



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

**ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DEL GEN *PN_TGS1* EN EL DESARROLLO
REPRODUCTIVO VEGETAL**

CAROLINA MARTA COLONO

Licenciada en Biotecnología

Tesis para optar al título de Dra. en Ciencias Agrarias

DIRECTOR: Dra. SILVINA CLAUDIA PESSINO

CO-DIRECTOR: Dr. HUGO RAÚL PERMINGEAT

“Estudio de la función del gen *PN_TGS1* en el desarrollo reproductivo vegetal”

Carolina M. Colono
Licenciada en Biotecnología - UNL

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctora en Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Rosario, y no ha sido previamente presentada para la obtención de otro título en ésta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agrarias, durante el período comprendido entre el 1 de Abril de 2015 y 30 de Octubre de 2019, bajo la dirección de la Dra. Silvina C. Pessino y la co-dirección del Dr. Hugo R. Permingeat.

Lic. Carolina M. Colono
Doctorando

Dra. Silvina C. Pessino
Directora

Dr. Hugo R. Permingeat
Co-Director

Defendida:..... de 2020.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer especialmente a mi directora de tesis, Dra. Silvina Pessino, por haber confiado en mí para la realización de este trabajo, por su apoyo y ayuda desinteresada en todo momento. Valoro muchísimo su entusiasmo en la transmisión de sus conocimientos que tanto colaboraron en mi formación. De corazón, muchísimas gracias por todo.

Al Dr. Hugo Permingeat, mi co-director, por compartir sus conocimientos y experiencia, principalmente en los experimentos de bombardeo.

Al Dr. Juan Pablo Ortiz por su predisposición y contribución en la realización de esta tesis.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por haber financiado la realización de mi posgrado.

A la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Rosario, por permitirme utilizar sus instalaciones para el desarrollo de este proyecto. Y al Instituto de Investigaciones en Ciencias Agrarias (IICAR).

A mis queridos Pipeteadores: Mariano, Nico, Álvaro, Vale Pal, Cele, Lucas, Andre, Vale Per, Luisi, Alber, Agos, Mari, por estar siempre presente. La amistad establecida en estos años fue significativa en el recorrido de este camino.

A la Dra Maricel Podio, por sus enseñanzas y predisposición en el manejo de la bioinformática.

A Lorena, Juliana, Luciana, Verónica, Daniel y demás integrantes del laboratorio, por su ayuda en diferentes experimentos y consejos siempre que los necesité.

A los CPA del IICAR por su colaboración. En especial a David, por el cuidado de las plantas y por sus enseñanzas agronómicas.

A toda la cátedra de Química Orgánica, que me recibió con mucho cariño. A la cátedra de Fisiología Vegetal por permitirme usar sus instalaciones en algunos experimentos.

A los miembros del jurado, por haber aceptado ser parte de la evaluación de esta tesis.

A mi familia, con los que siempre puedo contar de manera incondicional. Mis padres, Marta y Dante. Mis hermanos Diego, Javier y Elías. Y mis hermosos sobrinos Sofía y Augusto.

A los amigos y colegas que se han cruzado en mi camino. A mis queridas biotecnólogas por estar siempre presente. Y a mis amigos, que siempre están, brindándome cariño y soporte.

A todos, MUCHAS GRACIAS

Parte de los resultados descritos en esta Tesis han sido publicados o están siendo preparados para publicación en los siguientes artículos/comunicaciones científicas:

Artículos en revistas con referato

Colono C, Ortiz JPA, Permingeat HR, Souza Canada ED, Siena LA, Spoto N, Galdeano F, Espinoza F, Leblanc O, Pessino SC. (2019). A plant-specific *TGS1* homolog inhibits the formation of multiple embryo sacs in sexual tetraploid *Paspalum notatum* ovules. *Frontiers in Plant Science*. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01566>

Ortiz JPA, Leblanc O, Rohr C, Grisolia M, Siena LA, Podio M, Colono C, Azzaro C, Pessino SC. (2019). Small RNA-seq reveals novel regulatory components for apomixis in *Paspalum notatum*. *BMC Genomics*. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5881-0>.

Mancini M, Permingeat H, Colono C, Siena L, Pupilli F, Azzaro C, Dusi DM, Tavares de Campos Carneiro V, Podio M, Seijo JG, González AM, Felitti S, Ortiz JPA, Leblanc O, Pessino SC. (2018). The MAP3K-coding *QUI-GON JINN (QGJ)* gene is essential to the formation of unreduced embryo sacs in *Paspalum*. *Frontiers in Plant Science*. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01547>.

Podio M*, Colono C*, Rohr C, Grisolia M, Siena L, Ortiz JP, Pessino S. Comparative analysis of sense-antisense gene expression along reproductive development in sexual and apomictic bahiagrass. *En preparación*. *misma contribución

Colono C, Podio M, Pessino SC. The differential regulation of the splicing machinery in sexual and apomictic reproduction. *En preparación*.

Pessino SC, Costantini E, Colono C, Azzaro C, Colombo L, Mendes M. The role of miR160 and *ARF10* in the auxin-mediated plant reproduction control. *En preparación*.

Presentaciones en reuniones científicas

Colono C, Siena LA, Ortiz JPA, Leblanc O, Souza Canada ED, Permingeat HR, Pessino SC. (2019). *PN_TGS1-like* downregulation induces the formation of multiple embryo sacs in ovules of sexual *Paspalum notatum*. Asociación Latinoamericana de Genética. Mendoza. E-ISNN: 1852-6322.

Colono C, Siena LA, Ortiz JPA, Leblanc O, Souza Canada ED, Permingeat HR, Pessino SC. (2019). Investigando el rol de la metiltransferasa *PN_TGS1* en la transición sexualidad-apomixis en *Paspalum notatum*. Ciclo de Seminarios del IBONE 2019. Corrientes. *Exposición oral*.

Colono C, Siena LA, Ortiz JPA, Leblanc O, Souza Canada ED, Permingeat HR, Pessino SC. (2018). Operation of the *Paspalum notatum* sexuality-apomixis switch by *PN_TGS1-LIKE* and other members of the splicing machinery. Workshop Advances in Apomixis Research. Zavalla. *Exposición oral en inglés*.

Colono C, Siena LA, Ortiz JPA, Leblanc O, Souza Canada ED, Permingeat HR, Pessino SC. (2018). Investigación de la función del gen *TGS1-LIKE* en la transición sexualidad-apomixis de *Paspalum notatum*. IV Taller de Biología Celular y del Desarrollo. Chascomús.

Colono C, Siena LA, Ortiz JPA, Zanczuk A, Leblanc O, Souza Canada ED, Permingeat HR, Pessino SC. (2017). Estudio de la función del gen *PN_TGS1-LIKE* en el desarrollo reproductivo de *Paspalum notatum*. XIX Congreso y XXXVII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. ISSN 2314-1484.

Colono C, Siena LA, Ortiz JPA, Leblanc O, Souza Canada ED, Permingeat HR, Pessino SC. (2017). Caracterización del rol de la ARN-metiltransferasa *TGS1-like* en la transición desde la sexualidad a la apomixis en *Paspalum notatum*. XI Simposio Redbio, Bahía Blanca.

Colono C, Siena L, Ortiz JP, Leblanc O, Permingeat H, Pessino S. (2016). Exploring the link between *TGS1*-like downregulation and the transition from sexuality to apomixis in *Paspalum notatum*. V Ciclo de Seminarios sobre avances en la caracterización genética y molecular de la Apomixis. Bahía Blanca. *Exposición oral en inglés*

Colono C, Siena LA, Ortiz JPA, Leblanc O, Pessino SC. (2016). Identificación de transcritos que producen diferentes variantes de clivado y empalme en flores de *Paspalum notatum* apomictico y sexual. I Reunión Transdisciplinaria en Ciencias Agropecuarias. ISBN 978-987-4055-04-0.

Colono C, Demarchi L, Sambrailo A, Aladio M, Saenz E, Desir A, Zigolo I, Suárez A, Pessino S. (2015). Estudios de Germinación en semillas de plantas apomicticas de *Paspalum notatum* con expresión silenciada del gen *PNMEKK1*. XVII Congreso y XXXV Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. ISSN 2314-1484.

Colono C, Siena LA, Ortiz JPA, Leblanc O, Pessino SC. (2015). A search for transcripts producing differential splice variants in spikelets of apomictic and sexual *Paspalum notatum*. 11th International Congress of Plant Molecular Biology, in Foz de Iguazú, Paraná, Brazil.

INDICE

Índice	i
Abreviaturas, Símbolos y Anglicismos	v
Resumen	viii
Abstract	x
I- INTRODUCCIÓN	1
I.1- Apomixis.....	1
I.1.1- Definición del término apomixis.....	1
I.1.2- Evolución de la apomixis.....	2
I.1.3- Desarrollo sexual	4
I.1.4- Desarrollo apomítico	6
I.1.5- Control genético y epigenético	11
I.1.6- Estudios genómicos y transcriptómicos.....	16
I.1.7- Estudios funcionales	18
I.1.8- La apomixis y la agricultura.....	20
I.1.9- La apomixis en <i>Paspalum</i>	22
I.1.9.1- El género <i>Paspalum</i>	22
I.1.9.2- <i>Paspalum notatum</i>	24
I.2- El gen <i>TGS1</i> y su posible rol en el desarrollo reproductivo.....	26
I.2.1- ¿Por qué es interesante estudiar al gen <i>TGS1</i> ?.....	26
I.2.2- Funciones caracterizadas de <i>TGS1</i>	27
I.2.3- Formación de la caperuza.....	28
I.2.4- Localización intracelular de la proteína <i>TGS1</i>	29
I.2.5- Estructura proteica de <i>TGS1</i>	30
I.2.6- Consecuencias de la pérdida funcional de <i>TGS1</i>	31
I.2.7- Intelectores con <i>TGS1</i>	31
I.2.8- <i>TGS1</i> en plantas.....	32
I.2.9- <i>Splicing</i> alternativo como mecanismo de control.....	33

II- OBJETIVOS	35
II.1- Objetivo General	35
II.2- Objetivos Específicos	35
III- HIPÓTESIS	37
IV- MATERIALES Y MÉTODOS	38
IV.1- Material vegetal..	38
IV.2- Medios de cultivo <i>in vitro</i>	38
IV.3- Vectores de transformación	39
IV.4- Experimentos de transformación	40
IV.4.1- Construcción del plásmido pAct1-F1as	40
IV.4.2- Obtención de callos a partir de semillas maduras	41
IV.4.3- Transformación estable	42
IV.5- Verificación de la presencia del transgen	43
IV.5.1- Extracción de ADN genómico	43
IV.5.2- Detección del transgen por PCR	43
IV.6- Verificación de la expresión disminuida de <i>PN_TGS1-like</i>	44
IV.6.1- Extracción de ARN total	44
IV.6.2- Transcripción reversa	45
IV.6.3- PCR en tiempo real	45
IV.7- Análisis fenotípicos	46
IV.7.1- Caracterización fenotípica de las plantas control y transformantes.....	46
IV.7.2- Viabilidad del polen	46
IV.7.3- Análisis de fenotipos reproductivos en las plantas transformantes	46
IV.7.4- Citómetro de flujo	47
IV.7.5- Ensayos de germinación	48
IV.8- Uso de un marcador molecular para la detección del ACR	48
IV.9- Bases de datos	49
IV.10- Identificación de variantes de <i>splicing</i> en transcriptomas florales	50
IV.10.1- Búsqueda en bases de datos	50
IV.10.2- PCR convencional.....	51
IV.10.3- PCR en tiempo real	51

IV.11- Análisis bioinformático para localizar otros actores del <i>splicing</i> y determinar sus interrelaciones	52
V- RESULTADOS	53
V.1- Obtención de plantas transgénicas de <i>P. notatum</i> sexual en las que se silenció la actividad del gen <i>PN_TGS1-like</i> y análisis de las consecuencias sobre el desarrollo reproductivo	53
V.1.1- Experimentos de transformación	53
V.1.1.1- Construcción del plásmido pAct1-F1as	53
V.1.1.2- Obtención de callos a partir de semillas maduras	54
V.1.1.3- Transformación estable	55
V.1.2- Verificación de la presencia del transgen	56
V.1.2.1- Detección del transgen por PCR	56
V.1.3- Verificación de la expresión disminuida de <i>PN_TGS1-like</i>	57
V.1.3.1- PCR en tiempo real	57
V.1.4- Análisis fenotípicos	58
V.1.4.1- Caracterización fenotípica de las plantas control y transformantes	58
V.1.4.2- Viabilidad del polen	60
V.1.4.3- Análisis de fenotipos reproductivos en las plantas transformantes	62
V.1.4.4- Citómetro de flujo	69
V.1.4.5- Ensayo de germinación	70
V.1.5- Uso de un marcador molecular para la detección del ACR	71
V.2- Determinación de transcritos que muestran variantes de procesamiento diferenciales en tejidos reproductivos de plantas de <i>P. notatum</i> apomícticas y sexuales y en las líneas <i>tgs1-like</i> defectivas	73
V.2.1- Identificación de variantes de <i>splicing</i> en transcriptomas florales	73
V.2.2- Estudio del isotig 23387 en las plantas antisentido <i>tgs1-like</i>	77
V.3- Construcción de bibliotecas del transcriptoma floral reflejando estadios consecutivos del desarrollo en plantas apomícticas y sexuales. Análisis de la expresión de <i>PN_TGS1-like</i> y de otros miembros de la maquinaria de <i>splicing</i> ...	79

V.3.1- Construcción del transcriptoma floral de <i>P. notatum</i> estadio por estadio	79
V.3.2- Estudio de la expresión de <i>PN_TGS1-like</i> y del isotig 23387 en las bibliotecas generadas para los diferentes estadios de desarrollo	80
V.3.3- Identificación de genes que participan en el <i>splicing</i> en los diferentes transcriptomas disponibles	83
V.4- Identificación del número de copias y de la secuencia completa del gen <i>PN_TGS1-like</i> en el genoma de <i>Paspalum notatum</i>	90
V.4.1- Caracterización de la estructura genómica de <i>PN_TGS1-like</i>	90
V.5- Análisis de la posibilidad de que la expresión diferencial de <i>PN_TGS1-like</i> observada en óvulos de plantas apomíticas y sexuales, ocurra bajo silenciamiento transcripcional o postranscripcional	92
V.5.1- Análisis de las bibliotecas florales del componente pequeño (sRNA) de <i>P. notatum</i>	92
VI- DISCUSIÓN	93
VI.1- El gen específico de plantas <i>PN_TGS1-like</i> influye en el desarrollo de los gametofitos en óvulos de <i>Paspalum notatum</i> tetraploides sexuales	93
VI.2- Determinación de transcritos que presentan variantes de clivado y empalme del ARN en flores de plantas de <i>P. notatum</i> y estudio del posible blanco de <i>PN_TGS1-like</i>	100
VI.3- Construcción de bibliotecas del transcriptoma floral reflejando estadios consecutivos del desarrollo en plantas apomíticas y sexuales. Análisis de la expresión de <i>PN_TGS1-like</i> y de otros miembros de la maquinaria de <i>splicing</i>	102
VI.4- Identificación de la secuencia completa del gen <i>PN_TGS1-like</i> en el genoma de <i>Paspalum notatum</i>	105
VI.5- El gen <i>PN_TGS1-like</i> no es silenciado postranscripcionalmente por pequeños ARNs en plantas apomíticas	107
VII- CONCLUSIONES	108
VIII- BIBLIOGRAFÍA	110
IX- ANEXOS	131

ABREVIATURAS, SÍMBOLOS Y ANGLICISMOS

ACR: “Apomixis Controlling Region”, región genómica que controla la apomixis.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario.

AFLP: polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados.

ARN: ácido ribonucleico.

ARNasa: ribonucleasa.

ARNm: ácido ribonucleico mensajero.

BAP: N6-bencilaminopurina

BLAST: “Basic Local Alignment Search Tool”. Herramienta de búsqueda de alineamientos.

Buffer: solución reguladora, amortiguadora o tampón, que permite controlar el pH.

cDNA-AFLP: polimorfismos en el largo de los fragmentos amplificados a partir de ADN copia.

cm: centímetros.

CTAB: bromuro de cetiltrimetil amonio.

DIC: contraste de interferencia diferencial.

dNTPs: desoxinucleótidos trifosfato.

EDTA: ácido etilendiamino-tetracético.

Enhancer: sector de un promotor génico que promueve la transcripción de gen.

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

F1: primera generación en un cruzamiento.

FDR: del inglés “false discovery rate”.

g/l: gramos por litro.

g: gramos.

Ga: giga años.

GA3: ácido giberélico.

h: hora.

H₂O_d: agua destilada.

Isotigs: transcriptos ensamblados a partir de lecturas de secuencia.

Kinasa: enzima fosforilante dependiente de ATP.

Kit: equipo comercial.

kPa: kilo Pascales.

Linkat: conjunto de genes ligados posicionalmente (no recombinantes) que actúan como un bloque de unidad funcional.

Lnc-RNAs: del inglés “long non-coding RNA”.

LB: medio de cultivo bacteriano Luria-Bertani.

M: molar.

mA: miliamperes.

mg/l: miligramos por litro.

mg/ml: miligramos por mililitro.

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

MgCl₂: cloruro de magnesio.

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

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

MS: medio de cultivo de Murashige y Skoog.

N: normalidad.

n: número cromosómico haploide de una especie.

NaCl: cloruro de sodio.

NaOH: hidróxido de sodio.

NCBI: del inglés Resultados de búsqueda “National Center for Biotechnology Information”, o Centro Nacional para la Información Biotecnológica.

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

nm: nanómetro (10^{-9} m).

°C: grados centígrados.

OD: densidad óptica.

OGM: organismos genéticamente modificados.

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

pb: pares de bases.

PCR: reacción en cadena de la ADN polimerasa.

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

psi: libra por pulgada cuadrada (unidad de presión básica del sistema inglés).

RAPD: polimorfismos por amplificación al azar del ADN.

RFLP: polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción.

rpm: revoluciones por minuto.

s: segundos.

SDS: sulfato de dodecil sódico.

siRNA: del inglés “small-intefering RNAs”, o ARN pequeños de interferencia.

SSC: cloruro de sodio-citrato de sodio.

T: temperatura.

Ta: temperatura de anillado.

TAE: tris-ácido acético-EDTA.

Take off: número de ciclos de PCR requeridos para el despegue de la detección del amplicon (parámetro evaluado en los experimentos de PCR en tiempo real).

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

TE: Tris-EDTA.

Tm: temperatura de melting.

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

U: unidad de actividad enzimática.

UV: ultravioleta.

V: voltios.

W: wats.

wt: del inglés “wild type”, o tipo salvaje.

x: número cromosómico básico de una especie.

X-Gal: 5-bromo-4cloro-3indolil-beta-D-galactopiranósido.

µg: microgramos (10^{-6} g).

µl: microlitro (10^{-6} l).

% m/v: porcentaje de masa sobre volumen.

%v/v: porcentaje de volumen sobre volumen.

2n: número cromosómico diploide de una especie.

RESUMEN

Estudio de la función del gen *PN_TGS1* en el desarrollo reproductivo vegetal

Paspalum notatum es una gramínea modelo utilizada para estudiar la apomixis, un tipo de reproducción asexual por semillas que permite la formación de progenies clonales idénticas a la planta madre. En trabajos anteriores nuestro grupo determinó que el gen *PN_TGS1-like* (similar a *TRIMETILGUANOSINA SINTASA 1*) se expresa en óvulos de plantas sexuales de *P. notatum*, pero está reprimido en plantas apomícticas. *TGS1* codifica una metiltransferasa con rol dual, que promueve la biogénesis de sn(o) ARNs trimetilados en el proceso de *splicing*, y actúa como coactivador transcripcional. La eliminación de su función produce pérdida de la estructura nucleolar y deficiencias en el procesamiento de pre-rARNs y mARNs. Mientras que en levaduras y animales existe una sola copia del gen (*TGS1*), en plantas se detectan dos (*TGS1* y *TGS1-like*). En *P. notatum*, la expresión de la copia exclusiva de plantas (*TGS1-like*) se correlaciona negativamente con la expresividad de la apomixis. Nuestro objetivo fue estudiar el rol de *TGS1-like* en el desarrollo reproductivo de la especie apomíctica apospórica *P. notatum*. Para ello, caracterizamos la estructura genómica y las variantes de expresión del gen, usando bases de datos construidas en nuestro laboratorio, y determinamos que existe una sola copia genómica del mismo, que muestra dos variantes de transcritos florales. Luego, transformamos callos indiferenciados de una planta sexual con una construcción antisentido (pAct1-F1as) que silencia específicamente a *TGS1-like*. Las plantas antisentido desarrollaron tricomas en la superficie adaxial de la hoja y formación ocasional de óvulos gemelos. El análisis del desarrollo reproductivo en la antesis reveló que las líneas antisentido presentaban un 12,93-15,79% de los óvulos con sacos embrionarios de tipo apospórico (similares a SEA), y un 8,42-9,52% con una combinación de sacos meióticos y apospóricos. Además, en premeiosis/meiosis, el 32,5% de los óvulos mostraban células similares a iniciales de la aposporia (IAs) rodeando a la célula madre de la megáspora (CMM) o a las díadas meióticas derivadas de CMM. Estas IAs no iniciaban divisiones meióticas, por lo que podría inferirse que los sacos embrionarios supernumerarios detectados en antesis eran de tipo “no reducidos”. Las líneas antisentido producían una cantidad de polen y un conjunto de semillas viables equivalentes a los controles después de la autopolinización. Los análisis de citometría de flujo en cariopses derivados de líneas antisentido revelaron que todas las semillas viables se habían originado por sexualidad. Además, al comparar las líneas antisentido con los controles, detectamos una reducción de un

25,55% en el porcentaje de germinación. Para analizar si *TGS1-like* afectaba al proceso de clivado y empalme, comenzamos por seleccionar en nuestras bases transcriptómicas (454/Roche FLX +) los 316 transcritos con mayor expresión diferencial en flores de plantas apomícticas y sexuales (nótese que ambos tipos de plantas expresan diferencialmente al gen *TGS1-like* en flores) (FDR < 6,74E-10). Luego analizamos cuáles de estos transcritos diferenciales podrían corresponder a posibles variantes de *splicing*. Así, detectamos que una variante de *splicing* de *CHLOROPHYLL A-B BINDING PROTEIN 1B-21* (*CHLORO*, isotig 23387) presentaba menor representación en el transcriptoma de plantas apomícticas con respecto a sexuales. La expresión diferencial de dicha variante de *splicing* fue validada en varios individuos con diferente modo de reproducción mediante qRT-PCR. Además, un análisis del procesamiento de *CHLORO* en las líneas antisentido *tgsl-like* confirmó que la expresión de esa misma variante de *splicing* está disminuida respecto a los controles, lo que confirma que la actividad de *TGS1-like* es necesaria para su formación. A partir de estos resultados, concluimos que *CHLORO* es uno de los blancos de *TGS1-like*. Además, identificamos un grupo numeroso de transcritos relacionados con el *splicing*, que están diferencialmente representados en órganos reproductivos de plantas de *P. notatum*, y determinamos que conforman una red de interacciones junto con *TGS1-like*. En conjunto, nuestros resultados sugieren que, durante el proceso de reproducción sexual, *TGS1-like* se expresa en la nucela del óvulo e inhibe la formación de sacos embrionarios múltiples. La inhabilitación de la función *TGS1-like* provoca la aparición de células similares a IAs en la nucela, y luego sacos embrionarios supernumerarios, con morfología similar a los sacos embrionarios apospóricos, y posiblemente no reducidos. Sin embargo, la desregulación de *PN_TGS1* no es suficiente para inducir la formación de progeñe materna, ya que estos gametofitos extra no son capaces de llevar a cabo la partenogénesis y/o desarrollar endospermo viable. Además, la desregulación de *PN_TGS1-like* está asociada a defectos en la germinación de las semillas, aún de aquellas formadas por sexualidad, por lo que no descartamos un rol durante la embriogénesis y/o el desarrollo del endospermo. La regulación ejercida por *PN_TGS1-like* en la nucela del óvulo está enmarcada (al menos parcialmente) en un control del proceso de clivado y empalme, siendo la proteína cloroplástica de codificación nuclear *CHLORO* uno de sus genes blanco. Por otra parte, varios otros genes relacionados con la actividad de la maquinaria de *splicing* muestran una actividad diferencial durante la apomixis, y podrían integrar una red de interacciones funcionales junto con *TGS1-like*. En trabajos futuros deberán identificarse las relaciones funcionales entre los miembros de dicha malla, así como también la correspondencia entre el control ejercido por *TGS1* sobre el cloroplasto y el *splicing*.

