un determinado LOD score, d) se calculan las distancias y se ordenan los distintos *loci* sobre los grupos establecidos y e) los grupos de ligamiento son reunidos y asignados a cromosomas homólogos (Ripol et al. 1999). Consecuentemente, el desarrollo del mapa genético de *P. notatum* se efectuó siguiendo estrictamente esta serie de pasos, según se detalla en Materiales y Métodos. En primer lugar, se analizaron en forma independiente los datos de segregación de los marcadores de cada genotipo parental y se agruparon en dos archivos de datos. Con los marcadores de tipo ADS se construyeron dos mapas de ligamiento (mapa femenino y mapa masculino) correspondientes a cada progenitor utilizando el programa Mapmaker 3.0 (Lander et al. 1987). En una segunda fase se incluyeron también los marcadores con segregación distorsionada, ya que la aposporía y varios marcadores mostraron este tipo de segregación (ver ítem IV.1.2). Dentro de cada mapa se identificaron los grupos homólogos por análisis de marcadores ligados en fase de repulsión y finalmente se agregaron los marcadores de tipo puente alélico en ambos mapas empleando el programa Joinmap 1.4 (Stam 1993). En aquellos casos donde el mismo marcador se ubicó en grupos de ligamiento provenientes de los dos genotipos parentales se identificaron los cromosomas homólogos de los progenitores sexual y apomíctico.

Debido a que con Mapmaker 3.0 los grupos de co-segregación se definen sobre la base de ligamientos en fase de acoplamiento solamente, cada grupo de co-segregación corresponde

a un único cromosoma homólogo de los h posibles de cada juego (Ripol et al. 1999, Grivet et al. 1996). Es decir, en el caso de *Paspalum notatum*, que es un tetraploide con un total de $2n = 4x = 40$, el número teórico esperado de grupos de co-segregación en cada mapa de ligamiento completo es $= 40$ y a su vez estos grupos deberían asociarse en 10 juegos ($x = 10$) cada uno conteniendo 4 homólogos.

IV.5.1- Construcción del mapa marco de Q4188

Los datos de segregación de 259 marcadores ADS (1:1) fueron utilizados para la construcción del mapa de ligamiento genético marco del genotipo sexual de *P. notatum*. Los grupos de ligamiento fueron definidos utilizando un LOD = 6.0 y un valor máximo de recombinación (θ) = 0,39. Con estos valores umbrales un total de 27 grupos de co-segregación fueron definidos en esta primera etapa. Posteriormente se asignaron marcadores a cada grupo empleando un valor de LOD = 3.0 y se analizó la posibilidad de que los grupos definidos correspondieran a un mismo cromosoma (ver Materiales y Métodos), determinándose la presencia de 26 grupos de co-segregación definitivos. El ordenamiento de los marcadores dentro de cada grupo de cosegregación se realizó con el comando "order" del programa Mapmaker con la opción "error detection on" de manera de minimizar posibles errores debidos a dobles entrecruzamientos. En base al ordenamiento más probable, se fijaron los marcos para cada grupo de co-segregación (comando "framework"). Luego se incorporaron los datos de los 16 marcadores distorsionados al archivo de datos y 10 de ellos se asignaron a 5 de los grupos previamente establecidos, quedando 6 sin asociarse a ningún grupo. Finalmente se asignaron 2 marcadores a LOD = 2.0 a dos grupos diferentes. Tanto los marcadores distorsionados como los asignados a LOD 2.0 se incorporaron al mapa siempre y

cuando no causaran distorsión en las distancias y ordenamiento de los grupos fijados previamente.

El mapa materno consistió en 233 marcadores (84,7%) asignados a 26 grupos de co-segregación cubriendo una distancia total de 1.590,6 cM (Figura 16). La distancia promedio entre marcadores fue de 6,8 cM. Cuarenta y dos (15,3%) marcadores permanecieron sin asignarse a ninguno de los grupos establecidos. Los grupos de ligamiento se identificaron con la letra M seguida de un número x (M x). El tamaño de los mismos varió entre 119,7 y 7,2 cM y la distancia genética entre marcadores entre 41,5 y 0,0 cM. El número promedio de marcadores por grupo fue 8,9 pero se detectaron 5 grupos de solamente dos marcadores (M8, M12, M15a, M16 y M19). Establecidos los grupos de co-segregación se examinaron los datos de los marcadores ligados en fase de repulsión y los grupos que presentaron pares de marcadores ligados fueron considerados homólogos. Para identificar a cada homólogo se agregó una letra minúscula luego del número correspondiente (M xz). En total 14 de los 26 grupos de co-segregación se asociaron definiendo 7 grupos de homólogos, conteniendo entre 2 y 3 cromosomas homólogos cada grupo. Se detectaron además tres marcadores (que no pertenecían a ninguno de los grupos de co-segregación establecidos) que mostraron ligamiento en fase de repulsión con marcadores pertenecientes a tres grupos diferentes (M1a, M9a y M11a) y se sumaron al mapa.

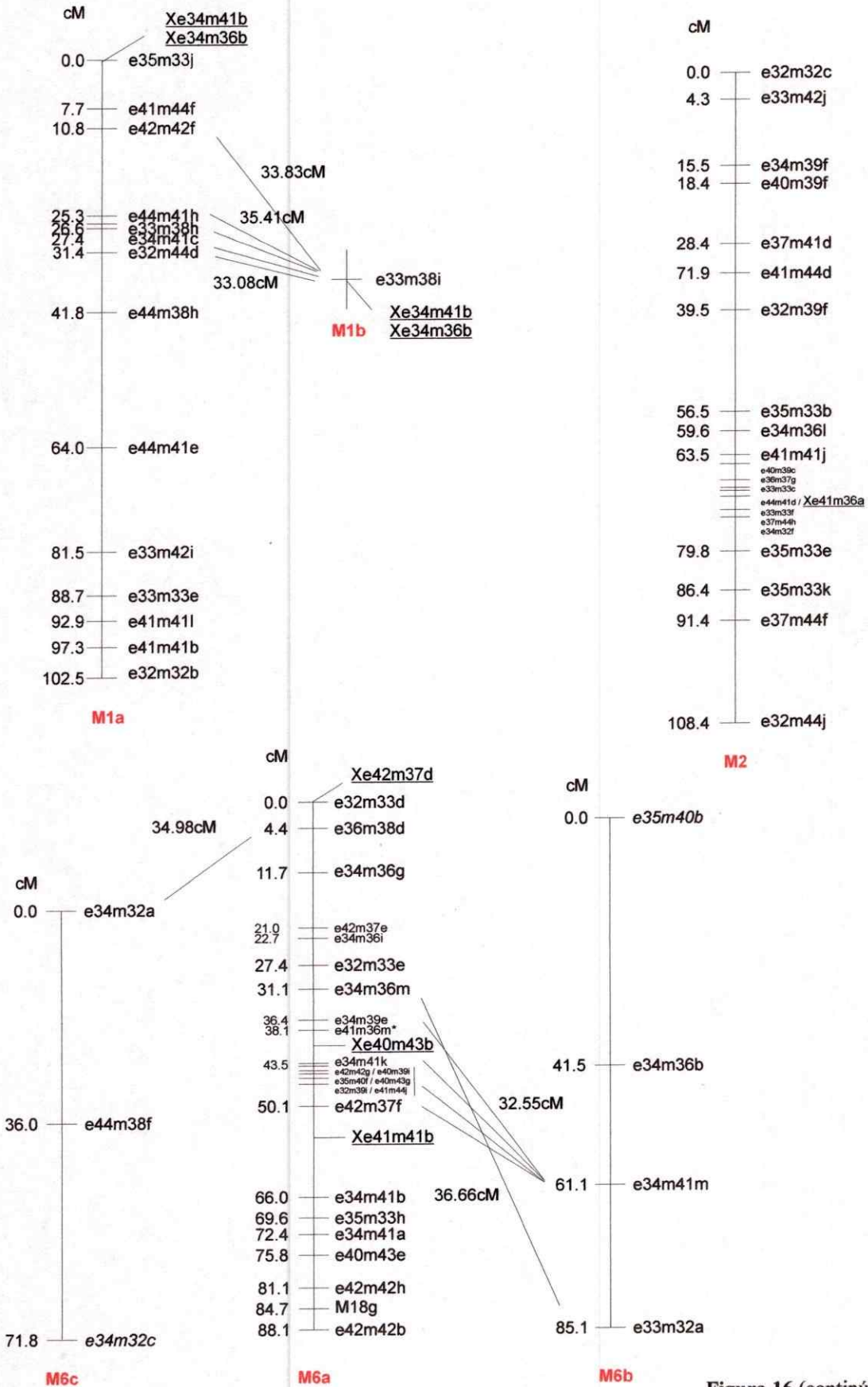


Figura 16 (continúa)

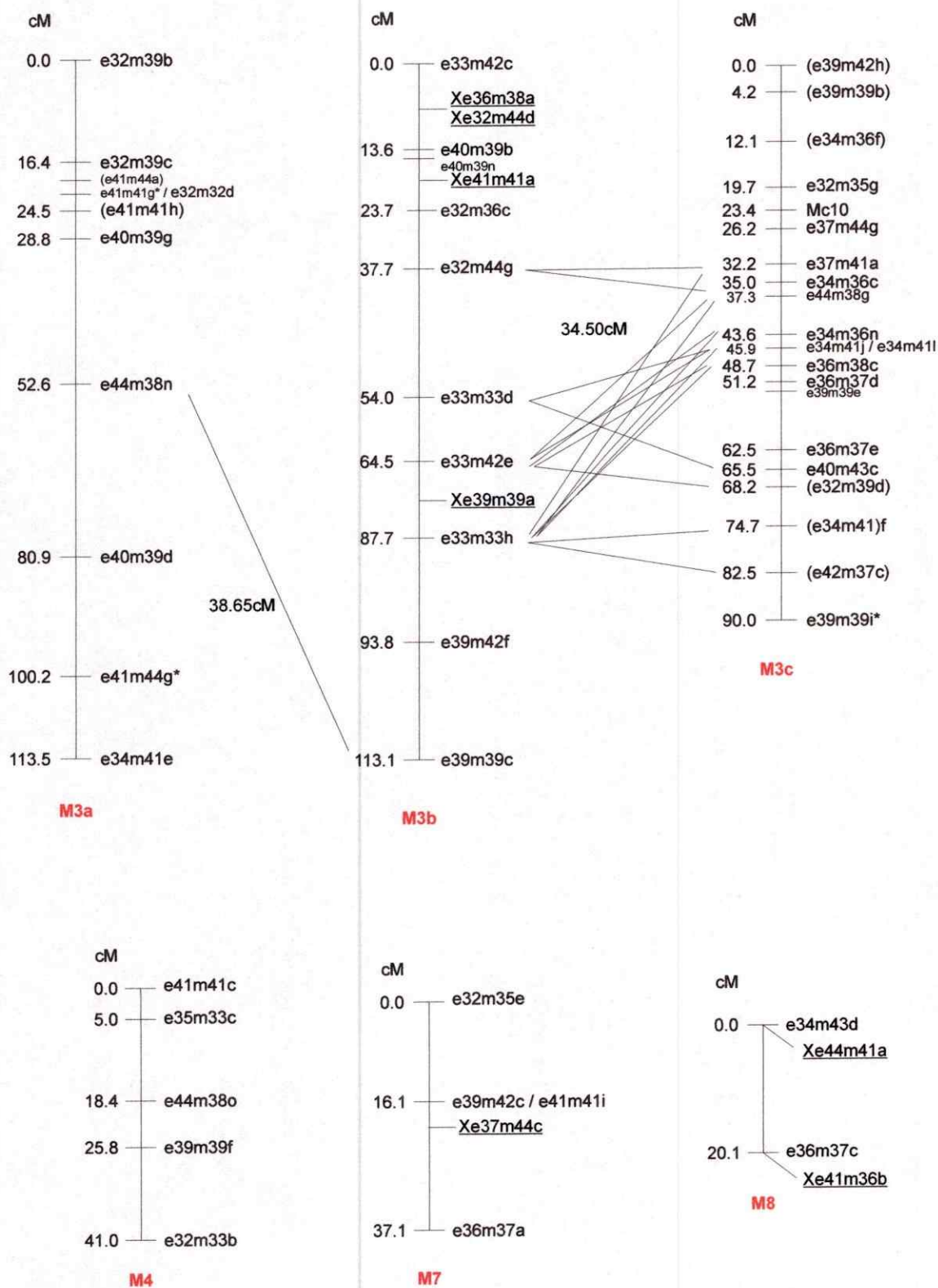


Figura 16 (continúa)

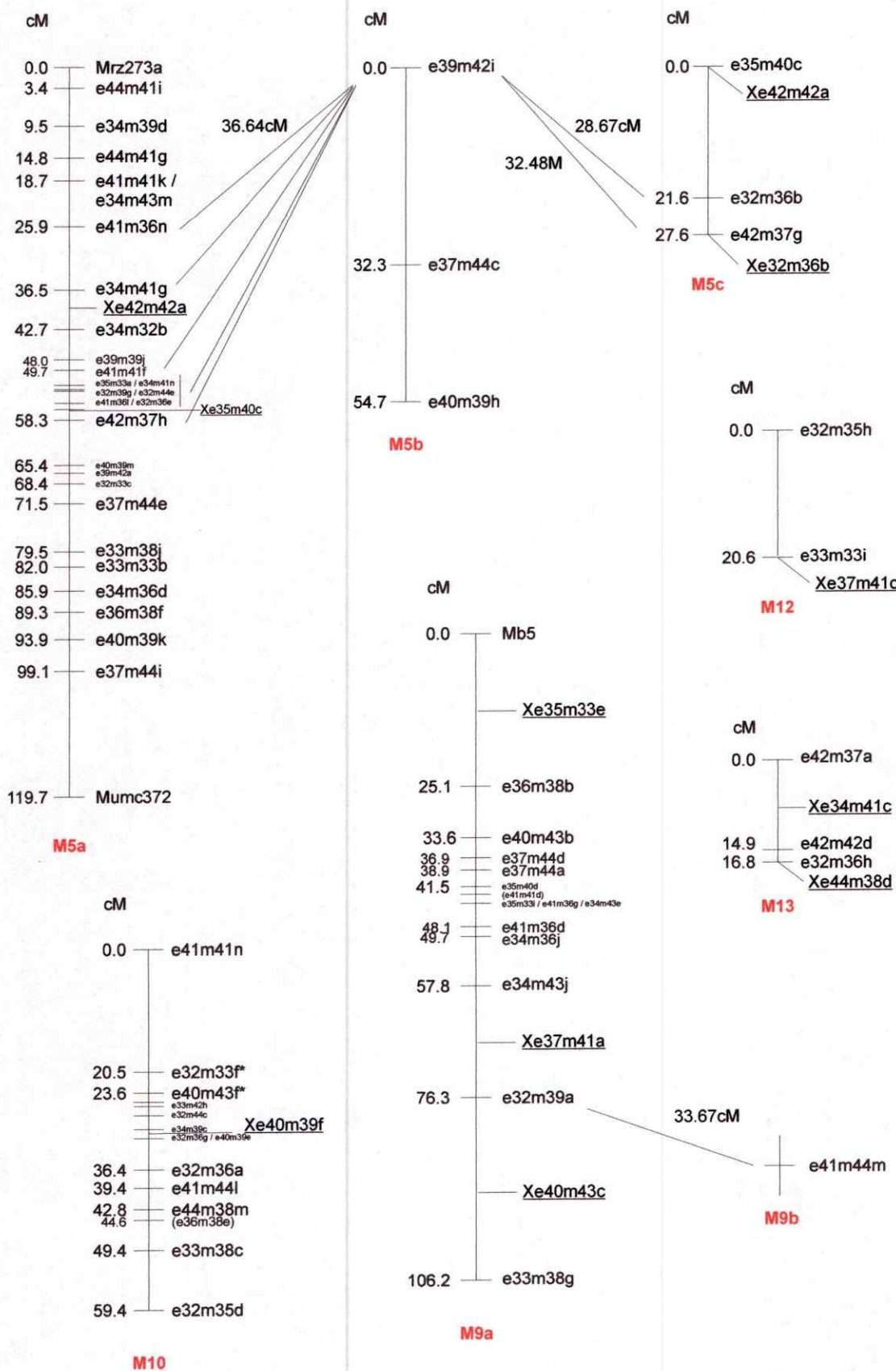


Figura 16 (continúa)

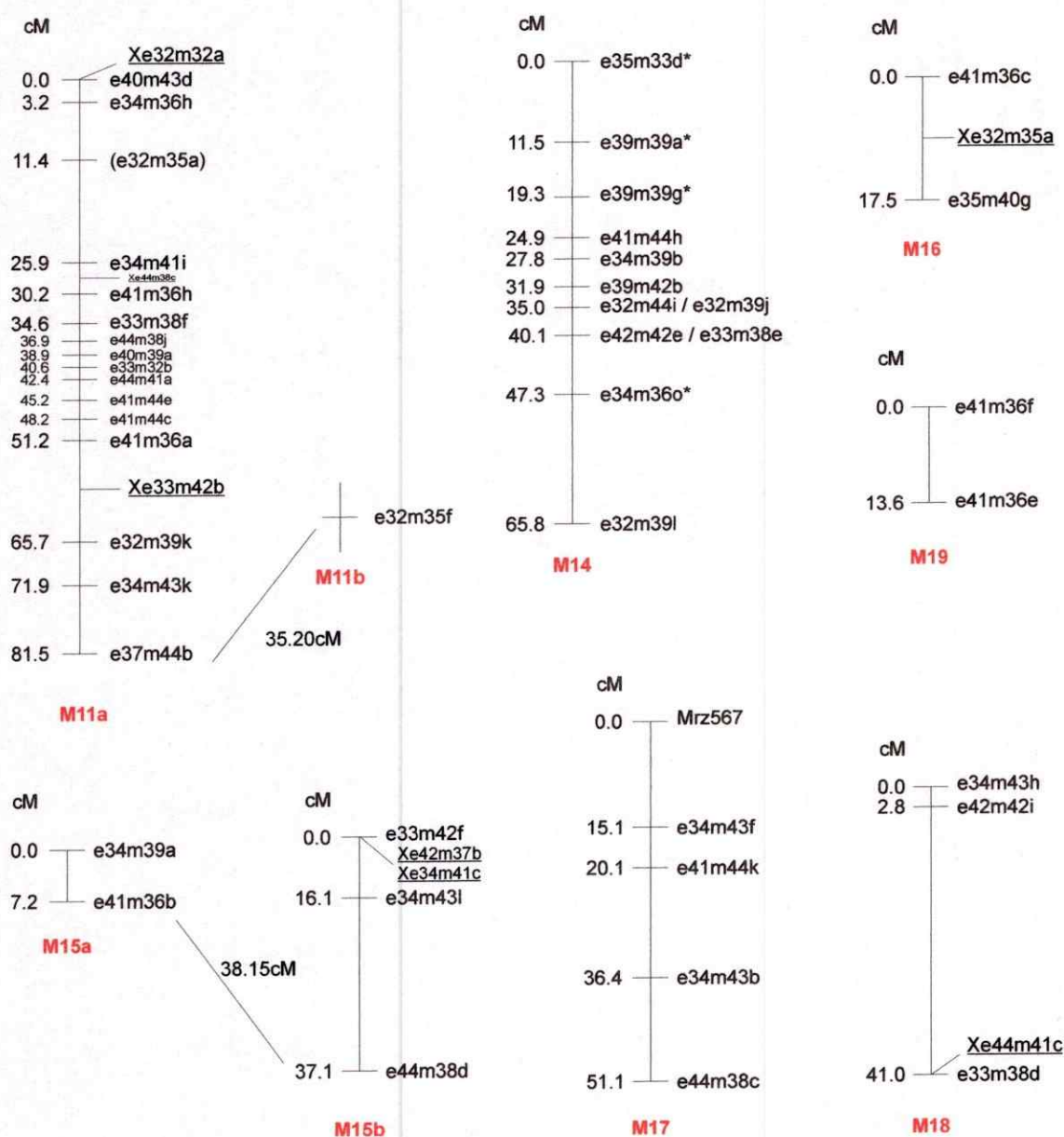


Figura 16: mapa de ligamiento genético de Q4188. Los grupos de ligamiento se definieron usando el programa Mapamker 3.0 (LOD score = 6.0 - 3.0, theta = 0,39). El nombre de los marcadores y la distancia en cM se expresan a la derecha y a la izquierda de cada grupo, respectivamente. Los asteriscos indican los marcadores con segregación distorsionada. Los marcadores en cursiva fueron asignados a los grupos de co-segregación a LOD score = 2. Los paréntesis indican aquellos marcadores cuya posición dentro del grupo no pudo establecerse claramente. Los marcadores subrayados son puentes alélicos y fueron agregados como marcadores accesorios empleando el programa Joinmap 1.4. Las líneas conectoras indican los pares de marcadores ligados en fase de repulsión. Los homólogos dentro de cada grupo de ligamiento se identifican por una letra minúscula a continuación del número del grupo.

Para la estimación del largo del genoma esperado [E(G)], se utilizó el método de Hulbert modificado por Chakravarti (Chakravarti et al. 1991) según se describe en Materiales y Métodos $\{E(G) = [n(n-1)d] / k\}$. El cálculo se realizó a LOD score 2, se consideraron los 233 marcadores posicionados en el mapa (n) que generaron un total de 1.236 pares de marcadores ligados en acoplamiento (k) y cuya mayor distancia fue de 41,5 cM (d), resultando $E(G) = 1.815$ cM. Por lo tanto, el porcentaje del genoma mapeado hasta el momento para el progenitor sexual sería aproximadamente del 87,6% $[(1.590,6 \text{ cM} / 1.815 \text{ cM}) \times 100]$. La cantidad de grupos de co-segregación detectados (26) con respecto al máximo teórico esperado (40) fue baja. Esto indicaría (en coincidencia con los experimentos anteriores) que posiblemente muchos sectores del genoma de la madre (Q4188) presenten herencia polisómica, lo cual disminuiría la eficiencia en la detección de los grupos de co-segregación (se requeriría un mayor número de marcadores o poblaciones de mayor número de individuos) (Wu et al. 1992, Qu y Hancock 2001).

IV.5.2- Construcción del mapa marco de Q4117

Para la construcción del mapa de ligamiento genético marco de Q4117 se utilizaron los datos de segregación de 177 marcadores ADS (1:1). El análisis de ligamiento se realizó utilizando el programa Mapmaker 3.0 en forma similar a lo descrito anteriormente aunque los grupos iniciales fueron establecidos empleando un valor umbral de $LOD = 4.0$. Los 177 marcadores incluidos en el análisis se agruparon en 42 grupos de co-segregación en la primera etapa. Posteriormente se asignaron marcadores a cada grupo empleando un valor de $LOD = 3.0$ y se analizó la posibilidad de que los grupos definidos correspondieran a un mismo cromosoma (ver Materiales y Métodos), obteniéndose 38 grupos definitivos. Luego de

establecido el ordenamiento más probable de marcadores dentro de cada grupo se fijó un marco para cada uno. En una segunda etapa se incorporaron 38 marcadores con segregación distorsionada entre los que se incluía el carácter aposporía. Veinticinco de los 38 *loci* se agruparon formando un grupo de ligamiento nuevo (grupo- apo, P17a) donde se localizó el *locus* responsable del carácter (*apo-locus*) (ver ítem IV.5.2.1 para más detalles). Otros 12 marcadores se asociaron a nueve grupos diferentes y 1 permaneció libre. Finalmente se asignaron algunos marcadores a LOD = 2.0 teniendo en cuenta lo descrito previamente.