ABSTRACT

Study of the *PN_TGS1* function in plant reproductive development

Paspalum notatum is a grass model used to study apomixis. In previous work we determined that *PN_TGS1-like* (*TRIMETILGUANOSINE SYNTHASE 1-like*) is repressed in ovules of apomictic *P. notatum* plants. *TGS1* encodes a RNA methyltransferase, which promotes the biogenesis of trimethylated sn (o) RNAs necessary for RNA splicing and acts as a transcriptional coactivator. *TGS1* downregulation causes loss of nucleolar structure and deficiencies in pre-rRNAs and mRNAs processing. In yeasts and animals there is only one copy of *TGS1*, but two copies are detected in plants (*TGS1* and *TGS1-like*). In *P. notatum*, the expression of the plant-specific copy (*TGS1-like*) negatively correlates with expressivity of apomixis. Our objective was to study the role of *TGS1-like* in the *P. notatum* reproductive development. First, we determined that *Paspalum* has a single genomic copy and two floral splice variants of *TGS1-like*. Then, we transformed sexual *P. notatum* with a *TGS1-like* antisense construction (pAct1-F1as). Phenotypic analysis revealed trichomes in leaves, and occasional formation of twin ovules. While control plants displayed a single meiotic embryo sac per ovule, antisense lines showed 12.93–15.79% of ovules bearing aposporous-like embryo sacs (AES-like), while 8.42–9.52% showed both meiotic and aposporous-like sacs. Besides, at early developmental stages, 32.5% of the ovules displayed nucellar cells resembling apospory initials (AIs) surrounding the megaspore mother cell (MMC) or the MMC-derived meiotic products. Flow cytometry analyses of caryopses in antisense lines revealed that full seeds originated only by sexuality. A reduction of 25.55% in the germination percentage was detected in antisense lines. To analyze whether *TGS1-like* affects the splicing, we selected 316 transcripts differentially expressed in flowers of apomictic and sexual plants, with values of FDR <6.74E-10, and examined the existence of putative splice variants. Using qPCR analysis in several apomictic and sexual individuals, we confirmed that the unprocessed splicing variant of one of these transcripts (*CHLOROPHYLL A-B BINDING PROTEIN 1B-21*, *CHLORO*) is less represented in apomictic plants. An analysis of the *tgs1-like* antisense lines confirmed that the representation of the unprocessed splicing variant is also diminished, confirming that *CHLORO* is one of the *TGS1-like* targets. In addition, we identified a group of splicing-related transcripts with differential representation in reproductive organs of *P. notatum* plants, and determined that

they form an interaction network including *TGS1-like*. We concluded that *PN_TGS1-like* is an apospory repressor, participates in splicing and target the CHLORO transcript. Numerous splicing genes integrate an interaction network with differential expression during apomixis.

INTRODUCCIÓN

I- INTRODUCCIÓN

I.1- Apomixis

I.1.1- Definición del término apomixis

El término apomixis fue definido como "reproducción asexual a través de semillas" por Gian Nogler hace 35 años, y esta descripción continúa siendo aún la más popular entre los científicos (Nogler, 1984). Etimológicamente, la palabra deriva del griego *apo* que significa "ausencia" y *mixis* que quiere decir "mezcla", haciendo referencia a la falta de unión de los gametos masculinos y femeninos durante la formación del cigoto, una particularidad que caracteriza a este proceso biológico. Este modo de reproducción peculiar conduce a la formación de semillas que contienen una progenie clonal genéticamente idéntica a la planta madre (Nogler, 1984). Ocurre naturalmente en las plantas con flores, y no ha sido descrita en las gimnospermas, salvo por una rara variante masculina observada en *Cupressus* (Pichot et al., 2008).

La apomixis fue descrita por primera vez en el año 1841 por J. Smith, como una anomalía observada en la especie australiana *Alchornea ilicifolia*. Cuando un ejemplar femenino de esta especie dioica fue introducido en los *Kew Royal Botanical Gardens* de Londres, fue capaz de florecer y producir una gran cantidad de semillas en ausencia de un progenitor masculino, evidenciando la existencia de un fenómeno asexual (Smith, 1841). Gregor Mendel fue quien, de forma involuntaria, realizó los primeros experimentos con plantas apomícticas, cuando utilizó cruces entre especies del género *Hieracium*, subgénero *Pilosella*, para intentar confirmar los resultados obtenidos en sus ensayos sobre la herencia en *Pisum sativum* (arvejas de jardín). Lo que Mendel desconocía es que la mayoría de las plantas de *Hieracium* no son sexuales, sino apomícticas facultativas (Bicknell et al., 2016), por lo que gran parte de sus semillas se forman por un mecanismo asexual, quedando su progenie mayoritariamente integrada por clones del progenitor materno. El padre de la genética atribuyó erróneamente la inesperada proporción de caracteres maternos observada en las progenies a una supuesta "autopolinización frecuente", y concluyó que "los híbridos de *Hieracium* presentaban un comportamiento exactamente opuesto a los de *Pisum*" (Nogler, 2006).

I.1.2- Evolución de la Apomixis

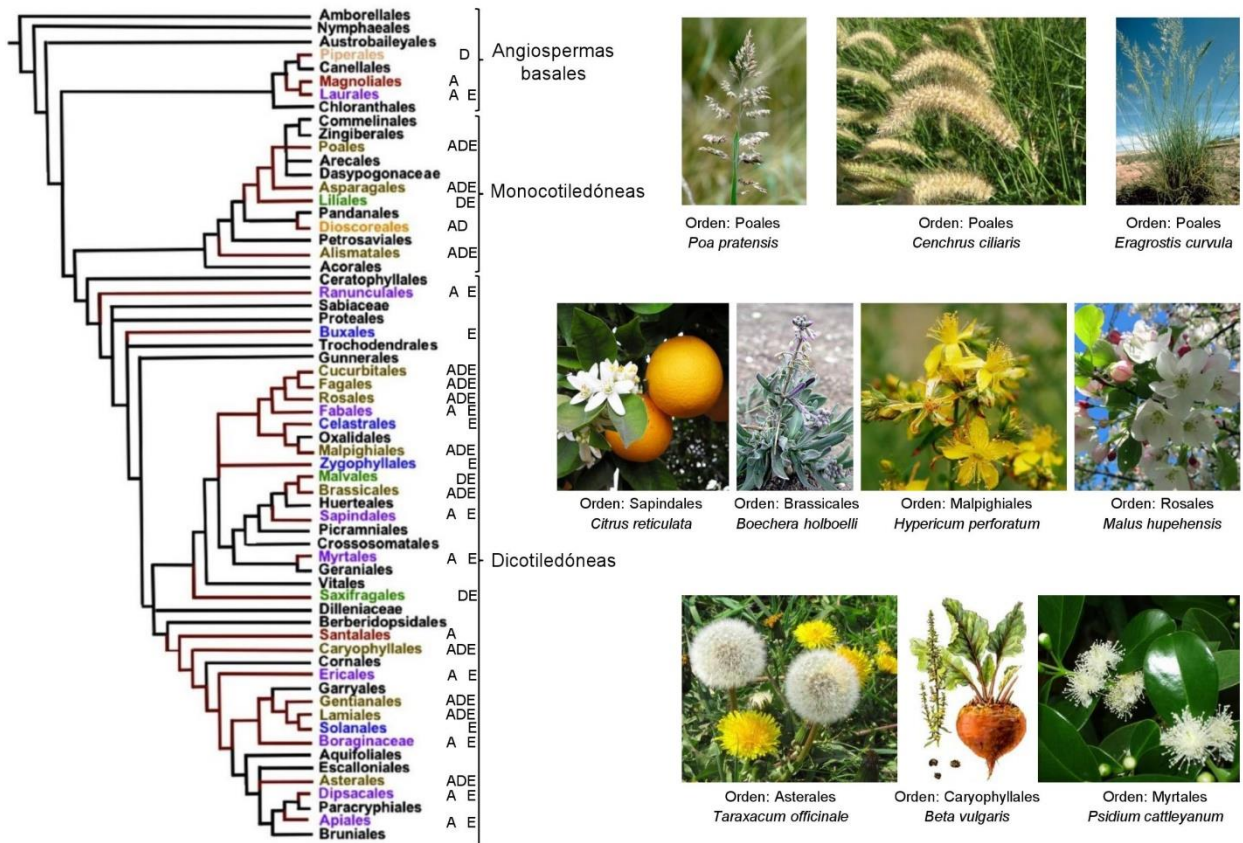
La apomixis se distribuye ampliamente entre las familias de angiospermas, con diferentes variantes reportadas entre las monocotiledóneas, las eudicotiledóneas y las magnolioides. Ha sido informada en al menos 78 de las 460 familias de plantas con flores (Carman, 1997; Hörandl y Hojsgaard, 2012; Hojsgaard et al., 2014), incluidos algunos miembros de órdenes basales como Piperales, Magnoliales y Laurales, así como en 25 de los 43 órdenes de dicotiledóneas, y en 5 de los 12 órdenes de monocotiledóneas (Figura I.1) (León-Martínez y Vielle-Calzada, 2019). Sin embargo, debe considerarse que menos del 10% de las 351.000 especies de angiospermas han sido examinadas en detalle desde el aspecto citoembriológico, y que nuevas familias, géneros y especies previamente asumidas como completamente sexuales continúan siendo añadidas con regularidad a las listas apomícticas (Albertini et al., 2019). Estos datos sugieren que en las próximas décadas la concepción actual acerca de la frecuencia de aparición de la apomixis en la evolución podría modificarse (Carman, 1997; Hojsgaard et al., 2014; Albertini et al., 2019). Los tres tipos principales de apomixis (*embrionía adventicia*, *aposporía* y *diplosporía*, ver más adelante) ocurren en todos los clados principales de plantas con flores, siendo la embrionía adventicia la forma más frecuente (148 géneros), seguida de la aposporía (110 géneros) y la diplosporía (68 géneros) (Hojsgaard et al., 2014). Tres familias numerosas, Poaceae, Asteraceae y Rosaceae, contienen la mayoría de los géneros apomícticos conocidos, aunque en este caso la alta frecuencia de aparición podría deberse, en parte, a la intensidad con la que se las ha estudiado, ya que contienen especies de interés para el cultivo (Ozias-Akins, 2006; Ozias-Akins y van Dijk, 2007). Sin embargo, las *Solanáceas* también incluyen muchas especies cultivadas y bien caracterizadas (por ejemplo, tomate, papa, tabaco), y no presentan esa misma frecuencia significativa de reproducción asexual por semillas (Ozias-Akins, 2006). El carácter no sólo está ausente en *Amborella trichopoda*, la angiosperma más basal, sino también en los linajes de plantas con semillas que no florecen, incluidas las gimnospermas (León-Martínez y Vielle-Calzada, 2019), apareciendo de manera discontinua en las distintas familias de plantas con flores.

Debido a su distribución intermitente en los árboles filogenéticos, y a la existencia de varios mecanismos diferentes para el carácter, tradicionalmente se consideró que la apomixis era una desviación de la sexualidad, que se originó repetidas veces de manera independiente en la evolución de las plantas con flores, a partir de mutaciones o epimutaciones en uno o unos pocos genes, *i. e.* se le atribuye un origen polifilético (Ozias-Akins, 2006; Brukhin, 2017). La

aparición de sus diferentes mecanismos se debería a la posibilidad de que las mutaciones o epimutaciones que ocurrieron a lo largo de la evolución afectaran a distintos genes de la vía sexual, provocando alteraciones con un final común: la formación de un embrión materno clonal (Koltunow y Grossniklaus, 2003). Curiosamente, los tipos de apomixis esporofítica y gametofítica a menudo están presentes en la misma familia, género, especie o, a veces, en un genotipo individual, lo que podría interpretarse como resultado de la superposición o intersección de las vías moleculares que controlan el desarrollo (Ozias-Akins, 2006). Sin embargo, las discontinuidades observadas en la aparición de mecanismos conservados, como la aposporía, son difíciles de explicar en el contexto de una repetición azarosa de eventos de (epi)mutación, y éste ha sido uno de los argumentos esgrimidos para sentar la idea de que la apomixis debe necesariamente estar controlada por uno o unos pocos genes.

Si bien las evidencias a primera vista soportan la tesis del origen polifilético, algunos autores consideran que la conclusión sobre la ocurrencia de eventos mutacionales independientes es algo forzada, ya que la evolución *de novo* de la apomixis desde la sexualidad requeriría intervenciones muy específicas en dos procesos conservados y molecularmente muy complejos como son la meiosis y la fecundación. Esto requeriría una combinación de alteraciones genéticas y/o epigenéticas difícil de recrear independientemente en forma repetida a través de la filogenia (Albertini et al., 2019). Por eso, recientemente se ha propuesto que apomixis y sexualidad podrían constituir características ancestrales polifénicas (*i. e.* fenotipos alternativos inducidos por el ambiente), y que ambos fenismos habrían estado presentes en el último ancestro extinto común de los eucariontes (Albertini et al., 2019). Se propuso que este eucarionte unicelular primitivo fue posiblemente asexual de manera cíclica, o sea, en condiciones favorables producía esporas no reducidas activas por mitosis y en condiciones de estrés esporas reducidas latentes por meiosis (Albertini et al., 2019). Más aún, los tres principales componentes de la apomixis (apomeiosis, diferenciación de gametas no reducidas, y partenogénesis) podrían haber evolucionado simultáneamente como innovaciones mitóticas de la fisión procariótica (Carman, 2007; Carman et al., 2011). Por lo tanto, esta hipótesis novedosa plantea que la apomixis y la sexualidad pueden haber coexistido en los organismos ancestrales, siendo las funciones asexuales mucho más antiguas (3,95 Ga) (Tashiro et al., 2017). La visión de la apomixis y la sexualidad como polifenismos sugiere que la apomixis no ocurre en muchos linajes eucariotas sexuales obligados actuales porque una o varias modificaciones genéticas o epigenéticas han silenciado el interruptor sexualidad-apomixis primitivo operado por el ambiente, o porque en numerosas especies se ha perdido la capacidad molecular para el

desarrollo apomítico, sin que esto implique una disminución decisiva en la capacidad de adaptación y supervivencia.



Diplosporía (D); Aposporía (A); Aposporía y diplosporía (AD); Embrionía adventicia (E); Aposporía y embrionía adventicia (AE); Diplosporía y embrionía adventicia (DE); Todos los tipos de apomixis (ADE)

Figura I.1: Distribución de los principales tipos de apomixis entre los órdenes de plantas con flores. Panel izquierdo: Árbol filogenético que muestra la distribución de la apomixis en las angiospermas. Los linajes filogenéticos que exhiben una apomixis confirmada por numerosas metodologías están indicados como brazos marcados en rojo. A: aposporía, D: diplosporía; E: embrionía adventicia. Adaptado de Hojsgaard et al. (2014) y León-Martínez y Vielle-Calzada (2019). Panel derecho: ejemplos de especies apomíticas pertenecientes a diferentes géneros (Fei et al., 2019).

I.1.3- Desarrollo sexual

Para comprender la apomixis y sus rasgos distintivos, resulta necesario repasar brevemente las características del sistema de reproducción sexual de las angiospermas. Las plantas terrestres exhiben un ciclo de vida complejo que varía entre una fase esporofítica diploide (la planta misma, $2n$) y una fase gametofítica haploide (el grano de polen y el saco embrionario, n). El desarrollo de los gametofitos femeninos está precedido por la megasporogénesis, cuya finalización marca el comienzo de la fase gametofítica. Si bien hay

una gran cantidad de patrones de megasporogénesis en las plantas (Gifford y Foster, 1989), las angiospermas exhiben tres esquemas principales: monospórico (tipo *Polygonum*), bispórico (tipo *Alisma*) y tetraspórico (tipo *Drusa*), según el número de macrósporas que intervienen en su formación, y el número de divisiones mitóticas que se producen (Maheshwari, 1950; Johri et al., 1992). Los sacos embrionarios monospóricos se forman a partir de una sola megáspora uninucleada; en los bispóricos hay dos megásporas funcionales que sufren dos mitosis y los ocho núcleos resultantes se ubican igual que en el caso de *Polygonum*; en el caso de los sacos tetraspóricos los cuatro productos de la meiosis participan en la formación del saco (Huang y Russell, 1992). La Figura 1.2 ilustra los eventos que conducen a la formación de la forma más común de saco embrionario, el tipo *Polygonum*, el cual se encuentra en >70% de las plantas con flores, incluyendo la especie modelo *Arabidopsis thaliana*, las gramíneas *Zea mays* (maíz) y *Oryza sativa* (arroz), y otras especies de cultivos importantes (Hand y Koltunow, 2014).

El desarrollo sexual 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 endomitótica de los productos de la meiosis y prosigue con la celularización y maduración (diferenciación) del saco embrionario (megagametofito). La *megaesporogénesis* se inicia cuando, durante el desarrollo temprano del óvulo en el gineceo esporofítico, una única célula especializada de la nucela, la célula arqueosporial, se diferencia como célula madre de la megáspora (CMM, Figura 1.2). Durante la diferenciación, la CMM se agranda, se alarga y su tamaño nuclear se duplica (She et al., 2013). Esta célula se divide luego por meiosis para formar cuatro megásporas reducidas (n). En el caso del desarrollo monospórico, que es el más común, tres de las megásporas, generalmente las más cercanas al extremo micropilar, degeneran, permaneciendo funcional una sola megáspora (MF). Después de su establecimiento, la MF inicia un proceso de desarrollo sintetizado bajo el término de megagametogénesis, para generar el gametofito femenino maduro (Figura 1.2). La *megagametogénesis* del tipo *Polygonum* consta de tres rondas de divisiones mitóticas sucesivas, acompañadas de un posicionamiento nuclear a lo largo del eje micropilar-chalazal, para dar lugar al saco embrionario. Durante la celularización, dos núcleos (núcleos polares), cada uno de ellos originario de cada polo, migran hacia el centro del gametofito femenino en desarrollo y se fusionan antes o después de la fertilización de la célula central (Yadegari y Drews, 2004). De esta manera, el saco embrionario queda formado por ocho núcleos haploides (n) contenidos en siete células: la ovocélula, que por fecundación dará origen al embrión; dos sinérgidas, que tienen un papel en la atracción, recepción y terminación de crecimiento del tubo

polínico y en la descarga del núcleo espermático (Higashiyama et al., 2001; Boisson-Dernier et al., 2008; Kessler y Grossniklaus, 2011; Liu et al., 2016); una célula central binucleada, precursora del endospermo; y tres antípodas, que podrían ser necesarias para la transferencia de nutrientes desde la nucela al gametofito femenino, pero cuya función está aún poco clara (Hand y Koltunow, 2014; Serbes et al., 2018). El desarrollo sexual masculino también consta de dos fases: la microsporogénesis y la microgametogénesis. Se da en las anteras, donde no existe la misma restricción estricta observada en el óvulo respecto del número de células que van a seguir un destino gamético. La meiosis sucede en los microesporocitos o células madre de las micrósporas, que se diferencian en gran número dentro del tejido esporógeno de las anteras. Cada uno de los productos de la meiosis desarrolla un grano de polen con una célula generativa y otra vegetativa, producto de la división mitótica del núcleo microspórico. La célula generativa se divide una vez más para originar dos células espermáticas.

El desarrollo de la semilla se inicia después de un proceso de doble fecundación (Figura I.2). El polen germina sobre el estigma de la flor, formando un tubo polínico que crece por el estilo y entra al óvulo a través de la micropila. Los núcleos espermáticos ingresan al saco embrionario después de la penetración del tubo polínico, a través de una sinérgida. Uno de los núcleos generativos 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 endospermo ($2n + n$), un tejido que proporciona recursos esenciales para el desarrollo del embrión (Berger et al., 2008). De esta manera la reducción meiótica se complementa con la fecundación, que restaura el número cromosómico diploide de la especie. 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 un nuevo individuo con una constitución genética particular.

I.1.4- Desarrollo apomítico

La apomixis evita infaliblemente la reducción meiótica (apomeiosis) y la fertilización del óvulo (partenogénesis), evadiendo los mecanismos que crean variación genética durante la reproducción sexual, pero manteniendo los beneficios de la dispersión de semillas (Koltunow y Grossniklaus, 2003). Los mecanismos de apomixis se clasifican históricamente en dos categorías, como esporofíticos o gametofíticos, en función de si el embrión clonal se desarrolla a partir de: a) células somáticas diploides de la nucela o de los tegumentos del óvulo; o b) un gametofito (saco embrionario) no reducido (Nogler, 1984; Koltunow, 1993).

Durante la *apomixis esporofítica*, también conocida como *embrionía adventicia*, muy común en los cítricos, el desarrollo del saco embrionario sigue la vía sexual típica de las angiospermas. Sin embargo, durante la mitosis de la megáspora funcional, algunas células somáticas ($2n$) del óvulo que rodean al saco embrionario en formación, se diferencian y adoptan un destino celular embriogénico. Estas células inician un proceso de embriogénesis somática, formando múltiples embriones de forma globular que pueden desarrollarse hasta la madurez sólo si el saco embrionario derivado sexualmente es fertilizado, ya que los embriones sexuales y asexuales comparten su endospermo nutritivo (Hand y Koltunow, 2014). 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 desconoce el mecanismo fisiológico por el cual se determina el destino de estas células para que se transformen en iniciales embrionarias (Koltunow, 1993). Comúnmente, la apomixis esporofítica produce embriones múltiples en cada semilla, considerándose una forma de poliembrionía. El embrión derivado sexualmente puede o no madurar o germinar (Koltunow et al., 1995, 1996).

En la *apomixis gametofítica*, el desarrollo femenino involucra siempre la formación de un saco embrionario no reducido ($2n$), que difiere en algunos aspectos del gametofito femenino haploide (n) generado a partir de la megáspora funcional (Nogler, 1984; Koltunow y Grossniklaus, 2003; León-Martínez y Vielle-Calzada, 2019). La principal alteración es que los núcleos que lo conforman no han pasado por el proceso meiótico, y por lo tanto no han reducido su contenido de ADN. En las especies apomícticas gametofíticas, la gametogénesis masculina generalmente no se ve afectada, ya que en más del 90% de los casos se requiere polen funcional para la formación de endospermo viable. Dentro de esta categoría de apomixis, es necesario hacer una distinción entre *diplosporía* y *aposporía*.

En la *apomixis gametofítica diplospórica*, el saco embrionario no reducido se origina de una célula generativa (CMM) ya sea directamente por mitosis (tipo *Antennaria*) o indirectamente por modificaciones en la meiosis (tipo *Taraxacum* e *Ixeris*) (Nogler, 1984; Crane, 2001). En la diplosporía mitótica (tipo *Antennaria*), la forma más difundida, la CMM no inicia la meiosis, y después de una larga interfase, se produce un crecimiento y pronunciada vacuolización que resulta directamente en la primera mitosis de la megagametogénesis. Así, la CMM funciona como una megáspora no reducida ($2n$). Luego se producen dos mitosis más, las cuales dan origen a un saco embrionario maduro (con todos los núcleos no reducidos) (Nogler, 1984). En la diplosporía tipo *Taraxacum*, la CMM entra en la profase meiótica, pero debido a una asinapsis, los cromosomas permanecen sin aparearse en forma de univalentes quedando dispersos en

todo el eje en metafase I y, por lo tanto, sin migrar hacia los polos. Luego de la primera división meiótica, los cromosomas univalentes quedan confinados en un núcleo común de restitución. Por lo tanto, la segunda división meiótica resulta, después de la citocinesis, en una díada no reducida en lugar de una tétrada reducida. Por lo general, en la célula del extremo chalazal de la díada, se llevan a cabo tres mitosis que conducen a la formación de un saco embrionario de ocho núcleos (Figura I.2). Se han descrito otros dos tipos de diplosporía meiótica, tipo *Ixeris* y tipo *Allium*, pero son menos frecuentes que el tipo *Taraxacum* (Nogler, 1984; Savidan, 2000; Crane, 2001).

En la *apomixis gametofítica apospórica*, los sacos embrionarios no reducidos se originan a partir de las células somáticas del óvulo, habitualmente de la nucela (Nogler, 1984; Koltunow y Grossniklaus, 2003). Estas células se diferencian como células iniciales de la aposporía (IAs), se reconocen debido al crecimiento y agrandamiento de su núcleo, especialmente su nucleolo, y por una vacuolización que causa compresión y reabsorción de las células adyacentes, tanto generativas como vegetativas (Nogler, 1984). Las IAs parecen tener identidad de megáspora no reducida, y luego de varias divisiones mitóticas son capaces de formar sacos embrionarios no reducidos con diferente morfología según la especie considerada: tipo *Hieracium* (Rosenberg, 1908, 1930), tipo *Panicum* (Warmke, 1954), y algunas variantes típicas del género *Paspalum* (Quarin y Burson, 1991). En la aposporía tipo *Hieracium* el saco embrionario se forma después de tres divisiones mitóticas, dando lugar al surgimiento de ocho núcleos que se distribuyen hacia ambos polos, conformando una estructura similar a los sacos embrionarios de tipo *Polygonum* presentes en las especies sexuales. La diferencia con estos últimos radica sólo en la falta de reducción de los núcleos integrantes (Figura I.2). Los sacos embrionarios tipo *Panicum* se forman a partir de células de la nucela del óvulo, las cuales, mediante dos mitosis consecutivas, dan origen a cuatro núcleos que se localizan en el polo micropilar. Luego de la celularización, estos núcleos se diferencian para formar dos sinérgidas, una ovocélula y una célula central uninucleada. Así, los sacos apospóricos de tipo *Panicum* carecen de antípodas (Figura I.2). En las variantes de tipo *Paspalum* el proceso es similar al de *Panicum*, pero los sacos que se forman son tetra o pentanucleados, y contienen una ovocélula, una o dos sinérgidas y dos núcleos polares. La apomixis apospórica está ampliamente distribuida entre las Gramíneas. Muchas de ellas poseen el tipo *Panicum* de desarrollo de saco embrionario (gramíneas tropicales y subtropicales), mientras que otras poseen sacos embrionarios del tipo *Hieracium* (Savidan, 2000). En algunas especies, como *Pennisetum* spp. (Wen et al., 1998) o *Hieracium* spp. (Tucker et al., 2001) la iniciación de la aposporía conduce al aborto completo del

proceso sexual presente en el mismo óvulo, mientras que en otras, como *Brachiaria* spp. o *Paspalum* spp., tanto los sacos embrionarios sexuales como los apospóricos pueden eventualmente aparecer juntos (Araujo et al., 2000). Es importante destacar que en las especies apospóricas se pueden formar una, dos, tres o múltiples células iniciales de la aposporía en un óvulo individual, dando lugar a la formación de un número variable de sacos embrionarios apospóricos que pueden o no coexistir con sacos meióticos provenientes de sexualidad, dependiendo de la especie, el genotipo e incluso del óvulo considerado.

En la apomixis gametofítica, el desarrollo del embrión es independiente de la fertilización (partenogénesis), mientras que la formación del endospermo puede requerir la fertilización de los núcleos polares (pseudogamia) o producirse de forma independiente (autonomía) (Savidan, 2000; Crane, 2001; Ozias-Akins y van Dijk, 2007). Es importante notar que durante el desarrollo sexual existe un estricto balance 2:1 en el número de juegos cromosómicos maternos y paternos, respectivamente, que son aportados durante la formación del endospermo. Este requerimiento es obligatorio, y está controlado por algunos miembros de la familia de genes *Polycomb*, los cuales desactivan la formación del endospermo en caso que se detecte una proporción materna paterna incorrecta. En las especies apomícticas que requieren pseudogamia para la formación del endospermo, se ponen en juego diferentes mecanismos particulares que aseguran una formación apropiada. Por ejemplo en *Paspalum* spp., el control molecular ejercido sobre el balance materno: paterno 2:1 está relajado, y el endospermo acepta contribuciones en diferentes proporciones (Ortiz et al., 2013). En *Eragrostis* spp., la fecundación de un solo núcleo polar no reducido asegura el mantenimiento de la proporción 2:1 (Meier et al., 2011). En la Figura I.2 se esquematizan y comparan los diferentes mecanismos de apomixis mencionados con la reproducción sexual.

La reproducción sexual y la apomixis no son mutuamente excluyentes. Mientras que todas las formas de apomixis son heredables, la mayoría de las plantas individuales exhiben el rasgo como una alternativa a la reproducción sexual (León-Martínez y Vielle-Calzada, 2019). Por otra parte, aunque con frecuencia se habla de sexualidad y apomixis como sistemas excluyentes, en muchas especies ambos coexisten en una misma planta, e incluso en un mismo óvulo, pudiendo aparecer simultáneamente sacos embrionarios reducidos y no reducidos. Una planta apomíctica es considerada como *facultativa* cuando puede producir una parte de su progenie por sexualidad. Las progenies de una planta facultativa pueden segregarse como clases maternas (progenie clonal $2n + 0$) o clases aberrantes (híbridos BII $n + n$, híbridos BIII $2n + n$ o haploides $n + 0$), provenientes de reproducción sexual (Asker y Jerling, 1992).

Mientras los híbridos BII ($n + n$) resultan de la unión habitual de dos gametos reducidos, los híbridos BIII ($2n + n$) se originan por fecundación de una ovocélula no reducida con un gameto masculino reducido y los haploides ($n + 0$) generados por partenogénesis a partir de una ovocélula reducida (Savidan, 2000). Una planta es considerada apomítica obligada cuando el 100 % de su progenie es de origen materno, aunque esta condición ha demostrado ser más teórica que real, ya que todas las especies parecen retener una proporción aunque sea mínima de sexualidad, que a veces es revelada únicamente cuando se realizan análisis de un gran número de descendientes (Nogler, 1984).

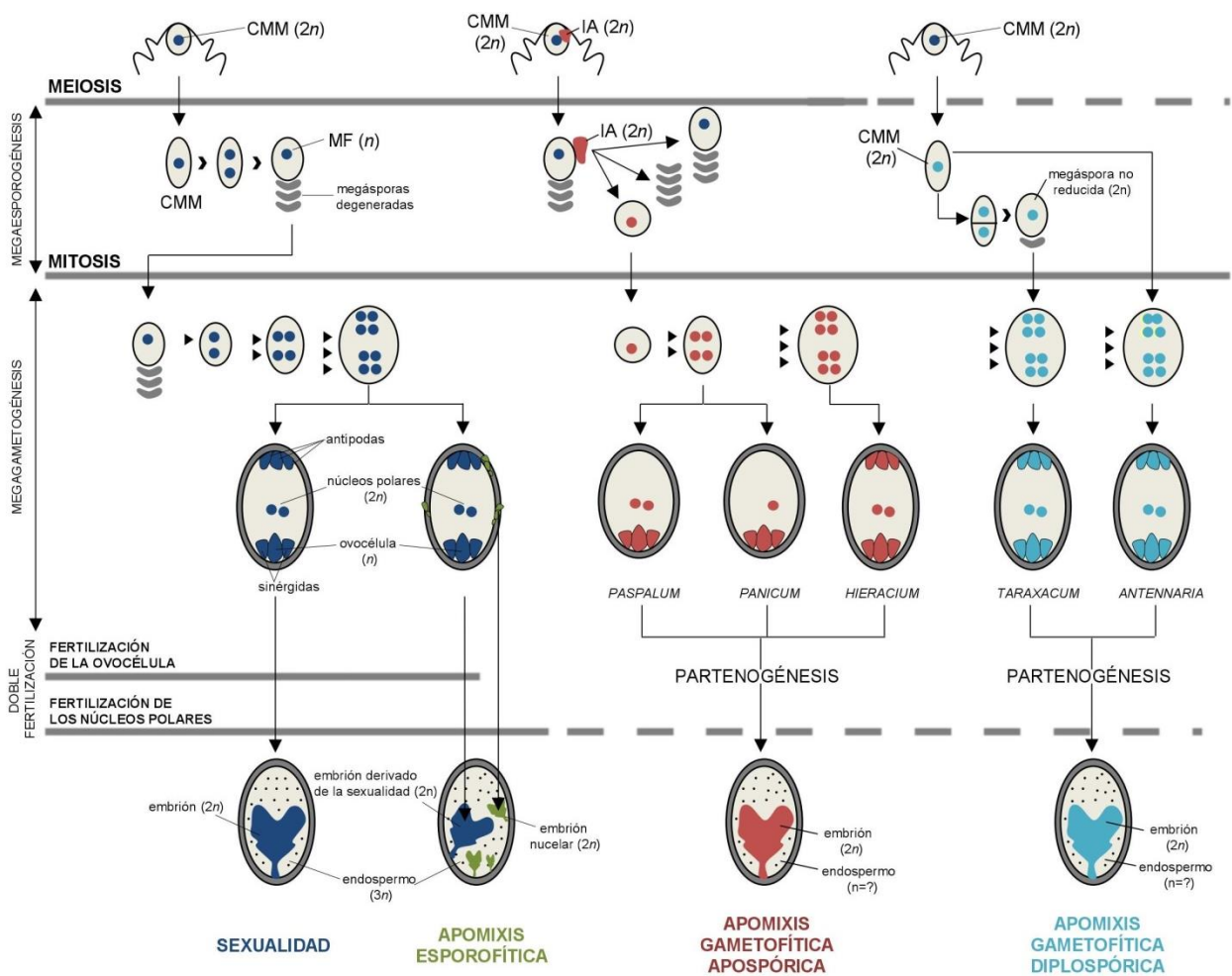


Figura I.2: Comparación de la reproducción sexual con las vías de desarrollo de la apomixis esporofítica y gametofítica. Este diagrama compara el desarrollo de semillas por la vía sexual o apomítica. CMM: célula madre de la megáspora; IA: inicial de la aposporia; MF: megáspora funcional; ► indican números de divisiones mitóticas. La figura es una adaptación de otras publicadas en Koltunow (1993) y Hand y Koltunow (2014).

I.1.5- Control genético y epigenético

Los primeros estudios del control genético de la apomixis indicaban que era un carácter heredable, pero no se conocían los genes o mecanismos involucrados en el mismo (Gustafsson, 1946). Los análisis genéticos llevados a cabo entre individuos apomícticos como donantes de polen (parental masculino) y plantas sexuales como individuos maternos demostraron que se heredaba como un rasgo dominante y que estaba controlada por un único *locus* (revisado en Savidan, 2002). Sin embargo, varios estudios posteriores confirmaron que los distintos componentes de desarrollo de la apomixis, es decir, la apomeiosis (formación de líneas germinales no reducidas), la partenogénesis y eventualmente el desarrollo autónomo del endospermo, podrían estar bajo el control de *loci* independientes (Hand y Koltunow, 2014), aunque en numerosas especies podrían estar asociados en un único *linkat* llamado ACR (región de control de la apomixis) (Grimanelli et al., 2001), que exhibe a menudo una fuerte supresión de la recombinación (Grossniklaus, 2001). Dicha condición se asocia con la existencia de regiones genómicas heterocromáticas, hemicígotas y con fuertes tendencias a la divergencia alélica (León-Martínez y Vielle-Calzada, 2019). Especies como *Pennisetum squamulatum* (Akiyama et al., 2004), *Paspalum simplex* (Calderini et al., 2006) o *Paspalum notatum* (Stein et al., 2007; Podio et al., 2012) codifican a los determinantes de la apomixis dentro de tales *linkats*, lo que plantea un desafío para identificar los genes disparadores del carácter. Las ACRs suelen contener secuencias repetitivas y ser ricas en transposones, como se ha informado para la región genómica específica de la aposporía (ASGR) en *Pennisetum*, el LOA en *Hieracium*, y el *locus* que controla la apomixis (ACL “*apospory controlling locus*”) en *Paspalum* (Calderini et al., 2006, Podio et al., 2012). Como resultado, se ha prestado mucha atención a la organización y transcripción de estas secuencias repetitivas, ya que pueden explicar desviaciones funcionales de la vía sexual mediante una reorganización general de regiones genómicas con posible impacto en la expresión de genes (Koltunow y Grossniklaus, 2003).

Una vez hechas estas consideraciones generales, vamos a resumir los resultados de los estudios de control genético para los diferentes tipos de apomixis, con énfasis en los trabajos que utilizaron mapeo genético de alta resolución.

La *apomixis esporofítica* se hereda en forma simple, como un carácter dominante (Iwamasa et al., 1967; Parlevliet y Cameron, 1959). No se ha estudiado ampliamente a nivel molecular; sin embargo, parece genéticamente compleja (García et al., 1999).

La *apomixis diplospórica* se encuentra controlada de manera variable, dependiendo de la especie considerada. En *Tripsacum* es gobernada por un *locus* simple (Leblanc et al., 1995),

habiéndose detectado varios marcadores ligados al mismo (Leblanc et al., 1995; Grimanelli et al., 1998). Estos mismos marcadores fueron mapeados en una población sexual diploide y se localizaron en un segmento que demostró colinearidad con un sector homeólogo del genoma de maíz correspondiente al cromosoma 6L (y duplicado en los cromosoma 3L y 8L) (Grimanelli et al., 1998). En *Taraxacum*, varios *loci* independientes controlan las distintas etapas de la apomixis diplospórica (apomeiosis, partenogénesis y desarrollo autónomo del endospermo) (Záveský et al., 2007). Un refinamiento del mapa de ligamiento genético sugirió una posible duplicación de un supuesto gen DIP controlador de la diplosporía (Vijverberg et al., 2010). En las especies diplospóricas *Taraxacum* y *Erigeron*, se identificaron dos *loci* independientes que controlan la diplosporía y la partenogénesis (Van Dijk et al., 1999; Noyes y Rieseberg, 2000). Recientemente, se determinó que en *Eragrostis curvula* la diplosporía parece estar controlada por un único *locus*, sinténico con los cromosomas 6 y 8 de maíz (nótese la similitud con el caso de *Tripsacum*) y que el grado de expresividad del carácter está asociado a dos QTLs que mapean muy cercanos a la región de control (Zappacosta et al., 2019).

Por otra parte, la *apomixis apospórica* suele estar controlada por un único *locus* dominante, que podría incluir a un único gen o a un grupo de genes ligados y coadaptados, heredados de manera mendeliana pero sujetos a distorsiones de la segregación (Ozias-Akins, 2006). Este patrón de herencia ha sido observado en especies como *P. squamulatum* (Dujardin y Hanna, 1983; Ozias-Akins et al., 1998), *Cenchrus ciliaris* syn. *Pennisetum ciliare* (Sherwood et al., 1994; Jessup et al., 2002), *Panicum maximum* (Ebina et al., 2005), *Brachiaria* sp. (do Valle y Newsl, 1993; Miles y Escandón, 1997), *Paspalum* sp. (Martínez et al., 2001, Pupilli et al., 2004), *Ranunculus* sp. (Nogler, 1995) y *Hieracium* sp. (Bicknell et al., 2000). Se trata de un *locus* complejo, que podría contener varios genes ligados que actuarían conjuntamente como una sola unidad genética, debido a una fuerte restricción de la recombinación. Esta región genómica específica no recombinante que controla la aposporía (ACL) se estudió en detalle en *B. brizantha* (Pessino et al., 1997, 1998), *P. squamulatum* (Ozias-Akins et al., 1998; Akiyama et al., 2005; Conner et al., 2008), *P. simplex* (Pupilli et al., 2001, 2004), *P. notatum* (Stein et al., 2004, 2007; Podio et al., 2012), *Hypericum perforatum*, *Poa pratensis* y *Hieracium* spp. En *B. brizantha*, consiste en un extenso bloque no recombinante rodeado por una región sinténica al cromosoma 2 de arroz (Pessino et al., 1997, 1998). En *P. squamulatum* es también un sector no recombinante de ~50 Mpb, heterocromático y hemicingota (Ozias-Akins et al., 1998; Roche et al., 1999; Akiyama et al., 2004, 2005). Un 2% de este sector fue clonado y secuenciado, determinándose que contiene abundantes retrotransposones (Conner et al., 2008). En *P.*

simplex, también consiste en un bloque no recombinante, en cuyo interior se han detectado marcadores moleculares cosegregantes que mapean en la región subtelomérica del brazo largo del cromosoma 12 de arroz (Pupilli et al., 2001, 2004). En *P. notatum*, es un sector no recombinante que involucra ~36 Mpb, integrado por un sector sinténico al cromosoma 12 de arroz insertado dentro de otro sinténico al cromosoma 2 de arroz (Pupilli et al., 2004; Stein et al., 2007; Podio et al., 2012; Siena et al., 2014a). Esta región está extensivamente rearrreglada por inversiones, translocaciones y/o inserción de retroelementos de baja y alta copia (Stein et al., 2007; Podio et al., 2012), características muy consistentes con la pérdida de recombinación detectada por mapeo genético y con las relaciones de segregación distorsionada observadas en la especie (Martinez et al., 2003). Varios marcadores de AFLP y dos marcadores SCAR completamente ligados al carácter en *P. notatum* están presentes en un grupo de plantas apomícticas de diversos orígenes geográficos, lo que sugiere que la estructura del segmento cromosómico que porta el carácter aposporía está altamente conservada en las razas apomícticas de la especie (Rebozzio et al., 2011). En *Hypericum perforatum*, *Poa pratensis* y *Hieracium praealtum*, la aposporía y la partenogénesis están controladas por dos *loci* independientes (Albertini et al., 2001; Catanach et al., 2006; Schallau et al., 2010; Koltunow et al., 2011; Ogawa et al., 2013). En *Hypericum perforatum* los estudios de mapeo genético detectaron un *locus* llamado *HAPPY* que cosegrega con la aposporía pero no con la partenogénesis, y que es parcialmente homólogo al gen *ARI7* de *Arabidopsis thaliana* (Schallau et al., 2010), que codifica al dedo RING Ariadne 7. En *Poa pratensis*, los estudios de segregación revelaron la existencia de individuos capaces de completar la partenogénesis en ausencia de aposporía, para dar lugar a la formación de progenie haploide, lo que demuestra que los genes que controlan ambos procesos son independientes (Albertini et al., 2001). En *Hieracium praealtum*, un miembro del subgénero *Pilosella*, la apomixis es controlada independientemente por dos *loci* desvinculados: *PÉRDIDA DE APOMEIOSIS (LOA)* y *PÉRDIDA DE PARTENOGENÉNESIS (LOP)*. Mientras que *LOA* es necesario para la apomeiosis y la supresión de todas las megásporas derivadas de sexualidad, la actividad de *LOP* es necesaria para el desarrollo autónomo del embrión y del endospermo (Catanach et al., 2006; Koltunow et al., 2011). La supresión de *LOA* o *LOP* resulta en una reversión parcial a la sexualidad (Catanach et al., 2006; Koltunow et al., 2011), sugiriendo que la apomixis se superpone a la vía sexual, la cual permanece funcional en ausencia de apomixis (Koltunow et al., 2013). Además, los estudios genéticos en *Hieracium* han revelado que la formación autónoma del endospermo

también puede segregarse independientemente de los otros dos componentes apomícticos (Ogawa et al., 2013).

Dado que no existe una correspondencia entre los marcadores moleculares de RFLPs que han sido asociados a las diferentes formas de apomixis gametofítica (aposporía y a la diplosporía) (Leblanc et al., 1995; Pessino et al., 1997; Pupilli et al., 2001, 2004), los resultados hasta el momento parecen indicar que ambas formas de apomixis están gobernadas por genes diferentes (Grimanelli et al., 2001), lo que coincide con las diferencias observadas en el desarrollo entre ambos modos de reproducción. Mientras los ortólogos de los genes que controlan la diplosporía estarían ubicados en los cromosomas 6/8 de maíz y 5 de arroz, los de los que gobiernan la aposporía se localizarían en los cromosomas 5 de maíz y 2/12 de arroz. Sin embargo, la posibilidad de microarreglos que hayan localizado los mismos genes en entornos genómicos diferentes no puede aún descartarse. Por otra parte, la frecuente aparición de aposporía y diplosporía en distintas especies de las mismas familias hace pensar que las vías de control de ambos modos de reproducción están relacionadas, aunque los disparadores parecen ser otros.

La mayoría de las plantas apomícticas son poliploides, por lo que inicialmente se propuso que el carácter podría haber surgido en la evolución como consecuencia de la hibridación y/o la duplicación de los genomas (Carman, 1997). Sin embargo, aunque casi siempre la apomixis aparece asociada a la poliploidía, está claro que el aumento de juegos cromosomales por sí mismo no es suficiente para inducir apomixis, ya que no todas las plantas poliploides son apomícticas, aún aquellas pertenecientes a especies donde el carácter está presente. Más aún, en varias de las especies apomícticas caracterizadas genéticamente, los determinantes de la apomixis son hemicígotas y aparecen en dosis simples (revisado en Hand y Koltunow, 2014). No obstante, varios estudios han señalado una fuerte conexión entre la poliploidía y/o la hibridación y las variaciones de expresividad de la apomixis (Hörandl y Hojsgaard, 2012; Zappacosta et al., 2014; Lovell et al., 2013). Estas variaciones fueron asociadas a la existencia de diferentes entornos epigenéticos característicos del genoma diploide y poliploide (Ochogavía et al., 2009; Zappacosta et al., 2014). Como veremos a continuación, el paisaje epigenético parece afectar de manera decisiva la progresión de algunas etapas de la apomixis, y ésta podría ser la causa por la cual un aumento en los juegos cromosomales (y el consecuente cambio epigenético que conlleva) induce una mayor expresividad del carácter.

La regulación epigenética es probablemente responsable de la respuesta reproductiva a factores abióticos en plantas con flores, controlando las decisiones sobre el desarrollo y el destino celular a través de modificaciones de la cromatina o la metilación del ADN. Se refiere a las variaciones heredables en el patrón de expresión fenotípica/génica resultante de la modificación química del ADN y las histonas y en los mecanismos de biogénesis de ARNs pequeños, que transcurren sin que se produzcan cambios en la secuencia de nucleótidos subyacentes (Kumar y Singh, 2016). Varios estudios han proporcionado evidencia revelando que los mecanismos dependientes de ARN pequeños juegan un rol importante en la especificación celular dentro del óvulo (Schmidt et al., 2015; Wang y Köhler, 2017; Martínez y Köhler, 2017), lo que tendría profundas implicancias en el establecimiento del linaje del gametofito femenino durante la reproducción sexual y apomíctica (León-Martínez y Vielle-Calzada, 2019). Además, la asociación de la apomixis apospórica con una región genómica heterocromática rica en retrotransposones plantea la posibilidad intrigante de que la estructura de la cromatina y/o los ARN de interferencia (Lippman et al., 2004) puedan desempeñar un papel en el control de su expresión génica.

Las vías de metilación del ADN dependiente de ARN (RdDM) que actúan durante la reproducción femenina son esenciales para el desarrollo reproductivo en las plantas y pueden representar reguladores claves en la diferenciación de la reproducción apomíctica y sexual. Las proteínas ARGONAUTA (AGO) están involucradas en la regulación del genoma mediada por una gran variedad de ARN pequeños, tales como microARNs y ARN pequeños de interferencia (Mallory y Vaucheret, 2010), con funciones específicas durante la reproducción (Bourchis y Voinnet, 2010; Feng et al., 2010). Entre ellas, el clado AGO4 (compuesto por AGO4, AGO6, AGO8 y AGO9 en *A. thaliana*) está activo en la vía RdDM, la cual regula el silenciamiento transcripcional de transposones y repeticiones mediante la metilación del ADN y la formación de heterocromatina (Law y Jacobsen, 2010). Las mutaciones defectivas de los miembros del clado AGO4 de *A. thaliana* conducen a fenotipos similares al apospórico, donde las células esporofíticas somáticas dan lugar a gametofitos femeninos derivados de apomeiosis (Olmedo-Monfil et al., 2010; Hernández-Lagana et al., 2016). El mismo fenotipo se encontró en mutantes que afectan a miembros adicionales de la vía RdDM (Olmedo-Monfil et al., 2010; Hernández-Lagana et al., 2016). Estos hallazgos sugieren que el silenciamiento de las regiones repetitivas heterocromáticas puede ser crucial para distinguir el desarrollo sexual del apospórico (León-Martínez y Vielle-Calzada, 2019). Efectos epigenéticos similares fueron encontrados en maíz, donde mutaciones en AGO104 (homólogo al AGO4 de *A. thaliana*), también dan lugar a

gametos formados por apomeiosis (Garcia-Aguilar et al., 2010). Además, los fenotipos de mutantes que afectan las metiltransferasas de ADN, DMT102 y DMT103, también evocan a la aposporia (Singh et al., 2011), incluyendo la formación de sacos embrionarios extra y gametos no reducidos, lo que supone un rol esencial de la vía de RdDM en la identidad de las células germinales. Por otra parte, se puede inducir una partenogénesis artificial manipulando la proteína específica del centrómero CENH3 (Ravi y Chan, 2010), indicando que los mecanismos complejos de remodelación de la cromatina, incluida la carga heterocrónica de CENH3 junto con la variación en la metilación del ADN, pueden afectar la partenogénesis natural (Grimanelli, 2012). De hecho, en *Paspalum* ya se reportó un primer informe de reversión del fenotipo partenogénico en una planta apomítica natural, inducido por una variación de los patrones de metilación del genoma (Podio et al., 2014a). Mientras el análisis de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) junto con la inmunodetección de 5-metilcitosina (5 mC) reveló una fuerte metilación del ADN en el ACR de *Paspalum* spp., la demetilación del genoma completo con 5' azacitidina mostró un aumento significativo en la formación de híbridos BIII, lo que sugiere que la fuerte metilación asociada a la ACR es necesaria para que ocurra la partenogénesis (Podio et al., 2014a).