El mapa de ligamiento genético de Q4117 quedó finalmente definido por 183 (85,1%) marcadores que se distribuyeron en 39 grupos de co-segregación de 2 o más marcadores. La distancia total cubierta fue de aproximadamente 2.265,7 cM, con una distancia promedio entre marcadores de 12,4 cM (Figura 17). Treinta y dos (14,9%) marcadores permanecieron sin asociarse a ninguno de los grupos establecidos. Los grupos de ligamiento se identificaron con la letra P seguida de un número *x* (Px). El tamaño de los mismos varió entre 11,5 y 121,1 cM y la distancia genética entre marcadores entre 0,0 y 43,9 cM. El grupo- apo, (P17a) quedó constituido por 25 *loci* con segregación distorsionada que se distribuyen sobre unos 33,8 cM. Se detectaron 10 grupos de dos marcadores (P2b, P13b, P14b, P15b, P18a, P18b, P19a, P22, P23 y P24) siendo el número promedio de marcadores por grupo (para los 28 restantes) de 4,9.

El análisis de los marcadores ligados en fase de repulsión permitió establecer los grupos homólogos que fueron identificados por una letra minúscula (*z*) seguida del número correspondiente (Pxz). En total 25 de los 39 grupos de co-segregación se asociaron definiendo 12 grupos de homólogos. El grupo-apo resultó ligado en repulsión a marcadores pertenecientes a un grupo homólogo (*apo-rep*, P17b) constituido por 4 marcadores distorsionados y dos ADS que se extienden sobre unos 104,1 cM (ver ítem IV.5.2.2 para más

detalles). Se detectaron además tres marcadores (que no pertenecían a ninguno de los grupos de co-segregación establecidos) que mostraron ligamiento en fase de repulsión con marcadores pertenecientes a tres grupos diferentes (P9a, P15a y P19a) y se sumaron al mapa.

El largo del genoma esperado [E(G)] fue de 2.707,6 cM. El cálculo se realizó a LOD score 2, se consideraron los 183 marcadores posicionados en el mapa (n) que generaron un total de 540 pares de marcadores ligados en acoplamiento (k) y cuya mayor distancia fue de 43,9 cM (d). Por lo tanto, el porcentaje del genoma mapeado hasta el momento para el progenitor apomíctico es aproximadamente del 83% $[(2.265,7 \text{ cM} / 2.707,6) \times 100]$. El hecho de que se detectó un número de grupos de co-segregación similar al máximo esperado (40) podría indicar que en este caso los sectores con apareamiento preferencial (herencia disómica) son más frecuentes que en el caso de la madre y por lo tanto la eficiencia de detección de grupos de co-segregación fue mayor en este genotipo a pesar de contar con un menor número de marcadores moleculares.

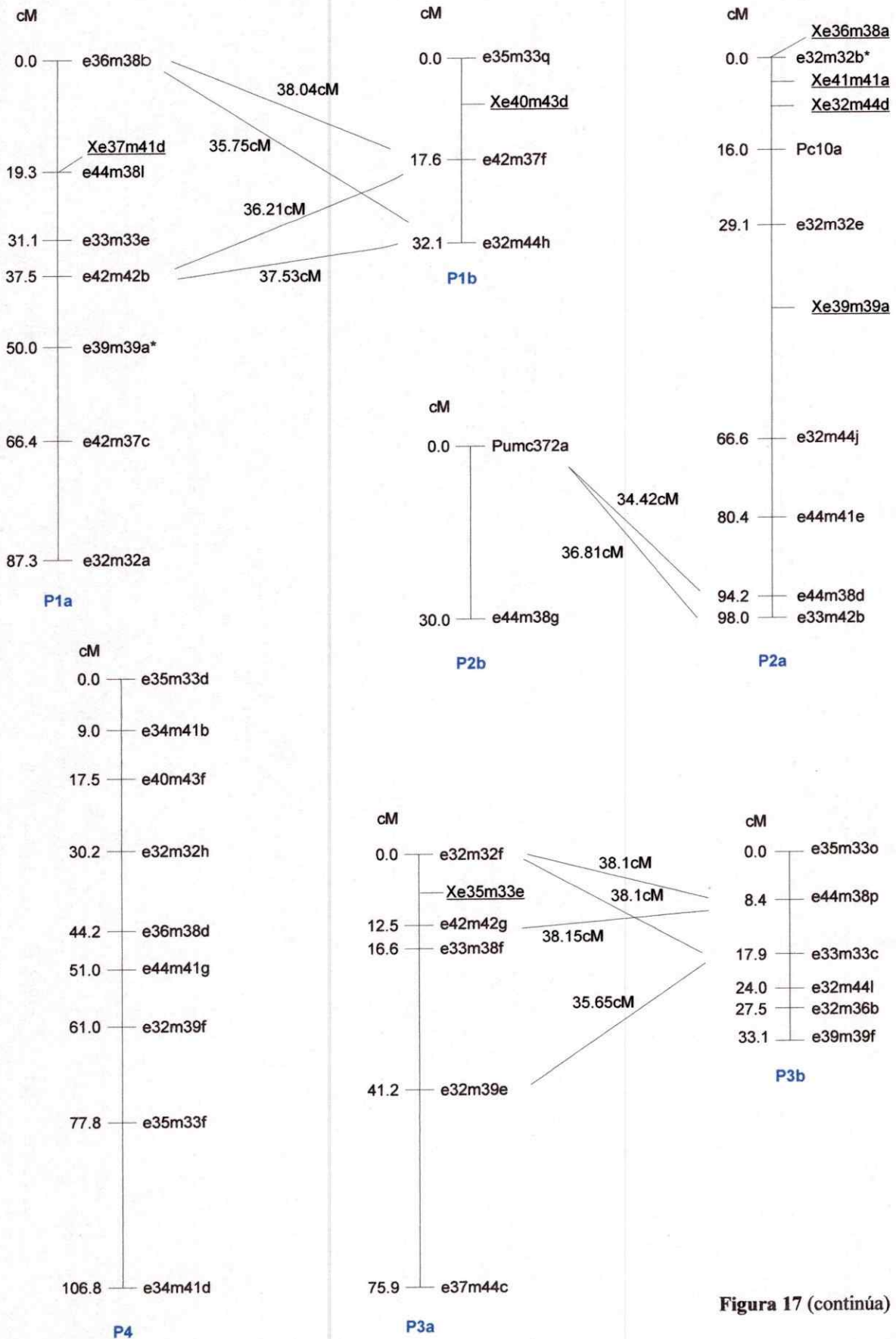
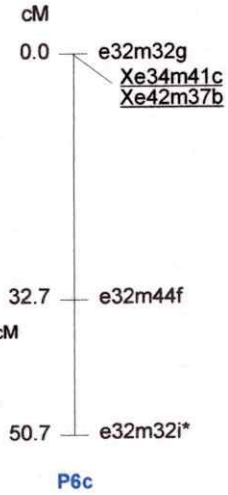
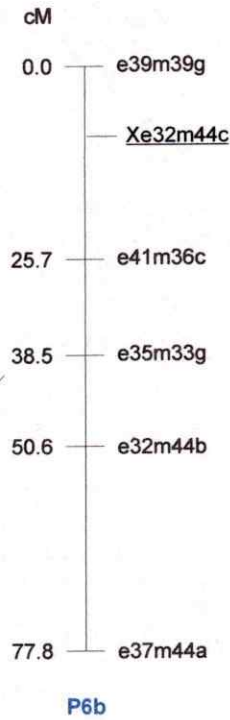
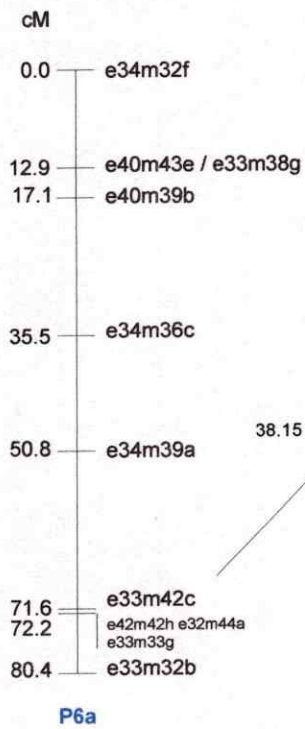
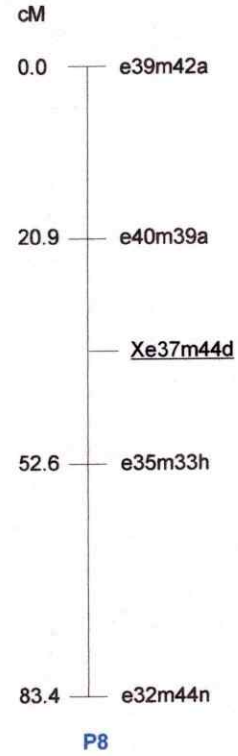
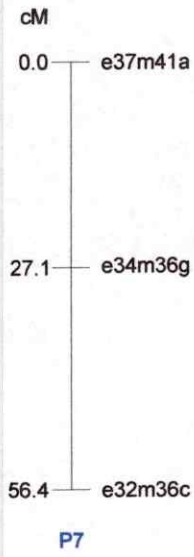
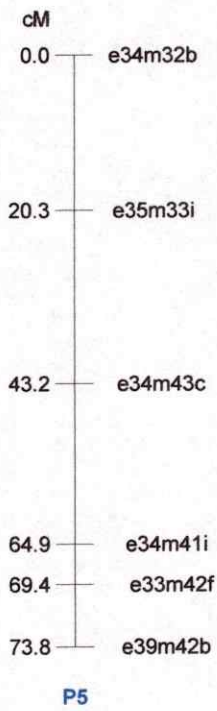


Figura 17 (continúa)



38.15 cM

37.60 cM

Figura 17 (continúa)

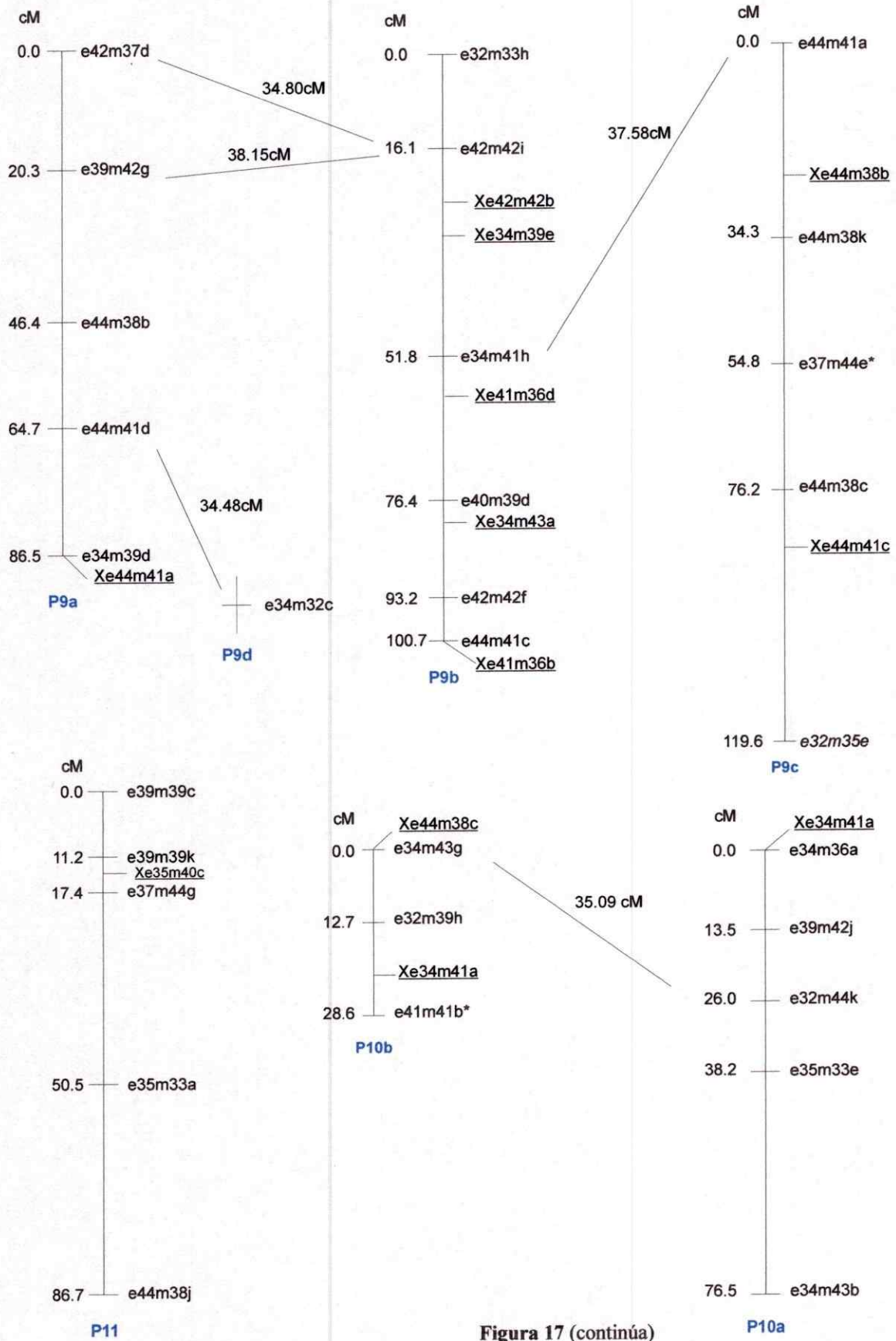


Figura 17 (continúa)

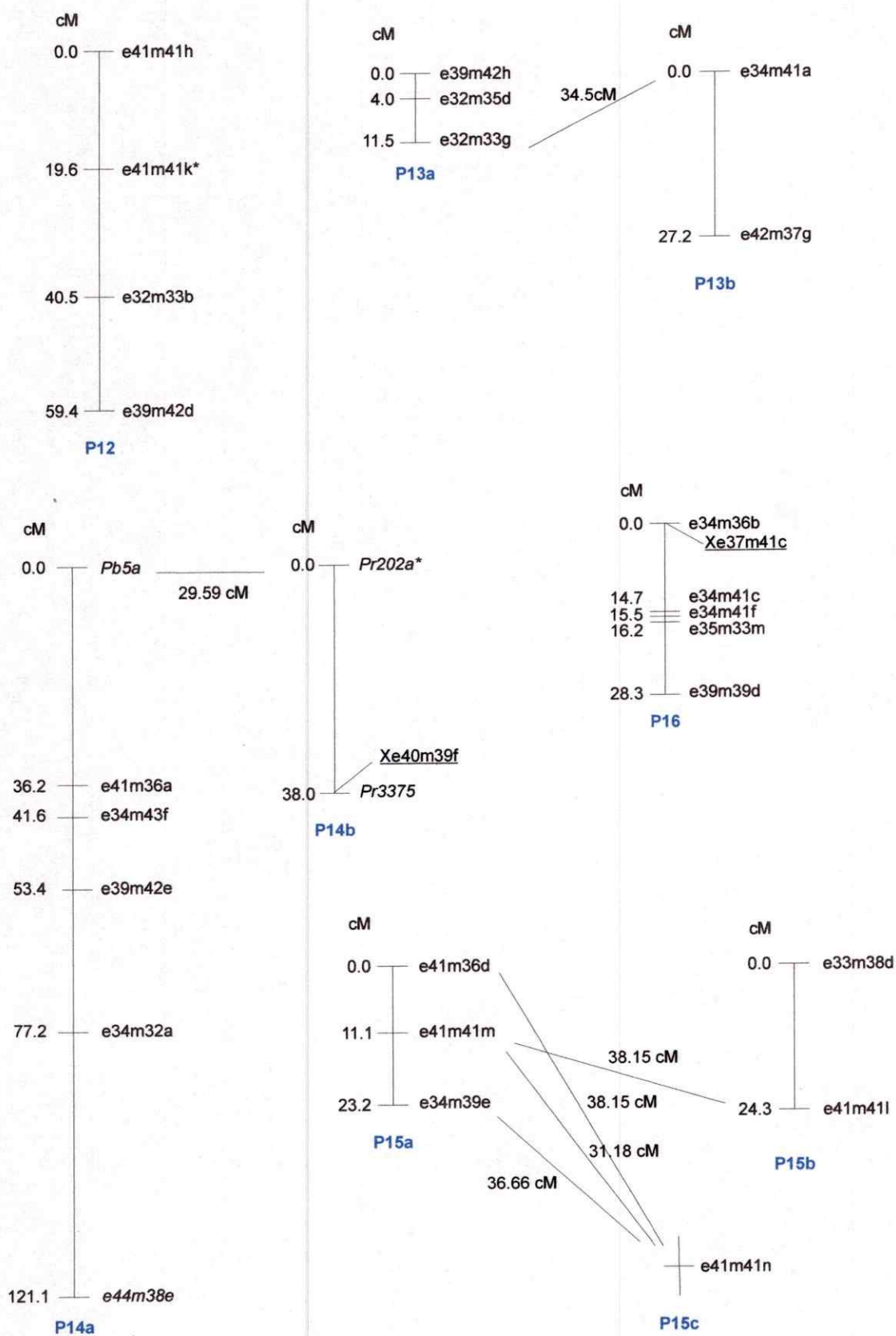


Figura 17 (continúa)

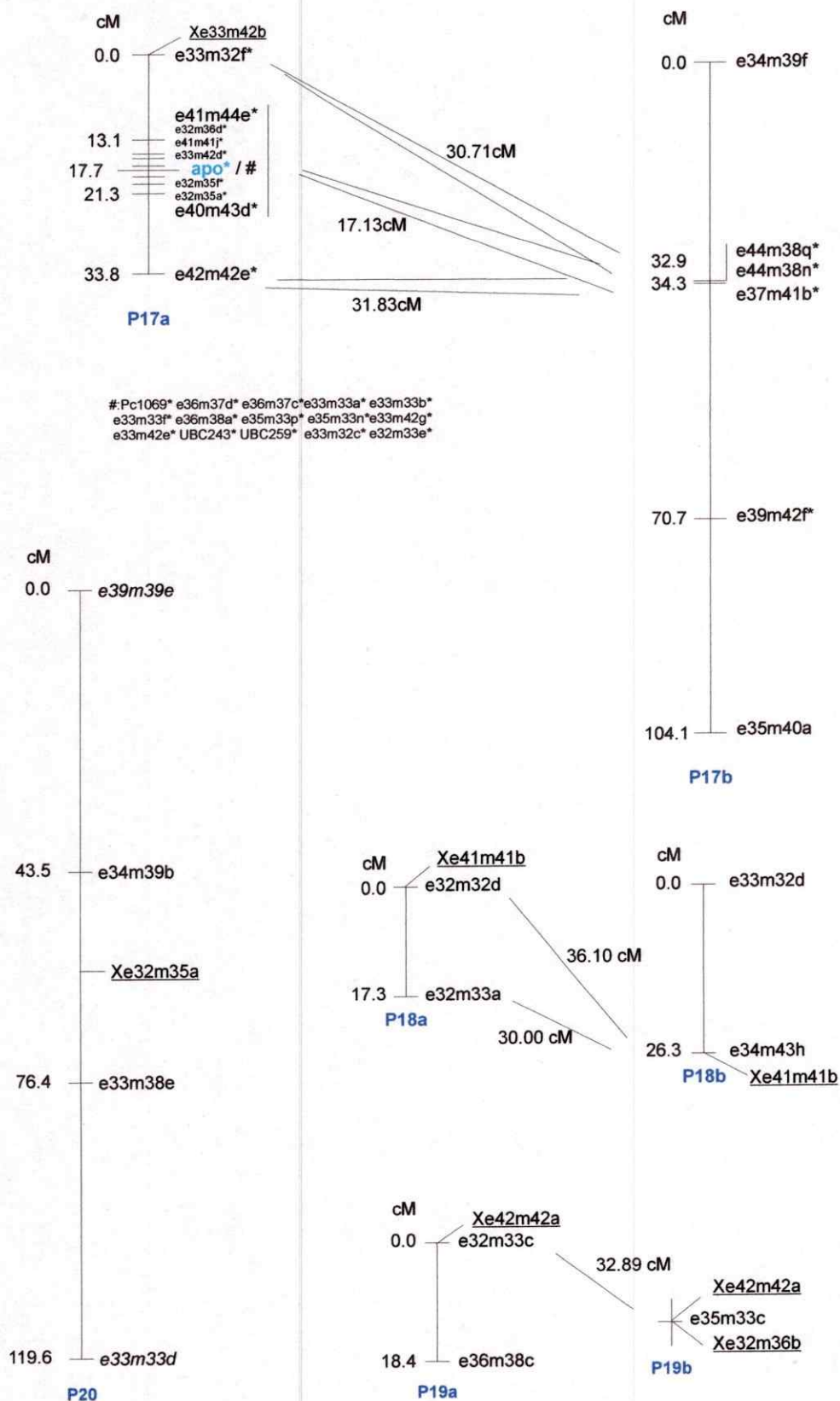


Figura 17 (continúa)

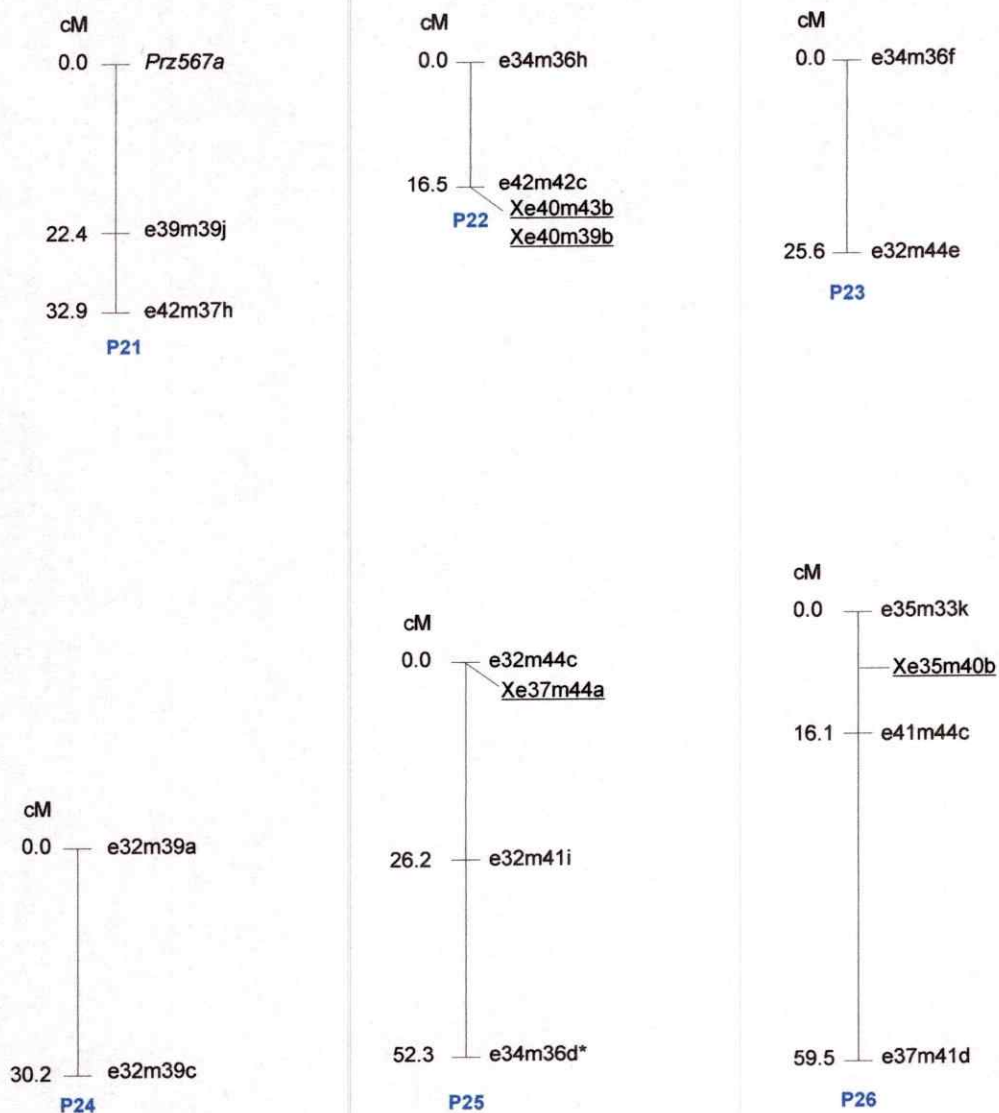


Figura 17: mapa de ligamiento genético de Q4117. Los grupos de ligamiento se construyeron usando el programa Mapamker 3.0 (LOD score = 4.0 - 3.0, theta = 0,39). El nombre de los marcadores y la distancia en cM se expresan a la derecha y a la izquierda de cada grupo, respectivamente. Los asteriscos indican los marcadores con segregación distorsionada. Los marcadores en cursiva fueron asignados a los grupos de co-segregación a LOD score = 2. Los marcadores subrayados son puentes alélicos y fueron agregados como marcadores accesorios empleando el programa Joinmap 1.4. Las líneas conectoras indican los pares de marcadores ligados en fase de repulsión. Los homólogos dentro de cada grupo de ligamiento se identifican por una letra minúscula a continuación del número del grupo. #: indica marcadores que mapean en el mismo sitio.