I.1.6- Estudios genómicos y transcriptómicos

La fuerte restricción de la recombinación observada frecuentemente en la región genómica que controla la apomixis (ACR), que la convierte en una “caja negra” de entre 30 y 50 Mpb, complicó las estrategias de clonado posicional de los genes responsables de gobernar el carácter. Los primeros intentos de caracterización por secuenciación de la ACR consistieron en largas y trabajosas caminatas genómicas parciales (Podio et al., 2012) y/o el clonado y secuenciación de grandes clones incluidos en cromosomas artificiales de bacterias (BACs), que cubrían sólo una parte menor de la misma (Conner et al., 2008, Calderini et al., 2006). A causa de estas restricciones, muchos proyectos de investigación se reorientaron a identificar genes diferencialmente expresados en tejidos reproductivos de plantas apomíticas y sexuales, y a comprobar cuáles de ellos mapeaban posicionalmente dentro de la ACR, para intentar identificar los genes que disparan el carácter.

En los últimos años, el avance sin precedentes en las técnicas de secuenciación masiva permitió secuenciar numerosos transcriptomas y genomas completos de una variedad de genotipos apomíticos y sexuales, posibilitando que los transcritos diferencialmente expresados se mapearan *in silico* directamente dentro de la secuencia del genoma, y que se

determinara su asociación posicional con la ACR. A su vez, la identificación de la ACR dentro de los genomas secuenciados puede hacerse en base al mapeo *in silico* de marcadores moleculares que han sido previamente asociados al carácter por mapeo genético tradicional en poblaciones segregantes. Permanece aún sin resolver el problema de que la región genómica involucrada es de gran tamaño y contiene cientos de genes candidatos, varios de los cuales presentan expresión diferencial. Por lo tanto, los disparadores del carácter permanecen sin identificar, aunque se han hecho avances muy importantes en la determinación de la identidad de genes que controlan etapas específicas y que podrían ser usados como herramientas para dispararlas, solos o en combinación.

Los primeros trabajos de transcriptómica, realizados mediante el uso de representación diferencial (DD por “*differential display*”), se limitaron a identificar unos pocos genes relacionados con el desarrollo apomítico (Vielle-Calzada et al., 1996; Leblanc et al., 1997; Pessino et al., 2001; Rodríguez et al., 2003). Luego se procedió a analizar en forma más exhaustiva la relación entre los transcriptomas florales de genotipos sexuales y apomíticos por DD o cDNA-AFLP, lo que permitió detectar decenas de genes candidatos diferencialmente expresados en tejidos reproductivos en las especies *Poa pratensis* (Albertini et al., 2004; Albertini et al., 2005), *Paspalum notatum* (Laspina et al., 2008), *Boechera* spp. (Sharbel et al., 2009), *Paspalum simplex* (Polegri et al., 2010) y *Hieracium* spp (revisado en Ortiz et al., 2013). Con el advenimiento de la era posgenómica, las tecnologías de secuenciación de próxima generación han posibilitado nuevos caminos en el descubrimiento de genes, incluidos los responsables de la megaesporogénesis, megagametogénesis, partenogénesis y desarrollo independiente de endospermo. Se han generado transcriptomas florales de referencia para genotipos apomíticos y sexuales de *P. notatum* y *Eragrostis curvula*, y se los ha comparado para producir extensas listas de entre 1700 y 3000 genes diferencialmente expresados a lo largo del desarrollo (Ortiz et al., 2017, Garbus et al., 2017). En *P. notatum* se han construido 24 bibliotecas transcriptómicas que cubren cuatro etapas clave del desarrollo reproductivo para ambos tipos de reproducción (apomítico y sexual), que ya están públicamente disponibles en el repositorio del NCBI (número de acceso PRJNA511813), cuyo ensamblado y comparación se reportará próximamente (Silvina Pessino, comunicación personal). Para *Boechera* spp. y *P. notatum*, se construyeron bases de datos públicas de sRNA, que se usaron para identificar genes diferencialmente modulados por mecanismos epigenéticos (Amiteye et al., 2011; Ortiz et al., 2019). Para *Hieracium* spp. se desarrolló un recurso genómico y transcriptómico, que incluye plantas sexuales y apomíticas, así como mutantes que exhiben reversión a la

reproducción sexual (Rabiger et al., 2016). Más aún, se han secuenciado y ensamblado genomas de especies apomícticas de interés, como es el caso de *Boechnera* (Brukhin et al., 2018), *Eragrostis curvula* (Carballo et al., 2019) y *Paspalum* (Juan Pablo Ortiz, comunicación personal).

I.1.7- Estudios funcionales

Las comparaciones del transcriptoma floral de genotipos sexuales y apomícticos, junto con los estudios de hibridación *in situ* de tejidos y el mapeo posicional de candidatos, han permitido seleccionar algunos genes que se revelaron como fuertes candidatos a controlar etapas específicas del desarrollo apomíctico. Se están utilizando diferentes metodologías para estudiar su función, mediante análisis fenotípico de mutantes y/o transformantes con expresión disminuida y/o aumentada. Todavía existen relativamente pocos estudios de este tipo, pero se han obtenido algunos logros importantes, que sientan una base sólida para futuros análisis. Los mismos se resumen a continuación:

- El gen candidato *N20* (Laspina et al., 2008), que se expresa diferencialmente en plantas apomícticas y sexuales de *P. notatum*, resultó ser un ortólogo putativo de dos de los integrantes de la familia *LORELEI* de *A. thaliana* (que codifica una proteína anclada a GPI). Una variante del gen está sobreexpresada en el aparato oosférico de plantas apomícticas. En base a los estudios de mutantes del gen *LORELEI*, que indican que el mismo está implicado en la descarga del núcleo espermático en la ovocélula, se ha inferido que *N20* (luego renombrado *GAP1*) podría ser responsable de inhibir dicho proceso en plantas apomícticas, dificultando el proceso de fecundación y favoreciendo el desarrollo de embriones clonales por partenogénesis (Felitti et al., 2011).

- El gen candidato *SERK* (Albertini et al., 2005), un receptor de tipo kinasa, se expresa ectópicamente en la nucela de plantas apomícticas de *Poa pratensis* (Albertini et al., 2005) y *Paspalum notatum* (Podio et al., 2014b). Ha sido asociado con la adquisición de un destino gamético de las células nucelares y/o con la partenogénesis, ya que en diversas especies se lo reportó como un inductor de la totipotencia celular, y se determinó que está relacionado con la vía de los brasinosteroides y la respuesta ambiental (revisado en Santos y Aragão, 2009).

- El gen *APOSTART*, contiene un dominio *START* de unión a lípidos y está involucrado en la meiosis. *APOSTART* fue asociado con la apomixis, y sus transcriptos son detectables específicamente en las células iniciales de la aposporia y en los sacos embrionarios en *Poa*

pratensis. Se ha sugerido que *APOSTART* puede estar relacionado con la muerte celular programada en las megaesporas no funcionales y en los eventos de degeneración de las células nucelares que permiten el agrandamiento de los sacos embrionarios maduros (Barcaccia et al., 2001; Albertini et al., 2005). También se han encontrado ortólogos de *APOSTART* en *A. thaliana*. La caracterización funcional de estos genes en *Arabidopsis* mostró su participación en el saco embrionario y el desarrollo del embrión (Barcaccia y Albertini, 2013).

– El gen *BABY BOOM*, un miembro de la familia de los factores de transcripción AP2, se encuentra en el *locus* de la apomixis en *P. squamulatum* (*PsASGR-BBM-like*), es activo en los óvulos y desencadena la partenogénesis (Akiyama et al., 2011; Conner et al., 2015). El silenciamiento de *PsASGR-BBML* en plantas apomícticas transgénicas de ARNi altera las capacidades partenogénicas del embrión, mientras que la expresión ectópica en los óvulos de las plantas sexuales desencadena la formación de progenie haploide (Conner et al., 2015). La expresión de *PsASGR-BBML* también puede inducir partenogénesis en maíz y arroz, pero no en *A. thaliana* (Conner et al., 2017), lo que sugiere que la represión de la división autónoma de óvulos en dicotiledóneas podría implicar mecanismos diferentes de aquellos prevaliente en monocotiledóneas.

– El gen *ORC3* (*COMPLEJO DE RECONOCIMIENTO DE ORIGEN*) codifica una proteína que forma parte del complejo multiproteico que controla la replicación del ADN y la diferenciación celular en eucariotas. *ORC3* (subunidad 3 de *ORC*), es requerido para la formación de endospermo en especies sexuales, y es el blanco que media el estricto control de la contribución genética materna:paterna ejercida por el complejo *POLYCOMB*. En plantas apomícticas podría estar regulado por un mecanismo de silenciamiento trans desencadenado por un pseudogen *ORC3* localizado en ACR (Siena et al., 2016).

– El gen *MAP3K PN_QGJ*, una MAP3K que está sobreexpresada en la nucela distal de plantas apospóricas, es esencial para el desarrollo apospórico en *P. notatum*, ya que su inhibición mediante ARNi resulta en tasas de formación de sacos embrionarios apospóricos significativamente reducidas con respecto a los niveles detectados en plantas apospóricas de tipo silvestre y controles de transformación (Mancini et al., 2018).

Por otro lado se han identificado genes cuya modulación mimifica algunas etapas de la reproducción apomíctica a partir del estudio de mutantes de *A. thaliana*. Usándolos, varios grupos de investigadores están intentando producir plantas transgénicas con reproducción

clonal artificial. A continuación se describen brevemente genes candidatos o mutaciones que afectan varios componentes de la vía apomítica:

- La triple mutante *MiMe* (mitosis en lugar de meiosis) en *A. thaliana*, que combina las mutantes *Ods1*, *Atspo11-1* y *Atrec8*, produce gametos diploides viables que son genéticamente idénticos a su madre (D'Erfurth et al., 2009; Marimuthu et al., 2011).

- El gen *FIE*, fertilización independiente del endospermo, es un importante miembro del grupo POLYCOMB, al igual que FIS. Mutaciones en *FIE*, permiten el desarrollo autónomo del endospermo en ausencia de fertilización (Ohad et al., 1999; Liu et al., 2012).

- Los genes *DYAD/SWITCH1* son importantes para la meiosis. *DYAD* es requerido para la organización del cromosoma meiótico y la progresión meiótica femenina, y *SWITCH1* es importante para que la célula madre de la megáspora sufra división mitótica en lugar de meiosis (Agashe et al., 2002; Sezer et al., 2016).

I.1.8- La apomixis y la agricultura

A pesar de su amplia distribución en las plantas con flores, la apomixis no está presente en muchas especies de interés agronómico, a excepción de varias gramíneas forrajeras, la mandioca, la manzana, los citrus, el mango y las fresas (Spillane et al., 2001; Ortiz y Pessino, 2002). Sin embargo, es un carácter de gran interés para la agricultura por su potencial para ser utilizado para acelerar el mejoramiento de cultivos, lo que permitiría aumentar significativamente la producción de alimentos a nivel mundial. El impacto potencial que tendría la introgresión del carácter en la agricultura ha sido ampliamente discutido (Hanna, 1995; Hanna y Bashaw, 1987; Savidan, 2000; Spillane et al., 2001; Toenniessen et al., 2001; Barcaccia y Albertini, 2013).

En la naturaleza, el uso combinado de la sexualidad y la apomixis constituye una estrategia reproductiva versátil, que le permite a las plantas variar en contextos desfavorables y reproducir clonalmente híbridos superiores adaptados a ambientes específicos (Asker y Jerlings, 1992). Las mismas ventajas pueden aplicarse a los programas de mejoramiento vegetal. En especies donde ambos modos de reproducción están presentes, se puede generar variabilidad mediante cruzamientos entre madres sexuales y padres apomíticos, para luego seleccionar híbridos F1 élite de reproducción clonal (Barcaccia y Albertini, 2013). Tales esquemas ya vienen desarrollándose con mucho éxito en especies forrajeras del género *Paspalum* comercializadas en Sudamérica y Oceanía (Acuña et al., 2007, 2009, 2011; Zilli et al., 2019). Los principales beneficios del aprovechamiento de la apomixis en plantas cultivadas son: 1) facilidad y eficiencia en la fijación del vigor híbrido en plantas cultivadas, ya que una planta

que posea el carácter puede convertirse inmediatamente en un cultivar estable; 2) supervivencia e inmediata fijación de recursos genéticos combinados; 3) expansión del uso de recursos genéticos y reproducción a través de verdaderas semillas de plantas que usualmente se propagan vegetativamente; 4) revaloración de la importancia de los centros de origen de especie como fuente de riqueza genética de la especie de interés (Savidan, 2000). Además, el mejoramiento genético vegetal empleando la tecnología de la apomixis sería rápido y respondería de manera específica a microambientes, limitaciones socioeconómicas y condiciones particulares de cultivo y de mercado (Toenniessen et al., 2001).

Las ventajas que representa la apomixis permitirían satisfacer, por un lado, el interés de los mejoradores, al lograr la inmediata fijación el vigor híbrido; el de las compañías semilleras, al permitir generar semilla híbrida a un costo ínfimo de producción y por último, el de los agricultores, sobre todo los de las de áreas marginales, al permitir la resiembra exitosa de una parte de la cosecha. Se debe considerar que la comercialización de las semillas híbridas apomícticas debería responder a un esquema similar al utilizado para el software informático, donde se pueden producir variedad de productos a bajo costo y con un grado de perfeccionamiento cada vez mayor, que, una vez adquiridos por el cliente, pueden ser utilizados indefinidamente. Dicho esquema es impracticable mientras se conserve el diagrama utilizado en los actuales programas de mejoramiento, en los que la generación de semilla híbrida o mejorada tiene un costo excesivamente alto.

También se debe tener en cuenta que en los países subdesarrollados se cultivan principalmente genotipos adaptados obtenidos por polinización abierta, debido a que los agricultores no pueden afrontar el costo de las semillas mejoradas. Es común que guarden sus propias semillas para la próxima generación de cultivo, y si bien seleccionan los mejores granos, al ser plantas de reproducción sexual y de polinización cruzada, las progenies segregan para todos los caracteres, incluyendo el rinde. Si en dichos sistemas agrícolas se pudiera introducir al menos un porcentaje de reproducción apomíctica, se lograrían mantener las características ventajosas de los genotipos seleccionados, lo que derivaría en una mayor producción de alimentos. Por ello, Hanna (1995) sostiene que el mayor impacto de la incorporación de la apomixis en los grandes cultivos se produciría más que nada en los países pobres y en vías de desarrollo. El aumento en la producción global de alimentos, sobre todo en zonas marginales, rendiría ganancias estimadas en billones de dólares anuales (Toenniessen, 2001, Spillane et al., 2004).

I.1.9- La apomixis en *Paspalum*

I.1.9.1- El género *Paspalum*

Paspalum (Linnaeus, 1759) es uno de los diez géneros más grandes e importantes dentro de la familia de las *Poaceae* o gramíneas (subfamilia *Panicoideae*, tribu *Paniceae*), debido al elevado número de especies que presenta (aproximadamente 370) y a su amplia distribución geográfica. Las especies de *Paspalum* ocupan diversos hábitats en América del Norte y del Sur, mientras que algunas de ellas son nativas de África, Asia y Oceanía, y solo tres o cuatro son cosmopolitas (Ortiz et al., 2013). América del Sur es el centro de origen del género (Chase, 1939; Nicora y Rugolo de Agrasar, 1987; Judziewicz, 1990), mientras que los centros de diversidad se encuentran en los cerrados brasileños y en los campos de Argentina, Uruguay y el sur de Brasil (Zuloaga y Morrone, 2005; Rua et al., 2010).

Debido al elevado número de especies y a la marcada variabilidad morfológica entre las mismas, varios autores han intentado dividir el género en subgéneros, secciones y/o grupos informales, encontrando dificultades para dicha delimitación (Doell, 1877; Chase, 1929; Pilger, 1940). Estas categorías fueron establecidas en base a caracteres exomorfológicos, principalmente a nivel de la espiguilla, sin considerarse en la mayoría de los casos los caracteres anatómicos foliares (Aliscioni, 2002). La clasificación infragenérica más ampliamente aceptada fue propuesta por Chase (1929), la cual comprendió dos subgéneros y 27 grupos informales, se basó en similitudes morfológicas de una variedad de taxones con un conjunto de especies bien reconocidas. La amplia variedad de adaptaciones ecológicas encontradas en el género (Chase, 1939; Parodi, 1969; Zuloaga y Morrone, 2005) probablemente esté relacionada con las diversas estrategias reproductivas (es decir, reproducción sexual, autogamia y alogamia, reproducción clonal a través de apomixis y propagación vegetativa) y la amplia variedad de niveles de ploidía presentes a niveles intra e interespecíficos (Quarin, 1992).

El género *Paspalum* se caracteriza por ser un sistema genético extremadamente versátil. La mayoría de las especies son poliploides (75%) (Ortiz et al., 2013), existiendo una gran variación en el nivel de ploidía que va desde 3x (Quarin y Lombardo, 1986) hasta excepcionalmente 16x en *P. floridanum* Michx. (Burton, 1940). Sin embargo, la mayoría de las especies de *Paspalum* tienen un número cromosómico base de $x = 10$ (Quarin, 1992). La poliploidía es una característica muy común, y está estrechamente relacionada con la apomixis (Quarin y Norrmann, 1990). Estudios en poblaciones naturales de *Paspalum* spp. apomícticas revelaron un nivel considerable de variación en cuanto a ploidías y estructuras genéticas (Urbani et al., 2002; Daurelio et al., 2004; Sartor et al., 2011). Se analizaron los niveles de

ploidía y el modo de reproducción en numerosas especies del género y se determinó que, en general, las poblaciones diploides se reproducen por sexualidad, mientras que las poliploides se reproducen por apomixis (Ortiz et al., 2013). Se piensa que cerca de la mitad de los poliploides son tetraploides. Además, es común que muchas especies tetraploides apomícticas dentro de este género presenten razas coespecíficas diploides, autoincompatibles y de reproducción sexual (Quarin, 1992).

La sexualidad en las especies de *Paspalum* sigue el patrón típico observado en la mayoría de las gramíneas, y se caracteriza por la doble fertilización de un saco embrionario reducido, compuesto típicamente por el aparato de huevo, una gran célula central de dos núcleos y una masa de antípodas proliferadas en el extremo chalazal (Quarin, 1992). La reproducción apomíctica, puede ser diplospórica (menos frecuente) o apospórica (Ortiz et al., 2013). En este último caso, los sacos embrionarios no reducidos se originan a partir de células nucleares diferenciadas, llamadas iniciales de la aposporia (IA). En la madurez, los SEA se caracterizan por contener entre cuatro y cinco núcleos, los cuales corresponden a la ovocélula, una o dos sinérgidas y una gran célula central con dos núcleos polares (Norrman et al., 1989; Quarin y Burson, 1991). Todas las especies apomícticas de *Paspalum* son pseudogámas, lo que significa que el endospermo se desarrolla después de la fertilización de los núcleos polares por un gameto masculino reducido (Ortiz et al., 2013).

Paspalum es un sistema biológico atractivo para estudiar la apomixis, porque además de ser un sistema modelo para estudiar genes candidatos, es una especie forrajera de gran interés agronómico. En las últimas décadas se ha producido una gran cantidad de información sobre las características biológicas, genéticas y reproductivas de muchas de sus especies, que incluyen aspectos citoembriológicos de la apomixis, mapas moleculares detallados, aislamiento de genes candidatos y desarrollo de sistemas de transformación para el estudio de genes de interés (Ortiz et al., 2013). Por otra parte, numerosas especies de *Paspalum* son valoradas por su calidad como forrajeras, su palatabilidad y su producción de materia seca. Sin embargo, sólo unas pocas han sido seleccionadas, domesticadas y llevadas a cultivo. *P. notatum* y *P. dilatatum* son económicamente las más importantes, y están siendo ampliamente empleadas como forrajeras, principalmente en el sur de los EE.UU, Australia, Uruguay y Argentina. Otras, son cultivadas como cereales, césped u ornamentales (Giussani et al., 2009).

P. notatum junto con *P. simplex* son las dos principales especies de *Paspalum* utilizadas como modelos para el estudio del control molecular de la apomixis, porque se las ha caracterizado muy extensamente a nivel citológico, citoembriológico, genético, molecular y

ecológico (revisado en Ortiz et al., 2013). Ambas forman complejos agámicos integrados por individuos apomícticos autopoliploides y diploides sexuales. El análisis genético de los apomixis en estas especies es imposible a menos que haya germoplasma tetraploide sexual disponible. La producción de individuos tetraploides sexuales artificiales (Quarin et al., 1984, 2001, 2003; Cáceres et al., 1999; Quesenberry et al., 2010) permitió iniciar la generación de poblaciones segregantes para el modo de reproducción sin la necesidad de cruces interespecíficas, y dio el puntapié inicial para una serie de estudios sin precedentes en la caracterización de la apomixis a nivel molecular en especies donde el carácter se presenta naturalmente.

I.1.9.2- *Paspalum notatum*

Paspalum notatum Flügge (de nombre vulgar pasto horqueta o *Bahiagrass*) es una especie de gramínea tropical a subtropical, perenne, de 20-75 cm de longitud en la madurez. Se distribuye en terrenos abiertos, sabanas y pastizales, desde el nivel del mar hasta los 2000 metros de altura, desde el centro-este de México hasta el extremo norte de la Patagonia en Argentina, atravesando Centroamérica y Sudamérica. Presenta un tallo erecto, comúnmente de solo dos nudos. Las hojas son vainas ciliadas, por lo general glabras, con lígula en forma de anillo con pelos cortos. La inflorescencia está formada por dos espigas dispuestas en V (Figura I.3), raramente tres, de 2,5 a 12 cm de largo (generalmente de 4 a 7 cm), erectas y ascendentes. Las espiguillas están dispuestas en dos hileras, imbricadas, muy juntas, ampliamente ovadas, elípticas u obovadas, glabras y brillantes, de 2,8 a 3,8 mm de longitud (Chase, 1929). Además presenta una semilla oval, 2,5 a 3,5 mm de largo. Las raíces son rizomas escamosos, cortos, superficiales, comúnmente engrosados y duros, que dan lugar a matas compactas.

Esta especie presenta varios niveles de ploidía y un sistema reproductivo complejo con citotipos diploides autoincompatibles de reproducción sexual y poliploides con reproducción apomíctica,seudógamos y autocompatibles (Forbes y Burton, 1961; Quarin, 1992). 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. En la Figura I.3 se esquematizan los óvulos presentes en plantas de *P. notatum* sexuales y apomícticos. Los citotipos tetraploides de *P. notatum* Flügge ($2n=4x=40$) se encuentran en los campos naturales del sur de Brasil, Paraguay, centro y noreste de Argentina y Uruguay. Asimismo, han sido introducidos en Estados Unidos y otros países alrededor del mundo (Gates

et al., 2004). Los citotipos diploides, *P. notatum* var. *saurae* Parodi (*Pensacola bahiagrass* en EEUU, $2n=2x=20$), son nativos de las cuencas de los ríos Paraná y Uruguay, en el noreste de Argentina. A principios del siglo veinte fueron introducidos en Florida, de forma accidental, y actualmente son una de las forrajeras cultivadas más importantes en el sur de los Estados Unidos. Las poblaciones diploides naturales son poco frecuentes y están confinadas en los márgenes de los ríos Uruguay, Paraná y sus afluentes, y en las planicies arenosas de las islas del río Paraná. Se ha descubierto una gran población natural de *Pensacola bahiagrass* en la isla Berduc, en la provincia de Santa Fe (Burton, 1967). En ésta isla se halló la totalidad de la variación genética observada en los Estados Unidos para la especie cultivada (Burton, 1967). Otra importante población de la raza diploide, con una gran variación genética, fue encontrada en Cayastá, 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 Berduc-Cayastá se considera el centro de origen de la especie (Forbes y Burton, 1961; Gates et al., 2004).

La especie se caracteriza por su resistencia a la sequía, su gran persistencia, su elevada tolerancia a plagas y su adaptabilidad a condiciones adversas. Es utilizada como forraje, como pasto de jardín y para rotación de cultivos (Gates et al., 2004). Nunca se ha informado la colección de una planta tetraploide sexual a partir de la naturaleza. Sin embargo, la obtención de plantas tetraploides sexuales ha sido lograda experimentalmente, tras la duplicación genómica de un individuo diploide por tratamiento con colchicina (Quarin et al., 2001) o por cruzamiento entre dos padres apomícticos, siendo el parental femenino apomíctico facultativo y el parental masculino apomíctico obligado (Quarin et al., 2003). La obtención de estos materiales ha permitido establecer cruzamientos entre plantas sexuales (como progenitores femeninos) y apomícticas (como dadores de polen) del mismo nivel de ploidía, que fueron cruciales a la hora de realizar estudios sobre las bases moleculares de la apomixis por mapeo genético y transcriptómica, como así también para iniciar programas de mejoramiento genético.

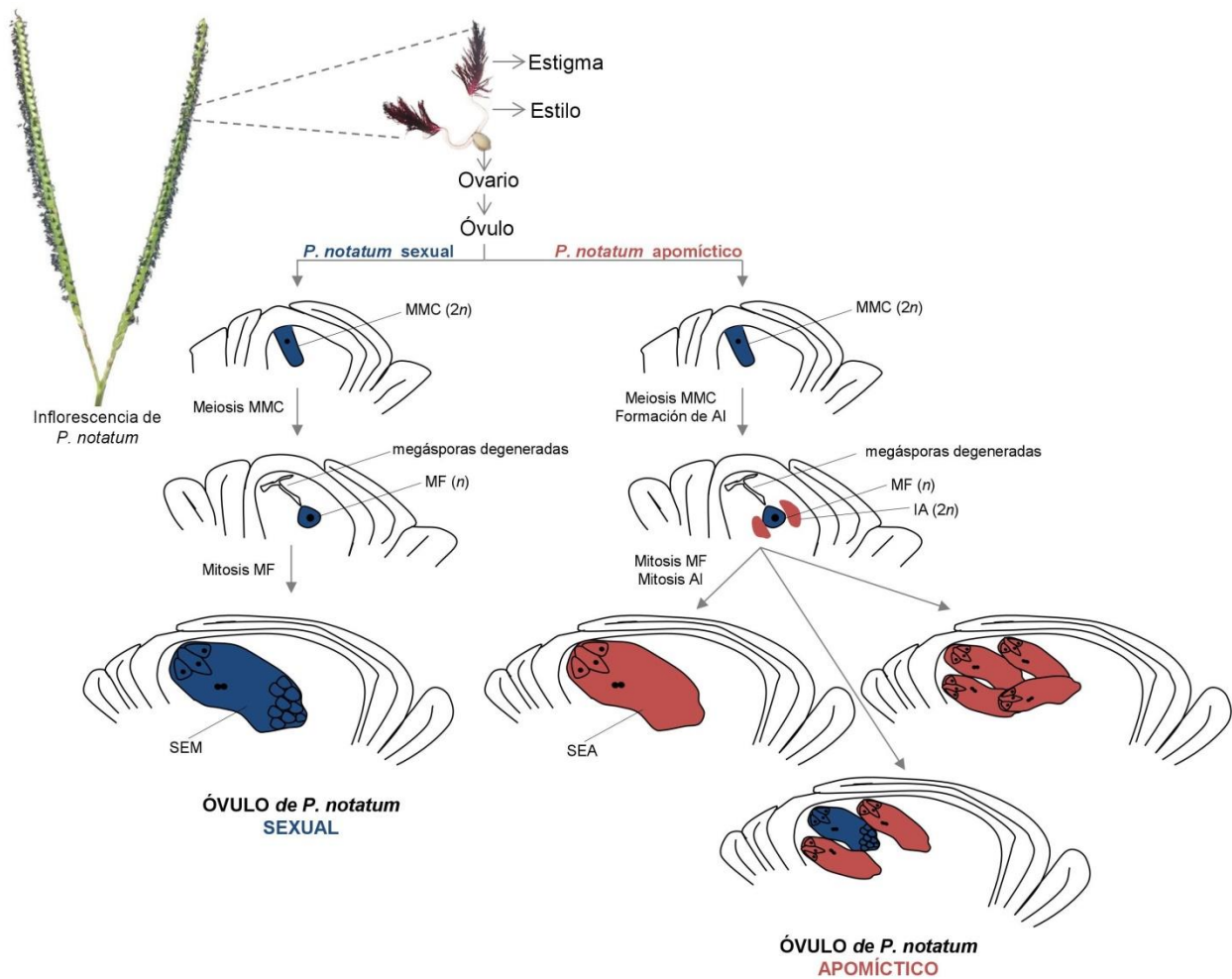


FIGURA I.3: Esquemas de la ocurrencia de sacos embrionarios sexuales (SEM, en azul) y apomícticos (SEA, en rojo) en óvulos de *P. notatum*. El óvulo de las plantas sexuales de *P. notatum* presenta un solo SEM, mientras que el óvulo de las plantas apomícticas de *P. notatum* puede presentar uno o varios SEA, o un SEM junto a varios SEA. MMC: célula madre de la megáspora; MF: megáspora funcional; IA: inicial de la aposporia; SEM: saco embrionario sexual; SEA: saco embrionario apomíctico. La imagen de los integumentos de los óvulos es una adaptación de Soliman et al. (2018).

I.2- El gen *TGS1* y su posible rol en el desarrollo reproductivo

I.2.1- ¿Por qué es interesante estudiar al gen *TGS1*?

Varios estudios de transcriptómica realizados en *P. notatum* permitieron la identificación de numerosos genes candidatos diferencialmente expresados en tejidos reproductivos de plantas apomícticas y sexuales (Pessino et al., 2001; Laspina et al., 2008; Ortiz et al., 2017). En el trabajo realizado por Laspina et al. (2008) se identificaron 65 genes candidatos a modular la

apomixis, de los cuales 45 fueron anotados funcionalmente. Uno de ellos llamado originalmente #N69, mostró similitud significativa con genes de metiltransferasas (Laspina et al., 2008). Dado que la ruta de metilación de ADN dependiente de ARN (RdDM) había sido asociada con fenotipos similares a la apomixis en maíz (García-Aguilar et al., 2010; Singh et al., 2011), nuestro grupo de investigación decidió enfocarse en el estudio de este candidato. Sin embargo, luego de una caracterización molecular exhaustiva de la secuencia completa del gen, se determinó que no pertenecía a la vía RdDM, sino que codificaba una metiltransferasa similar a TGS1/PIMT-PRIP de mamíferos (Siena et al., 2014b). PIMT es una proteína de unión a ARN con un dominio metiltransferasa, que interacciona con el coactivador nuclear PRIP, y lo estimula para realizar su función. A su vez, PRIP es un coactivador del receptor nuclear activado por PPAR (proliferador del peroxisoma), el cual participa en la inducción de la transcripción de genes específicos. En base a esos antecedentes, N69 fue renombrado como *PN_TGS1*.

I.2.2- Funciones caracterizadas de *TGS1*

TGS1/PIMT-PRIP fue identificado originalmente como un co-activador transcripcional que interacciona con el activador de la transcripción PRIP (Zhu et al., 2001). PIMT/TGS1 típicamente contiene un dominio metiltransferasa y dos dominios de unión, que permiten su interacción con ARNs y con el sustrato S-adenosil-L-metionina, el dador de metilos en la reacción catalizada por la enzima. Las proteínas PIMT y PRIP aparecen co-localizadas en el núcleo celular, e interactúan fuertemente tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo*. PIMT era capaz de unirse tanto a S-adenosil-L-metionina como a ARN, por lo que se propuso inicialmente un rol como metiltransferasa de ARN (Zhu et al., 2001).

La trimetilguanosina sintasa 1 (*TGS1*) es la enzima que convierte las caperuzas de 7-metilguanosina (m^7G) en 2,2,7-trimetilguanosina (TMG). Estas estructuras de caperuza hipermetilada son características de los ARN pequeños nucleares (snARN) y nucleolares (snoARN) que programan el corte y empalme (*splicing*) del pre-ARNm (U1, U2, U4 y U5), el procesamiento de pre-ARNr (U3 y U8) y la adición de telómeros (ARN de la telomerasa) (Mouaikel et al., 2002; Franke et al., 2008). TMG se forma postranscripcionalmente a partir de las caperuzas m^7G por la enzima TGS1, que cataliza dos reacciones sucesivas de transferencia de metilo desde la S-adenosilmetionina al átomo N2 de la guanosina (Mouaikel et al., 2002, 2003; Hausmann y Shuman, 2005; ver apartado I.1.10.3- Formación de la caperuza).

Además PIMT/TGS1 es esencial para la modulación transcripcional en varios contextos: interacciona y co-localiza en el núcleo con coactivadores transcripcionales que contienen

actividad HAT (histona acetiltransferasa) como CBP/Ep300, y con otros que no contienen actividad HAT como la subunidad mediadora Med1 (proteína de unión a PPAR; PBP/TRAP220/DRIP205) y PRIP (Zhu et al., 2001; Misra et al., 2002; Kornberg et al., 2007). La capacidad que tiene PRIP de interactuar con una variedad de receptores nucleares y con CBP sugiere que PRIP es tan indispensable como CBP, Ep300 y PBP, para mediar en la actividad transcripcional de los receptores nucleares y de otros factores de transcripción (Zhu et al., 2001). Se propuso que PIMT podría actuar como un puente molecular entre los complejos que contienen HATs y los que no lo contienen, para controlar la transcripción nuclear mediada por receptores de complejos de transducción de señales. Misra et al. (2002) confirmaron la participación de proteínas de unión a ARN, tal como PIMT y las metiltransferasas de ARN en la transcripción. Más aún, se demostró que la fosforilación por ERK2 en la Ser²⁹⁸ de PIMT/TGS1 promueve la actividad transcripcional de algunos promotores, sugiriendo un papel directo de las vías de transducción de señales en la modulación de la transcripción (Kapadia et al., 2013).

I.2.3- Formación de la caperuza

La estructura de caperuza, en donde se encuentra metilado el átomo N7 de la guanosina terminal, es una característica que define a todos los ARNm eucariotas. Este proceso de agregado de la caperuza, junto con el corte y empalme de los intrones y el agregado de la cola de poli A, es uno de los procesamientos que tiene que sufrir el ARNm para madurar. El agregado de la caperuza (*capping*) tiene lugar en el extremo 5' intacto del transcrito primario de ARN que se va generando por la actividad de la ARN polimerasa II, y que termina en un grupo trifosfato (el nucleótido 5'terminal es precedido por tres fosfatos enlazados al carbono 5' de la ribosa). El proceso de *capping* empieza antes de que termine la transcripción, de forma simultánea a la síntesis del pre-ARNm, e incluye tres pasos: primero el extremo 5'-trifosfato del transcrito primario es hidrolizado a difosfato (es decir, se elimina el fosfato y del extremo 5'), luego se produce la transferencia de un grupo guanosin monofosfato, GMP (proveniente del guanosin trifosfato, GTP), al extremo del ARN difosfatado obtenido en el paso anterior, mediante un enlace fosfodiéster 5'-5'; y por último se adicionan los grupos metilo usando S-adenosilmetionina como donante. Las reacciones son catalizadas por las enzimas ARN trifosfatasa, ARN guanilil-transferasa, y la ARN metiltransferasa, respectivamente (Shuman, 2001) (Figura I.4). La estructura de caperuza es necesaria para la viabilidad del ARNm y además tiene un papel fundamental en el inicio de la traducción y en la protección del extremo 5' del ARN de la posible degradación exonucleolítica. Además sirve como marca para el

sistema inmune innato para distinguir los ARN endógenos de los patógenos (Pichlmair et al., 2007).

En los snARN y snoARN, la caperuza metilada m⁷G sufre además dos metilaciones sucesivas, generando una estructura de caperuza hipermetilada, característica de estas moléculas (Figura I.4). Las ribonucleoproteínas pequeñas (RNPs) son complejos necesarios para transformar los precursores de ARN en especies maduras (Yu et al., 1999). En base a su localización y función intracelular, éstas RNPs se pueden clasificar en dos grupos, las RNP pequeñas nucleares (snRNP), que desempeñan un papel en la maduración de los pre-ARNm y las RNP pequeñas nucleolares (snoRNP), que residen en el nucleolo celular y son necesarias para la maduración de los pre-ARNr (Will y Lührmann, 2001; Filipowicz y Pogači, 2002). Los snRNPs U1, U2, U4/U6 y U5 son componentes esenciales del complejo de clivado y empalme, y contienen, respectivamente, a los snRNAs U1, U2, U4/U6 y U5 y a un conjunto de proteínas comunes llamadas proteínas Sm. Estas proteínas se ensamblan como una estructura heptamérica tipo rosquilla alrededor del sitio Sm de los snARNs. Con la excepción de U6, los snARNs son transcritos por la ARN polimerasa II, adquieren una caperuza m⁷G en el núcleo y, tras su exportación al citoplasma, se asocian con las proteínas Sm, lo que permite la hipermetilación de la caperuza m⁷G a una estructura de caperuza trimetilguanosina (m³G) (Mataj, 1986). En mamíferos, tanto el complejo del núcleo Sm como la estructura de la caperuza hipermetilada de los snARNs proporcionan señales para la posterior importación nuclear de los snRNPs recién ensamblados (Fischer y Lührmann, 1990; Will y Lührmann, 2001).

I.2.4- Localización intracelular de la proteína TGS1

La correcta ubicación intracelular es importante para la función de TGS1; en mutantes de levadura y humanos, se ha observado que cuando la proteína TGS1 está dirigida incorrectamente, presenta una menor actividad de trimetilación (Boon et al., 2015). En levaduras, TGS1 se encuentra principalmente en el nucleolo (Mouaikel et al., 2002), mientras que en *Arabidopsis* y en los metazoos, TGS1 se ha detectado tanto en el núcleo como en el citoplasma (Zhu et al., 2001; Enünlü et al., 2003; Komonyi et al., 2005, Gao et al., 2017). En mamíferos, TGS1 se distribuye difusamente en el citoplasma y localmente en el núcleo, donde se concentra en los cuerpos de Cajal (Verheggen et al., 2002).

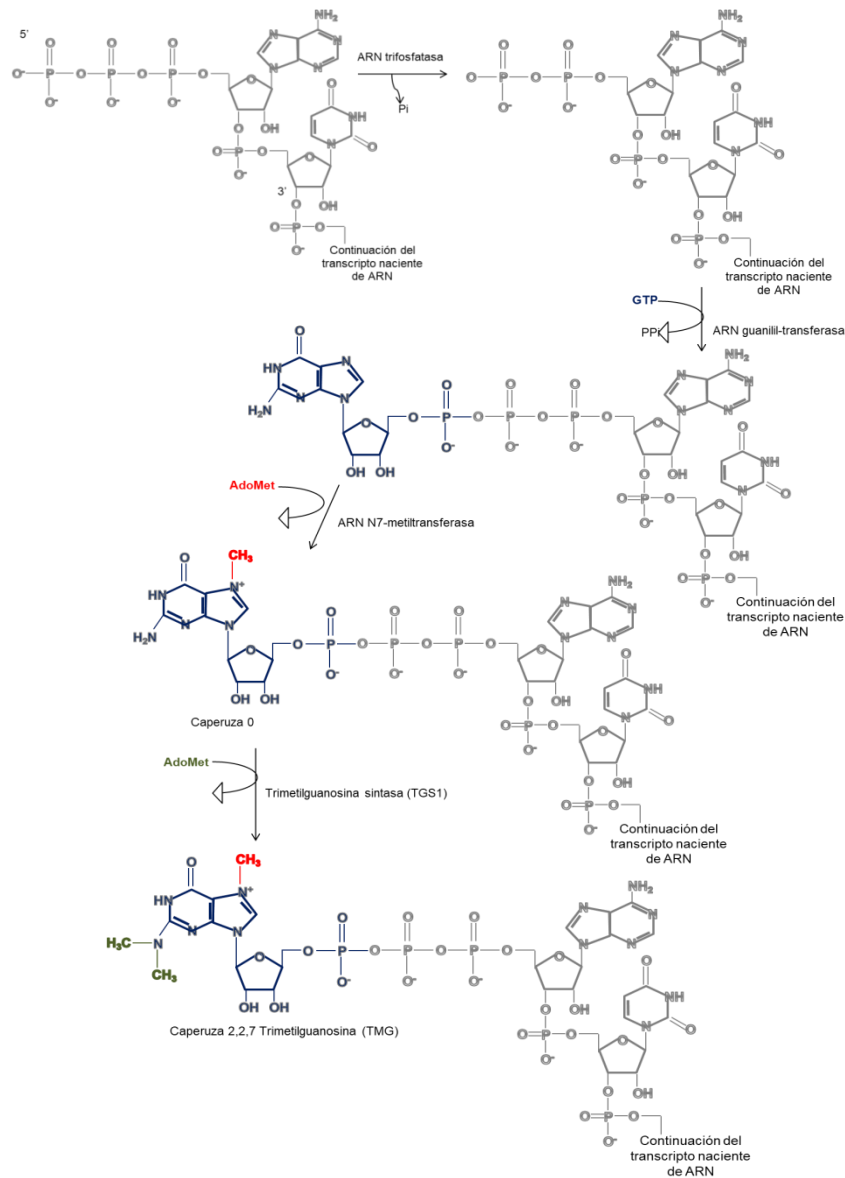


Figura I.4: Estructura y síntesis de la caperuza 0 o m^7G , presente en todos los ARNm eucariotas y la caperuza 2,2,7 trimetilguanosa (TMG), presente en los snARN y snoARN. Adaptado de Ghosh y Lima. (2010).

I.2.5- Estructura proteica de TGS1

Las enzimas TGS1 en levaduras (que se producen por fisión binaria o gemación) y en *Giardia* son polipéptidos relativamente pequeños (239-315 aminoácidos) que consisten en poco más del dominio catalítico metiltransferasa en la región C-terminal. Por el contrario, las proteínas TGS1 en el grupo Metazoa son mucho más grandes (por ejemplo, 853 aa en humanos; 491 aa en *Drosophila*) porque incluyen una extensión N-terminal que no se encuentra

en los eucariotas inferiores (Hausmann et al., 2008). Para más detalle de las estructuras proteicas de diferentes organismos, ver el apartado I.1.10.5- TGS1 en plantas.

I.2.6- Consecuencias de la pérdida funcional de TGS1 en diferentes organismos

La abolición de la función PIMT/TGS1 causa un amplio rango de efectos fenotípicos en sistemas eucariotas no vegetales. En *S. cerevisiae* estas alteraciones consisten en defectos de la maquinaria de clivaje y empalme sensibles a frío, demoras en el crecimiento a bajas temperaturas, pérdida de la organización nucleolar, deficiencias en el procesamiento de pre-ARNr, y fallas de la meiosis por clivaje y empalme aberrante de reguladores clave (Mouaikel et al., 2002; Colau et al., 2004; Qiu et al., 2011). La pérdida de TGS1 en los animales multicelulares tiene graves consecuencias. En *Caenorhabditis elegans* causa letalidad larval (Zipperlen et al., 2001). En *Drosophila* se informó letalidad embrionaria en el estadio temprano de pupa (Komonyi et al., 2005; Provart et al., 2016). En mamíferos, la pérdida de función de PIMT/TGS1 conduce a una alteración de la progresión del ciclo celular, letalidad embrionaria temprana y gluconeogénesis hepática aumentada (Kapadia et al., 2013; Enünlü et al., 2003; Jia et al., 2012), estableciendo que las proteínas TGS1 son esenciales para muchos organismos superiores.

I.2.7- Interoctores con TGS1

Hausmann et al. (2008), han documentado e identificado 21 proteínas de levaduras que se relacionan funcionalmente con TGS1 *in vivo* (Tabla I.1). Nueve de las ellas son proteínas involucradas en el *splicing* de pre-ARNm: Mud1, Mud2, Nam8, Brr1, Lea1, Ist3, Isy1, Cwc21, y Bud13. De estas nueve, dos (Mud1 y Nam8) son constituyentes del U1snRNP, y otros dos (Lea1 e Ist3) son componentes del U2snRNP. Otros seis interectores están implicados en la regulación de la transcripción de la ARN polimerasa II y/o la estructura de la cromatina: Spt3, Srb2, Soh1, Swr1, Rpn4 y Htz1. Otros tres están implicados en el procesamiento final y degradación del ARN y son: Lsm1, Pat1 y Trf4 (Tabla I.1).

Nam8 es un componente de unión al pre-ARNm del U1snRNP, y está presente en el llamado “complejo de compromiso” del U1snRNP en el sitio de corte y empalme 5', un intermedio clave en el ensamblaje de la maquinaria de clivado y empalme (Gottschalk et al., 1998; Puig et al., 1999). Su homólogo putativo en mamíferos es el regulador de empalme alternativo TIA-1 (Del Gatto-Konczak et al., 2000; Forch et al., 2000). Nam8 es necesario para el *splicing* en situaciones en las que la unión del U1snRNP al sitio de empalme es ineficiente

(Puig et al., 1999; Spingola et al., 2000). Mud2, el homólogo de levaduras del factor de *splicing* de metazoos U2AF65, interactúa con el complejo preARNm/U1snRNP de una manera dependiente de la secuencia del punto de ramificación del intrón. Se cree que Mud2 facilita el reclutamiento posterior del complejo U2 snRNP (Abovich et al., 1994; Rutz y Seraphin, 1999).

Tabla I.1: Interactores de TGS1 (adaptada de Hausmann et al., 2008)

Categoría	Interactor con Tgs1	Propiedades
Splicing ARNm	Mud1	<i>U1 snRNP A protein</i>
	Mud2	<i>U2AF65 homolog spliceosome assembly</i>
	Nam8 (Mud15)	<i>U1 snRNP protein meiosis-specific splicing</i>
	Brr1	<i>snRNP protein</i>
	Lea1	<i>U2 snRNP protein</i>
	Ist3 (Snu17)	<i>U2 snRNP protein meiosis-specific splicing</i>
	Isy1 (Ntc30)	<i>Spliceosome protein Prp19-complex</i>
	Cwc21	<i>Cef1 complex</i>
Bud13 (Cwc26)	<i>Cef1, RES complexes meiosis-specific splicing</i>	
Transcripción	Rpn4	<i>Transcription factor stress response</i>
	Spt3	<i>Transcription factor SAGA complex</i>
	Srb2	<i>Pol2 mediator complex</i>
	Soh1 (Med31)	<i>Pol2 mediator complex</i>
	Swr1	<i>Chromatin remodeling ATPase, deposition of H2A.Z</i>
	Htz1	<i>Histone H2A.Z</i>
Estabilidad del ARN	Lsm1	<i>Decapping, RNA decay</i>
	Trf4 (Pap2)	<i>Poly(A) polymerase TRAMP complex</i>
	Pat1	<i>Decapping, RNA decay P-body component</i>
Otros	Prm6	<i>Pheromone-regulated protein</i>
	Mrm2	<i>RNA 2'-O-methyltransferase</i>
	Ynl187w (Swt21)	<i>Interactions with snRNP proteins Prp40 and SmB</i>

En síntesis, la asociación física de numerosas proteínas relacionadas del *splicing* con TGS1 *in vivo*, nos proporciona información convincente del papel central que tiene la caperuza de trimetilguanosina en el metabolismo del ARN. De hecho, el grupo más grande de interactores consiste en proteínas involucradas en el ensamblado de la maquinaria de clivado y empalme, aunque también se han encontrado reguladores transcripcionales de la polimerasa II y factores involucrados en el procesamiento y degradación del ARN.

I.2.8- TGS1 en plantas

El gen *TGS1* fue muy estudiado en levaduras, moscas y mamíferos (revisado en Viswakarma et al., 2010), pero hasta que nuestro grupo reportó su asociación con la apomixis permaneció sin caracterizar en plantas (Siena et al., 2014b). Mientras en levaduras, mamíferos

y *Drosophila* existe una sola copia de este gen (*TGS1*), en plantas se detectan al menos dos copias (*TGS1* y *TGS1-like*) (Siena et al., 2014b). *TGS1* muestra una estructura similar a las variantes observadas en otros taxones, mientras que *TGS1-like* es una forma exclusiva de plantas, más larga en el extremo 5' terminal, que incluye un dominio WW de interacción proteína-proteína (Otte et al., 2003; Siena et al., 2014b). En estudios realizados en *P. notatum*, determinamos que la forma *TGS1-like* presenta una expresión marcadamente diferencial en órganos reproductivos de plantas apomícticas y sexuales, desde la premeiosis hasta la antesis (Siena et al., 2014b). En varios genotipos con diferente grado de expresividad de la apomixis, los niveles de representación del transcrito *TGS1* se correlacionaron negativamente con la capacidad de formación de sacos apospóricos (Siena et al., 2014b). Más aún, las hibridaciones *in situ* revelaron que *PN_TGS1-like* se expresaba en la nucela de los óvulos de plantas sexuales a lo largo de todo el desarrollo, desde la premeiosis a la madurez, mientras estaba ausente en plantas apomícticas (Siena et al., 2014b). La función biológica de esta variante específica de plantas aún no había sido estudiada al iniciarse esta tesis, sin embargo, durante el transcurso de la misma fue reportada una asociación con la tolerancia al frío en *Arabidopsis thaliana* (Gao et al., 2017).