IV.5.2.1- Caracterización del grupo de ligamiento que incluye al control de la aposporía (grupo - apo)

En el mapa paterno se identificó el grupo de ligamiento que contiene al *locus* responsable de la aposporía (grupo-apo, P17a) mediante la combinación de los datos embriológicos y moleculares de cada individuo de la población. Todos los marcadores que forman parte del grupo - apo mostraron distorsión de la segregación. El análisis de ligamiento a LOD score 4.0 y $\theta = 0,39$ determinó que el *locus* responsable de la aposporía (*apo-locus*) y 24 marcadores mapean juntos formando un único grupo de ligamiento en fase de acoplamiento. Quince marcadores (incluyendo 12 AFLPs, 1 RFLP y los dos RADPs usados para la clasificación) resultaron completamente ligados a la aposporía y otros 7 se localizaron a ambos lados del *locus* mostrando valores de recombinación entre 0,7 y 4,6 cM. Estos marcadores definen un bloque de ligamiento-apo formado por 23 *loci* adyacentes sobre unos 8,2 cM (Figura 18). La total co-segregación entre los marcadores y el *apo-locus* sugiere una fuerte restricción de la recombinación en esta región cromosómica. Es poco probable que trabajando con una estrategia de generación de marcadores al azar y con una población de mapeo de 113 individuos, se haya saturado esta pequeña región genómica. Dos marcadores de AFLP (e33m32f y e42m42e) pertenecientes al grupo de ligamiento mapean por fuera del bloque-apo mostrando valores de recombinación de 17,7 y 16,1 cM, respectivamente.

El análisis genético para detectar marcadores ligados en fase de repulsión mostró que el bloque de ligamiento apo está ligado a 3 marcadores (e32m41b, e44m38q y e44m38n) que forman parte del grupo apo-rep (homólogo) (Figura 18). Los valores de recombinación (R) entre los marcadores del bloque-apo y los del apo-rep, resultaron entre 15,7 y 21,0 cM, siendo siempre significativamente inferiores a 33,3 cM (valor mínimo esperado para *loci* ligados en

fase de repulsión en un autotetraploide con herencia polisómica o apareamiento al azar de cromosomas homólogos) (Qu y Hancock 2001) (Tabla 11). En consecuencia se obtuvieron valores negativos de r_2 para todos los ligamientos en repulsión en esta región genómica. Los valores negativos de r_2 indican apareamiento preferencial de cromosomas durante la meiosis (herencia disómica).

Los marcadores e33m32f y e42m42e (que se encuentran separados del bloque-apo) mostraron valores promedio de recombinación de 30,7 y 31,8 con los marcadores del apo-rep. Estos valores no difieren considerablemente del R_i esperado (33,3 cM) por lo que se puede asumir que el apareamiento al azar de cromosomas se restablece aproximadamente a 16 cM hacia ambos lados del apo-locus.

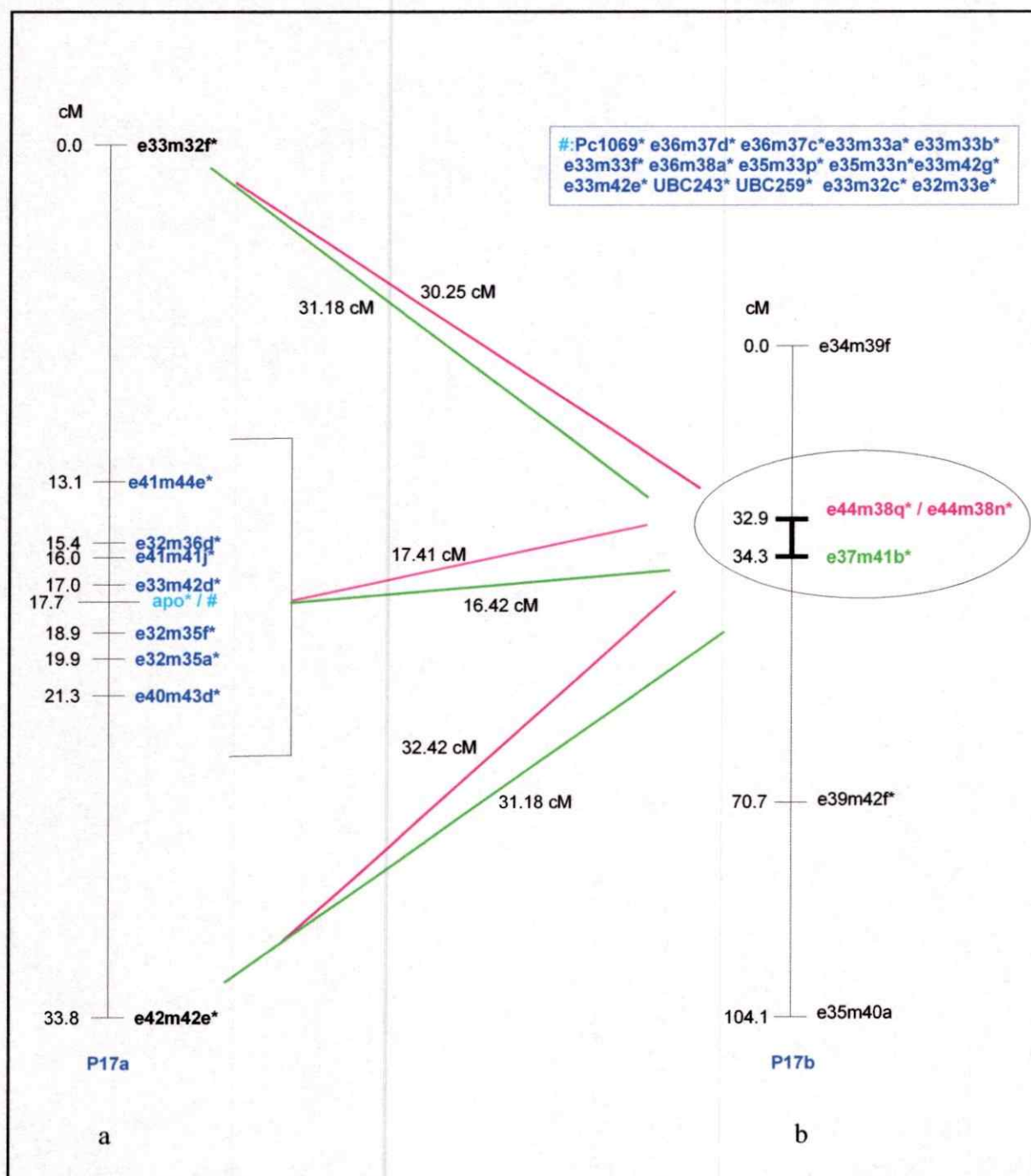


Figura 18: Grupo de ligamiento donde se localiza el locus responsable de la aposporia en *P. notatum*. a) grupo-*apo*, b) grupo *apo-rep*. Los grupos de ligamiento se construyeron usando el programa Mapmaker 3.0 (LOD score = 3.0-4.0, $\theta = 0,39$). El nombre de los marcadores y la distancia en cM se expresan a la derecha y a la izquierda de cada grupo, respectivamente. Los asteriscos indican los marcadores con segregación distorsionada. El grupo- *apo* y el sector resaltado por el círculo del *apo-rep* están dibujados a una escala 4x con respecto al resto del grupo *apo-rep*. #: marcadores que mapean en el mismo sitio.

Tabla 11: Marcadores ligados en fase de repulsión correspondientes al grupo-apo y apo-rep en el genotipo Q4117. Se utilizaron los datos de los 38 *loci* paternos que mostraron relaciones de segregación distorsionada.

Pares de marcadores ligados	Theta	LOD	cM ^a	r ₂ ^b
apo-locus ^c - e37m41b	0,15	12,78	15,82	-0,525
apo-locus ^c - e44m38p ^d	0,16	12,05	16,82	-0,494
e33m42d - e37m41b	0,17	11,35	17,84	-0,464
e33m42d - e44m38p ^d	0,18	10,68	18,86	-0,433
e41m41j - e37m41b	0,18	10,69	18,38	-0,448
e41m41j - e44m38p ^d	0,19	9,82	19,64	-0,410
e32m36d - e37m41b	0,16	12,27	16,66	-0,499
e32m36d - e44m38p ^d	0,18	10,89	18,68	-0,439
e41m44e - e37m41b	0,19	10,24	19,71	-0,408
e41m44e - e44m38p ^d	0,20	9,41	20,97	-0,370
e32m35f - e37m41b	0,16	12,27	16,66	-0,499
e32m35f - e44m38p ^d	0,15	13,00	15,67	-0,529
e32m35a - e37m41b	0,16	12,27	16,66	-0,499
e32m35a - e44m38p ^d	0,18	10,89	18,68	-0,437
e40m43d - e37m41b	0,18	10,88	18,68	-0,437
e40m43d - e44m38p ^d	0,18	10,68	18,86	-0,433
e42m42e - e37m41b	0,28	5,02	31,18	-0,064
e42m42e - e44m38p ^d	0,29	4,61	32,48	-0,025
e33m32f - e37m41b	0,28	5,02	31,18	-0,064
e33m32f - e44m38p ^d	0,27	5,28	30,25	-0,091

a: distancia en centiMorgan, calculada según la función de Kosambi.

b: $r_2 = (h - 1) (R - R_i) / 100$, siendo $h = 4$ y $R_i = 33,30$ para un autotetraploide (Qu y Hancock 2001).

c: los mismos valores corresponden para los pares con marcadores ligados 100% al apo-locus: C1069, e32m33e, e36m38a, e33m32c, UBC259, UBC243, e35m33p, e35m33n, e33m42g, e33m42e, e33m33f, e33m33b, e33m33a, e36m37c y e32m37d.

d: e44m38p y e44m38n mapean juntos, por lo tanto los valores para los pares de marcadores ligados en repulsión con e44m38p y e44m38n son los mismos.

Parte de los resultados presentados en el ítem IV.5.2.1 fueron publicados en Martínez et al. 2003 y en Stein et al. 2004.

IV.5.2.2- Clonado y secuenciación de marcadores ligados a la aposporia en *P. notatum*

Las bandas correspondientes a 8 marcadores completamente ligados a la aposporia (e36m38a*, e36m37c*, e32m33e*, e33m32c*, e33m42e*, e33m42g*, e35m33n* y e35m33p*) fueron cortadas del gel, eluidas, reamplificadas y clonadas en un vector comercial.

Los clones fueron secuenciados mediante la contratación del servicio de secuenciación de la Universidad de Maine, EEUU (los cuatro primeros) o de Macrogen Inc., Corea (los cuatro últimos) (Tabla 12). Con las secuencias obtenidas se realizaron estudios de comparación de homología por medio de Análisis de Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), tanto Blastn como Blastsx. Uno de los clones (e36m37c*) mostró similitud con los genes gag/pol de un retrotransposón de maíz (e-value 10^{-12}) indicando que secuencias móviles y repetitivas están presentes en la región responsable del carácter. El resto de las secuencias obtenidas no mostraron homología con las secuencias almacenadas en las bases de datos.

Tabla 12: marcadores de AFLP ligados a la aposporia en *Paspalum notatum* 4x.

Marcador	PM	Secuencia	Análisis de Blast ^a
e36m38a*	80 pb	gactgcgtac caattcacct caatagcaca taccacattc tcaatgtgat agtcatatgc aagtttactc aggactcatc	s.h.
e36m37c*	110 pb	gactgcgtac caattcacca agtcagtaa cgtgcggtt ttctctcgg caatcccggt agactgggt gaataagac agacctaagg cgtttactca ggactcatca	Valor-E: 2×10^{-12} (n) Genes gag/pol de un retrotransposon de maíz
e32m33e*	118 pb	gactgcgtac caattcaaca atcatcaaag actatataac cttcaaggc acaatctatc tatgtattt gtccagcct actgaaanca tgettcaacc ttactcan gactcatc	s.h.
e33m32c*	301 pb	gactgcgtac caattcaagc aaccaatcgg acccctagtg cattcactgg aacgtccgac gcctgcatt tgcagcgg cgctcattct tctctctgc cgctctgtc tagtagtga tcccagacc gttcgatag tgtaatatgc atcgatct gatctcatt tgcggcaatc ttctcaccg gaccgtccn tgtgcatcac cggattggtt ggtacgtgca aaaattcggc ttcacggcat tggcattga tgccttgggt ctctcttat acgttttact caggactent c	s.h.
e33m42e*	230 bp	gactgcgtac caattcaaga atcattaggg aagcatgaca attaccttg aaaacactaa ttgctcagg gtggtgatgc gccgagagaa gttggagaca atccgctgct agggaaagta tatcgtcggg ttattacata gaacataggt acatattat agtcgaaga ctggacaac aagtcgact attctatat ctaaaaccct actttactca ggactcatca	s.h.
e33m42g*	138 bp	gatgagtcct gagtaaagtc taaagttgt aggtactagg tagtatgtat atgaaattc ataggtgtat acttgcgcac tgtatgtatt catagctagc gcctataac tagtactact tgaattgta cgcagtca	s.h.

Marcador	PM	Secuencia	Análisis de Blast ^a
e35m33n*	114 bp	gatgagtcct gagtaaaaga actaccaat caagcgtaat attgatccta ttgacagccc atcactcaga gcacattgct tgtctactaa tctctgtgaa ttggtacgca gtca	s.h.
e35m33p*	199 bp	gatgagtcct gagtaaaagg tcaaaacgga gcgaggcagg cagcactcga aagaaaagg gattaaagtc taataatgc agtggaaaga ttctaaagg tccatgcct aatcagaagc acatcgaacc tactgtgaat gcaactgaag tccaagaaac caagaagata cctgtagtat gtgaattggt acgcagtca	s.h.

* marcadores con segregación distorsionada.

a: (n) indica homología obtenida con Blastn.

s.h.: sin homología con secuencias conocidas.

El clon e36m37c* fue utilizado como sonda y se lo hibridó contra ADN genómico de Q4188 y Q4117 digeridos por separado con *EcoRI* y *HindIII* (Figura 19). El patrón de hibridación obtenido reveló bandas discretas que se distinguen sobre un fondo chorreado característico de secuencias alta/moderadamente repetitivas. Si bien el marcador fue clonado a partir del genotipo apomítico, regiones homólogas al marcador se encuentran también en el genotipo sexual, como era de esperar dado que se trata de un sector repetitivo que puede estar localizado en diferentes regiones del genoma. Asimismo, se pueden distinguir bandas claramente polimórficas entre ambos genotipos que podrían corresponder a la región que gobierna el modo de reproducción.

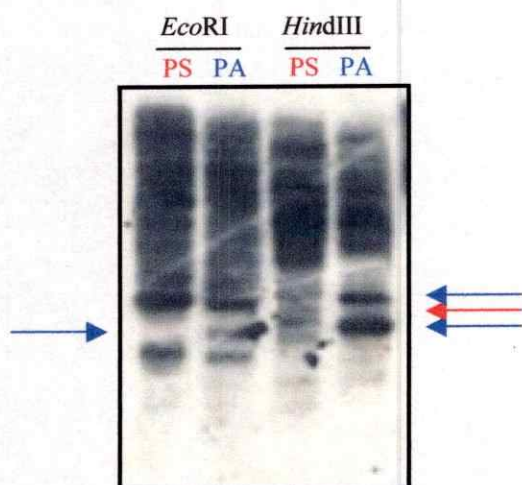


Figura 19: autorradiografía mostrando el resultado de la hibridación del clon e36m37c* contra ADN de los genotipos parentales digeridos con dos enzimas de restricción. PS: progenitor sexual, PA: progenitor apomítico. Las flechas indican las bandas polimórficas.

IV.5.3- Determinación de cromosomas homólogos de Q4188 y Q4117 en base a marcadores de tipo puente alélico

Los datos de los 60 marcadores segregantes desde ambos genotipos y que ajustaron a una relación de 3:1 (Aaaa x Aaaa) fueron incorporados a los archivos de datos de los alelos en dosis simples (ADS) correspondientes a cada progenitor utilizados para construir los mapas materno y paterno, a fin de identificar posibles grupos homólogos. Los análisis de ligamiento se realizaron usando el programa Joinmap 1.4 determinándose la asociación de 30 y 33 marcadores puentes alélicos a los grupos establecidos en Q4188 y Q4117, respectivamente. En el progenitor sexual los 30 marcadores se distribuyeron en 17 grupos de co-segregación maternos (Figura 16, marcadores subrayados). En el progenitor apomíctico los 33 marcadores se distribuyeron en 24 grupos de co-segregación paternos (Figura 17, marcadores subrayados). Los marcadores puente se incluyeron en ambos mapas como marcadores accesorios. Se posicionaron en los intervalos correspondientes (sin indicar las distancias genéticas) en los grupos de ligamiento establecidos previamente por Mapmaker 3.0, considerando a los datos de ligamiento obtenidos por Joinmap 1.4. En algunos casos el mapeo simultáneo de los marcadores puentes en grupos de co-segregación ligados en repulsión confirmó estas asociaciones detectadas previamente por el análisis de ligamientos en repulsión (por ejemplo, Xe34m41b y Xe34m36b en M1a/M1b, Xe42m42a en M5a/M5c, Xe34m41a en P10a /P10b, Xe41m41b en P18a/P18b y Xe42m42a en P19a/P19b).

Veintiún marcadores puentes alélicos mapearon en grupos pertenecientes a ambos mapas parentales permitiendo la identificación de los cromosomas homólogos entre los dos genotipos. La Tabla 13 resume los resultados obtenidos. En particular el marcador X33m42b se asoció al grupo-apo (P17a) en el mapa de Q4117 y al grupo M11a en el mapa de Q4188

indicando que el cromosoma 11 materno sería el homólogo del genotipo sexual al cromosoma paterno que contiene a *locus* determinate de la aposporia (P17a). Además, otro marcador puente alélico que mapeó en el M11a resultó ligado a marcadores del grupo P10b. Estos resultados indican que posiblemente P17a/b y P10a/b sean los cuatro cromosomas homólogos correspondientes a un grupo de ligamiento paterno (Figura 20). Debido a que no se detectaron marcadores que revelen una asociación directa entre P17 y P10, esta hipótesis debe aún comprobarse. Asimismo, los grupos de co-segregación M13/M15, P11/P19 y P18/P22 representarían grupos homólogos a pesar de no haberse detectado aún marcadores ligados en fase de repulsión entre ellos.

Tabla 13: Cromosomas homólogos identificados en Q4188 y Q4117.

Marcador puente alélico	Cromosoma de Q4188	Cromosoma de Q4117
Xe41m41a, Xe32m44d, Xe36m38a, Xe39m39a	M3 (a/b/c)	P2 (a/b)
Xe35m40c, Xe32m36b, Xe42m42a	M5 (a/b/c)	P11 + P19 (a/b)
Xe40m43b, Xe41m41b	M6 (a/b)	P18 (a/b) + P22
Xe41m36b, Xe44m41a, Xe44m41c	M8 + M18	P9 (a/b/c/d)
Xe35m33e	M9 (a/b)	P3 (a/b)
Xe40m39f	M10	P14 (a/b)
Xe33m42b, Xe44m38c	M11(a/b)	P17 (a/b) + P10 (a/b)
Xe37m41c	M12	P16
Xe32m44c, Xe42m37b, Xe34m41c	M13 + M15 (a/b)	P6 (a/bc)
Xe32m35a	M16	P20

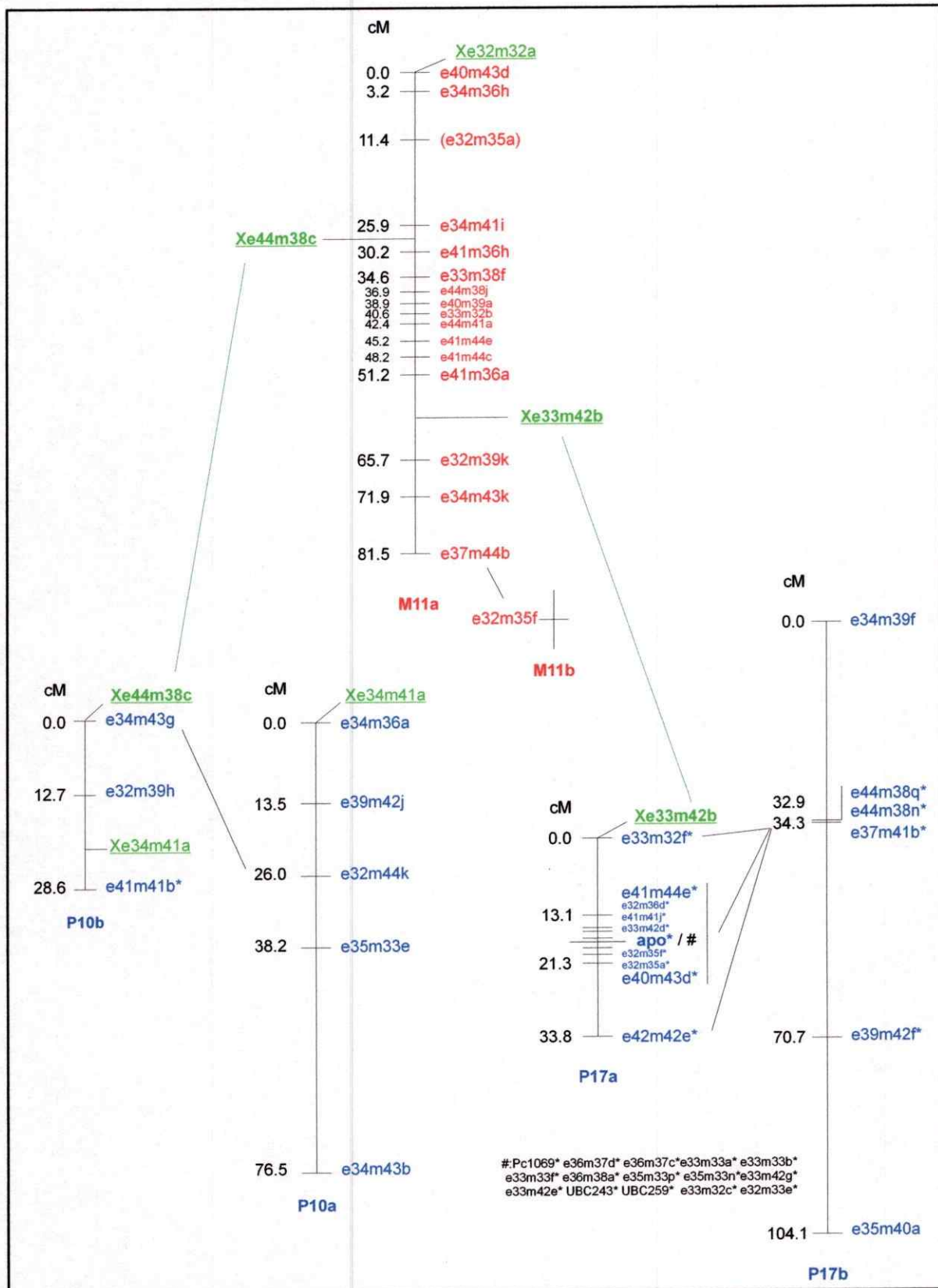


Figura 20: Cromosomas homólogos al grupo-*apo* detectados en Q4188 y Q4117. Las flechas verdes conectan los marcadores tipo puente alélico que mapean simultáneamente en los grupos de los dos genotipos. En rojo se indican los marcadores maternos, en azul los paternos y en verde los puentes alélicos. #: indica marcadores que mapean en el mismo sitio.