I.2.9- El *splicing* alternativo como mecanismo de control

La transcripción en eucariotas está acoplada funcionalmente a la maduración del ARNm (Saldi et al., 2016), que incluye la incorporación de la caperuza, el *splicing* y la poliadenilación. A su vez, los transcritos primarios pueden sufrir *splicing* alternativo, para generar múltiples productos a partir de un solo gen, mediante el uso diferencial de los sitios de corte y empalme. Se ha demostrado que el *splicing* alternativo modula la expresión génica durante el desarrollo de la planta y en respuesta a señales ambientales (Syed et al., 2012). El *splicing* alternativo y la elongación de la transcripción por la ARN polimerasa II (ARNPII) son dos procesos estrechamente conectados. El *splicing* es un proceso co-transcripcional, y diferentes enfoques experimentales muestran que el mismo está acoplado a la transcripción en *Drosophila*, levaduras y mamíferos (Godoy Herz y Kornblihtt, 2019). Es importante señalar que en la mayoría de los casos, un ARNPII de funcionamiento lento produce la inclusión del exón. Sin embargo, en algunos casos, una ARNPII lenta promueve la omisión del exón al permitir el reclutamiento de factores negativos en los sitios de corte y empalme (Dujardin et al., 2014; Fong et al., 2014). En ambos casos, la velocidad de elongación de la transcripción regula el *splicing* alternativo.

Recientemente, se ha demostrado que las condiciones de luz/oscuridad regulan el *splicing* alternativo de las plantas (Petrillo et al., 2014). La luz inicia una señal retrógrada desde el cloroplasto, que regula el *splicing* alternativo nuclear de un subconjunto de eventos transcripcionales (Petrillo et al., 2014). Este efecto de la luz depende de los cloroplastos funcionales, ya que el uso de medicamentos que bloquean la cadena de transporte fotosintética del cloroplasto inhibe el efecto de la luz en el *splicing* alternativo. Más aún, se ha demostrado que el control de la luz sobre el *splicing* alternativo responde a un mecanismo de acoplamiento cinético. La luz promueve la velocidad de elongación de la transcripción, mientras que en la oscuridad la extensión de la ARNPII es menor (Godoy Herz et al., 2019). Aunque el mediador de la señal entre el cloroplasto y el núcleo se desconoce, se sabe que el *pool* de plastoquinonas está involucrado en la salida de la señal desde el cloroplasto (Godoy Herz y Kornblihtt, 2019). Todos estos hallazgos proporcionan evidencia de que el acoplamiento entre la velocidad de la transcripción y el *splicing* alternativo es importante en regulación de la expresión génica en las plantas (Godoy Herz y Kornblihtt, 2019).

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

II-OBJETIVOS

TGS1-like es un gen exclusivo de las plantas, que no está presente en otros *taxa*. Su expresión se detecta en el óvulo y el desarrollo embrionario de las plantas sexuales, pero está significativamente atenuada en plantas apomícticas (Siena et al., 2014b). Por otra parte, el grado de sexualidad de una planta y el valor de expresión del gen están directamente correlacionados (Siena et al., 2014b). Se desconoce si la función de *TGS1-like* es análoga a la descrita para *TGS1* en otros sistemas eucariotas, o si es específica de plantas. Además, la observación de que el gen se expresa en la nucela de los óvulos de plantas sexuales a lo largo de todo el desarrollo, pero especialmente en la antesis, mientras se mantiene ausente en plantas apomícticas es interesante, ya que la nucela es precisamente el sitio donde se diferencian las células iniciales de la aposporia. Por ello, Siena et al. (2014b) postularon que *PN_TGS1-like* podría formar parte del mecanismo inhibitorio que impide a las células acompañantes que rodean al megasporocito adquirir un destino gamético y que la inhibición de este gen podría eventualmente inducir la formación de sacos embrionarios en la nucela. El objetivo de este trabajo de tesis fue precisamente investigar la función del gen *TGS1-like* en el desarrollo reproductivo de la especie apomíctica apospórica *Paspalum notatum*, mediante la obtención y caracterización fenotípica de plantas sexuales donde la función del gen estuviese silenciada.

II.1- Objetivo general

Contribuir a la elucidación del rol del gen *PN_TGS1-like* en el desarrollo reproductivo de la especie apomíctica apospórica *Paspalum notatum*.

II.2- Objetivos específicos

1. Obtener plantas transgénicas de *P. notatum* sexual en las que se haya silenciado de manera constitutiva la actividad del gen *PN_TGS1-like* y analizar las consecuencias fenotípicas, con énfasis en el desarrollo reproductivo.
2. Determinar qué transcritos muestran variantes de procesamiento diferenciales (variantes de *splicing*) en tejidos reproductivos de plantas de *P. notatum* apomícticas y sexuales

(que naturalmente presentan una expresión diferencial de *TGS1*) y estudiar su procesamiento en las líneas sexuales defectivas para *tgs1-like* (obtenidas en el objetivo 1).

3. Construir varias bibliotecas del transcriptoma floral reflejando estadíos consecutivos del desarrollo en plantas apomícticas y sexuales y usarlas para analizar la expresión de *PN_TGS1-like* y otros miembros de la maquinaria de *splicing*, incluyendo sus interactores descritos o predichos.

4. Identificar el número de copias y la secuencia completa del gen *TGS1* en el genoma de *Paspalum notatum*.

5. Analizar, mediante el estudio de bibliotecas del componente pequeño (sRNA) del transcriptoma floral, la posibilidad de que la expresión diferencial de *PN_TGS1-like* observada en óvulos de plantas apomícticas y sexuales ocurra bajo el control de un mecanismo de silenciamiento transcripcional o postranscripcional.

III- HIPÓTESIS

1. *Las modificaciones en los niveles de expresión de PN_TGS1-like en la flor están asociados con alteraciones del fenotipo reproductivo (asociada al objetivo específico 1).*
2. *Las plantas apomícticas presentan un procesamiento alternativo de un grupo de ARNm respecto a las sexuales a causa de la actividad diferencial de PN_TGS1-like (asociada al objetivo específico 2).*
3. *Otros miembros de la maquinaria de splicing están diferencialmente expresados durante el desarrollo apomíctico y presentan interacciones predichas con PN_TGS1-like (asociada al objetivo específico 3).*
4. *El gen TGS1 está presente en dos copias en el genoma de Paspalum (TGS1 y TGS1-like), como se observa en numerosas especies de plantas (asociada al objetivo específico 4).*
5. *El gen PN_TGS1-like está siendo silenciado postranscripcionalmente en plantas apomícticas (asociada al objetivo específico 5).*

MATERIALES Y MÉTODOS

IV- MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1- Material vegetal

El material de *P. notatum* usado consistió de genotipos tetraploides de diferentes orígenes: Q4117 ($2n = 4x = 40$; apomítico obligado) (Ortiz et al., 1997); Q4188 ($2n = 4x = 40$; sexual; obtenido experimentalmente) (Quarin et al., 2003); JS-36, JS-58 y JS-83 ($2n = 4x = 40$; sexuales) y JS-9, JS-71 y JS-130 ($2n = 4x = 40$; apomíticos), progenies híbridas F_1 derivadas de una cruce entre los genotipos Q4188 x Q4117 (Stein et al., 2004); y una población tetraploide sintética completamente sexual (SSTP) de *P. notatum* obtenida por Zilli et al. (Zilli et al., 2015, 2019). Los genotipos Q4188 y Q4117 pertenecen a la colección *Paspalum* establecida en el IBONE, CONICET-UNNE, Corrientes, Argentina. Las plantas Q4188, Q4117, y sus progenies F_1 están establecidas en el IICAR, CONICET-UNR, Rosario, Argentina. Las líneas control y transformadas se cultivaron en una cámara de OMG con condiciones reguladas, en el IICAR, CONICET-UNR, Rosario, Argentina. Para la identificación de variantes de *splicing* en transcriptomas florales se usaron los genotipos tetraploides Q4117 (ver arriba); C4-4x ($2n = 4x = 40$; sexual; colchipoide obtenido experimentalmente) (Quarin et al., 2002), así como también tres híbridos F_1 tetraploides apomíticos (JS-40, JS-112, JS-74) y tres sexuales (JS-76, JS-43, JS-60), derivados de la cruce Q4188 x Q4117 (Stein et al., 2004). Las bibliotecas Illumina TrueSeq fueron construidas con los genotipos C4-4x y Q4117 (ver arriba).

IV.2- Medios de cultivo *in vitro*

Los medios de cultivo utilizados en este trabajo fueron:

- MM5: 4,3 g/L de medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS), 30 g/L de sacarosa, 5 μ M de N6-bencilaminopurina (BAP), 30 μ M Dicamba;
- IM: 4,3 g/L de MS, 30 g/L de sacarosa;
- IM con el agregado de manitol: 4,3 g/L de MS, 30 g/L de sacarosa, 0,4 M de manitol;
- MRV1: 4,3 g/L de MS, 30 g/L de sacarosa, 5 μ M BAP, 1 μ M de ácido giberélico (GA3) y 50 μ M CuSO_4 ;
- MEEV3: 2,15 g/L MS y 30 g/L sacarosa.

Todos ellos contenían como base 30 g/l de sacarosa y 2,2 g/l de Phytigel. El pH de los medios se ajustó a 5,7 con hidróxido de sodio 1M. Los medios fueron esterilizados en autoclave durante 30 min a 120°C y 1,2 kPa. La esterilización de las hormonas se realizó con filtros de 0,2 µm (Millipore, Billerica, MA, USA), y el agregado de las mismas se efectuó cuando el medio adquirió una temperatura inferior a 55°C. Los medios de cultivo apropiados, los requerimientos nutricionales y la dosis efectiva de hormonas, fueron seleccionados a partir de la metodología desarrollada en nuestro laboratorio por Mancini et al. (2014).

IV.3- Vectores de transformación

Para obtener la construcción de transformación se empleó el plásmido de base pAct1-gfbsd2 (Ochiai-Fukuda et al., 2006), que contiene una variante con *enhancer* del gen que codifica a la proteína verde fluorescente (*EGFP*) clonada bajo el promotor de actina 1 de arroz (pAct1). A partir de él se construyó el plásmido pAct1-F1as, mediante el reemplazo del gen *EGFP* por un fragmento de 733 pb del gen *PN_TGS1-like* (fragmento F1) (Siena et al., 2014b), quedando este último clonado en antisentido bajo el control del promotor pAct1 (Figura IV.1). En los experimentos de co-bombardío se utilizó el plásmido pUbi-BAR-35S-GFP (Huber et al., 2002), portador del gen reportero GFP y del selector BAR (que otorga resistencia al herbicida glufosinato de amonio), clonados bajo el promotor de ubiquitina de maíz y del virus del mosaico de coliflor, respectivamente.

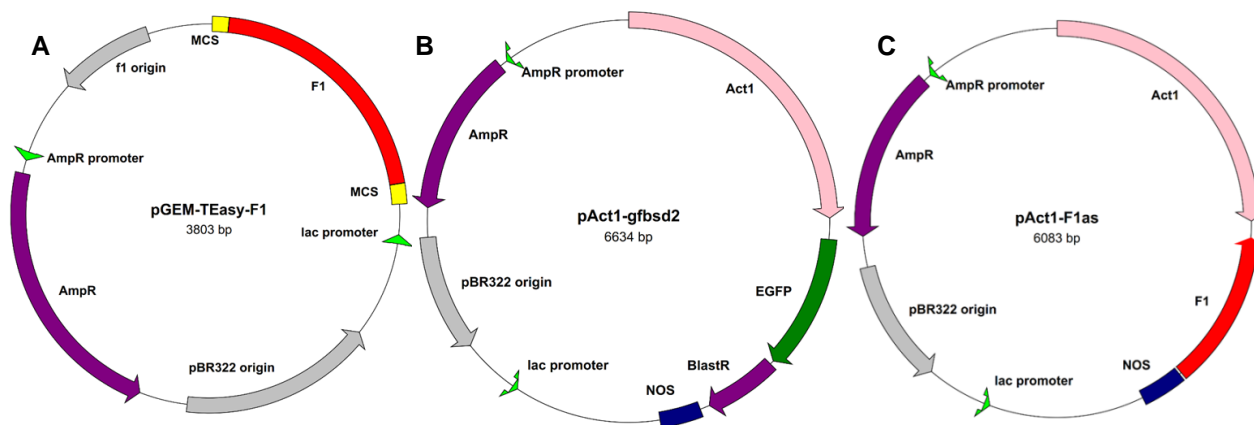


Figura IV.1. Representación esquemática de los vectores de transformación usados en los experimentos de transformación. A: plásmido pGEM-TEasy F1 (Siena et al., 2014b), B: plásmido pAct1-gfbsd2 (Ochiai-Fukuda et al., 2006), y C: plásmido pAct1-F1as, el cual se originó al reemplazar el segmento EGFP/BLASTR del plásmido pAct1-gfbsd2 por el fragmento F1 de *PN_TGS1* clonado en orientación antisentido.

IV.4- Experimentos de transformación

IV.4.1- Construcción del plásmido pAct1-F1as

Los cortes con las enzimas de restricción *SpeI* y *NotI* se realizaron de acuerdo con las especificaciones de los fabricantes (PROMEGA). Los fragmentos cortados se corrieron en geles de agarosa al 1% m/v, se visualizaron por tinción con bromuro de etidio y se purificaron con bolsas de diálisis por electroelución, siguiendo el protocolo que se detalla en Sambrook y Russell (2001). La reacción de ligación de F1 (733 pb) y pAct1 (5510 pb) se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante. En un volumen final de 10 μ l se incorporaron 5 μ l de pAct1, solución reguladora Rapid Ligation (Promega) 10X, 3 μ l del inserto F1 y 1 μ l de ADN ligasa T4 (Promega). La incubación se realizó a 4°C durante toda la noche. La transformación de cepas DH5 α de *E. coli* con los plásmidos recombinantes se llevó a cabo mediante un electroporador BIO-RAD, respetando las recomendaciones descritas en las guías de aplicaciones. La preparación de células electrocompetentes comenzó con la inoculación de 500 ml de medio de cultivo líquido LB (peptona de carne 1% m/v; extracto de levadura 0,5% m/v; cloruro de sodio 1% m/v; pH 7) con 5 ml de cultivo fresco de *E. coli*. Se incubó a 37°C con agitación durante aproximadamente 3 h hasta alcanzar un índice DO₆₀₀ de 0,5-0,7. Luego el cultivo fue transferido a tubos Falcon de 50 ml y centrifugado a 3500 rpm a 4°C durante 15 min. Se descartó el sobrenadante y las células fueron resuspendidas cuidadosamente en 500 ml de glicerol 10% v/v frío. Se procedió a centrifugar nuevamente a 3500 rpm a 4°C durante 15 min y se descartó el sobrenadante. Las células fueron resuspendidas en 250 ml de glicerol 10% v/v y luego centrifugadas en las mismas condiciones. Se descartó el sobrenadante y las células fueron disueltas en 20 ml de glicerol 10% v/v y nuevamente centrifugadas en las condiciones detalladas anteriormente. Finalmente el sobrenadante fue descartado y las células fueron resuspendidas en 2 ml de glicerol 10% v/v. La suspensión fue fraccionada en tubos de 1,5 ml y éstos conservados a -80°C. Para la electroporación se incubaron en hielo 40 μ l de la suspensión celular electrocompetente con 3 μ l de la mezcla de ligación durante 1 min. Se transfirió la mezcla a la cubeta y se aplicó un micropulso. Se agregó 1 ml de medio SOC (0,5 % m/v extracto de levadura; triptona de carne 2% m/v; cloruro de sodio 10 mM; cloruro de potasio 2,5 mM; cloruro de magnesio 10 mM; sulfato de magnesio 10 mM; glucosa 20 mM) a la cubeta, se mezcló cuidadosamente con micropipeta y se transfirió a microtubos de 1,5 ml. Se incubó a 37°C con agitación durante 1 h y se procedió a depositar 200 μ l del cultivo en medio selectivo: medio LB adicionado con antibiótico y X-Gal (peptona de carne 1% m/v; extracto de levadura 0,5 % m/v; cloruro de sodio 1 % m/v, pH 7; 100 μ g/ml ampicilina; 60 μ g/ml X-Gal; 1,5 % m/v

agar). Las placas se incubaron toda la noche a 37°C. Las colonias transformadas resultaron de color blanco y las no transformadas de color azul (Sambrook et al., 1989). Para la confirmación de la identificación de colonias portadoras de los plásmidos recombinantes con el fragmento de interés se realizó una PCR de colonia. Se seleccionaron colonias blancas y se utilizó un palillo estéril para inocular 20 µl de agua destilada estéril en tubos de 0,2 ml. Esta suspensión se incubó 10 min a 100°C para lograr una lisis celular. A continuación se llevó a cabo una reacción de PCR en un volumen final de 25 µl, con 2 µl de lisado, 0,5 µM de cebadores (Act-Nos2 Upper/Lower, Tabla IV.1), 0,2 mM de dNTPs, 1X de solución reguladora GoTaq (Promega) y 1,5 U de polimerasa Go Taq (Promega). El programa de ciclado consistió en 1 min inicial a 94°C, seguido de 30 ciclos de 1 min a 94°C; 2 min a 57°C y 2 min a 72°C, con una fase de elongación final de 5 min a 72°C. Los productos de amplificación fueron visualizados por medio de electroforesis en geles de 1,5 % m/v de agarosa, en cubas horizontales a 60 mA, con solución reguladora TAE (0,04M Tris-Acetato; 1mM EDTA) y posteriormente teñidos con bromuro de etidio 10 mg/l.

Para el aislamiento de plásmidos recombinantes se utilizó el equipo comercial Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega), siguiendo las indicaciones establecidas por los fabricantes. Se seleccionaron colonias blancas por placa de estriado para ser cultivadas en 5 ml de medio selectivo LB líquido con ampicilina 100 µg/ml, durante toda la noche, a 37°C, con agitación. Para la extracción de los plásmidos se trabajó con los reactivos, concentraciones y volúmenes indicados en el equipo comercial. Finalmente, los plásmidos fueron eluidos en 100 µl de agua estéril libre de nucleasas (Promega) y almacenados a -20°C. La calidad y cantidad del ADN plasmídico fueron evaluadas en un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda Bio+. Los clones se secuenciaron en Macrogen Inc. (Seoul, Korea) para chequear la posición, sentido e integridad del fragmento F1.

IV.4.2- Obtención de callos a partir de semillas maduras

Las semillas maduras de la población tetraploide sintética completamente sexual (SSTP, ver apartado IV.1- Material vegetal), fueron tratadas con ácido sulfúrico concentrado durante 30 min, para inducir la ruptura de la dormancia. Seguidamente fueron esterilizadas con agua lavandina comercial (hipoclorito de sodio 50% v/v, con 35 g/l de cloro activo) y 100 µl de Tween 20 durante 7 min, seguido de un tratamiento con etanol 97% durante 7 min. Posteriormente, fueron lavadas con agua destilada estéril, y secadas sobre papel de filtro estéril. Entre 15-30 semillas fueron colocadas en cada placa de Petri conteniendo medio MM5, y cultivadas en

oscuridad a 28°C durante 45 días aproximadamente, con repiques cada 15 días en medio fresco. Una vez que se obtuvieron callos, fracciones de 5 mm de los mismos fueron transferidas al mismo medio de cultivo cada dos semanas. Para el bombardeo fueron utilizados sectores de callos embriogénicos, los cuales presentan un aspecto compacto, nodular y un color blanco-amarillento.

IV.4.3- Transformación estable

Se realizaron dos experimentos independientes de co-transformación: 1) sin selección: usando los plásmidos pAct1-F1as y pAct1-gfbsd2 (relación 2,5/1); 2) con selección: con los plásmidos pAct1-F1as y pUbi-BAR-p35S-GFP (relación 2,5/1). Previo al bombardeo, a los callos se les realizó un tratamiento osmótico, para facilitar la incorporación de las partículas en las células. Quince secciones de callos fueron colocadas sobre papel de filtro estéril en cada placa de Petri conteniendo medio IM con el agregado de 0,4M de manitol, e incubadas a temperatura ambiente durante 4 horas. Para precipitar los plásmidos sobre las partículas de tungsteno (1µm de diámetro), en un microtubo de 1,5 ml se colocaron 65 µl de la suspensión de partículas (50 µg/µl), 6,5 µg totales de ADN plasmídico y 75 µl de nitrato de calcio 1M pH 10, y se incubó en hielo durante 10 min para favorecer la sedimentación. Luego, la suspensión fue centrifugada brevemente para descartar el sobrenadante. Finalmente las partículas fueron lavadas con 100 µl isopropanol 70% v/v. El precipitado fue resuspendido en 65 µl de isopropanol, sonicando brevemente para romper los aglomerados. Las membranas de vuelo fueron lavadas con 70% v/v de isopropanol y secadas en posición horizontal. A continuación, 15 µl de la suspensión de partículas fueron ubicadas sobre estas membranas. Los experimentos de bombardeo se llevaron a cabo utilizando un acelerador de micropartículas BIOMICS (BIOMICS, Brasilia, Brasil) con una presión de helio de 900 psi y a una distancia de 5 cm. Después del bombardeo, los callos fueron transferidos al mismo medio osmótico utilizado anteriormente durante una hora. Se trasladaron a medio IM y se incubaron durante 24 h. Finalmente, se situaron en medio de inducción de callos MM5 conteniendo 1mg/L de glufosinato de amonio, durante un mes, con repiques cada 15 días. Se incluyeron dos placas control en cada experimento: un control de selección (callos bombardeados sin plásmido y con selección con herbicida) y un control de regeneración (sin bombardeo y sin selección). Los callos que toleraron al herbicida fueron transferidos a medio de inducción de vástagos MRV1 e incubados a 28°C en una cámara de cultivo con fotoperiodo de 16 h luz/día. Después de 40 días, los callos que habían producido vástagos superiores a 5 cm fueron transferidos a frascos conteniendo medio de inducción de

vástagos y raíces MEEV3 e incubados a 28°C en cámara de cultivo con un fotoperiodo de 16 h luz/día. Finalmente, las plántulas fueron lavadas con agua destilada para eliminar el remanente de medio de cultivo y transferidas a macetas con una mezcla 1:1 de tierra: vermiculita, manteniéndose en condiciones de humedad elevada durante una semana. Durante la floración, las inflorescencias se embolsaron para permitir la autopolinización.

IV.5- Verificación de la presencia del transgen

IV.5.1- Extracción de ADN genómico

Para analizar la presencia de la construcción pAct1-F1as, se extrajo ADN de las plantas transformadas utilizando el método CTAB (Saghai-Maroo et al., 1984) con la siguiente modificación: se congelaron en N₂ líquido aproximadamente 1 g de tejido fresco de hojas jóvenes, sanas y limpias, disgregándose las luego mecánicamente en mortero hasta obtener un polvo fino. Cada muestra fue transferida a un tubo de polipropileno de 15 ml conteniendo 5 ml de *buffer* de extracción (Tris-HCl 100 mM pH 7,5; NaCl 700 mM; EDTA 50 mM pH 8,0; CTAB 2% p/v y β-Mercaptoetanol 140 mM), e incubada a 65°C durante una hora con agitación. Se agregaron 5 ml de cloroformo, se mezcló durante 10 min, se centrifugó a 4000 rpm por 15 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 10 min en una solución de etanol 70 %, secado al aire y resuspendido en 200 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 media, y posteriormente re-precipitada con 5% v/v de NaCl 5M y un dos volúmenes de etanol absoluto frío. Finalmente, se centrifugó a 14000 rpm por 20 min, se lavó el precipitado con etanol 70%, se secó y disolvió en 200 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 como índice 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%.

IV.5.2- Detección del transgen por PCR

Se realizaron experimentos de PCR utilizando cebadores específicos diseñados con el programa Primer3 v.0.4.0. La secuencia de los cebadores y sus correspondientes Tms se listan en la Tabla IV.1. Se realizaron dos tipos de experimentos de PCR: PCR-F1 anidada (nested PCR) y PCR-NOS. En la PCR-F1 anidada se hizo una primera amplificación con un par de

cebadores complementarios a las secuencias plasmídicas que flaquean el F1 antisentido en el plásmido pAct1-F1as (cebadores: Act-Nos2 Upper/Lower). Esta primera amplificación fue usada como molde para realizar una segunda amplificación con cebadores complementarios a la secuencia interna de F1 y al flanco 5' del plásmido pAct1-F1as (primers: Act-Nos2 Upper/Nested Lower). En la PCR NOS se utilizaron cebadores específicos del terminador NOS-T de *Agrobacterium*. Todos los experimentos de amplificación fueron llevados a cabo en un volumen final de 25 µl conteniendo 1X solución reguladora de Taq polimerasa (INBIO), 0,5 µM de los cebadores directo y reverso, 1,25U Taq polimerasa (INBIO HIGHWAY, Buenos Aires, Argentina), 1,5 mM de cloruro de magnesio, 0,2 mM de dNTPs, 50 ng de ADN genómico para cada muestra y como control positivo se utilizaron 2 µl de una dilución 1/100 del plásmido pAct1-F1as. Para el caso de la PCR anidada, como molde de la segunda amplificación, se utilizaron diluciones 1/1000 del producto de la primera amplificación para todas las muestras y 1/10000 para el control positivo. La reacción de PCR consistió de un paso inicial de desnaturalización de 94°C durante 5 min, seguido de 35 ciclos de 94°C durante 30 segundos, la correspondiente temperatura de anillado (Ta) durante 1 minuto, 72°C durante 25 minutos o 1:30 minutos (dependiente del tamaño del fragmento a amplificar) y finalmente una extensión de 72°C durante 10 min.

IV.6- Verificación de la expresión disminuida de *PN_TGS1-like*

IV.6.1- Extracción de ARN total

La extracción de ARN total se realizó a partir de hojas e inflorescencias en el estadio de antesis (Laspina et al., 2008). Se extrajo ARN total de 30 mg de tejido, utilizando el equipo comercial "ARN SV Total RNA Isolation Kit" (Promega), y siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN extraído se cuantificó en un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda Bio+, midiendo el índice de absorbancia a 260 nm, y considerando la relación 1 DO = 40 µg/µl. La pureza de las muestras se controló midiendo la relación de Abs 260 nm/Abs 280 nm (se consideraron aceptables relaciones entre 1,8 y 2,2). La integridad del ARN se estimó realizando electroforesis de 300 ng de muestra en geles de agarosa al 1 % m/v a 60 mA, considerando que una muestra íntegra presenta dos bandas bien definidas, que corresponden a los ARN ribosomales 18S y 5S, y una banda difusa de bajo peso molecular que corresponde a los ARN de transferencia. Las muestras fueron almacenadas a -80°C.

IV.6.2- Transcripción reversa

Se realizó la transcripción reversa del ARNm de *P. notatum* de hojas y flores utilizando la enzima Transcriptasa Reversa Superscript II (INVITROGEN, Carlsbad, CA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 20 μ l. Se incorporaron, 10 ng de oligo (dT)₁₂₋₁₈, 0,5 μ g de ARN total, 1 μ l de dNTP (10 mM) y agua destilada estéril, hasta llegar a un volumen de 12 μ l. Se incubó a 65°C por 5 min y la mezcla se mantuvo en hielo. Posteriormente, se adicionaron 4 μ l de solución reguladora 5X Primera Hebra (INVITROGEN) y 2 μ l de DTT (0,1 M) y luego de homogeneizar la mezcla se incubó a 42°C durante 2 min. Se adicionaron 200 U de Superscript II RT (INVITROGEN, Carlsbad, CA, USA), mezclando suavemente con micropipeta, y se incubó 60 min a 42°C. La reacción de retrotranscripción se detuvo incubando durante 15 min a 70°C. El ADNc sintetizado fue conservado a -20°C.

IV.6.3- PCR en tiempo real

Las reacciones de PCR en tiempo real fueron preparadas en un volumen final de 20 μ l conteniendo 0,5 μ M de cebadores específicos (primers: qPCR Upper/Lower, Tabla IV.1), 1x Real Mix (BIODYNAMICS, Buenos Aires, Argentina) y 20 ng de ADNc. En cada experimento, se procesaron dos réplicas biológicas y tres réplicas técnicas. Además, se incorporaron controles sin templado (control negativo). Todas las amplificaciones fueron realizadas en un equipo Rotor-Gene Q thermocycler (QIAGEN, Hilden, Germany), con el siguiente programa: 2 min a 94°C, 45 ciclos de 15 s a 94°C, 30 s a 57°C, 17 s a 72°C, y una elongación final de 5 min a 72°C. Los datos de cada amplificación fueron analizados utilizando el programa Rotor-Gene Q Series Software 1.7 y la cuantificación relativa se realizó considerando los valores de despegue (“take off”) y eficiencia de amplificación para cada reacción individual. El análisis estadístico se desarrolló con el programa REST-RG (Relative Expression Software Tool V 2.0.7 para Rotor Gene, Corvett Life Sciences). Se utilizó al gen endógeno β -tubulina como referencia, debido a que en trabajos previos fue reportado como uno de los candidatos con expresión más estable en órganos reproductivos de *P. notatum* en diferentes estadios del desarrollo (Felitti et al., 2011; Ochogavía et al., 2011; Podio et al., 2014b). Las eficiencias de las amplificaciones fueron controladas para los genes candidatos y de referencia.

IV.7- Análisis fenotípicos

IV.7.1- Caracterización fenotípica de las plantas controles y transformantes

Las plantas obtenidas a partir de la plataforma de transformación (transgénicas y controles de transformación que sufrieron el proceso de cultivo *in vitro*) fueron cultivadas bajo condiciones controladas de fotoperíodo, humedad y temperatura, en cámara de cultivo, como se mencionó en apartados anteriores. Se evaluaron las características morfológicas de las plantas, así como también caracteres fenotípicos como largo de las inflorescencias, y productivos, como el número de inflorescencias por planta y número de semillas llenas por planta.

IV.7.2- Viabilidad del polen

Para el estudio de viabilidad se cosechó polen maduro en el estadio de antesis. Todas las muestras de polen fueron colectadas de espiguillas recién abiertas. Se analizaron 3 espiguillas de cada planta. Bajo la lupa se disectaron las tres anteras de cada flor sobre un portaobjeto, y se las coloreó con unas gotas 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 viable (púrpura) y los no viables (translúcidos y verde/celestes). Las observaciones se llevaron a cabo utilizando un microscopio de transmisión de luz Nikon Eclipse E200. Los datos de viabilidad de polen obtenidos para cada planta fueron evaluados estadísticamente usando el test de intervalos de confianza de proporciones de *Newcombe* con correcciones de continuidad (Newcombe, 1998).

IV.7.3- Análisis citoembriológicos

Las plantas (controles de transformación y transgénicas) fueron llevadas a cámara de cultivo en condiciones controladas de fotoperíodo y temperatura para inducir la floración. El desarrollo y la morfología de los sacos embrionarios fueron caracterizados por observaciones citoembriológicas de clarificados de óvulos, siguiendo el protocolo descrito por Young et al. (1979). El análisis de los sacos embrionarios maduros de *Paspalum* en la etapa de antesis permite la determinación de su origen, ya que los sacos embrionarios meióticos y apospóricos muestran morfologías distintas (Martínez et al., 2001; Ortiz et al., 2013). Mientras que los sacos embrionarios meióticos maduros (SEM) muestran una ovocélula, una o dos sinérgidas, una célula central con dos núcleos polares y una masa de células antipodales, los sacos embrionarios apospóricos (SEA) son tetra o pentanucleados, y comprenden una ovocélula, una a dos sinérgidas y dos núcleos polares, pero carecen de células antipodales (Martínez et al.,

2001). Se fijaron espiguillas en estadíos de antesis y premeiosis/meiosis (Laspina et al., 2008) en FAA (70% etanol:formaldehído:acético 18:1:1) durante 24-48 h. Los pistilos fueron disectados y los ovarios fueron colocados en 70% etanol por al menos 24 h. Luego fueron tratados con 3% peróxido de hidrógeno durante 2 h. Posteriormente, fueron deshidratados en una serie de etanol (50%, 70%, 95% y dos veces 100%), haciendo incubaciones de 30 min a cada concentración. Se los trató con una serie de metilsalicilato/etanol (1:1, 3:1, 5,6:1), realizando incubaciones de 30 min a cada concentración. Finalmente, fueron incubados en metilsalicilato 100% por al menos 12 h. Sobre un portaobjeto se colocaron unas gotas de metilsalicilato y los ovarios fueron depositados sobre ellas, se los cubrió con el cubreobjetos y fueron examinados en un microscopio de interferencia diferencial de contraste Leica DM2500. Se evaluó el número de sacos embrionarios y los datos fueron analizados usando el cálculo de intervalos de confianza para proporciones de Newcombe, con una corrección de continuidad (Newcombe, 1998).

IV.7.4- Citómetro de flujo

El origen de las semillas (apomixis o sexualidad) fue determinado usando un método de *Flow Cytometric Seed Screening* (FCSS), el cual estima la relación entre el contenido de ADN genómico entre el embrión y el endosperma (2:3 para las semillas sexuales; 2:5 para las semillas apomícticas) (Matzk et al., 2000). Se colectaron semillas maduras 40 días después de la antesis. Después de remover las espiguillas del raquis, las semillas vacías fueron eliminadas usando un separador de viento. Las semillas llenas fueron escarificadas manualmente para separar los cariopses, los cuales fueron tratados con una serie de 30% v/v de hipoclorito, 70% de etanol 70% y agua destilada estéril (5 min cada paso). Luego, los núcleos fueron extraídos rebanando los cariopses en 0,5 ml de *buffer* de extracción (CyStain UV Precise P Nuclei extraction *buffer*, SYSMEX PARTEC, Görlitz, Germany), seguido de la adición de 1,5 ml de *buffer* de tinción (Cystain UV Precise P Staining Buffer, SYSMEX PARTEC) que contiene 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Los contenidos de ADN en las preparaciones de núcleos (valor C) fueron determinados midiendo la intensidad de fluorescencia de los núcleos teñidos con DAPI, mediante el uso de un citómetro de flujo CyFlow Space (SYSMEX PARTEC) y siguiendo el protocolo descrito por Galdeano et al. (2016).

IV.7.5- Ensayos de germinación

Para realizar experimentos de germinación de semillas, 3 grupos de 30 semillas originadas de las plantas E1.4 (control sexual de transformación) y E2.9 (transformante *tgs1*) se escarificaron con H₂SO₄ concentrado durante 15 minutos, luego se lavaron con agua destilada y se incubaron en placas de Petri conteniendo un fondo de algodón húmedo cubierto con papel de filtro. Finalmente las placas de Petri se colocaron en una cámara de crecimiento a 28 °C con un fotoperíodo de 12 h de luz durante 30 días.

IV.8- Uso de un marcador molecular para la detección del ACR

Para verificar molecularmente que las plantas regeneradas no presentaban la región genómica responsable de la apomixis (ACR), nos enfocamos en trabajos anteriores que informaban la especificidad de una secuencia de ADN con identidad con la *peptidyl-prolyl cis-trans isomerase* (PPIase) de arroz (LOC_Os02g52290.1), que mapeaba dentro de la región que controla la apomixis en *Paspalum* (ACR) (Pupilli et al., 2004; Podio et al., 2012). En nuestro laboratorio se diseñaron cebadores específicos que amplifican un fragmento de 570 pb de dicha secuencia, que está presente únicamente en la ACR (Ing. Nicolás Spoto, resultados no publicados) (Tabla IV.1). Este fragmento es un marcador que se asocia en un 100% al modo reproductivo apomíctico. Se realizaron experimentos de PCR en una mezcla de reacción de 25 µL conteniendo: 90 ng de ADN genómico, 0,2 µM de cada cebador (PPIAPO Upper/Lower, Tabla IV.1), 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs y 1,25 U de Taq polimerasa (INBIO, HIGHWAY). Los experimentos se realizaron en un termociclador MyCycler (BIORAD, Hércules, CA, EE.UU), de la siguiente manera: 5 min a 94°C, 35 ciclos de 94°C durante 30 sec, 59°C 1 min y 72°C 2 min, y un paso final de elongación de 5 min a 72°C. Finalmente, utilizamos el genotipo Q4117 y tres individuos apomícticos de la población JS (JS-9, JS-71 y JS-130) como controles positivos y el genotipo Q4188 y tres individuos sexuales de la población JS (JS-39, JS-58 y JS-83) como controles negativos del ACR.

Tabla IV.1: Cebadores utilizados para analizar las plantas transgénicas y controles

Cebador	Secuencia	T _m (°C)	T _a (°C)	Producto de tamaño esperado (pb)
Act-Nos2-Upper	5'-AAGAGGGGAAAAGGGCACTA-3'	60,07	59	1270
Act-Nos2-Lower	5'-ATTGCCAAATGTTTGAACGA-3'	59,02		
Act-Nos2-Upper	5'-AAGAGGGGAAAAGGGCACTA-3'	60,07	59	530
Nested-Lower	5'-CAAGAACAGCCTCGCTGTAG-3'	59,00		
NOS-Upper	5'-GGTACCGAGCTCCGAATTTCC-3'	60,96	57	187
NOS-Lower	5'-TTGCGGGACTCTAATCATAAAAA-3'	59,98		
qPCR-Upper	5'-ACGTTCTTGTGTTGGCATT-3'	59,00	57	180
qPCR-Lower	5'-TGCTCATCCACAGAAGATGG-3'	59,00		
β-tubulina-Upper	5'-GTGGAGTGGATCCCCAACAA-3'	63,23	57	158
β-tubulina-Lower	5'-AAAGCCTTCCTCCTGAACATGG-3'	65,85		
PPIAPO-Upper	5'-CCGGTTCGAGTACAACAGAA -3'	62,00	59	570
PPIAPO-Lower	5'-TTTCTGGACAGATCACGATCC -3'	62,00		

IV.9- Bases de datos

Para recuperar las secuencias completas de los genes expresados en tejidos reproductivos de plantas apomícticas y sexuales se utilizaron las bases de datos ensamblados *de novo* a partir de lecturas largas Roche 454/FLX+ desarrolladas en nuestro laboratorio, y disponibles públicamente en el repositorio NCBI Sequence Read Archive (SRA), <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA330955>, bajo los números de acceso SRX1971037 y SRX1971038 para las bibliotecas apomíctica y sexual, respectivamente (Ortiz et al., 2017). Además, se construyó una base de datos de expresión cuantitativa a partir de la

secuenciación HiSeq de bibliotecas Illumina TrueSeq florales, secuenciando por triplicado 4 estadíos del desarrollo: premeiosis, meiosis, posmeiosis y aneisis (los datos están disponibles en forma pública en el repositorio SRA del NCBI bajo el número de accesoión PRJNA511813). Por otra parte, se usaron bibliotecas de sRNA florales apomícticos y sexuales desarrolladas previamente en nuestro laboratorio (disponibles en el repositorio NCBI SRA bajo los números de accesoión SRX1971037 y SRX1971038 para las bibliotecas apomícticas y sexuales respectivamente) (Ortiz et al., 2019). El genoma completo de *P. notatum* está siendo secuenciado usando tecnologías Hi-seq Illumina y Oxford Nanopore, en colaboración con otros institutos de Francia, Italia y Argentina. A partir de los datos crudos generados hasta el momento, proveniente del genotipo diploide sexual R1, que muestra una tasa vestigial de aposporía, se realizaron alineamientos y búsquedas blastn, usando como interrogante la secuencia nucleotídica del gen *PN_TGS1-like* proveniente del transcriptoma floral Roche 454. Se utilizó el programa DNA Baser v4.23.0 para ensamblar todas las secuencias homólogas a *PN_TGS1-like* y el programa en línea Splign del NCBI para predecir los exones e intrones.

IV.10- Identificación de variantes de *splicing* en transcriptomas florales

IV.10.1- Búsqueda en bases de datos

Las variantes se identificaron a partir de bases de datos de secuencias desarrolladas previamente por nuestro grupo de trabajo, correspondientes a transcriptomas florales de referencia de *P. notatum* sexual (C4-4x, 2n=4x=40) y apomíctico (Q4117, 2n=4x=40), ensamblados *de novo* a partir de lecturas largas FLX Roche 454 (Ortiz et al., 2017). Los transcriptos diferencialmente expresados de la base global se ordenaron de acuerdo al FDR (*False Discovery Rate*), para seleccionar aquellos genes con menor probabilidad de haber sido identificados por azar. Luego para cada uno de los isotigs diferenciales se buscaron las secuencias apomícticas y sexuales, en sus respectivas bases de datos, y se alinearon con Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Se hicieron alineamientos con BLASTN/BLASTX contra las bases no redundantes del NCBI y con ClustalW entre las secuencias apomícticas y sexuales. Se compararon las secuencias y se determinó la posible existencia de intrones no procesados controlando la existencia de los sitios característicos de intrones del grupo II.

IV.10.2- PCR convencional

Para controlar el clivado diferencial se efectuaron amplificaciones por PCR cualitativa en muestras de ADNc generadas a partir de ARN floral. Los cebadores utilizados (Tabla IV.2) se diseñaron con Primer3 v.0.4.0 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) sobre secuencias internas del intrón alternativo. Las muestras de ARN total fueron extraídas de flores en anthesis con “SV Total RNA Isolation System” (PROMEGA, Massachusetts USA) (ver apartado IV.6.1- Extracción de ARN). Se retrotranscribió 1 µg de ARN usando Transcriptasa Reversa Superscript II (INVITROGEN, Carlsbad, CA, USA). Para más detalles, ver los apartados IV.6.1- Extracción de ARN e IV.6.2- Transcripción reversa. Se realizaron experimentos de PCR en una mezcla de reacción de 25 µL conteniendo: 50 ng de ADNc, 0,5 µM de cada cebador (Tabla IV.2), 0,2 mM de dNTPs, 1X de solución reguladora GoTaq (Promega) y 1,25 U de polimerasa Go Taq (Promega). Los experimentos se realizaron en un termociclador MyCycler (BIORAD, Hércules, CA, EE.UU), de la siguiente manera: 2 min a 95°C, 35 ciclos de 95°C durante 1 min, 57°C 1 min y 72°C 1 min, y un paso final de elongación de 5 min a 72°C. Los productos de amplificación fueron visualizados por medio de electroforesis en geles de 2 % m/v de agarosa, en cubas horizontales a 60 mA, con solución reguladora TAE y posteriormente teñidos con bromuro de etidio 10 mg/l.

IV.10.3- PCR en tiempo real

Para los genes que amplificaron cualitativamente la variante alternativa, se hicieron experimentos de PCR en tiempo real procesando dos réplicas biológicas y tres réplicas técnicas. Las PCR cuantitativas (PCR en tiempo real) se realizaron en muestras obtenidas de manera idéntica a la descrita para la PCR cualitativa, en un equipo Rotor-Gene Q (QIAGEN, Hilden, Alemania), usando 1x SYBR Green PCR Master Mix Mezcla Real (BIODYNAMICS, Buenos Aires, Argentina), en un volumen final de 20 µL conteniendo 0,5 µM de cebadores específicos (Tabla IV.2) y 20 ng de ADNc. Se incluyó el análisis de un gen de expresión constitutiva (β 2-tubulina), que ya fue seleccionado como una referencia adecuada para comparaciones en el sistema apomítico-sexual de *Paspalum* (Felitti et al., 2011; Podio et al., 2014b) y controles sin ADN molde (control negativo). Todas las amplificaciones fueron realizadas con el siguiente programa: 2 min a 94°C, 45 ciclos de 15 min a 94°C, 30 s a 57°C, 17 s a 72°C, y una elongación final de 5 min a 72°C. Los datos crudos de despegue (take off) fueron exportados a un archivo de datos y analizados con el programa REST-RG 2009 (QIAGEN, Hilden, Alemania).

IV.11- Análisis bioinformático para localizar otros actores del *splicing* y determinar sus interrelaciones

Se realizó una búsqueda en la base de expresión diferencial Roche 454 de los genes representados por términos GO relacionados con el *splicing* dentro de la categoría proceso biológico. Las secuencias recuperadas se utilizaron como interrogantes de las bibliotecas Illumina TrueSeq. Se confirmó la expresión diferencial para cada uno de los genes. Se localizaron los ortólogos de *Arabidopsis thaliana* para estos genes y se utilizó el programa STRING (*functional protein association networks*) para establecer interacciones.

Tabla IV.2: Cebadores utilizados para la identificación de variantes de *splicing*

Cebador	Secuencia	Tm (°C)	Ta (°C)	Producto de tamaño esperado (pb)
Tetraket1-Upper	5'-CTCGCATGATAGGCTGAGTG-3'	59,57	57	244
Tetraket1-Lower	5'-ATTGGCAGAGAAAGCAGCAT-3'	59,98		
Stricto-Upper	5'-CAGAAGATTATAGAGCAGCCAATG-3'	59,46	57	291
Stricto-Lower	5'-GCTCTCCTCGTGAGCATCTT-3'	59,71		
Chloro-Upper	5'-CTTTTCGCTGCATCCTTCAT-3'	60,35	57	375
Chloro-Lower	5'-CGTCGTCGTTGTACAGTTCC-3'	59,21		
CP26-Upper	5'-GAGGTGAGCACCATACATGC-3'	59,12	57	250
CP26-Lower	5'-CAAGAAGCCAGAGGATTTTCG-3'	59,95		
LTP-Upper	5'-CATGGCACAGAACAGGCATA-3'	60,69	57	297
LTP-Lower	5'-CTCGGGGACGTGAACAAG-3'	60,24		
DHN1-Upper	5'-ACCATGCGTCACAAAGACAT-3'	59,01	57	288
DHN1-Lower	5'-GTCGACCAGTACGGCAACC-3'	61,54		

RESULTADOS

V-RESULTADOS

V.1- OBTENCIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS DE *P. NOTATUM* SEXUAL EN LAS QUE SE SILENCIÓ LA ACTIVIDAD DEL GEN *PN_TGS1-LIKE* Y ANÁLISIS DE LAS CONSECUENCIAS SOBRE EL DESARROLLO REPRODUCTIVO

Generamos plantas transformantes de *P. notatum* sexual con una representación disminuida del gen *PN_TGS1-like*, por transformación con un fragmento antisentido y luego analizamos su desarrollo reproductivo, para compararlo con el de plantas silvestres. Para ello, realizamos los experimentos que se describen a continuación:

V.1.1- Experimentos de transformación

V.1.1.1- Construcción del plásmido pAct1-F1as

Generamos construcciones que contenían un fragmento del gen *PN_TGS1-like* (fragmento F1, flanqueado entre las posiciones 7-739 dentro de la secuencia *PN_TGS1*, acceso GeneBank KM114905), clonado en antisentido bajo un promotor de expresión constitutiva (pAct1 de arroz). F1 comprende los últimos 63 nt de la región 5'UTR y los primeros 670 nt del CDS de *PN_TGS1-like*, excluyendo el dominio conservado de ARN metiltransferasa. Se digirieron los plásmidos pGEM-TEasy-F1 (que contenía un fragmento F1 de 733 pb de *PN_TGS1-like*) y pAct1-gfbsd2 (vector de expresión en plantas que contenía GFP clonado bajo el promotor Act1) con las enzimas de restricción *SpeI* y *NotI* (Figura V1.1A). Por electroforesis se visualizaron y extrajeron las bandas F1 (733 pb) y pAct1-gfbsd2 digerido (5510 pb). A continuación, el fragmento F1 y el plásmido pAct1-gfbsd2 digerido se ligaron y se transformaron células competentes DH5 α . Se confirmó, a partir de PCR de colonias, la presencia del inserto F1 en 4 clones (clones 3, 5, 9, 16, Figura V1.1B, marcados con asterisco). A estos 4 clones se les extrajo ADN plasmídico, y por secuenciación se confirmó que el fragmento F1 estaba clonado en antisentido en el vector pAct1-gfbsd2, bajo el promotor Act1 de arroz (construcción pAct1-F1as).