IV.5.4- Mapeo de sondas de RFLP

Los mapas de ligamiento genético basados en marcadores de AFLP, no se pueden utilizar directamente para realizar estudios comparativos con los genomas de especies relacionadas. El mapeo comparativo se basa en la utilización de marcadores que pueden detectar *loci* homeólogos entre distintas especies (por ejemplo, RFLP, SSR) (Ahn et al. 1993, Van Deynze et al. 1998). Por lo tanto, como primer paso para la realización de estudios comparativos se llevaron a cabo experimentos de RFLP con sondas heterólogas de arroz y maíz a fin de identificar un conjunto de marcadores que permita anclar los grupos de ligamiento de *Paspalum* y posteriormente compararlos con sus homeólogos de especies modelo. Se seleccionó un grupo de sondas distribuidas uniformemente por el genoma de arroz y algunas de maíz para ensayarlas contra el ADN genómico de ambos progenitores y detectar aquellas que muestren polimorfismos claros para el mapeo. Algunas de las sondas seleccionadas fueron localizadas previamente en el mapa diploide de *P. notatum* (Ortiz et al. 2001). Como mapa base de arroz se tomó el descrito en el *RFLP Landmarker set 1 of the Rice Genome Research Program* (<http://rgp.dna.affrc.go.jp/>), publicado por el *Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries* de Japón (MAFF). Se ensayaron además sondas del *RZ Cornell Anchor Clone Kit*, (<http://nightshade.cit.cornell.edu/probes/chromo.html>), Universidad de Cornell, NY, EEUU. Como referencia del genoma de maíz se utilizó el grupo de clones *UMC Maize Core Set*, (http://www.maizegdb.org/mnl/70/probe_bank.html) provisto por la Universidad de Missouri-Columbia, EEUU. La selección de las sondas se realizó empleando tres enzimas de restricción (*EcoRI*, *HindIII* y *PstI*) a fin de determinar cuál era la mejor combinación sonda/enzima para revelar polimorfismos entre los progenitores. Los resultados de la selección de los clones ensayados se muestran en la Tabla 14. Sobre un

total de 39 sondas (29 de arroz y 10 de maíz), sólo 9 (23,7%) evidenciaron polimorfismo entre el genotipo sexual y el apomítico (indicadas en rosa en la Tabla 14), 12 (30,8%) mostraron un patrón monomórfico (indicadas en negrita en la Tabla 14), 2 mostraron un patrón de hibridación inespecífico (indicadas en cursiva en la Tabla 14) y las 16 restantes (41,0%) no generaron patrones claros de hibridación probablemente debido a una baja homología con el genoma de *Paspalum*.

Tabla 14: Sondas de RFLP de arroz y maíz usadas para detectar polimorfismo entre los progenitores (Q4188 y Q4117) de la población de mapeo digeridos con tres enzimas de restricción.

Cromosoma de Arroz	Sonda ^a	Nº
1	C122, R117	2
2	C1408, C1221, rz273, rz 567	4
3	R1677, rz630	2
4	C891, R374	2
5	<i>R372, R1838, rz244</i>	3
7	R1440, rz753	2
8	R202, R902	2
9	C397, rz206	2
10	C1286	1
11	<i>R1506, C1172, C3, rz525</i>	4
12	C1069, R642, R1709, R449, R3375	5
Cromosoma de maíz		
1	umc107	1
2	umc106	1
5	umc147, umc72, umc372, umc382, umc90	5
6	umc132, umc21	2
7	umc168	1
Total		39

a: En rosa se indican las sondas que evidenciaron polimorfismo entre el genotipo sexual y el apomítico, en negrita las que mostraron un patrón monomórfico, en cursiva las que generaron patrones inespecíficos y el resto no evidenció hibridación.

Los 9 clones que mostraron polimorfismo entre los progenitores fueron ensayados sobre una muestra de 60-80 individuos de la F₁ y los datos de segregación de los marcadores generados se incorporaron a los archivos de datos materno y paterno según se indica en el

ítem IV.3.1. Tres clones (rz630, R642 y umc132) no pudieron ser incluidos en los análisis de ligamiento ya que las bandas polimórficas detectadas entre los progenitores no segregaron en la población de mapeo. Esto puede deberse a que los marcadores analizados en dichos casos (1 materno y 3 paternos) podrían tener configuraciones de alelos en dosis triple o cuádruple (AAAa o AAAA) en los genotipos parentales. Los otros 6 clones (rz273, rz567, R202, C1069, R3375 y umc372) generaron en total 6 marcadores maternos, 6 paternos y 1 materno/paterno. En la Tabla 15 se compara la localización de los marcadores generados por estas sondas en los mapas de *P. notatum* 4x, *P. notatum* 2x, arroz y maíz.

Tabla 15: Localización de clones de arroz y maíz en el genoma de *Paspalum notatum*.

Sonda	Cromosoma	Cromosoma	GL.	GL. <i>P. notatum</i> 4x	GL. <i>P. notatum</i> 4x
	Arroz	Maíz	<i>P. notatum</i> 2x	sexual	Apomítico
Rz 273	2	5	4, 5, 7	M5a	-
Rz 567	2	5	-	M17	P21
R202	8	-	-	-	P14b
C1069	12	-	-	-	P17a
R3375	12	-	-	-	P14b
umc 372	-	5	-	M5a	P2b

El clon C1069 perteneciente al cromosoma 12 de arroz generó un marcador de RFLP completamente ligado a la aposporia (Figura 21), confirmando resultados anteriores que indican que el *apo-locus* está asociado a sondas que mapean en el cromosoma 12 de arroz en *P. notatum* y en *P. simplex* (Martínez et al. 2003, Pupilli et al. 2004). Un estudio reciente de las secuencias de cromosoma 11 y 12 de arroz reveló que el clon C1069 corresponde a una presunta proteína de un transposón perteneciente a la sub-clase mutador (*mutator*) (gi: DP000011.1). El resultado obtenido indica nuevamente que existen secuencias móviles en la región responsable de la aposporia en *Paspalum notatum*.

Por otro lado, otra sonda de cromosoma 12, R3375, mapeó en el grupo P14b ligada al marcador generado por la sonda R202 del cromosoma 8 de arroz. Estas sondas no generaron marcadores maternos por lo que no se las pudo ubicar en el mapa de Q4188.

Los clones rz567 y umc372 pertenecientes a cromosoma 5 de maíz mapearon en dos grupos diferentes en el genotipo apospórico de *Paspalum 4x*. En el genotipo sexual Q4188 sólo se pudieron localizar 3 sondas de cromosoma 5 de maíz: rz567 fue asignada al grupo M17 y las otras dos (rz273 y umc372) mapearon en el grupo M5a, en extremos opuestos, coincidiendo con la posición que ocupan en el cromosoma de maíz.

Un punto interesante a destacar es que sondas del cromosoma 2 (C932 y C560) y 12 de arroz (C1069, C454) fueron asociadas a la aposporia en *P. notatum* (Pupilli et al 2004) y sondas de cromosoma 5 de maíz y 2 de arroz (entre las que se encuentran umc372, rz567 y rz273) resultaron asociadas a la aposporia en *Brachiaria* (Pessino et al. 1997 y 1998). Los resultados obtenidos en el presente trabajo de Tesis confirmaron la asociación del clon C1069 con la aposporia pero no se pudo detectar ligamiento al carácter de ninguna de las sondas de cromosoma 2 de arroz y 5 de maíz ensayadas.

Dado el bajo número de sondas ancladas que pudieron asignarse al genoma de *Paspalum* en este trabajo, no es posible hacer inferencias sobre la estructura del genoma de esta especie con relación a las especies modelo. Será necesario continuar con el análisis y localizar un número mayor de clones para obtener conclusiones en este punto.

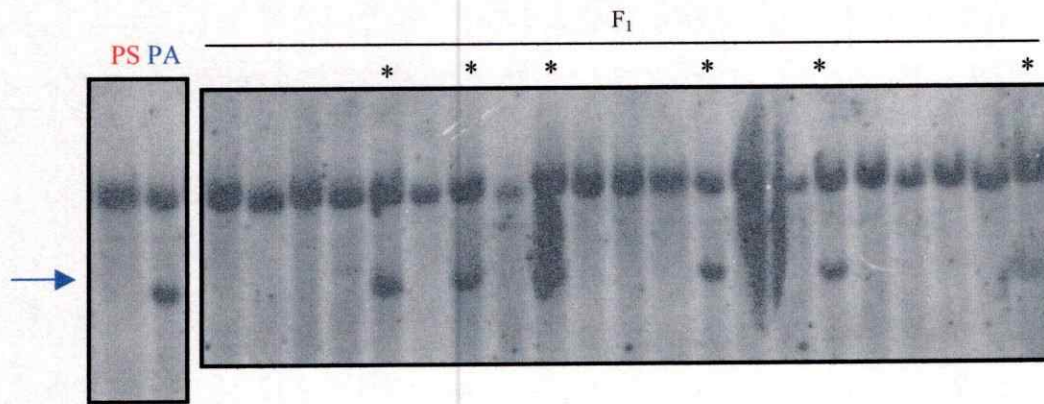


Figura 21: Segregación de un marcador de RFLP en una muestra de la población de mapeo. Se muestra la autorradiografía de una membrana revelada por el método no radiactivo. El ADN de los progenitores y 21 individuos F₁ (58-60, 62-78, 86) se digirió con *Hind*III y se usó como sonda el clon C1069 del cromosoma 12 de arroz. Los asteriscos indican las calles donde se sembró ADN de individuos apomícticos. La flecha indica el fragmento polimórfico detectado en el progenitor masculino y que co-segrega con el carácter en estudio

IV.5.5- Mapeo de transcritos de ARNm relacionados con la aposporia

Tres clones de cDNA derivados de transcritos específicos del desarrollo de flores (1 obtenido a partir del progenitor sexual y 2 del apomíctico) de *Paspalum notatum* (Pessino et al. 2001) y siete (6 derivados de ovarios apomícticos y 1 de ovarios sexuales) de *Brachiaria* sp. (Rodrigues et al. 2003) fueron ensayados en la población de mapeo a fin de determinar su posición en el mapa genético de la especie (Tabla 16). Los clones de *Brachiaria* fueron cedidos por la Dra. Vera Carneiro del EMBRAPA Brasilia, con la cual se llevan a cabo trabajos en colaboración desde hace aproximadamente 10 años (Ortiz JPA, comunicación personal).

Tabla 16: transcritos de ARN, obtenidos por exposición diferencial, específicos del desarrollo de ovarios apomícticos y sexuales ensayados por RFLP.

Sonda	Origen del ARNm /estadio desarrollo		Homología de secuencia
	<i>P. notatum</i>	<i>Brachiaria sp.</i>	
C10	Apo / saco embrionario maduro	-	kinesina KatD de flores de <i>Arabidopsis thaliana</i>
B5	Apo / inicio de megasporogénesis	-	Proteína, pequeña rica en repeticiones tetratricopéptido de gln, SGT de <i>A.thaliana</i>
S4	Sex / inicio de megasporogénesis	-	
5G	-	Apo/megasporogénesis y megagametogénesis	
7G	-	Apo/megagametogénesis	
18G	-	Apo/megagametogénesis	cadena pesada de miosina de <i>Arabidopsis thaliana</i>
20G	-	Apo/megasporogénesis	
30G	-	Apo/megasporogénesis	
34G	-	Apo/megasporogénesis y megagametogénesis	
56G	-	Sex/megagametogénesis	

Como una forma rápida de determinar asociaciones entre posibles marcadores y el carácter aposporia se realizó un análisis de segregantes en grupo (Michelmore et al. 1991) utilizando parte de los individuos de la población segregante. Para esto se construyeron *in vitro* dos mezclas de ADN (sexual, GS y apomíctico, GA) combinando cantidades iguales de ADN genómico de 10 individuos F₁ clasificados como sexuales y aposporicos. El ADN de los progenitores y de ambos grupos (GS y GA) fue digerido con tres enzimas de restricción diferentes (*EcoRI*, *HindIII* y *PstI*) y se prepararon los filtros según se detalla en materiales y métodos. Esta estrategia permitió determinar cuál era la mejor combinación sonda/enzima que revela polimorfismo entre los progenitores y además detectar posibles ligamientos entre los clones analizados y el carácter aposporia en el mismo paso (si el polimorfismo detectado entre los genotipos parentales se repitiera entre GS y GA).

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 17. Respecto a los marcadores homólogos únicamente se pudo detectar polimorfismo entre los progenitores cuando se

hibridó con los clones C10 y B5, pero ninguno de los dos marcadores fue polimórfico en el GS o el GA. La hibridación del clon C10 a un filtro de mapeo con ADN digerido con *HindIII* permitió la detección de tres marcadores ADS (uno materno y dos paternos). Uno de los marcadores paternos resultó ligado al grupo de ligamiento P2a en el mapa del progenitor apomítico quedando el otro sin asociarse a ninguno de los grupos y el marcador materno mapeo en el grupo M3c. Ambos marcadores se posicionaron en grupos de ligamiento homólogos entre Q4117 y Q4188 (ver Tabla 13). El clon B5 generó un marcador materno y otro paterno que mapearon en los grupos M9a y P14a, respectivamente.

De los 7 clones analizados de *Brachiaria* el clon 18G fue el único que detectó polimorfismo entre los progenitores, aunque no entre GS y GA. El marcador se ubicó en el grupo M6a del mapa del genotipo materno.

Estos resultados indican que si bien C10, B5 y 18G corresponden a genes involucrados en el desarrollo apomítico, no son los disparadores genéticos del carácter.

Tabla 17: Resultado de las hibridaciones de los clones de ADNc, provenientes de transcritos de ARN diferenciales entre genotipos sexuales y apospóricos, en la población de mapeo.

Sonda	Análisis de segregantes en grupo		Mapeo	
	Hibridación Q4188 / Q4117	Hibridación GS / GA	Marcadores ADS detectados	Posición en mapa de <i>P.</i> <i>notatum</i> 4x
C10	Polimórfica	Monomórfica	3 (2 paternos y 1 materno)	P2a M3c
B5	Polimórfica	Monomórfica	2 (1 paterno y 1 materno)	P14a M9a
S4	Monomórfica	Monomórfica	-	-
5G	Inespecífica	Inespecífica	-	-
7G	No Híbrido	No Híbrido	-	-
18G	Polimórfica	Monomórfica	1 (materno)	M6a
20G	Monomórfica	Monomórfica	-	-
30G	Monomórfica	Monomórfica	-	-
34G	Monomórfica	Monomórfica	-	-
56G	No Híbrido	No Híbrido	-	-

Es importante destacar que de las 7 secuencias de *Brachiaria* utilizadas, 2 (7G y 56G) no hibridaron, 1 (5G) produjo una hibridación inespecífica, 3 (20G, 30G y 34G) hibridaron muy débilmente y sólo una (18G) generó bandas claras. Los resultados obtenidos indican una homología baja entre los transcritos de ARN de *Brachiaria* sp. y el ADN genómico de *P. notatum*. Estos patrones de hibridación (débiles o inexistentes) no variaron incluso cuando la temperatura de hibridación se bajó a 50° C y se aumentó la concentración de la sonda durante las hibridaciones.

V- DISCUSION

V.1- Población de mapeo y segregación de la aposporía en *Paspalum notatum* tetraploide

El desarrollo del mapa de ligamiento genético de *Paspalum notatum* a nivel tetraploide y la caracterización genética y molecular de la herencia de la aposporía en la especie se basaron en la generación de una población de mapeo obtenida a partir del cruzamiento entre un genotipo sexual de origen experimental (Q4188) y uno apomítico obligado (Q4117), conjuntamente con la generación de marcadores de AFLP y la detección de alelos en dosis simples. La disponibilidad de la planta Q4188 (tetraploide sexual) permitió la creación de una familia F₁ euploide (del mismo nivel de ploidía) e intraespecífica de 113 individuos segregante por el modo de reproducción que permitió tanto la comprobación del modelo de herencia del carácter aposporía propuesto para la especie así como la identificación de la región genómica responsable del carácter. La clasificación de los individuos de acuerdo a su modo de reproducción por técnicas embriológicas y moleculares mostró una relación de 6,5:1 de plantas sexuales vs. apospóricas. Esta relación de segregación puede explicarse por el modelo de herencia propuesto por Martínez et al. (2001). Como se mencionó anteriormente, los autores plantearon que en la especie el carácter estaría controlado por un gen simple dominante con distorsión de la segregación, posiblemente debida a una letalidad parcial asociada a las gametas que llevan el/los factores determinantes de la aposporía o bien, a un

efecto letal pleiotrópico con penetrancia incompleta de un gen mayor. Los resultados obtenidos corroboran que un solo *locus* es el responsable del carácter, debido a que sólo se detectó una región del genoma asociada al fenotipo apospórico y confirmaron la fuerte distorsión en la segregación asociada al mismo, que se desvía significativamente de los valores esperados para un factor dominante simple. Distorsiones de la segregación asociada a la apomixis han sido descritas también en otras gramíneas sugiriendo que ésta es una característica común en varias especies (Grimanelli et al. 1998b, Roche et al. 2001).

Considerando el modelo propuesto para *Paspalum*, la presencia de un número menor al esperado de individuos F_1 apospóricos en la población de mapeo podría deberse a una letalidad gamética, a una letalidad cigótica o bien a una falla en alguno de los procesos de la fecundación. Se realizaron análisis citogenéticos y de viabilidad de los granos de polen de los genotipos parentales a fin de estudiar el comportamiento de las gametas de los progenitores sexual y apomíctico. El análisis citogenético mostró que en los dos genotipos los cromosomas se asocian mayoritariamente formando cuádris y bivalentes. En la raza apospórica (Q4117) se observaron alteraciones meióticas que podrían deberse a la presencia de un segmento invertido en uno de los cromosomas. Este re-arreglo cromosomal puede ser una inversión paracéntrica, localizada cercana al centrómero, ya que uno de los homólogos de un bivalente permanece frecuentemente unido luego de la metafase I y muestra separación retrasada. No se detectaron evidencias de inversiones en el genotipo sexual Q4188. Es sabido que las inversiones pueden causar letalidad gamética y supresión del entrecruzamiento en el segmento cromosómico invertido (Brown 1972, Russell 1996). Los individuos heterocigóticos para una inversión son generalmente perfectamente viables debido a que la inversión no conlleva a una pérdida o ganancia neta de material genético. Sin embargo, la heterocigosis para una inversión tiene importantes efectos genéticos y citológicos (Suzuki et al. 1996). Las consecuencias

genéticas dependen de que se den dentro de la inversión uno o más entrecruzamientos, siendo éstos últimos menos probables (Lacadena 1988). Los individuos con inversiones paracéntricas (las que no incluyen al centrómero) forman durante la meiosis bucles de inversión en los cromosomas homólogos apareados. La recombinación dentro del bucle produce la conexión de los centrómeros homólogos por medio de un puente dicéntrico y además, produce un fragmento de cromosoma acéntrico (sin centrómero). Así, cuando los cromosomas intentan separarse durante la anafase I, los centrómeros permanecen unidos a través de un puente de cromatina. El fragmento acéntrico no puede migrar y por lo tanto se pierde. El puente puede permanecer intacto hasta mucho tiempo después de la anafase I. Cuando comienza la segunda división meiótica las cromátidas que no intervinieron en la recombinación se separan mientras que el puente puede permanecer unido o bien, romperse aleatoriamente generando fragmentos incompletos del cromosoma original que darán lugar a gametas defectuosas en cuanto al contenido genético, que en la mayoría de los casos resultan inviables. En cualquier caso, la consecuencia genética para una inversión heterocigota es la recuperación selectiva de gametas conteniendo cromátidas no recombinantes. Además, los heterocigotos para una inversión suelen tener problemas mecánicos para aparearse en la región de la inversión, esto también reduce los entrecruzamientos y la frecuencia de recombinantes en las regiones vecinas (Suzuki et al. 1996). Sumado a esto, los estudios de viabilidad de polen indicaron que el promedio de granos de polen no viables difiere significativamente entre los genotipos sexual (22,6%) y apomíctico (38,6%). Estos hallazgos explicarían al menos en parte la distorsión de la segregación observada en la transmisión de la aposporía y la existencia de un factor letal con penetrancia incompleta asociado a las gametas que transmiten la aposporía en la especie.

V.2- Tipo de herencia en las razas tetraploides de *Paspalum notatum*

El análisis citogenético de Q4188 y Q4117 indicó que una alta proporción de cromosomas forman asociaciones cuadrivalentes. Esta configuración es una fuerte indicación del origen autotetraploide de la especie, como fuera sugerido previamente por Forbes y Burton (1961) y Quarín et al. (1984). Sin embargo, debido a que la proporción de cromosomas formando cuadrivalentes varía ampliamente (20-80 y 10-80% en Q4188 y Q4117, respectivamente) y a la presencia frecuente de cromosomas formando asociaciones bivalentes, no estaba del todo establecido el tipo de segregación (disómica o tetrasómica) presente en estas razas (Stein et al. 2004).

El análisis de segregación de los marcadores moleculares evidenció la presencia de 27 *loci* maternos y 39 paternos con configuración de alelos en dosis doble (ADD) que ajustaron a una relación de segregación de 5:1 típica de un autotetraploide. Varios de estos marcadores ajustaron simultáneamente a una relación 3:1 (Tabla 6) aunque esto podría deberse a la imposibilidad de discriminar entre ambos tipos de segregaciones considerando el tamaño de la población utilizada. Teniendo en cuenta estos resultados y la presencia de varios marcadores cuya segregación ajustó exclusivamente a una relación 5:1 es posible afirmar que la especie presenta una herencia de tipo polisómica (tetrasómica). Los valores de segregación sólo pueden explicarse considerando los 4 cromosomas como homólogos y segregación al azar de los mismos en la meiosis. Es de destacar, sin embargo, que se obtuvieron también 27 ADD cuyas relaciones de segregación ajustaron exclusivamente a 3:1. Posiblemente, dichos marcadores se localizan en regiones genómicas donde ocurre apareamiento preferencial de cromosomas ya que esta relación de segregación corresponde exclusivamente a una herencia disómica. Estos resultados están de acuerdo con la observación de una proporción

relativamente alta de asociaciones de cromosomas en configuraciones bivalentes. Como los ADD no se pueden mapear por la metodología convencional, no se los pudo asignar a ninguno de los grupos de ligamiento definidos en este trabajo y por lo tanto es aún desconocido si corresponden a regiones genómicas específicas o si se encuentran distribuidos a lo largo del genoma. En frutilla se ha demostrado a nivel molecular la presencia de regiones cromosómicas puntuales (PG1 y genes de resistencia a *Phytophthora fragariae*) con herencia disómica (Arulsekhar et al. 1981, Haymes et al. 1997). Asimismo, en un estudio reciente, a partir de los datos de segregación de marcadores moleculares de AFLP, se determinó que la frutilla octoploide *Fragaria x annnassa*, muestra un comportamiento meiótico mixto, con regiones presentando herencia disómica y otras con herencia polisómica (Lerceteau – Köhler et al. 2003).

Por otro lado, el análisis de los marcadores presentes en dosis simple (ADS) para determinar el tipo de herencia de la especie arrojó resultados contundentes. Las relaciones entre el número de pares de marcadores ADS ligados en fase de repulsión vs. acoplamiento fueron 0,04:1 para el genotipo materno y 0,11:1 para el paterno, indicando un tipo de herencia polisómica para ambas razas. En especies tetraploides, trabajando con poblaciones de 75 individuos o más, la proporción de ligamientos que se pueden detectar en fase de repulsión y acoplamiento es la misma si la especie es alotetraploide (1:1). Sin embargo, si se trata de un autotetraploide la proporción de ligamientos detectables en fase de repulsión es aproximadamente un cuarto de los ligamientos en fase de acoplamiento (0-0,25:1) (Wu et al. 1992). Asimismo, los parámetros genéticos asociados (R y r_2) a los pares de marcadores ligados en fase de repulsión indicaron una segregación al azar de los cromosomas durante la meiosis en ambos genotipos según lo descrito por Qu y Hancock (2001). Estudios similares permitieron determinar el tipo de herencia presente en otras especies poliploides como ser

Fragaria ananassa (Lerceteau-Köhler et al. 2003) y *Panicum virgatum* (Missaoui et al. 2005).

Resumiendo, los resultados obtenidos por las diferentes metodologías (presencia de cuadrivalentes, marcadores ADD con segregación 5:1 e índices entre 0-0,25:1 para ligamientos en repulsión) indican que las razas tetraploides de *Paspalum notatum* presentan en general una herencia tetrasómica, pero que existen sectores del genoma con herencia disómica. Los resultados confirman el origen autopoliploide de la especie como fuera anticipado por Forbes y Burton (1961) e indican que las razas poliploides están sufriendo un proceso gradual de diploidización.

La presencia frecuente de cromosomas formando asociaciones bivalentes se explicaría considerando que ocasionalmente los homólogos en los autopoliploides pueden por azar asociarse formando bivalentes en vez de multivalentes. Estudios citogenéticos realizados en *Vaccinium corymbosum* demostraron que si bien la especie mostraba un alto número de cromosomas en configuración de bivalentes, cuando se estudió el tipo de herencia usando marcadores moleculares ésta resultó ser de tipo polisómica (los bivalentes se formaban al azar en cada evento de meiosis) (Qu y Hancock 1998). Esto llevó a los autores a plantear que la mera presencia de cromosomas formando una u otra configuración (bivalentes o multivalentes) durante la meiosis no pueda considerarse en sí como un indicador confiable de que las especies de origen alopoliploide presenten siempre herencia disómica y las autopoliploides herencia polisómica.

V.3- Mapas de ligamiento genético de razas tetraploides de *Paspalum notatum*

La construcción de mapas de ligamiento genético de especies poliploides es bastante más compleja que la de especies diploides: se necesitan métodos estadísticos más elaborados y poblaciones segregantes de gran número de individuos a fin de obtener estimaciones de distancias confiables. Además, en general la constitución genómica de las especies poliploides es desconocida. En las especies alopoliploides los cromosomas homólogos se aparean específicamente durante la meiosis, por lo tanto la genética de estas especies es similar a la de los diploides, excepto por los múltiples genomas. En las especies autopoliploides los cromosomas de un mismo grupo de homólogos se aparean al azar durante la meiosis, por lo que además de presentar un número mayor de combinaciones alélicas posibles, el problema en la construcción de los mapas genéticos es doble: los *loci* se deben ordenar a lo largo de cada uno de los cromosomas y luego los cromosomas se deben asignar a los diferentes grupos de homólogos (Ripol et al. 1999).

La estrategia para la construcción del mapa genético de razas tetraploides de *Paspalum notatum* se basó en la utilización de una población de mapeo segregante por el modo de reproducción derivada de genotipos altamente heterocigotas y de marcadores moleculares de AFLP segregantes como alelos en dosis simple. Este tipo de población se considera como una pseudo-retrocruza (*pseudo-testcross*) de doble entrada, ya que cada genotipo parental se comporta como “tester” (control) del otro y viceversa, a pesar de que la configuración de los genotipos sea desconocida (Ritter et al. 1990, Grattapaglia y Sederoff 1994). La utilización como progenitores de la población de 2 individuos tetraploides con distinto modo de reproducción derivados de poblaciones naturales y de diferente origen, permitió contar con un alto grado de polimorfismo en ambos progenitores, lo cual facilitó la obtención de marcadores

moleculares informativos y de un número suficiente de alelos en dosis simples como para cubrir una buena proporción de ambos genomas (materno y paterno). Se desarrollaron 2 mapas genéticos independientes (mapa materno y paterno) a partir de la información de segregación derivada de ambos progenitores (meiosis femenina y masculina).

El análisis de ligamiento de los marcadores de AFLP resultó en la detección de 26 y 39 grupos de ligamiento en fase de acoplamiento (grupos de co-segregación) en los mapas materno y paterno, respectivamente, de los 40 grupos teóricos esperados ($2n = 4x = 40$), para la especie. Esto se debe a que a pesar de que ambos genomas fueron cubiertos en una alta proporción (87% y 83,5%), el mapeo no fue aún lo suficientemente denso como para detectar todos los cromosomas. Una indicación de esto es el número de marcadores que permaneció sin asociarse a ninguno de los grupos de ligamiento formados en ambos casos, sugiriendo que los mismos estarían localizados en regiones del genoma que aún no han sido cubiertas.

La distribución de los marcadores distorsionados fue diferente en los dos genotipos. Si bien en ambos mapas varios marcadores (10 en el materno y 8 en el paterno) se distribuyeron en diferentes grupos, en el mapa paterno 29 de los 38 *loci* distorsionados mapearon juntos en el grupo P17 (25 en el P17a y 4 en el P17b), resultando el P17a el grupo donde se localizó el *locus* responsable de la aposporia en Q4117 (grupo- apo). Esta alta concentración de marcadores con segregación distorsionada en la región donde se encuentra el *apo-locus* confirma la distorsión en la transmisión del carácter observada en la progenie F₁.

El análisis de marcadores en fase de repulsión permitió el establecimiento de los grupos de homólogos en ambos mapas. En el genotipo sexual se formaron 7 grupos de ligamiento con al menos 2 grupos homólogos, quedando 12 grupos sin asociarse. En el genotipo apomíctico se obtuvieron 12 grupos de ligamiento con al menos 2 grupos de co-segregación, permaneciendo 14 sin asociarse. Si bien el número esperado de grupos de

homólogos es 10 ($x = 10$) y dentro de cada grupo se deberían encontrar hasta un máximo de 4 homólogos, sólo se pudieron identificar grupos constituidos por 2 y 3 grupos de co-segregación e incluso en algunos casos solo se detectó un marcador unido en fase de repulsión que indicaría el grupo homólogo (M1b, M9b, M11b, P9d, P15c y P19b). Posiblemente, a medida que la densidad de marcadores se incremente, estos marcadores libres se asociarán a sus grupos de co-segregación correspondientes permitiendo completar los 10 juegos de 4 cromosomas homólogos esperados.

Como se mencionó anteriormente, la eficiencia de la detección de marcadores ligados en fase de repulsión en especies autoploiploides es muy baja comparada con los ligamientos en fase de acoplamiento (Wu et al. 1992). Esto se debe a que las progenies recombinantes para un par de alelos ligados en fase de repulsión pueden provenir de la segregación al azar de los cromosomas durante la meiosis o bien por entrecruzamiento de los cromosomas que llevan los *loci* considerados. De esta manera, los ligamientos en repulsión no pueden ubicarse directamente en un mapa. Como criterio general Qu y Hancock (2001) propusieron que para la localización de estos *loci* (marcadores) se deben cumplir tres condiciones: i) cada par de marcadores se debe analizar independientemente, ii) el grado de apareamiento preferencial de la especie debe conocerse (en el caso de *Paspalum* es desconocido) y iii) la distancia genética se debe expresar en r_2 (% de recombinación debida exclusivamente al entrecruzamiento) y no en R (distancia total observada). De acuerdo a estos antecedentes, los grupos de co-segregación asociados en grupos de homólogos no fueron integrados en un único grupo de ligamiento ya que esto podría modificar las distancias relativas entre marcadores establecidas con los alelos en dosis simples y por lo tanto distorsionar la estructura de los grupos obtenidos (Qu y Hancock 2001).

Los mapas del genotipo sexual y el apomítico muestran una clara diferencia en cuanto al número de grupos detectados, largo del genoma y a la distribución de los marcadores en los mismos. Si bien el número de marcadores mapeados en el genotipo materno es mayor que en el paterno (233 vs. 183), su distribución comprende en un número menor de grupos de co-segregación (26 vs. 39). Además, dentro de cada grupo materno se pudieron detectar regiones internas con una alta densidad de marcadores y otras con marcadores distanciados. Este tipo de patrón de distribución de marcadores dentro de cada grupo es característico de regiones centroméricas (donde la recombinación está restringida) y brazos cromosomales (donde se observa una alta frecuencia de quiasmas), respectivamente. Por el contrario, en el mapa del genotipo Q4117, los 39 grupos obtenidos no mostraron el patrón mencionado, sino que los grupos presentaron una distribución más uniforme de marcadores. Una de las posibles hipótesis que pueden explicar las diferencias en el número de grupos de co-segregación detectados en los dos mapas es el origen de cada uno de los individuos parentales. Por un lado la planta Q4188 proviene de un cruzamiento entre Q3664 x Q3853. Q3664 es un individuo tetraploide facultativo híbrido, derivado de un tetraploide inducido por colchicina (obtenido por duplicación de cromosomas de un diploide natural) y un apomítico obligado. Debido a que este individuo de origen experimental (Q4188) es de constitución poliploide reciente, es probable que la mayoría de los cromosomas no se hayan diferenciado y se asocien al azar formando cuadrivalentes. Este tipo de configuración disminuye la eficiencia para detectar tanto grupos de co-segregación en acoplamiento como ligamientos en repulsión. Por el contrario, el genotipo Q4117 es un tetraploide natural cuyo origen puede remontarse a innumerables generaciones y por lo tanto podría estar en proceso de diploidización (es decir que pares de cromosomas se apareen entre sí más frecuentemente que con el resto del grupo homólogo) dando posibilidad a la detección de un mayor número

de grupos de co-segregación. Una evidencia de esto serían los resultados obtenidos en el grupo-apo (ver más adelante).

El largo del genoma de los mapas femenino y masculino (1.590,6 cM y 2.265,7 cM, respectivamente) correspondiente a la suma de los grupos de co-segregación fue diferente. Asimismo, el largo total del genoma estimado para el genotipo apomíctico (2.707,6 cM) resultó bastante mayor que para el genotipo sexual (1.815 cM), indicando que la frecuencia de recombinación sería mayor en las gametas masculinas. Esta diferencia también podría deberse a los orígenes de ambos genotipos citados anteriormente. Esto asimismo quedaría evidenciado por el alto número de marcadores ligados con bajos valores de recombinación que presentan los grupos maternos, evidenciando la presencia de regiones saturadas de marcadores que podrían asociarse con regiones centroméricas y/o regiones con baja recombinación. En *Fragaria*, Lerceteua-Köhler et al. (2003) obtuvieron una diferencia semejante entre el largo del genoma femenino y masculino y sugirieron que dicha diferencia podría estar reflejando un hecho biológico, considerando que lo mismo se reportó en otras especies [por ejemplo tomate (de Vicente y Tanksley 1991) y cebada (Graner et al. 1991)]. Además, los autores discuten que una frecuencia de recombinación mayor fue detectada en las gametas masculinas de varias especies, como *Pinus* (Plomion y O'Maley 1996, Lerceteau et al. 2000) y *Maniholt esculenta* (Fregene et al. 1997).

La incorporación de los marcadores tipo puente alélico a ambos mapas permitió la identificación de cromosomas homólogos entre los genotipos materno y paterno. Uno de los grupos detectados comprende al homólogo materno del grupo-apo. En general no se observó una similitud en el largo o densidad de marcadores entre los grupos homólogos identificados en ambos genotipos. El análisis de ligamiento para determinar la localización de dichos marcadores se realizó usando el programa Joinmap 1.4 (Stam 1993). En una primera etapa se

realizó un análisis de a pares y aquellos marcadores puente que mostraron asociación con los *loci* posicionados en los grupos de co-segregación establecidos previamente por Mapmaker 3.0 (Lander et al.1997) fueron ubicados dentro de cada grupo incluyendo la totalidad de los marcadores (1:1 + 3:1) de cada grupo. En general los grupos obtenidos por Joinmap1.4 fueron más cortos que los construidos por Mapmaker 3.0. Esto puede deberse a que si bien ambos programas usan la función de Kosambi para la transformación de los valores de recombinación (r) en unidades de mapeo (cM), el método empleado por Mapmaker para calcular distancias (máxima verosimilitud mutilocus) asume ausencia de interferencia por entrecruzamiento mientras que JoinMap considera esta posibilidad. La interferencia se refiere a la imposibilidad de que dado un entrecruzamiento en un determinado punto del cromosoma, se produzca otro en un punto adyacente cercano, debido al impedimento físico de entrecruzamiento de las cromátidas. Se estima que entre 10-15 cM a ambos lados del lugar de un entrecruzamiento es muy improbable que se ocurra otro en la misma meiosis (Kearsey and Pooni 1996). De esta manera, en presencia de interferencia Joinmap genera grupos de ligamiento más cortos [con menos puntos (%) de recombinación] (Stam 1993). Resultados similares mostrando diferencias entre el largo de los mapas obtenidos por ambos programas de mapeo fueron obtenidos en cebada (Qi et al. 1996) y en *Cryptomeria japonica* (Tani et al. 2003).

El contenido de ADN genómico en *P. notatum var. suarae* (diploide) fue estimado en aproximadamente 0,57 pg/C o $5,2 \times 10^8$ pb (Jarret et al. 1995). Considerando estos valores y que la especie es un autopoliploide, el contenido total de ADN de las gametas en las razas tetraploides sería de 1,14 pg o 1×10^9 pb. Esto representa un contenido de ADN intermedio si se lo compara con el de otras gramíneas como por ejemplo arroz ($4,4 \times 10^8$ pb) y maíz (3×10^9 pb), aunque resulta bajo en comparación con otros poliploides como cebada ($5,4 \times 10^9$ pb)

o trigo ($1,6 \times 10^{10}$ pb) (Arumuganathan y Earle 1991, Moore 2000). Dividiendo el total de pares de bases en la gameta por el número de cromosomas en las mismas (20), se obtiene que el tamaño promedio de cada cromosoma de *Paspalum notatum* es 50 Mpb aproximadamente. Asimismo, el total de pares de bases en el genoma tetraploide resulta en 2×10^9 pb ($5,2 \times 10^8$ pb x 4). Considerando el largo del genoma estimado para Q4117 y Q4188, 1 cM equivaldría a 738 kpb (2×10^9 pb / 2.707,6 cM) y 1100 kbp (2×10^9 pb / 1.815 cM), respectivamente. Estos valores están dentro del rango de tamaño conocido para plantas superiores de alrededor de 750 kbp/cM (Lincoln et al. 1993). Sin embargo, todas estas consideraciones tal vez no sean del todo exactas, ya que estamos considerando una aditividad completa en la cantidad de ADN genómico al pasar del nivel diploide al tetraploide. En trigo Ozkan et al. (2003) observaron una reducción considerable del tamaño del genoma haploide luego de la poliploidización.

La utilización de sondas heterólogas de arroz y maíz para generar marcadores de RFLP indicó una baja homología entre los genomas de *Paspalum* y estas gramíneas y sólo unos pocos marcadores pudieron ser mapeados. Será necesario incorporar un número mayor de marcadores de RFLP anclados (Van-Deynze et al. 1998) para poder realizar estudios más profundos de mapeo comparativo. Sin embargo, varias de las sondas utilizadas fueron clones que habían resultado asociados a la aposporia en especies relacionadas. Sólo uno, el clon C1069 correspondiente al cromosoma 12 de arroz, se pudo detectar ligado al grupo-apo, corroborando resultados previos (Martínez et al. 2003). Estudios recientes de mapeo comparativo entre tres especies de *Paspalum* (*P. simplex*, *P. malacophyllum* y *P. notatum*) indicaron que clones de los cromosomas 2 y 12 de arroz resultaron ligados a la aposporia en *P. notatum* (Pupilli et al 2004). Los autores postularon que habría sucedido una translocación entre los cromosomas de *P. notatum* homeólogos al 2 y 12 de arroz que generó un cromosoma

híbrido. Es de destacar que clones del cromosoma 2 de arroz resultaron asimismo asociados a la aposporía en *Brachiaria* sp (Pessino et al. 1998). A pesar de que se detectó sintenia entre las regiones específicas de la aposporía y clones del cromosoma 5 de maíz y 2 de arroz en *Brachiaria brizantha* (Pessino et al. 1997 y 1998), clones del cromosoma 12 de arroz en *Paspalum simplex* (Pupilli et al. 2001 y 2004) y clones del cromosoma D de sorgo en *Cenchrus ciliare* (Burrow et al. 2001), las regiones sinténicas en el círculo de las gramíneas (Gale y Devos 1998) son incongruentes. Ozias –Akins et al. (2003) discuten que estos resultados podrían explicarse considerando el origen polifilético de la apomixis apospórica en la tribu.

Los mapas obtenidos en este trabajo de Tesis pueden considerarse los primeros mapas de ligamiento genético disponibles para las razas tetraploides de *Paspalum notatum*. Los mismos pueden usarse como marco genético para estudios básicos y aplicados en la especie y como base para la construcción de mapas más saturados. La disponibilidad de los mismos facilitará el anclado de marcadores de RFLP y SSR que son apropiados para realizar estudios comparativos y de detección de QTLs asociados a caracteres de interés agronómico. Asimismo, proveen la base para el desarrollo de mapas funcionales a partir de la localización de marcadores de secuencias expresadas (EST-SSR) (Kantety et al. 2002) que han sido identificados en otras especies de gramíneas relacionadas así como de diversos genes de función conocida provenientes de estudios de cDNA-AFLP y/o exposición diferencial. El seguimiento de genes candidatos responsables de QTLs y caracteres simples a nivel molecular permitirá la incorporación de los mismos a genotipos con buenas características agronómicas para que puedan convertirse en cultivares mejorados de la especie. Esto sumado a la posibilidad de monitorear la herencia del carácter apomixis por medio de marcadores moleculares, posibilitará el establecimiento de nuevas estrategias de mejoramiento. Parte de

los resultados obtenidos en esta área están actualmente siendo empleados en el Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE) Corrientes, como herramientas moleculares para la asistencia al mejoramiento de esta y otras especies del género.

V.4- Caracterización del grupo de ligamiento donde se localiza el locus responsable de la aposporia

El mapa de ligamiento del genotipo Q4117 de *Paspalum notatum* desarrollado en el presente trabajo de Tesis junto con los de *Cenchrus ciliaris* (Burrow et al. 2001) y *Panicum maximum* (Ebina et al. 2005) son los primeros antecedentes de mapas de gramíneas apospóricas. En los tres casos se identificó un único grupo de ligamiento donde se localizó el *locus* responsable del carácter. En *Poa pratensis*, otra gramínea apospórica, se informó la construcción de dos mapas de ligamiento de genotipos sexuales y apospóricos de la especie pero no se identificó el grupo donde se localizan los factores responsables de la aposporia ya que la población de mapeo no fue clasificada por el modo de reproducción (Porceddu et al. 2002).

El grupo de ligamiento donde se localiza el *apo-locus* en *Paspalum notatum* cuenta con 25 marcadores que se distribuyen sobre unos 34 cM. Todos los marcadores incluidos en el grupo-*apo* mostraron segregación distorsionada. Un subgrupo de ellos define una región cromosómica de 8,2 cM constituida por 15 *loci* completamente ligados al *apo-locus* y otros 7 con valores de recombinación menores a 3 cM (bloque de ligamiento-*apo*). El grupo cuenta además con dos marcadores localizados a 16 cM hacia ambos lados del *apo-locus* donde la recombinación genética parecería normalizarse. Una fuerte supresión de la recombinación en

la región genómica que incluye al control de la aposporia ya había sido detectada en *Paspalum notatum* en un trabajo previo (Martínez et al. 2003). Utilizando una población derivada de los mismos genotipos y por medio de la técnica de segregantes en grupo se identificó un grupo de marcadores moleculares ligados 100% al carácter (incluidos los dos marcadores de RAPD usados para la clasificación de las plantas en este trabajo de Tesis) (Martínez et al. 2003). El mismo fenómeno también fue descrito en otras gramíneas apomicticas. En *Pennisetum squamulatum*, Ozias-Akins et al. (1998) trabajando con una población de 397 híbridos provenientes de un cruzamiento interespecífico, detectaron 12 marcadores moleculares de PCR completamente ligados a la aposporia. La hibridación de estos marcadores determinó que el apo-locus se localizaba en una región parcialmente hemicigota que se denominó “región genómica específica de la aposporia” (ASGR). Estudios recientes de hibridación *in situ* con sondas fluorescentes confirmaron la hemiciogocis de la ASGR y demostraron que el cromosoma donde se localiza se aparea con un homólogo, pero la zona de la ASGR se mantiene asináptica, indicando ausencia de recombinación (Goel et al. 2003, Akiyama et al. 2004). Varios de los marcadores detectados en *P. squamulatum* fueron luego ensayados en *Cenchrus ciliaris* (Roche et al. 1999) donde mantuvieron su asociación con el carácter. Por otro lado, en *Brachiaria brizantha* (Pessino et al. 1998), *Cenchrus ciliaris* (Gustine et al. 1997 y Jessup et al. 2002), *Paspalum simplex* (Pupilli et al. 2001, Labombarda et al. 2002) y *Panicum maximum* (Ebina et al. 2005) se determinó la presencia tanto de marcadores moleculares completamente ligados a la aposporia como de otros recombinantes cercanos. En todos los casos, al igual que en *Paspalum notatum*, se trabajó con poblaciones provenientes de cruzamientos euploides, sosteniendo la idea que sólo se pueden detectar recombinantes cercanos al apo-locus en cruzamientos de este tipo, sobre todo si son intraespecíficos (Jessup et al. 2002). Asimismo, en cuanto a la diplosporia en gramíneas, en

Tripsacum dactyloides (Grimanelli et al. 1998a) trabajando con poblaciones interespecíficas entre maíz y *Tripsacum tetraploide* determinaron que la diplosporía y un grupo de marcadores de RFLP correspondientes al cromosoma 6 de maíz segregaban frecuentemente ligados.

El análisis de marcadores ligados en fase de repulsión detectó apareamiento preferencial de cromosomas (herencia disómica) en el grupo-apo de *Paspalum notatum*. Este hallazgo indica que las adyacencias al apo-locus tendrían una mayor homología con un segmento localizado sólo en uno de los otros 3 cromosomas homólogos del grupo. Esta característica también puede explicar la detección de varios marcadores con muy bajo porcentaje de recombinación alrededor del apo-locus en una especie autotetraploide (Stein et al. 2004). Resultados similares fueron publicados para buffelgrass (*Cenchrus ciliaris*) donde se identificó un cromosoma homólogo al que contiene al apo-locus y dos homeólogos (Jessup et al. 2002). La determinación del tipo de herencia disómica de la apomixis en estas especies sugiere que los genes que controlan el carácter tienen origen diploide o bien que la región genómica involucrada está en proceso de diploidización. Además, tiene implicancias directas en los programas de mejoramiento debido a que se necesitan poblaciones de menor tamaño para producir los genotipos deseados (Jessup et al. 2002). Estudios recientes de hibridación *in situ* con sondas fluorescentes homólogas y heterólogas (de *P. squamulatum*) fortalecieron estos resultados mostrando que el cromosoma que contiene a la región específica de la aposporía en *Cenchrus* se puede aparear con un homólogo y sufrir recombinación, al menos por fuera de la ASGR (Akiyama et al. 2005). Sin embargo, análisis de segregación de marcadores moleculares indicaron herencia tetrasómica para la apomixis en *Paspalum simplex* (Pupilli et al. 1997) e híbridos de maíz- *tripsacum* (Grimanelli et al. 1998a) y se postuló un modelo de herencia tetrasómica con un factor letal gamético asociado al carácter en *Pennisetum squamulatum* (Ozias-Akins et al. 1998).

En Q4117 el apo-*locus* muestra una fuerte supresión de la recombinación con 15 *loci* 100% ligados entre sí obtenidos al azar (no se tiene en cuenta el marcador de RFLP). Para calcular el número aproximado de pares de bases comprendido en el apo-*locus*, se procedió de la siguiente manera: i) se consideró que los marcadores obtenidos en el mapa de Q4117 amplificaron a partir de secuencias al azar uniformemente distribuidas en el genoma, ii) se calculó el número de pares de bases por marcador en el genomio = $2,84 \times 10^6$ pb [$(5,2 \times 10^8$ pb / 183 marcadores)], iii) se multiplicó el número de pares de bases/marc. por el número de marcadores obtenidos al azar en el apo-*locus* ($2,84 \times 10^6$ pb/marc. x 15 *loci*). Así, el largo estimado de la región cromosómica responsable de la aposporia *Paspalum notatum* resultó en 43 Mpb aproximadamente. En *P. squamulatum*, en base a los experimentos de mapeo físico de alta resolución por hibridación *in situ* con sondas fluorescentes (FISH), se estimó que el largo de la ASGR es de 50 Mpb, equivalente a medio brazo cromosomal aproximadamente en dicha especie (Akiyama et al. 2004). Estos resultados obtenidos para *Paspalum notatum* y *Pennisetum squamulatum* permiten anticipar complicaciones a la hora de intentar el aislamiento de los genes responsables por clonado posicional, ya que marcadores fuertemente ligados al carácter por recombinación podrían encontrarse separados por distancias físicas considerables.

La ausencia de recombinación asociada al *locus* de la apomixis, como se mencionó anteriormente, podría estar asociada a una estrategia para evitar la dispersión de varios factores que necesitan co-segregar estrictamente para determinar este tipo de reproducción. Así, la existencia de una región de baja recombinación puede enmascarar la presencia de varios genes que gobiernan al carácter, haciéndolos aparecer y funcionar como una sola unidad genética. Savidan (2000) propuso la existencia de un “linkat” como hipótesis para explicar la supresión de recombinación en el *locus* de la apomixis. Demarly (1979) definió a

un “linkat” como un segmento cromosómico en el que un grupo de genes que contribuyen a una función común se mantiene fuertemente ligado. Existen descritos varios casos de *loci* complejos en la naturaleza conteniendo genes co-adaptados, como ser el *loci* S de autoincompatibilidad en *Brassica*, el *locus* de “tipo de apareamiento” en *Chlamydomonas* y el *locus* del complejo mayor de histocompatibilidad en humanos (revisado en Grossniklaus et al. 2001). Una caracterización molecular detallada de este segmento cromosómico revelará en el futuro la variedad y el número de genes involucrados. Dado que varios elementos diferencian a la apomixis de la sexualidad (apomeiosis, partenogénesis y a veces desarrollo autónomo del endosperma) la cuestión de si la apomixis es consecuencia de la expresión de un solo gen maestro o de un grupo de factores ligados coadaptados es uno de los problemas a resolver en el futuro cercano (Grimanelli et al. 1998a).

La supresión de la recombinación podría deberse a diferentes factores como ser: la presencia de una inversión, una localización centromérica o telomérica de la región y/o una invasión de retrotransposones y secuencias repetitivas.

Como se mencionó anteriormente, la inversión es en sí un mecanismo supresor de la recombinación, bien porque impide el entrecruzamiento por causas meramente citológicas o bien porque en el supuesto de que se dé uno solo en la zona de la inversión, los únicos gametos viables son los que presentan las ordenaciones normal e invertida, pero sin recombinación entre *loci*. Por ello, cuando se produce una inversión los *loci* incluidos en la misma tienen una fuerte tendencia a mantenerse ligados sobre el cromosoma y a transmitirse como una unidad hereditaria (Lacadena 1988).

La supresión de la recombinación puede deberse también a una localización centromérica o telomérica del segmento cromosómico involucrado. Es sabido que la recombinación está reducida en estas regiones de heterocromatina del genoma (Wu y

Tanskley 1993). Por experimentos de mapeo comparativo con maíz y arroz se determinó que en *Brachiaria* y en *Paspalum simplex* el apo-locus tendría una localización telomérica considerando la sintenia detectada entre marcadores asociados a la aposporia y clones de RFLP correspondientes a las regiones distales del brazo corto del cromosoma 5 de maíz y del brazo largo del cromosoma 12 de arroz, respectivamente (Pessino et al. 1997, Pupilli et al. 2001). En *Paspalum notatum* el clon C1069, correspondiente al brazo largo del cromosoma 12 de arroz resultó ligado completamente a la aposporia (Martínez et al. 2003, Pupilli et al. 2004, esta Tesis). El análisis de secuencia del clon C1069 mostró homología con una proteína perteneciente a transposones de la clase mutador.

Ocho de los marcadores de AFLP ligados a la aposporia en *Paspalum notatum* fueron clonados y secuenciados. En primer lugar los datos de secuencia de cada uno de estos marcadores podrán utilizarse para el diseño de oligonucleóticos de manera de amplificar marcadores alelo específicos y detectarlos fácilmente en geles de agarosa (SCARS). Estos marcadores servirán para una identificación temprana de las plantas apomícticas y sexuales y podrán ser utilizados en el futuro para la identificación de clones a partir de genotecas de cDNA y/o de BACs de la especie y/o de especies relacionadas. Uno de los marcadores (e36m37c*) mostró homología (Valor-E: 2×10^{-12}) con secuencias de genes de un retrotransposón de maíz. Los siete restantes no evidenciaron similitud con genes presentes en las bases de datos. En *Pennisetum squamulatum* los 12 marcadores de RAPD detectados completamente ligados a la aposporia fueron clonados, transformados en SCARs e hibridados sobre ADN genómico resultando 6 marcadores de alto y 6 de bajo número de copias (Ozias Akins et al. 1998). Los mismos fueron utilizados para aislar clones en BAC de una genoteca de la especie (Roche et al. 2002). Los clones en BAC fueron caracterizados (“*fingerprinted*”) y analizados por hibridación. Los que hibridaron con marcadores ligados a la ASGR se

utilizaron como sondas para realizar experimentos de FISH sobre cromosomas mitóticos de genotipos apomícticos de *Pennisetum* (6x) y *Cenchrus* (4x) (Goel et al. 2003). Todos los clones hibridaron sobre un único cromosoma en ambos casos, pero en posiciones cromosomales diferentes resultando cercanas al telómero en *Pennisetum* y próximas al centrómero en *Cenchrus*, demostrando además que la región es hemicingota. Posteriormente, se realizaron experimentos de FISH de alta resolución sobre complementos en paquiteno que permitieron posicionar los clones de bajo y alto número de copias en ambas especies (Akiyama et al. 2004 y 2005). Los resultados revelaron que la región cromosomal hemicingota estudiada contenía dos bloques de clones repetitivos que rodeaban a los de secuencia única. Los clones de BAC de alto número de copia fueron secuenciados mostrando homología con genes de retrotransposones de la familia Opie-2 pertenecientes a maíz y a secuencias de los genes gag-pol de retrotransposones centroméricos de maíz (Akiyama et al. 2004 y 2005). Resultados similares se obtuvieron en *Paspalum simplex*, donde luego de secuenciar clones de BAC (detectados usando marcadores de SCAR ligados a la aposporia) de una genoteca de la especie se determinó la presencia en dichos clones de secuencias con homología a elementos transponibles (Pupilli et al. 2004).

Todos estos estudios demuestran que la presencia de elementos móviles y secuencias repetitivas en la región genómica involucrada con la aposporia es un rasgo común en las diferentes especies de gramíneas. Los retrotransposones son un componente principal de la mayoría de los genomas eucariotas, representando entre el 50-80% en los genomas de algunas gramíneas. Afectan la estructura del genoma por inserción o escisión en diferentes *loci*, proliferando durante estos procesos hasta alcanzar un alto número de copias. La actividad de los mismos está sujeta a regulación epigenética durante el desarrollo (metilación de citocinas) y posterior silenciamiento (Kashkush et al. 2003). Su actividad puede afectar a genes vecinos

como se evidenció en maíz para las inserciones de *Spm* y *Mu* en los loci *a* y *hcf106*, respectivamente (Masson et al. 1987, Martienssen et al. 1990) y en trigo (Kashkush et al. 2003). Por lo general se distribuyen en clusters, anidados en regiones intergénicas, heterocromáticas, pero también se pueden encontrar cercanos a genes. Su acumulación puede hasta iniciar la formación de heterocromatina (Steinmann y Steinmann 1997). Son agentes causantes de reordenamientos estructurales, tanto inversiones como translocaciones (Lacadena 1988). Son transcripcionalmente inactivos pero pueden activarse bajo determinado estrés afectando la expresión de genes vecinos (Kashkush et al. 2003).

Estudios en trigo permitieron a Kashkush et al. (2003) postular un mecanismo de regulación de la expresión de genes basado en la actividad transcripcional de retrotransposones. Los autores demostraron que en trigos aniploides recientemente sintetizados se producía un número elevado de transcritos de una familia de retrotransposones. Algunos de estos transcritos eran quiméricos conteniendo secuencias en orientación sentido o antisentido de genes adyacentes que codificaban para proteínas; cuya expresión se silenciaba o activaba. Ozias –Akins et al. (2003) plantean que la ASGR en *Pennisetum* podría estar evolucionando de manera similar los cromosomas Y y B (ambos acumulan secuencias repetitivas y están aislados de recombinación). En humanos se ha descrito la presencia de transcritos no codificantes provenientes de regiones del cromosoma Y, cuya función estaría asociada a mecanismos de silenciamiento mediados por RNA. El silenciamiento genético posiblemente evolucionó como una respuesta a invasión viral o por transposones. Considerando los mecanismos de silenciamiento génico post transcripcional y los de interferencia de ARN, los autores especulan que ARNs no codificantes de la ASGR junto con genes codificantes para proteínas, podrían actuar como factores en *trans*

responsables de la dominancia, plasticidad y penetrancia incompleta de la apomixis en la mayoría de los sistemas (revisado por Ozias-Akins et al. 2003).

Sólo tres de los 10 clones de ADNc provenientes de transcritos polimórficos, obtenidos por exposición diferencial, entre genotipos sexuales y apomícticos de *P. notatum* y *B. brizantha* se pudieron localizar en los mapas de ligamiento de razas tetraploides de *Paspalum*. Ninguno de los genes ensayados resultó asociado al grupo-apo por recombinación, por lo cual si bien pertenecerían a la cascada de genes que se activan específicamente en este tipo de reproducción su localización en el genoma sería independiente del modo de reproducción. Un punto interesante a considerar es que tanto C10 como 18G corresponden a genes que codifican proteínas del citoesqueleto. Ninguno de los dos serían los disparadores del carácter, pero ambos están sobreexpresados en plantas apomícticas. Esto indicaría que hay alguna modificación en la estructura/función/dinámica de ensamblado del citoesqueleto entre ambos tipos de plantas y que esta modificación estaría determinada por otros genes (genes del grupo-apo). Existen varios estudios recientes sobre la identificación y aislamiento de genes candidatos de la aposporia en diferentes especies de gramíneas (Vielle-Calzada et al. 1996b, Chen et al. 1999, Leblanc et al. 1997, Rodrigues et al. 2003, Pessino et al. 2001 y Albertini et al. 2004 y 2005). Sin embargo, no hay reportados antecedentes analizando la asociación a nivel genético de dichos genes con la región genómica responsable del carácter. El mecanismo genético involucrado con la apomixis en gramíneas aún no ha sido esclarecido completamente pudiendo ser tan simple como un único gen codificante de una proteína regulatoria o tan complejo como una alternancia de la expresión génica debida al contexto genético de múltiples secuencias génicas incluidas en la región determinante del carácter (Ozias-Akins et al. 2003).

La caracterización del grupo-apo realizada en esta Tesis constituye un punto de partida para el inicio de estudios moleculares tendientes a identificar y clonar genes candidatos relacionados con la expresión del carácter en la especie. Una estrategia similar a la desarrollada en *Pennisetum* se está llevando a cabo. El desarrollo de marcadores SCAR a partir de los marcadores ligados al apo-*locus* y de genotecas de genotipos apomíticos y sexuales han comenzado. Además, se están realizando estudios epigenéticos a fin de determinar el grado de metilación de la región genómica involucrada con la aposporia. Se desarrollarán marcadores para ser utilizados como sondas en experimentos de hibridación *in situ*, similares a los estudios realizados recientemente en *Pennisetum* (Goel et al. 2003, Akiyama et al. 2004 y 2005) que podrían ayudar a determinar si el bloque de ligamiento-apo se localiza en el bivalente retrasado observado en anafase I y a explicar la falta de recombinación alrededor del *locus*.

V.5- Revisión del Modelo de herencia de la aposporia en *P. notatum*

Los resultados obtenidos en cuanto a la caracterización de la región genómica responsable de la aposporia en *Paspalum notatum* obtenidos en el presente trabajo de Tesis y los antecedentes disponibles a partir de trabajos anteriores, justifican revisar el modelo de herencia del carácter en la especie. Las evidencias genéticas disponibles al respecto pueden resumirse en los siguientes ítems:

- a- la aposporia se comporta como un carácter simple dominante con segregación distorsionada, 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 de un gen mayor (Martínez et al. 2001 y 2003)
- b- el análisis citológico de la raza Q4117 (apospórica) sugiere la presencia de una inversión paracéntrica, localizada cercana al centrómero en uno de los cromosomas. No se detectaron evidencias de inversiones en el genotipo sexual Q4188. Es bien sabido que las inversiones pueden causar letalidad gamética y supresión del entrecruzamiento en el segmento cromosómico invertido (Stein et al. 2004 y esta Tesis)
- c- la viabilidad de los granos de polen difiere significativamente entre los genotipos sexual (Q4188) y apomíctico (Q4117), indicando que la distorsión de la segregación observada para la aposporia podría deberse a una letalidad gamética parcial (esta Tesis).
- d- el grupo-apo muestra restricción de la recombinación y apareamiento preferencial de cromosomas (herencia disómica) (Stein et al. 2004 y esta Tesis).
- e- la caracterización del segmento cromosómico donde se localiza el *apo-locus* mediante el análisis de secuencias de 2 marcadores moleculares ligados 100% al mismo mostraron homología con genes de elementos transponibles (esta Tesis). Es un hecho conocido que los retrotransposones son agentes causantes de reordenamientos estructurales, tanto inversiones como translocaciones y están frecuentemente asociados a la metilación del ADN en plantas.

Considerando estos antecedentes, un modelo posible sería que:

La presencia de una inversión en Q4117 puede ser la responsable de la distorsión de la segregación observada en la transferencia de la aposporía (y un grupo de marcadores ligados) y de la supresión de la recombinación detectada alrededor de dicho *locus*. El apo-*locus* se localizaría en uno de los cuatro cromosomas del grupo homólogo en un segmento invertido (Figura 22). Las plantas apomícticas tendrían una configuración Aaaa, donde el alelo A es el responsable del carácter. La presencia de elementos transponibles en esta región, la supresión de la recombinación observada y la letalidad gamética de los granos de polen concuerdan con la presencia de un rearrreglo cromosomal. La herencia disómica se explicaría considerando que durante la meiosis dicho cromosoma sólo puede aparearse y entrecruzarse generando gametas con configuración parental y gametas recombinantes viables cuando el apareamiento se da con solo uno de los 3 homólogos posibles (por ejemplo a_1). Está descrito que si bien son poco frecuentes, los dobles entrecruzamientos recíprocos dentro del bucle de inversión generan 4 gametas viables, dos parentales y dos recombinantes (Lacadena 1988). El apareamiento y entrecruzamiento con cualquiera de los otros dos cromosomas conllevaría a la formación de los puentes de cromatina observados y letalidad de las gametas recombinantes, recuperándose solo las combinaciones parentales. Esta hipótesis podría esclarecerse con experimentos de hibridación *in situ* usando sondas específicas del apo-*locus*, que demuestren su localización y si uno de los cromosomas involucrados en el puente de cromatina es el que contiene a los genes responsables del carácter. También podríamos suponer que la presencia de elementos transponibles en la región mencionada podrían afectar la estructura o regulación de ciertos genes vitales en las gametas que contienen el cromosoma donde se localiza el apo-*locus* en *Paspalum notatum*. En conclusión, el carácter aposporía en la especie estaría

controlado por una región genómica específica presente en un solo cromosoma y con homología parcial en solo uno de los 3 homólogos (se estaría diploidizando). Esta región podría haber sufrido una inversión, estar invadida por transposones y sufrir metilación parcial por lo que los genes incluidos podrían presentar una expresión alterada con respecto a la raza sexual. Esto explicaría la obtención de recombinantes cercanos en un autotetraploide así como la fuerte distorsión de la segregación observada en la transmisión del carácter por las gametas masculinas.

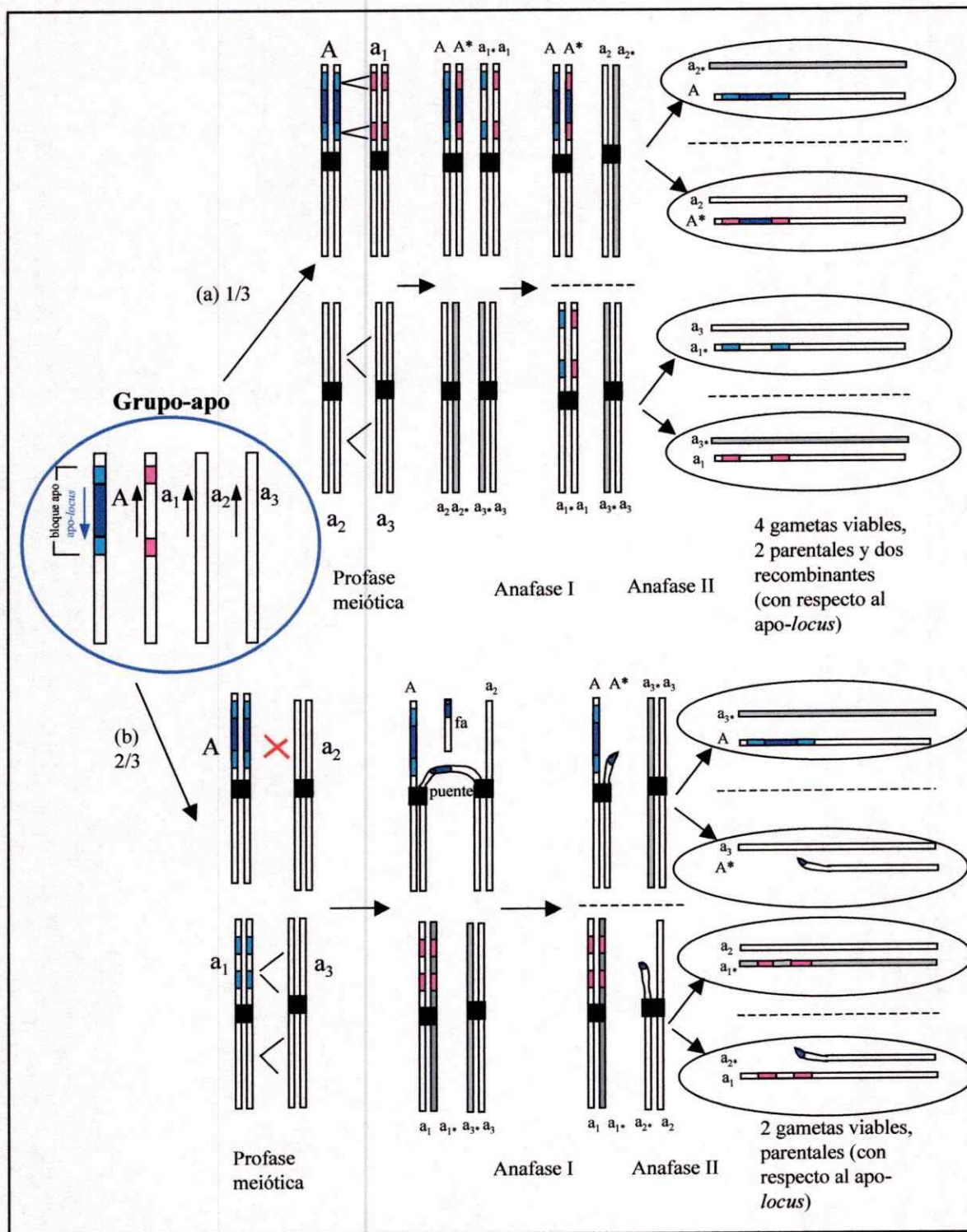


Figura 22: modelo propuesto de herencia de la aposporia en *Paspalum notatum*. Las flechas en el grupo-apo indican el sentido de la inversión. (a) El cromosoma que contiene a los factores responsables del carácter sólo puede generar gametas recombinantes viables cuando se aparea y entrecruza con el grupo a₁ (que tiene homología parcial con el A en los extremos de la región invertida). (b) Cuando A se aparea con a₂ o a₃, se forman el puente de cromatina entre las cromátidas que se entrecruzan y un fragmento acéntrico (fa), que luego se pierde. Sólo se van a producir dos gametas viables con la configuración parental con respecto al apo-locus. Los asteriscos indican las cromátidas recombinantes.

VI- CONCLUSIONES

Los resultados experimentales obtenidos durante el este trabajo de Tesis sobre la caracterización del tipo de herencia presente en las razas tetraploides de *Paspalum notatum*, la construcción de un mapa de ligamiento genético de la especie y la localización del *locus* responsable de la aposporía (*apo-locus*) y de otros genes involucrados con la expresión del carácter permiten arribar a las siguientes conclusiones:

- 1- La aposporía en *P. notatum* se transmite de acuerdo a un factor simple dominante con segregación distorsionada. Las alteraciones meióticas provocadas por un re-arreglo cromosómico (posiblemente una inversión) podrían estar afectando la transmisión del carácter a la progenie y por consiguiente ser las responsables de la distorsión de la segregación observada. Esta misma situación se ve reflejada en una baja viabilidad de los granos de polen en el genotipo apospórico (Q4117) en comparación con el genotipo sexual (Q4188).
- 2- Las razas tetraploides de *P. notatum* muestran mayoritariamente una herencia de tipo polisómica, corroborando el origen autotetraploide de la especie propuesto previamente en base a observaciones citogenéticas. Sin embargo, la región genómica asociada con la aposporía y probablemente otras aún no identificadas presentan

herencia disómica, lo que sugiere que algunos sectores del genoma de *Paspalum* están sufriendo un proceso de diploidización citológica.

- 3- Durante la realización de este trabajo de tesis se construyeron los primeros mapas de razas tetraploides de *P. notatum* y se caracterizó el único grupo de ligamiento donde se ubica el *locus* responsable de la aposporia. Este sector del genoma mostró una fuerte supresión de la recombinación y un claro apareamiento preferencial de cromosomas.
- 4- Se identificaron varios marcadores (15) completamente ligados a la aposporia. Dos de ellos mostraron homología con genes de elementos transponibles. Al menos uno de los marcadores identificados corresponde a un sector genómico localizado en el cromosoma 12 de arroz, en una región que ya había sido asociada por sintenia al *locus* que gobierna la aposporia en especies de *Paspalum*.
- 5- La región genómica que gobierna la apomixis es de gran tamaño y podría representar un *locus* complejo que incluye varios genes. La longitud estimada en base a los datos de representación de marcadores en el *locus* obtenidos en este trabajo rondaría los 43 Mpb. Esta característica del *locus* que gobierna la apomixis complica la estrategia inicialmente propuesta de identificación de genes candidatos por clonado posicional. Para intentarla se requerirá obligatoriamente el empleo de poblaciones de gran tamaño que permitan un mapeo más detallado de la región, la construcción de genotecas de insertos largos (BACs o BIBACs) y una secuenciación extensiva de este gran sector. En base a los resultados obtenidos en esta tesis cobran importancia los estudios de expresión de genes en inflorescencias inmaduras de *P. notatum* apospórico, que

podrían permitir reemplazar la estrategia tradicional de clonado posicional por otra más directa de mapeo funcional.

- 6- Varios genes funcionalmente relacionados a la aposporia fueron localizados en dos grupos de ligamiento diferentes. Ninguno de ellos mostró una asociación genética con el carácter, lo que indica que no se trata de los genes disparadores. Por otra parte, el mapeo comparativo de sondas previamente asociadas al modo de reproducción en *Brachiaria* mostraron (como ya se había observado en otros trabajos) que la región apo podría tener un origen polifilético en el grupo de las gramíneas.

VII- REFERENCIAS

- Ahn S, Anderson JA, Sorrells ME y Tanksley SD (1993) Homeologous relationships of rice, wheat and maize chromosomes. *Mol Gen Genet* 241: 483-490.
- Akiyama Y, Conner JA, Goel S, Morishige DT, Mullet JE, Hanna WW y Ozias-Akins P (2004) High resolution physical mapping in *Pennisetum squamulatum* reveals extensive chromosomal heteromorphism of genomic region associated with apomixis. *Plant Physiol* 134: 1733-1741.
- Akiyama Y, Hanna WW y Ozias-Akins P (2005) High resolution physical mapping reveals that the apospory specific genomic region (ASGR) in *Cenchrus ciliaris* is located on a heterochromatic and hemizygous region of a single chromosome. *Theor Appl Genet* 111: 1042-1051.
- Albertini E, Marconi G, Barcaccia G, Raggi L y Falcinelli M (2004) Isolation of candidate genes for apomixis in *Poa pratensis* L. *Plant Molecular Biology* 56: 879-894.
- Alexander MP (1980) Differential staining of aborted and non- aborted pollen. *Stain Technol* 44: 117-122.
- Allard RW (1960) Principles of plant breeding. John Wiley & Sons, Inc.
- Al-Janabi SM, Honeycutt RJ, Mc Clelland M y Sobral BW (1993) A genetic linkage map of *Saccharum spontaneum* L. SES 208. *Genetics* 134: 1249-1260

- Alm V, Fang C, Busso CS, Devos KM, Vollan K, Grieg Z y Rognli OA (2003) A linkage map of meadow fescue (*Festuca pratensis* Huds.) and comparative mapping with other Poaceae species. *Theor Appl Genet* 108: 25-40.
- Altamiranda VJ (1983) Pasto Horqueta: Método de reproducción y distribución geográfica. Trabajo Final de Graduación FCA-UNNE.
- Andersen JR y Lubberstedt T (2003) Functional markers in plants. *Trends Plant Sci* 8: 554-560.
- Arulsekar S, Bringham RS y Voth V (1981) Inheritance of PGI and LAP isozymes in octoploid cultivated strawberries. *J Am Soc Hort Sci* 106: 679-683.
- Arumuganathan K y Earle ED (1991) Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol Biol Rep* 9: 208-218.
- Asker SE y L Jerling (1992) Apomixis in plants. CRC Press, Boca Raton.
- Asnaghi C, Paulet F, Kaye C, Grivet L, Deu M, Galzmann JC y D'Hont A (2000) Application of synteny across Poaceae to determine the maps of sugarcane rust resistance gene. *Theor Appl Genet* 101: 962-969.
- Bashaw EC (1980) Apomixis and its implication in crop improvement. p. 45-68. In W. R. Fehr and H. H. Hadley (eds.), *Hybridization of crop plants. Am. Soc. Agron.*, Madison, WI.
- Bennetzen JL y Ramakrishna W (2002) Numerous small rearrangements of gene content, order and orientation differentiate grass genomes. *Plant Mol Biol* 48: 821-827.
- Berger F (2003) Endosperm: the crossroad of seed development. *Current Opinion In Plant Biology* 6: 42-50.

- Bert PF, Charmet G, Sourdille P, Hayward MD y Balfourier F (1999) A high density molecular map for ryegrass (*Lolium perenne* L.) using AFLP markers. *Theor Appl Genet* 99: 445-452.
- Bicknell RA (1997) Isolation of a diploid, apomictic plant of *Hieracium aurantiacum*. *Sex Plant Reprod* 10: 168-172.
- Bicknell RA, Borst NK y Koltunow AM (2000) Monogenic inheritance of apomixis in two *Hieracium* species with distinct developmental mechanisms. *Heredity* 84: 228-237.
- Boivin K, Deu M, Rami JF, Trouche G y Hamon P (1999) Towards a saturated sorghum map using RFLP and AFLP markers. *Theor Appl Genet* 98: 320-328.
- Bonierbale MW, Plaisted RL y Tanksley SD (1988) RFLP map based on a common set of clones reveal modes of chromosomal evolution in potato and tomato. *Genetics* 120: 1095-1103.
- Bonilla JR y CL Quarin (1997) Diplosporous and aposporous apomixis in a pentaploid race of *Paspalum minus*. *Plant Sci* 127: 97-104.
- Botstein D, White RL, Skolnick M y Davis W (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32: 314-331.
- Brower DJ y Osborn TC (1999) A molecular marker linkage map of tetraloid alfalfa (*Medicago sativa* L.) *Theor Appl Genet* 99: 1194-1200.
- Brown WV (1972) Inversions. En Brown WV (ed) *Textbook of Cytogenetics*. Mosby Company Saint Louis USA, Capítulo 14: 196-206.
- Burr B y Burr FA (1991) Recombinant inbreds for molecular mapping in maize. *Trends Genet* 7:55-60.

- Burr B, Burr FA, Thompson KH, Albertson MC y CW Stuber (1988) Gene Mapping with Recombinant Inbreds in Maize. *Genetics* 118:519-526.
- Burrow GB, Jessup RW, Bowers JE, Schulze SR, Li Z, Wang YW, Burson BB; Hussey MA y Patterson AH (2001) Alignment of *Pennisetum ciliare* and sorghum bicolor chromosomes based on EST-enriched genetic maps. http://www.intl-pag.org/pag/9/abstracts/W25_03.html.
- Burton GW (1940) A cytological study of some species in the genus *Paspalum*. *J Agric Res* 60: 193-197.
- Burton GW (1948a) The method of reproduction in common Bahia Grass, *Paspalum notatum*. *J Americ Soc Agron* 40: 443-452.
- Burton GW (1948b) Artificial fog facilitates *Paspalum* emasculation. *J Americ Soc Agron* 40: 281-282.
- Burton GW (1967) A search for the origin of Pensacola bahiagrass. *Econ Bot* 21: 379-382.
- Burton GW (1974) Recurrent restricted phenotypic selection increases forage yields of Pensacola Bahiagrass. *Crop Sci.* 14: 831-835.
- Burton GW y Forbes I (1960) The genetics and manipulation of obligate apomixis in Common bahiagrass (*Paspalum notatum* Flüge). Proceed 8th Internatl Grassland Congress. Alen Press, Oxford, UK, p. 66-71.
- Cáceres ME, Matzk F, Busti A y Pupilli F (2001) Apomixis and sexuality in *Paspalum simplex*: characterization of the mode of reproduction in segregating progenies by different methods. *Sex Plant Reprod* 14: 201-206.
- Carman JG (1997) Asynchronous expression of duplicate genes in angiosperms may cause apomixis, bispory, tetraspory, and polyembryony (review). *Biol J Linn Soc* 61: 51-94.

- Causse M, Fulton TM, Chao YG, Ahn SN, Chunwongse J, Wu K, Xiao J, Yu Z, Ronald PC, Harrington SE, Second G, Mc Couch SR y Tanksley SD (1994) Saturated molecular map of the rice genome based on an interspecific backcross population. *Genetics* 138: 1251-1274.
- Chakravarti A, Lasher LK and Reefer JE (1991) A maximum likelihood method for estimating genome length using genetic linkage data. *Genetics* 128: 175-182.
- Chase A (1929) North American species of *Paspalum*. Cont. US Natl. Herb. Vol. 28: Part 1.
- Chen L, Miyazaki C, Kojima A, Saito A y Adachi T (1999) Isolation and characterization of a gene expressed during early embryo sac development in apomictic Guinea grass (*Panicum maximum*). *Journal Plant Physiol.* 154: 55-62.
- Chittenden LM, Schertz KF, Lin YR, Wing RA y Paterson AH (1994) A detailed RFLP map of *Sorghum bicolor* x *S. propinquum* suitable for high density mapping suggests ancestral duplication of *Sorghum* chromosomes or chromosomal segments. *Theor Appl Genet* 87:925-933.
- Christoff M (1942) Die genetische Grundlage der apomiktischen Fortpflanzung bei *Hieracium aurantiacum* L. *Z. Indukt Abstamm Vererb-L.* 80-103-125.
- Christoff M y G Papasova (1943) Die genetischen Grundlagen der apomiktischen Fortpflanzung in der Gattung *Potentilla*. *Z. Indukt Abstamm Vererbungslehre* 81:1-27.
- Cleij G, Bock TSM y B Lekkerkerker (1976) Crosses between *Beta vulgaris* L. and *Beta lomatogona* F. et M. *Euphytica* 25: 539-547.
- da Silva JA, Sorrells ME, Burnquist, WL y Tanksley SD (1993) RFLP linkage map and genome analysis of *Saccharum spontaneum*. *Genome* 36: 782-791.

- Daurelio DL, Espinoza F, Quarin CL y Pessino SC (2004) Genetic diversity in sexual diploid and apomictic tetraploid populations of *Paspalum notatum* situated in sympatry or allopatry. *Plant Systematics and Evolution* 244 (3-4): 189 – 199.
- Demarly Y (1979) The concept of linkat. Proc Conf on Broadening Genet Base of Crops, Wageningen, 1978. Pudoc, Wageningen, The Netherlands. p. 257-265.
- den Nijs APM y van Dijk GE (1993) Apomixis. En: *Plant Breeding, principles and prospects*. Hayward MD, Bosemark NO and Romagosa Y (eds.), Chapman & Hall, London, p. 229-245.
- De Vicente MC y Tanksley SD (1991) Genome wide reduction in recombination of backcross progeny derived from male versus female gametes in an interspecific cross of tomato. *Theor Appl Genet* 83: 173-178.
- Devos K, Atkinson M, Chinoy C, Liu C y Gale MD (1992) RFLP-based genetic map of the homeologous group three chromosomes of wheat and rice. *Theor Appl Genet* 83: 931-939.
- Devos K, Millam T y Gale MD (1993) Comparative RFLP maps of homeologous group 2 chromosomes of wheat, rye and barley. *Theor appl Genet* 85: 784-792.
- Devos K, Moore G y MD Gale (1995) Conservation of marker synteny during evolution. *Euphytica* 85: 367-372.
- Devos KM y Gale MD (1997) Comparative genetics in the grasses. *Plant Mol Biol* 35: 3-15.
- Devos KM, Pittaway TS, Reynolds A y Gale MD (2000) Comparative mapping reveals a complex relationship between the pearl millet genome and those of foxtail millet and rice. *Theor Appl Genet* 100: 190-198.
- do Valle CB, Glienke C y Leguizamón GOC (1994) Inheritance of apomixis in *Brachiaria*, a tropical forage grass. *Apomixis Newst.* 7: 42-43.

- Ebina M, Nakagawa H, Yamamoto T, Araya H, Tsuruta S, Takahra M y Nakayima K (2005) Grassland Science 51: 71-78.
- Fernandes MIB, Barreto IL y FM Salzano (1973) Cytogenetic, ecologic and morphologic studies in Brazilian forms of *Paspalum notatum*. Can J Genet Cytol 15: 523-531.
- Feuillet C y Keller B (2002) Comparative genomics in the grass family: molecular characterization of the grass genome structure and evolution. Annals of Botany 89: 3-10.
- Forbes I Jr. y GW Burton (1961) Cytology of diploids, natural and induced tetraploids, and intraspecies hybrids of bahiagrass, *Paspalum notatum* Flugge. Crop Sci 1: 402-406.
- Fregene M, Angel F, Gomez R, Rodríguez F, Chavarriaga P, Roca W, Tohme J y Bonierbale M (1997) A molecular genetic map of cassava (*Manihot esculenta* Crantz.). Theor Appl Genet 95: 431-441.
- Gale MD y Devos KM (1998) Plant comparative genetics after 10 years. Science 282: 656-659.
- Gates RN, Quarin CL y Pedreira CGS (2004) Bahiagrass. In Moser LE, Burson BL & Sollenberger LE (Eds.) Warm-Season (C4) Grasses. pp. 651-680. ASA, CSSA, and SSSA, Madison, WI.
- Garcia AAF, Kido EA, Meza AN, Souza HMB, Pinto LR, Pastina MM, Leite CS, Da Silva JAG, Ulian EC, Figueira A y Souza AP (2006) Development of an integrated genetic map of sugarcane (*Sacharum* spp.) commercial cross, based on a maximum likelihood approach for estimation of linkage and linkage phases. Theor Appl Genet 112: 298-314.
- 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: 1069-1082.
- Graner A, Jahoor A, Schondelmaier J, Siedler H, Pillen K, Fischbeck G, Wenzel G y Hermann RG (1991) Construction of an RFLP map of barley. *Theor Appl Genet* 83: 250-256.
- Graner A, E Bauer, A Kellermann, S Kirchner, JK Muraya, A Jahoor y G Wenzel (1994) Progress of RFLP map construction in winter barley. *Genet Newsl* 23: 53-61.
- Grattapaglia D y Sederoff R (1994) Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo test cross: mapping strategy and RAPD markers. *Genetics* 137: 1121-1137.
- Grimanelli D, Hernandez M, Perotti E y Savidan Y (1997) Dosage effects in the endosperm of diplosporous apomictic *Tripsacum*. *Sex Plant Reprod* 10:279-282.
- Grimanelli D, Leblanc O, Espinosa E, Perotti E, González de León D y Y Savidan (1998a) Mapping diplosporous apomixis in tetraploid *Tripsacum*: one gene or several genes? *Heredity* 80: 33-39.
- Grimanelli D, Leblanc O, Espinosa E, Perotti E, Gonzalez de Leon D y Savidan Y (1998b) 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 y Grossniklaus U (2001) Developmental genetics of gametophytic apomixis. *Trends in Genetics* 17: 597-604.
- Grimanelli D, García M, Kaszas E, Perotti E y Leblanc O (2003) Heterochronic expression of sexual reproductive programs during apomictic development in *Tripsacum*. *Genetics* 165: 1521-1531.

- Grivet L, D'Hont A, Roques D, Feldman P, Lanaud C y Glazmann JC (1996) RFLP mapping in cultivated sugarcane (*Sacharum* spp.): genome organization in a highly polyploid and aneuploid interspecific hybrid. *Genetics* 142: 987-1000.
- Grossniklaus U, Nogler GA y van Dijk PJ (2001a) How to avoid sex: The genetic control of gametophytic apomixis. *The Plant Cell*: 1491-1497.
- Grossniklaus U, Spillane C, Page DR y Koler C (2001b) Genomic imprinting and seed development: endosperm formation with and without sex. *Current Opinion in Plant Biology* 4: 21-27.
- Gustafsson A (1946) Apomixis in higher plants. Part I. The mechanisms of apomixis. *Lunds Univ. årsskr. N. F. Avd. 2*, 42:1-66.
- Gustine DL, Sherwood RT y DR Huff (1997) Apospory-linked molecular markers in buffelgrass. *Crop Sci.* 37:947-951.
- Haldane, JBS (1919) The combination of linkage values and the calculation of distances between the loci of linked factors. *J. Genetics* 8:299-309.
- Hanna WW (1995) Use of apomixis in cultivar development. *Adv Agron* 54: 333-350.
- Hanna WW y Bashaw EC (1987) Apomixis: its identification and use in plant breeding. *Crop Sci* 27: 1136-1139.
- Hanna WW, Dujardin M, Ozias-Akins P, Lubbers E y Arthur L (1993) Reproduction, cytology and fertility of pearl millet (*Pennisetum squamulatum*) Bc₄ plants. *Journal of Heredity* 84: 213-216.
- Harlan JR, Brooks MH, Borgaonkar DS y deWet JMJ (1964) Nature and inheritance of apomixis in *Bothriochloa* and *Dichanthium*. *Bot Gaz* 125: 41-46.

- Harrington SE, Bligh HFJ, Park WD, Jones CA y McCouch SR (1997) Linkage mapping of starch branching enzyme III in rice (*Oryza sativa* L.) And prediction of location of orthologous genes in other grasses. *Theor Appl genet* 94: 564-568.
- Haymes KM, Henken B, Davis TM y van de Weg WE (1997) Identification of RAPD markers linked to a *Phytophthora fragariae* resistance gene (Rpfl) in the cultivated strawberry. *Theor Appl Genet* 94: 1097-1101.
- Helentjaris T, Slocum M, Wright S, Schaeffer A, Nienhuis J (1986) Construction of genetic linkage maps in maize and tomato using restriction fragment length polymorphisms. *Theor Appl Genet* 72: 761-769.
- Herr JM (1971) A new clearing – squash technique for the study of the ovule development in angiosperms. *Amer J Bot* 58: 785-790.
- Holm S y L Ghatnekar (1996) Sexuality and no apomixis found in crossing experiments with diploid *Potentilla argentea*. *Hereditas* 125:77-82.
- Holm S, Ghatnekar L y BO Bengtsson (1997) Selfing and outcrossing but no apomixis in two natural populations of diploid *Potentilla argentea*. *J. Evol. Biol.* 10:343-352.
- Huang BQ y Russell SD (1992) Female germ unit: organization, isolation and function. En: *Sexual reproduction in flowering plants*. Editado por Russell SD y Dumas C. Academic Press Inc. Harcourt Brace Jovanovich Publishers.
- Hulbert SH, Illott TW, Legg EJ, Lincoln SE, Lander ES y Michelmore RW (1988) Genetic analysis of the fungus, *Bremia lactucae*, using restriction fragment length polymorphism. *Genetics* 120: 947-958.
- Jarret RL, Ozias-Akins P, Phatak S, Nadimpalli R, Duncan R y Hiliard S (1995) DNA contents in *Paspalum* ssp. determined by flow cytometry. *Genet Resources Crop Evol* 42: 242-273.

- Jefferson RA (1994) Apomixis: a social revolution for agriculture? *The Monitor* 19: 14-16.
- Jessup RW, Burson BL, Burow GB, Wang YW, Chang C, Li Z, Paterson AH y Hussey MA (2002) Disomic inheritance, suppressed recombination and allelic interactions govern apospory in Buffelgrass as revealed by genome mapping. *Crop Sci* 42: 1688-1694.
- Kam-Morgan LNW, Gill BS y Muthukrishnan S (1989) DNA restriction fragment length polymorphisms: a strategy for genetic mapping of D genome of wheat. *Genome* 32: 724-732.
- Kantety RV, Rota ML, Matthews DE y Sorrells ME (2002) Data mining for simple sequence repeats in expressed sequence tags from barley, maize, rice, sorghum and wheat. *Plant Mol Biol* 48: 501-510.
- Kashkush K, Feldman M y Levy AA (2003) Transcriptional activation of retrotransposones alters the expresión of adjacent genes in wheat. *Nature Genet* 33: 102-106.
- Kearsey MJ y Pooni HS (1996) *The Genetical Analysis of Quantitative Traits*, Kearsey and Pooni (Ed.). Chapman & Hall, 2-6 Boundary Row, London SE1 SHN, UK.
- Keller B y Feuillet C (2000) Colinearity and gene density in grass genomes. *Trend in Plant Sc* 5 (6): 246-251.
- Kidinger B, Bai D y Sokolov V (1996) Assignmet of a gene(s) conferring apomixis in *Tripsacum* to a chromosome arm: cytological and molecular evidence. *Genome* 39: 1133-1141.
- Kojima A y Nagato Y (1997) Discovery of highly apomictic and highly amphimictic dihaploids in *Allium Tuberosum*. *Sex Plant Reprod* 10: 8-12.
- Koltunow AM (1993) Apomixis: embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. *Plant Cell* 5: 1425-1437.

- Koltunow AM, Bicknell RA y Chaudhury AM (1995) Apomixis: Molecular strategies for the generation of genetically identical seeds without fertilization. *Plant Physiol* 108: 1345-1352.
- Kosambi DD (1944) The estimation of map distance from recombination values. *Ann Eugen* 12: 172-175.
- Krebs, SL y Hancock, JF (1989) Tetrasomic inheritance of isoenzyme markers in the highbush blueberry, *Vaccinium corumbosum* L. *Heredity* 63: 11-18.
- Kurata N, Nagamura Y, Yamamoto K, Harushima Y, Sue N, Wu J, Antonio BA, Shomura A, Shimizu T, Lin SY, Inoue T, Fukuda A, Shimano T, Kuboky Y, Toyam T, Miyamoto Y, Kirihara T, Hayasaka K, Miyao A, Monna L, Zhonh HS, Tamura Y, Wang ZX, Momma T, Umehara Y, Yano M, Sasaki T y Minobe Y (1994) A 300 kilobase interval genetic map of rice including 883 expressed sequences. *Nature Genet* 8: 367-372.
- Lacadena JR (1988) Capítulo XV: Variaciones cromosómicas numéricas: poliploidía. En *Genética*. 4º Edición. Agesa. Madrid.
- Labombarda P, Busti A, Cáceres ME, Pupilli F y Arcioni S (2002) An AFLP marker tightly linked to apomixis reveals hemigocity in a portion of the apomixis controlling locus in *Paspalum simplex*. *Genome* 45: 513-519.
- Lander ES, Green P, Abrahamson J, Barlow A, Daly MJ, Lincoln SE, Newburg L (1987) MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1: 174-181.
- Leblanc O, Grimanelli D, González-de-León D y Y Savidan (1995) Detection of the apomictic mode of reproduction in maize-*Tripsacum* hybrids using maize RFLP markers. *Theor Appl Genet* 90: 1198-1203.

- Leblanc O, Armstead I, Pessino SC, Ortiz JPA, Evans C, do Valle CB y 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 (1997) 49-58.
- Lerceteau E, Plomion CT y Andersson B (2000) AFLP and detection of quantitative trait loci (QTLs) for economically important traits in *Pinus sylvestris*: a preliminary study. *Mol Breed* 6: 451-458.
- Lerceteau-Kölher E, Guerin G, Laigret F y Denoyes-Rothan B (2003) Characterization of mixed disomic and polysomic inheritance in octoploid strawberry (*Fragaria x ananassa*) using AFLP mapping. *Theor Appl Genet* 107(4):619-628.
- Li X, van Eck Hj, Rouppe van der Voort JNAM, Hugien DJ, Stam P y Jacobsen E (1998) Autotetraploids and genetic mapping using common AFLP markers: the R2 allele conferring resistance to *Phytophthora infestans* mapped on potato chromosome 4. *Theor Appl Genet* 96: 1121-1128.
- Liljefors A (1955) Cytological studies in Sorbus. *Acta Horti Bergiani* 16: 47-113.
- Linclon SE, Dali MJ y Lander ES (1993) Constructing genetic linkage maps with MAPMAKEREXP Versión 3.0: A tutorial and reference manual. A Whitehead Institute for biomedical research. Technical Report. Third Edition.
- Litt M y Luty JA (1989) A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am J Hum Genet* 44: 398-401.
- Maheshwari P (1978) The female gametophyte. En: An introduction to the embryology of angiosperms. Tata Mc Graw Publishing Company Ltd. Nueva Delhi.

- Martienssen R, Barkan A Taylor WC y Freeling M (1990) Somaticly heritable switches in the DNA modification of *Mu* transposable elements monitored with suppressible mutant in maize. *Genes Dev* 4: 331-343.
- Martínez EJ, Espinoza F y CL Quarin (1994) B_{III} progeny (2n+n) from apomictic *Paspalum notatum* obtained through early pollination. *J Hered* 85: 295-297.
- Martínez EJ, Quarin CL y Hayward MD (1999) Genetic control of apospory in *Paspalum* species. *Cytologia* 64: 425-433.
- Martínez EJ, Urbani MH, Quarin CL y Ortiz JPA (2001) Inheritance of apospory in bahiagrass, *Paspalum notatum*. *Hereditas* 135: 19-25.
- Martínez EJ, Hopp E, Stein J, Ortiz JPA y Quarin CL (2003) Genetic characterization of apospory in tetraploid *Paspalum notatum* based on the identification of linked molecular markers. *Molecular Breeding* 12 (4): 319-327.
- Masson P, Surosky R, Kingsbury JA y Fedoroff NV (1987) Genetic and molecular analysis of the *Spm*-dependent *a-m2* alleles of the maize *a* locus. *Genetics* 117: 117-137.
- Mather K (1957) The measurement of linkage in heredity. Methuen and Co., London.
- Matzk F, Meister A y Schubert I (2000) An efficient screen for reproductive pathways using mature seeds of monocots and dicots. *Plant J* 21: 97-108.
- Matzk F, Meister A, Brutovska R y Schubert I (2001) Reconstruction of reproductive diversity in *Hypericum perforatum* L. opens novel strategies to manage apomixis. *Plant J* 26: 275-282.
- Matzk F, Prodanovic S Bäumlein H y Schubert I (2005) The inheritance of apomixis in *Poa pratensis* confirms a five locus model with differences in gene expressivity. *The Plant Cell* 17: 13-24.

- Mc Couch Sr, Kochert G, Yu ZH, Wang ZY, Khush GS, Coffman WR y Tanksley SD (1988) Molecular mapping of rice chromosomes. *Theor Appl Genet* 76: 815-829.
- Michelmore RW, Paran I y Kesseli V (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. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 9828-9832.
- Missaoui AM, Paterson AH y Bouton JH (2005) Investigation of genomic organization in switchgrass (*Panicum virgatum* L.) using DNA markers. *Theor Appl Genet* 110: 1372-1383.
- Mogie M (1992) *The Evolution of Asexual Reproduction in Plants*. Chapman & Hall, London.
- Morgan RN, Ozias-Akins P y Hanna WW (1998) Seed set in an apomictic BC₃ pearl millet. *International Journal of Plant Science* 159: 89-97.
- Moore G (1995) Cereal genome evolution: pastoral pursuits with *lego* genomes. *Curr Opin Genet Dev* 5: 717-724.
- Moore G (2000) Cereal chromosome structure, evolution and pairing. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 51: 195-222.
- Moore G, Gale MD, Kurata N y Flavell RB (1993) Molecular analysis of small grain cereal genomes: current status and prospects. *Biotechnology* 11: 584-589.
- Moore G, Devos KM, Wang Z y MD Gale (1995a) Grasses, line up and form a circle. *Curr. Biol.* 5:737-739.
- Moore G, Foote T, Helentjaris T, Devos KM, Kurata N y Gale MD (1995b) Was there a single ancestral cereal chromosome? *Trends Genet.* 11:81-82.

- Naumova TN, Hayward MD y Wagenvoort M (1999) Apomixis and sexuality in diploid and tetraploid accessions of *Brachiaria decumbens*. *Sex and Plant Reprod* 12: 43-52.
- Noack L (1939) Über Hypericum-Kreuzungen. VI. Fortpflanzungsverhältnisse und Bastarde von *Hypericum perforatum* L. *Z. Indukt Abstamm Vererb-L.* 76:569-601.
- Nogler GA (1982) How to obtain diploid apomictic *Ranunculus auricomus* plants not found in the wild state. *Bot Helv* 92: 13-22.
- Nogler GA (1984a) Gametophytic apomixis. In: Johri BM (ed). *Embryology of angiosperms*. Springer-Verlag, Berlin, pages 475-518.
- Nogler GA (1984b) Genetics of apospory in apomictic *Ranunculus auricomus*. V. Conclusion. *Botanica Helvetica* 94: 411-422.
- Norrmann GA, Quarin CL y BL Burson (1989) Cytogenetics and reproductive behavior of different chromosome races in six *Paspalum* species. *Jour Hered* 80: 24-28.
- Noyes RD y Reiseberg LH (2000) Two independent loci control agamospermy (apomixis) in the triploid flowering plant *Erigeron annuus*. *Genetics* 155: 379-390.
- 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 y Quarin CL (2001) A genetic linkage map of diploid *Paspalum notatum*. *Crop Sci* 41: 823-830.
- Ortiz JPA y Pessino CL (2002) Apomixis and its potential role in agriculture. *AgboitechNet* 4. *ABN 081*.
- Ostenfeld CH (1910) Further studies on the apogamy and hybridisation of the Hieracia. *Z. Indukt Abstamm Vererbungslehre* 3: 241-285.

- Ozias-Akins P, Lubbers EL, Hanna WW y McNay JW (1993) Transmission of the apomictic mode of reproduction in *Pennisetum*: co-inheritance of the trait and molecular markers. *Theor Appl Genet* 85:632-638.
- Ozias-Akins P, Roche D y WW Hanna (1998) Tight clustering and hemizygoty of apomixis-linked molecular markers in *Pennisetum squamulatum* implies genetic control of apospory by a divergent locus that may have no allelic form in sexual genotypes. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 5127-5132.
- Ozias-Akins P, Akiyama Y y Hanna WW (2003) Molecular characterization of the genomic region linked with apomixis in *Pennisetum/Cenchrus*. *Funct Integr Genomics* 3: 94-104.
- Ozkan H, Tuna M y Arumuganathan K (2003) Non-additive changes in genome size during allopolyploidization in the wheat (*Aegilops - Triticum*) group. *J Hered* 94: 260- 264.
- Pessino SC, Ortiz JP, Leblanc O, do Valle CB y MD Hayward (1997) Identification of a maize linkage group related to apomixis in *Brachiaria*. *Theor Appl Genet* 94: 439-444.
- Pessino SC, Evans C, Ortiz JPA, Armstead I, do Valle CB y MD Hayward (1998) A genetic map of the apospory-region in *Brachiaria* hybrids: Identification of two markers closely associated with the trait. *Hereditas* 128: 153-158.
- Pessino SC, Ortiz JPA, Hayward MD y CL Quarin (1999) The molecular genetics of gametophytic apomixis. *Hereditas* 130: 1-11.
- Pessino SC, Espinoza F, Martínez EJ, Ortiz JPA, Valle E y Quarin CL (2001) Isolation of cDNA clones differentially expressed in flowers of apomictic and sexual *Paspalum notatum*. *Hereditas* 134:35-42.

- Petrov DF, Belousova NI y Fokina ES (1979) Inheritance of apomixis and its elements in *Tripsacum* hybrids. *Genetika* 15: 1827-1836.
- Plomion C y O'Malley DM (1996) Recombination rate differences for pollen parents and seed parents in *Pinus pinaster*. *Heredity* 77: 341-350.
- Porceddu A, Albertini E, Barcaccia E, Falistocco E y Falcinelli M (2002) Linkage mapping in apomictic and sexual Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.) genotypes using a two way pseudo-testcross strategy based on AFLP and SAMPL markers. *Theor Appl Genet* 104: 273-280.
- Pozzobon MT y Valls JFM (1997) Chromosome number in germoplasma accessions of *Paspalum notatum* (Gramineae). *Braz J Genetics* 20: 29.34.
- Pupilli F, Cáceres ME, Quarín CL y S Arcioni (1997) Segregation analysis of RFLP markers reveals a tetrasomic inheritance in apomictic *Paspalum simplex*. *Genome* 40: 822-828.
- Pupilli F, Busti A, Quarín CL y Arcioni S (2001) The chromosome segment related to apomixis in *Paspalum simplex* is homeologous to the telomeric region of the long arm of rice chromosome 12. *Molecular Breeding* 8: 53-61.
- Pupilli F, Martínez EJ, Busti A, Calderini O, Quarín CL y Arcioni S (2004) Comparative mapping reveals partial conservation of synteny at the apomixis locus in *Paspalum* spp. *Mol. Gen. Genomics* 270: 539-548.
- Qi X, Stam P y Lindhout P (1996) Comparison and integration of four barley genetic maps. *Genome* 39: 379-394.
- Qu L y Hancock JF (1995) Nature of 2n gamete formation and mode of inheritance in interspecific hybrids of diploid *Vaccinium darrowianum* tetraploid *V. corymbosum*. *Theor Appl Genet* 91: 1309-1315.



- Qu L y Hancock JF (1998) Evolution in an autopolyploid group displaying predominantly bivalent pairing at meiosis: genomic similarity of diploid *Vaccinium darrewi* and autotetraploid *V. corymbosum*. *Am J Bot* 85: 698-703.
- Qu L y Hancock JF (2001) Detecting and mapping repulsion-phase linkage in polyploids with polysomic inheritance. *Theor Appl Genet* 103: 136-143.
- Quarin CL (1992) The nature of apomixis and its origin in Panicoid grasses. *Apomixis Newsletter* 5: 8-15.
- Quarin CL (1999) Effect of pollen source and pollen ploidy on endosperm formation and seed set in pseudogamous apomictic *Paspalum notatum*. *Sex. Plant Reprod.* 11:331-335.
- Quarin CL y Hanna WW (1980) Effect of three ploidy levels on meiosis and mode of reproduction in *Paspalum hexastachyum*. *Crop Sci* 20: 69-75.
- Quarin CL, Burson BL y GW Burton (1984) Cytology of intra- and interspecific hybrids between two cytotypes of *Paspalum notatum* and *P. cromyorrhizon*. *Bot Gaz* 145: 420-426.
- Quarin CL y EP Lombardo (1986) Niveles de ploidía y distribución geográfica de *Paspalum quadrifarium* (Gramineae). *Mendeliana* 7: 101-107.
- Quarin CL y GA Norrmann (1987) Relaciones entre el número de cromosomas, su comportamiento en la meiosis y el sistema reproductivo del género *Paspalum*. En: *Anales del IV Congreso Latinoamericano de Botánica, Bogotá, Colombia* 3:25-35.
- Quarin CL, Norrmann GA y MH Urbani (1989) Polyploidization in aposporous *Paspalum* species. *Apomixis Newsl* 2: 44-46.
- Quarin CL y GA Norrmann (1990) Interspecific hybrids between five *Paspalum* species. *Bot Gaz* 15: 366-369.

- Quarin CL y Burson BL (1991) Cytology of sexual and apomictic *Paspalum* species. *Cytologia* 56: 223-228.
- Quarin CL y OA Bovo (1995) Apomictic colchicine-induced tetraploid *Paspalum notatum*, Abstracts of International Conference on Harnessing Apomixis, College Station, Texas. p. 71.
- Quarin CL, Espinoza F, Martinez EJ, Pessino SC y Bovo OA (2001) A rise of ploidy level induces the expression of apomixis in *Paspalum notatum*. *Sex Plant Reprod* 13: 243-249.
- Quarin CL, Urbani MH, Blount AR, Martínez EJ, Hack CM, Burton GW y Quesenberry KH (2003) Registration of Q4188 and Q4205, sexual tetraploid germplasm lines of Bahiagrass. *Crop Sci* 43: 745-746.
- Rajapakse S, Byrne DH; Zhang L, Anderson N, Arumuganathan K y Ballard RE (2001) Two genetic linkage maps of tetraloid roses. *Theor Appl Genet* 103: 575-583.
- Ramsey J y Schermeske DW (1998) Pathways, mechanisms and rate of polyploid formation in flowering plants. *Annu Rev Ecol Syst* 29: 467-501.
- Rayapati PJ, Gregory JW, Lee M y Wise RP (1995) A linkage map of diploid oat *Avena* based on RFLP loci and locus conferring resistance to *Puccinia coronata* var *avenae*. *Theor Appl Genet* 89:831-835.
- Reik W y Walter J (2001) Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nat Rev Genet* 2: 21-32.
- Reiser L y Fischer RL (1993) The ovule and the embryo sac. *Plant Cell* 5: 1291-1301.
- Ribault JM y Hoisington D (1998) Marker-assisted selection: new tools and strategies. *Trends Plant Sci* 3: 236-239.

- Ripol MI, Churchill GA, da Silva JAG y Sorrells M (1999) Statistical aspects of genetic mapping in autopolyploids. *Gene* 235: 31-41.
- Ritter E, Gebhardt C y Salamini F (1990) Estimation of recombination frequencies and construction of RFLP linkage maps in plants from crosses between heterozygous parents. *Genetics* 125: 645-654.
- Roche D, Cong P, Chen ZB, Hanna WW, Gustine DL, Sherwood RT y Ozias-Akins P (1999) An apospory specific genomic region is conserved between buffelgrass (*Cenchrus ciliaris*) and *Pennisetum squamulatum* Fresen. *Plant J* 19: 203-208.
- Roche D, Chen Z, Hanna WW y Ozias-Akins P (2001) Non-mendelian transmission of an apospory-specific genomic region in a reciprocal cross between sexual pearl millet (*Pennisetum glaucum*) and an apomictic F1 (*P. glaucum* x *P. squamulatum*). *Sex Plant Reprod* 13: 217-223.
- Roche D, Conner JA, Budiman MA, Frisch D, Wing R, Hanna WW y Ozias-Akins P (2002) Construction of BAC libraries from two apomictic grasses to study the microcolinearity of their apospory-specific genomic regions. *Theor Appl Genet* 104: 804-812.
- Rodrigues JCM, Cabral GB, Dusi DMA, de Mello LV, Ridgen DJ y Carneiro VTC (2003) Identification of differentially expressed cDNA sequences in ovaries of sexual and apomictic plants of *Brachiaria brizantha*. *Plant Molecular Biology* 53:745-757.
- Rosenberg O (1908) Cytological studies on the apogamy in Hieracium. *Bot Tidsskr.* 28:143-170.
- Rosenberg O (1930) Apogamie und Parthenogenesis bei Pflanzen. In: Baur E, Hartmann M (eds.) *Handbuch Vererbungswiss* II (12). Borntraeger, Berlin.

- Russell SD (1993) The egg cell: Development and role in fertilization and early embryogenesis. *Plant Cell* 5:1349-1359.
- Russell PJ (1996) Linkage, crossing-over, and gene mapping in eukaryotes. En: Genetics, PJ Russell (Ed.) Harper Collins College Publishers, 10 East 53rd Street, New York, NY 10022.
- Saghai-Marouf MA, KM Soliman, RA Jorgensen y RW Allard (1984) *Proc Natl Acad Sci* 81: 8014-8018.
- Saha MC, Mian R, Zwonitzer JC, Chekhovskiy K y Hopkins AA (2005) An SSR and AFLP based genetic linkage map of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). *Theor Appl Genet* 110(2):323-336.
- Sambrook J, Fritsch EF y Maniatis T (1989) *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2^o de. Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Savidan Y (1981) Genetics and utilisation of apomixis for the improvement of Guineagrass (*Panicum maximum* Jacq). *Proc. XIV Intl. Grassland Congr. Lexington Ky*, p.182-184.
- Savidan Y (1982) Nature et hérédité de l'apomixie chez *Panicum maximum* Jacq. *Travaux et Documents OSTROM, Paris*, 153: 1-159.
- Savidan Y (1986) Apomixis as a new tool to increase grain crop productions in semi-arid tropics. A research project. *Agric. Ecosystems Environ.* 16:285-290.
- Savidan Y y Dujardin M (1992) Apomixie: la prochaine révolution verte? *La Recherche* 241:326-334
- Savidan Y (2000) Apomixis: Genetics and breeding. *Plant Breeding Reviews* 18:13-86.
- Sax K (1923) The association of size differences with seed-coat pattern and pigmentation in *Phaseolus vulgaris*. *Genetics* 8: 552-560.

- Sax K (1959) The cytogenetics of facultative apomixis in *Malus* species. *J Arnold Arbor (Harv Univ)* 40: 289-297.
- Shapiro SS y Wilk MB (1965) An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika* 52 (3 Anal 4): 591- 611.
- Sherwood RT, Berg CC y BA Young (1994) Inheritance of apospory in Buffelgrass. *Crop Sci.* 34: 1490-1494.
- Siena LA, Stein J, Quarín CL y Ortiz JPA (2005) Determinación del origen sexual o asexual de progenies diploides de *Paspalum rufum* con marcadores de RAPD. Baires Biotec 2005. Libro de Resúmenes, pág. 241.
- Soltis, DE y Riesenber, LH (1986) Autopolyploidy in *Tolmiea menziesii* (*Saxifragaceae*): genetic insights from enzyme electrophoresis. *Am J Bot* 73: 310-318.
- Sorrells ME (1992) Development and application of RFLPs in polyploids. *Crop Sci* 32: 1086-1091.
- Stam P (1993) Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package: JoinMap. *The Plant Journal* 3: 739-744.
- Stebbins GL (1950) Variation and evolution in plants. Columbia Univ Press, New York.
- Stein J, Quarín CL, Martínez EJ, Pessino SC y Ortiz JPAO (2004) Tetraploid races of *Paspalum notatum* show polysomic inheritance and preferential chromosome pairing around the apospory-controlling locus. *Theor Appl Genet* 109: 186-191.
- Steinemann M y Steinemann S (1997) The enigma of Y chromosome degeneration: TRAM a novel retrotransposon is preferentially located on the neo-Y chromosome of *Drosophila miranda*. *Genetics* 145: 179-187.
- Sturtevant AH (1913) The linear arrangement of six sex-linked factors in *Drosophila*, as shown by mode of association. *J Exp Zool* 14: 43-59.

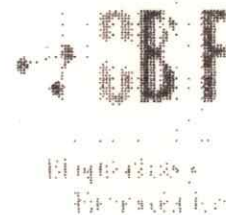
- Suzuki DT, Griffiths AJF, Miller JH y Lewontin RC (1996) Introducción al análisis Genético. Cuarta ed. Interamericana-McGraw-Hill. Madrid.
- Tani N, Tkahashi T, Iwata H, Mukai Y, Ujino-Ihara T, Matsumoto A, Yoshimura K, Yoshimaru H, Murai M, Nagasaka K y Tsumura Y (2003) A consensus linkage map for sugi (*Crytomeria japonica*) from two pedigrees, based on microsatellites and expressed sequense tags. *Genetics* 165: 1551-1568.
- Tao Q, Chang YL, Wang J, Chen H, Islam-Faridi MN, Scheuring C, Wang B, Stelly DM y Zhang HB (2001) Bacterial artificial chromosome based physical map of the rice genoime constructed by restriction fingerprint analysis. *Genetics* 158: 1711-1724.
- Tao Q, Wang A y Zhang HB (2002) One large-insert plant-transformation-competent BIBAC and three BAC libraries of Japonica rice for genome research in rice and other grasses. *Theor Appl Genet* 105: 1058-1066.
- Tischler CR y Burson BL (1995) Evaluating different bahiagrass cytotypes for heat tolerance and leaf epicuticular wax content. *Euphytica* 84:229-235.
- Van Deynze AE, Dubcovsky J, Gill KS, Nelson JC, Sorrells MD, Dvorak J, Gill BS, Lagudah ES, Mc Couch SR y Appels R (1995) Molecular genetic maps for chromosome 1 in Triticeae species and their relation to chromosomes in rice and oats. *Genome* 38: 45-59.
- Van Deynze AE, Sorrells ME, Park WD, Ayres NM, Fu H, Cartinhour SW, Paul E y McCouch SR (1998) Anchor probes for comparative mapping of grass genera. *Theor Appl Genet* 97:356-369.
- Van Dijk PJ, Tas ICQ, Flaque M y Bakx-Schotman JMT (1999) Crosses between sexual and apomictic dandelions (*Taraxacum*) II: the breakdown of apomixis. *Heredity* 83: 715-721.

- Van Dijk PJ y (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.
- Vavilov NI (1940) The doctrine about an origin of cultural plants after Darwin. *Sov Sci* 2: 55-75.
- Vielle Calzada JP, Crane CF y Stelly DM (1996a) Apomixis: The asexual revolution. *Science* 274: 1322-1323.
- Vielle-Calzada JP, Nuccio ML, Budiman MA, Thomas TL, Burson BL, Hussey MA y Wing RA (1996b) Comparative gene expression in sexual and apomictic ovaries of *Pennisetum ciliare* (L.) Link. *Plant Molecular Biology* 32: 1085-1092.
- Vielle-Calzada JP, Baskar R y Grossniklaus U (2000) Delayed activation of the paternal genome during seed development. *Nature* 404: 91-94.
- Vijverberg K, Van der Hulst RGM, Lindhout P y Van Dijk PJ (2004) A genetic linkage map of the diplosporous chromosomal region in *Taraxacum officinale* (common dandelion; Asteraceae). *Theor Appl Genet* 108: 725-732.
- Vos PR, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters, A, Pot J, Peleman J, Kuiper M y M Zabeau (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl Acids Res* 23: 4407-4414.
- Walbot V (1992) Strategies for mutagenesis and gene cloning using transposon tagging and T-DNA insertional mutagenesis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 43: 49-82.
- Wang ZM, Devos KM, Liu CJ, Wang RQ y Gale MD (1998a) Construction of RFLP based maps of foxtail millet, *Setaria italica* (L.) P. Beauv. *Theor Appl genet* 96:31-36.
- Wang D, Karle R, Brettin TS y Ienossi AF (1998b) Genetic linkage map in sour cherry using RFLP markers. *Theor Appl Genet* 97: 1217-1224.

- Warmke HE (1954) Apomixis in *Panicum maximum*. Am J Bot 41: 5-11.
- Wendel JF (2000) Genome evolution in polyploids. Plant Mol Biol 42: 225-249.
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak DL, Rafalski JA y Tingey SV (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucl Acids Res 18: 6531-6536.
- Wu KK, Burnquist W, Sorrells ME, Tew TL, Moore PH y Tanksley SD (1992) The detection and estimation of linkage in polyploids using single-dose restriction fragments. Theor Appl Genet 83: 294-300.
- Wu KS y Tanksley SD (1993) Genetic and physical mapping of telomeres and microsatellites of rice. Plant Mol Biol 22: 861-872.
- Young ND (1994) Constructing a plant genetic linkage map with DNA markers. DNA Based markers in Plants. Edited by RL Phillips and IK Vasil. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands.
- Zhang HB y Wing RA (1997) Physical mapping of the rice genome with BACs. Plant Mol Biol 35: 115-127.
- Zhang HB y Wu C (2001) BAC as tools for genome sequencing. Plant Physiol Biochem 39: 195-209.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOQUIMICAS Y FARMACEUTICAS
SECRETARIA CONSEJO DIRECTIVO
sconsejo@fbioyf.unr.edu.ar
Suipacha 531 - S2002LRK Rosario - Argentina
Teléfono Fax: 54 (0341) 480-4592/3 - Int. 245



"2006 - Año de homenaje al Dr. Ramón Carrillo"

EXPTE N° 6722/004
Rosario, 6 de abril de 2006

VISTO el dictamen del Jurado oportunamente designado para evaluar la Tesis de la Lic. en Biotec. STEIN, Juliana.

Por ello,

**EL CONSEJO DIRECTIVO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS
BIOQUIMICAS Y FARMACEUTICAS
RESUELVE:**

ARTICULO 1°.- Aprobar el Trabajo de Tesis de Doctorado presentado por la Lic. en Biotec. STEIN, Juliana; titulado: "ESTUDIOS DE LOCALIZACIÓN Y HERENCIA DE GENES RELACIONADOS CON LA APOMIXIS EN RAZAS TETRAPLOIDES DE PASPALUM NOTATUM"

ARTICULO 2°.- Téngase presente a los efectos que puedan corresponder la opinión del Jurado en cuanto a la calificación de la Tesis como SOBRESALIENTE.

ARTICULO 3°.- Regístrese, comuníquese y archívese.-

RESOLUCION C.D. N° 056/06

Fdo).- Dra. Claudia E. Balagué - Presidente de la Sesión

ES COPIA


IVANA L. LOPEZ
Secretaria
Consejo Directivo