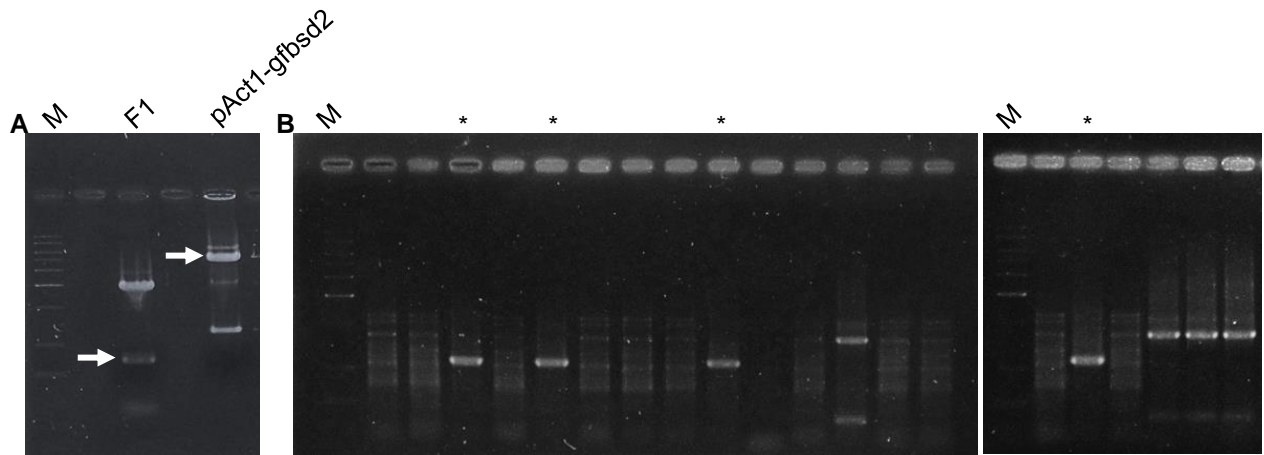


Figura V1.1: Construcción del plásmido pAct1-F1as. A: Digestión de los plásmidos pGEM-TEasy-F1 y pAct1-gfbsd2 con las enzimas de restricción *SpeI* y *NotI*. Las bandas extraídas del gel (marcadas con líneas blancas) fueron F1 (733 pb) y pAct1 (5510 pb). B: Detección de clones positivos (marcados con asterisco en la parte superior) a partir de amplificaciones por PCR de colonias de las bacterias transformadas con la construcción pAct1-F1as. M: marcador de peso molecular Milmarker (0,5 - 10,5 Kb) (BIODYNAMICS, Buenos Aires, Argentina).

V.1.1.2- Obtención de callos a partir de semillas maduras

El protocolo para la inducción de callos a partir de semillas maduras, se realizó de acuerdo con Mancini et al. (2014). Diferentes variedades de explantos (embriones inmaduros, meristemas, semillas maduras) fueron examinados para obtener plantas transformadas de *P. notatum*, y a pesar de que todos los tejidos demostraron ser adecuados para generar callos y plantas regeneradas, se seleccionaron las semillas maduras como explantos de este trabajo debido a sus porcentajes de regeneración elevados y a la simplicidad de la técnica utilizada (Mancini et al., 2014). Para los experimentos de transformación estable, se utilizaron callos embriogénicos (aspecto nodular, compacto y de color blanco-amarillento). Los callos no embriogénicos (translúcidos) fueron descartados en los sucesivos repiques. En la Figura V1.2, se muestra la secuencia de inducción de callos originados a partir de semillas maduras sexuales de *P. notatum*.

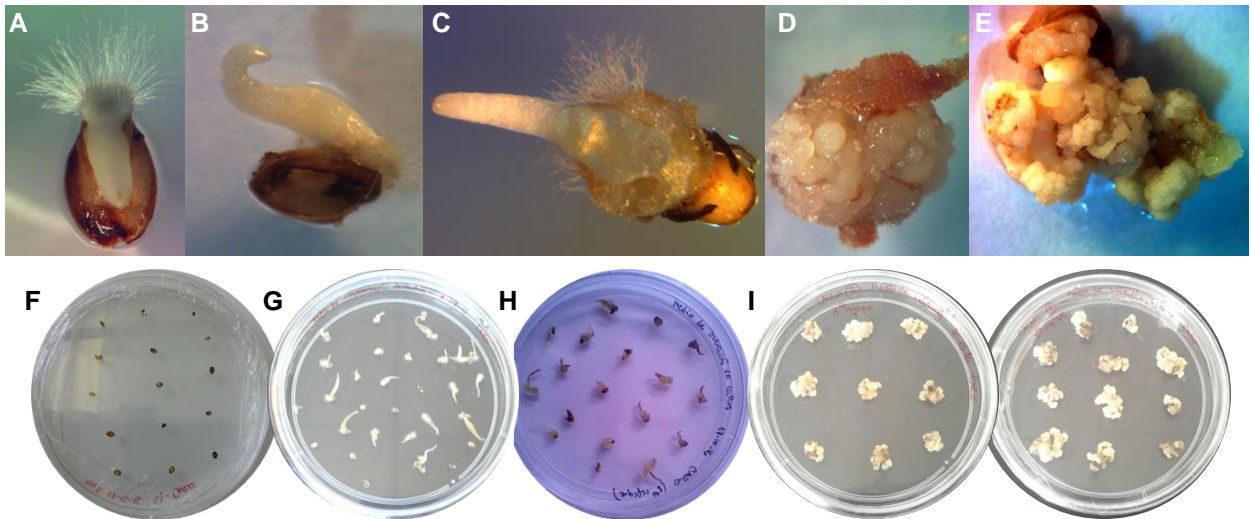


Figura V1.2: Obtención de callos a partir de semillas sexuales maduras de *P. notatum*. (A-E): secuencia de inducción de callos observados bajo lupa binocular; Semillas maduras en medio MM5 a los 3 (A), 8 (B), 10 (C), 21 (D) y 30 (E) días, respectivamente. Nótese que en las figuras C, D y E se observa el crecimiento del callo. F: Semillas escarificadas en MM5; G: brotes emergiendo en medio MM5; H: callos subcultivados en MM5; I: callos embriogénicos aptos para ser bombardeados.

V.1.1.3- Transformación estable

La transformación estable fue realizada sobre callos, utilizando el protocolo descrito por Mancini et al. (2014). Se llevaron a cabo dos experimentos de co-transformación, uno sin selección (usando los plásmidos pAct1-F1as y pAct1-gfbsd2), y otro con selección (empleando los plásmidos pAct1-F1as y pUbi-BAR-35S-GFP (Huber et al., 2002) (ver Materiales y Métodos). Nótese que el plásmido pAct1-F1as tiene el fragmento F1 del gen *PN_TGS1-like* clonado en antisentido bajo el promotor Act1 de arroz, mientras que el pUbi-BAR-35S-GFP (Huber et al., 2002) incluye el gen selector *BAR* (que otorga resistencia a glufosinato de amonio) y el gen reportero *GFP*, clonados bajo el promotor de ubiquitina de maíz y del virus del mosaico de coliflor, respectivamente. Dado que la tasa de co-transformación en *P. notatum* usando esta metodología biolística es de alrededor de 40% (Mancini et al., 2014), decidimos utilizar este procedimiento para lograr la selección de las transformantes. Se realizaron dos experimentos de co-transformación independientes, bombardeando con la construcción pAct1-F1as 100 callos por experimento. Luego de efectuar los disparos, se llevó a cabo un tratamiento postbombardeo con 1,0 mg/l de glufosinato de amonio, para seleccionar a aquellas plantas que hubiesen incorporado el plásmido conteniendo al gen *BAR*, según se indica en Materiales y Métodos. Se

obtuvieron un total de 31 plantas regenerantes (26 plantas putativas transgénicas y 5 controles). En la Figura V1.3 se resumen las diferentes etapas del proceso de transformación estable.

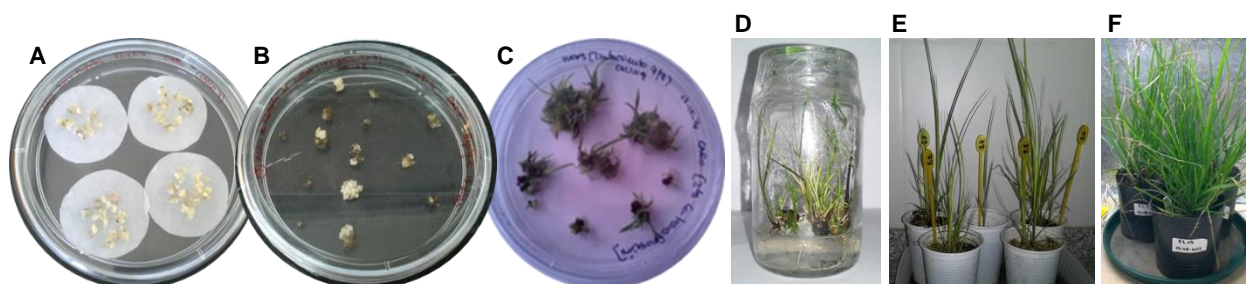


Figura V1.3: Experimentos de transformación estable. A: callos a bombardear en medio osmótico (IM + 0,4M manitol), B: callos a 15 días postbombardeo en medio selectivo con herbicida (glufosinato de amonio), C: callos en medio de regeneración de vástagos (MRV1). D: vástagos y raíces regenerando en medio MEEV3. E y F: Plantas regeneradas en tierra.

V.1.2- Verificación de la presencia del transgen

V.1.2.1- Detección del transgen por PCR

Se extrajo ADN genómico de las presuntas plantas transgénicas y de 2 plantas controles y se analizó la presencia del transgen mediante PCR utilizando los cebadores que se listan en la Tabla IV.1 (ver Materiales y Métodos), que permiten amplificar la construcción introducida durante la transformación. En la Figura V1.4 se muestran las imágenes de los geles de agarosa correspondientes a las amplificaciones por PCR (PCR anidada y PCR-NOS). Siete plantas (E2.1, E2.3, E2.7, E2.9, E2.10, E2.13, E2.14) amplificaron las bandas esperadas en la nested-PCR: 1270 pb en la primera amplificación realizada con los primers Act-Nos2 Upper/Lower (Figura V1.4A) y 530 pb en la segunda amplificación realizada con los primers Act-Nos2 Upper/Nested Lower (Figura V1.4B). Sin embargo, sólo seis plantas (Figura V1.4C) mostraron también la amplificación con los primers específicos NOS (E2.1, E2.3, E2.9, E2.10, E2.13, E2.14), y fueron por lo tanto seleccionadas como verdaderos positivos. Las plantas restantes (E1.1, E1.2, E1.4, E1.6, E1.9 y E2.7) se reclasificaron como controles de transformación, ya que habían pasado por todo el procedimiento de transformación, pero no incorporaron el vector de transformación.

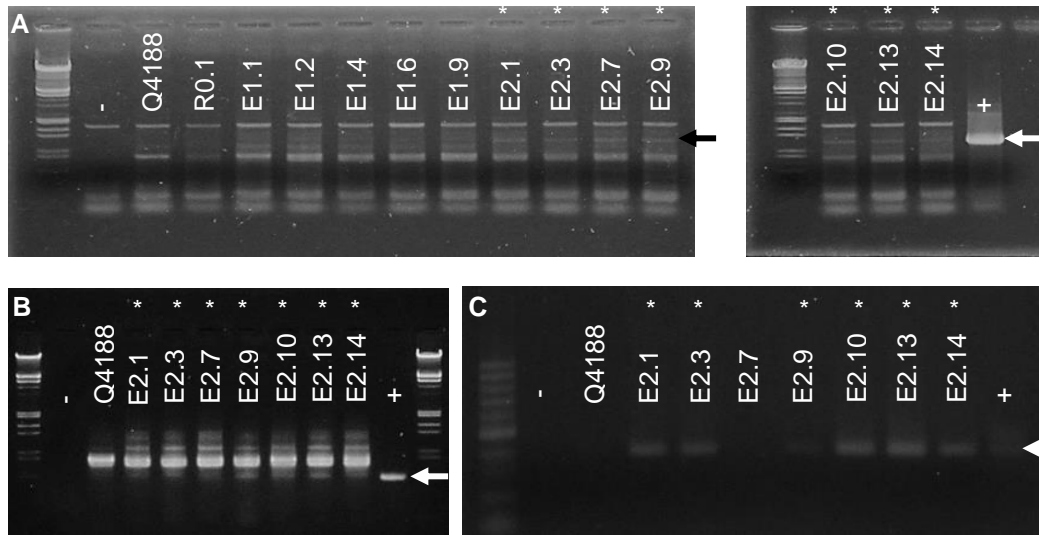


Figura V1.4: Detección de transgenes por PCR. Las flechas indican los productos de amplificación esperados. A-B: Nested PCR, donde A, tanto el panel izquierdo como derecho, corresponde a la primera amplificación (primers Act-Nos2) y B a la segunda amplificación (primers Act-Nos2/Nested). C: PCR-NOS. -: control negativo, Q4188: planta silvestre sexual, +: control positivo, R0.1: control de regeneración, E: eventos de transformación. Los asteriscos indican las líneas transgénicas en antisentido positivas (E.2.1, E.2.3, E.2.7, E.2.9, E.2.10, E.2.13, E.2.14).

V.1.3- Verificación de la expresión disminuida de *PN_TGS1-like*

V.1.3.1- PCR en tiempo real

Se realizaron experimentos de PCR en tiempo real para cuantificar la expresión relativa del gen *PN_TGS1-like* en hojas de cinco plantas transgénicas (E2.1, E2.3, E2.9, E2.13, E2.14) del total de seis que habíamos identificado (E2.10 no sobrevivió al período de aclimatación de la cámara de crecimiento), los controles de transformación (E1.1 y E1.4) y Q4188 como control sexual de tipo silvestre. Tres de las plantas transgénicas (E2.9, E2.13 y E2.14) mostraron una expresión de *PN_TGS1-like* significativamente más baja en las hojas en comparación con los controles de transformación y de tipo silvestre. (Figura V1.5), mientras que no se detectó una reducción significativa en las plantas E2.1 y E2.3. Además confirmamos una expresión significativamente más baja en flores de las líneas E2.9 y E2.13 (Figura V1.5, la planta E2.14 no floreció aún después de tres años de crecimiento vegetativo, por lo que no se ha controlado todavía la expresión en flor). Por lo tanto, para los eventos de transformación E2.9, E2.13 y E2.14 se confirmó la introducción estable del transgen en la planta y el silenciamiento del gen blanco *PN_TGS1-like*. Las plantas fueron transferidas a cámara en condiciones adecuadas para inducir la floración.

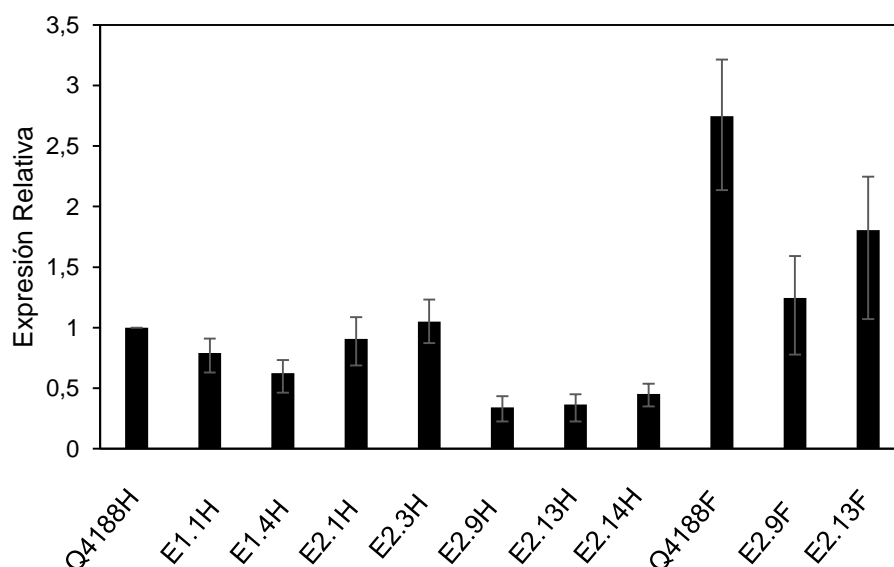


Figura V1.5: Cuantificación de la expresión relativa de *PN_TGS1-like* en hojas (H) y flores (F) de plantas putativas transgénicas. Los productos amplificados fueron generados usando los primers qPCR Upper/Lower. Q4188: planta silvestre sexual. E1.1 y E1.4: controles de transformación. E2.1, E2.3, E2.9, E2.13, E2.14: plantas transgénicas positivas. Todos los cálculos estadísticos de la qPCR se encuentran publicados en *Supplementary Data Sheet 1* de Colono et al (2019).

V.1.4- Análisis fenotípicos

V.1.4.1- Caracterización fenotípica de las plantas controles y transformantes

Las líneas antisentido (generación T_0) mostraron características morfológicas similares a las de los controles con respecto al tamaño de la planta, el vigor y el ancho de la hoja (ver Figura V1.6, ancho de la base de las hojas de plantas controles y transgénicas). Sin embargo, mostraron tricomas largos en la superficie adaxial de las hojas, un rasgo que estaba ausente en las plantas control (Figura V1.7). Además, las plantas transgénicas evidenciaron una floración tardía: solo las plantas antisentido E2.9 y E2.13 florecieron en la cámara de OGM (ver Materiales y Métodos) después de períodos de crecimiento de uno y dos años, respectivamente. La línea antisentido E2.14 no ha florecido todavía, después de tres años de crecimiento vegetativo. Un análisis comparativo del número y la morfología de las inflorescencias realizado para las líneas antisentido y para las plantas controles se muestra en la Tabla V1.1. La planta E2.9 mostró un número mayor de inflorescencias con más de dos racimos (Tabla V1.1). Tanto E2.9 como E2.13 mostraron racimos más cortos con menos

espiguillas que las plantas control (Tabla V1.1). En la Figura V1.8 se muestran algunas imágenes de las inflorescencias de las plantas transgénicas y controles.

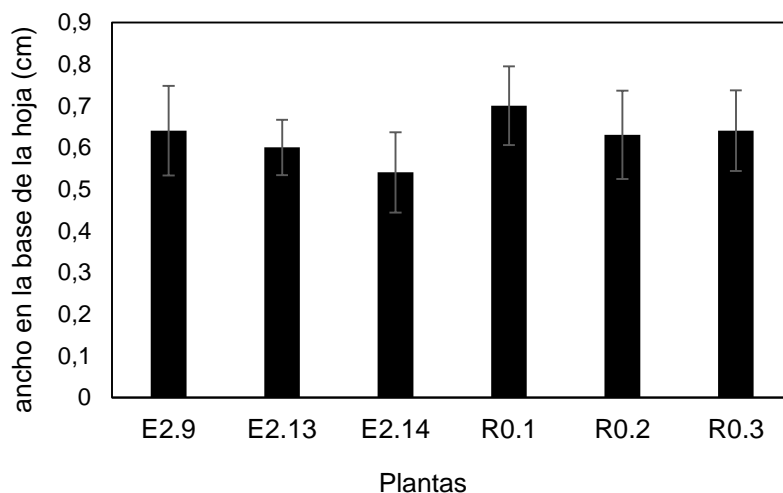


Figura V1.6: Ancho en la base de las hojas. Plantas transgénicas (E2.9, E2.13 y E2.14) y plantas controles de regeneración (R0.1, R0.2 y R0.3).

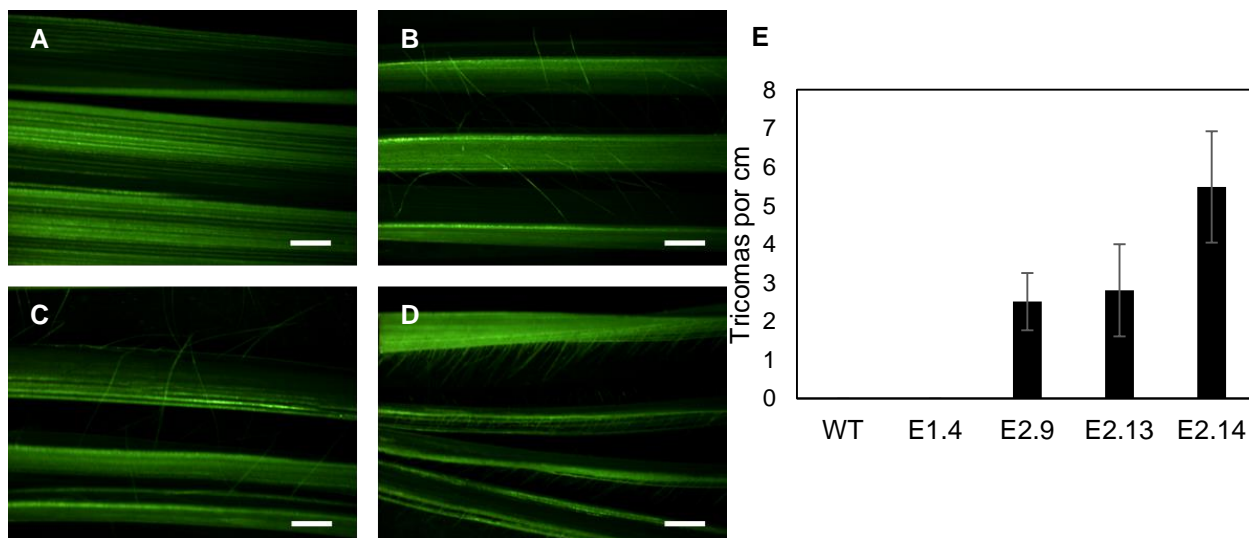


Figura V1.7: Tricomas formados en las plantas transgénicas y controles. Formación de tricomas en las hojas: A: E1.4 (control de transformación), B: E2.9, C: E2.13 y D: E2.14. E: número de tricomas por cm de hoja en cada planta. WT: control sexual, planta silvestre. Barras: 0,25 cm.

Tabla V1.1: Número de inflorescencias y morfología

Planta	Número de inflorescencias analizadas	Racimos por inflorescencia (SD)	Número de espiguillas por fila (SD)	Longitud del racimo (cm) (SD)
WT (Q4188)	12	2 (0)	48,5 (12,0)	13,7 (1,6)
E1.4 (control)	8	2 (0)	42,1 (7,6)	12,23 (2,9)
E2.9 (antisentido)	45	2,7 (0,5)	32,6 (7,1)	9,92 (2,0)
E2.13 (antisentido)	6	2 (0)	33,5 (1,9)	10,41 (0,5)

SD: Desviación estándar, del inglés “*standard deviation*”

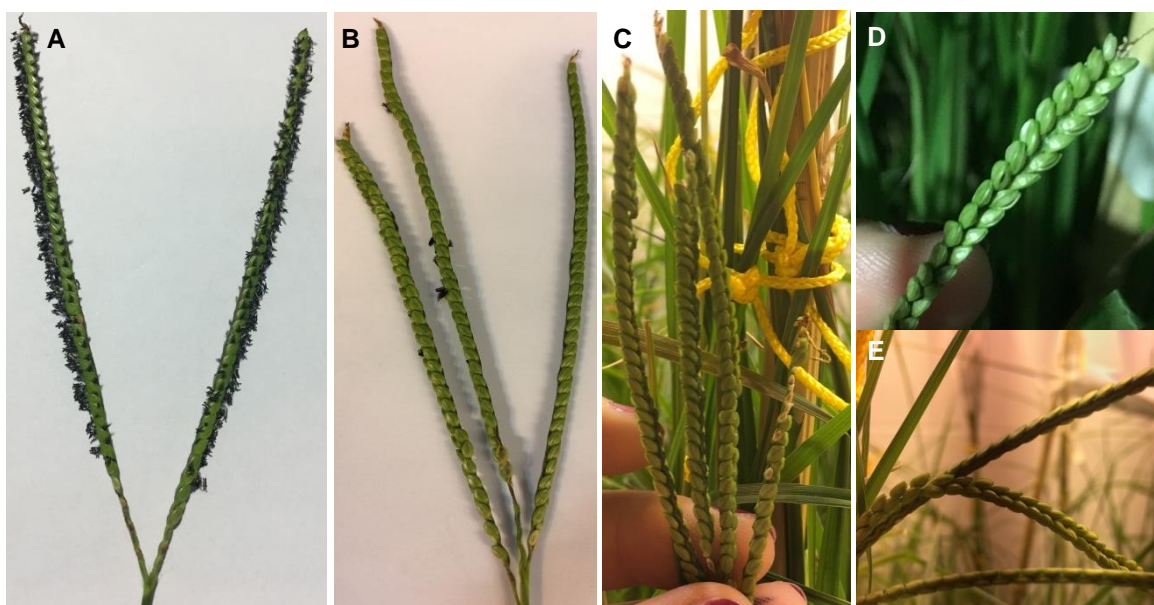


Figura V1.8: Inflorescencias presentes en las plantas control y antisentido. A: control de transformación E1.4. (B-E): línea antisentido E2.9.

V.1.4.2- Viabilidad del polen

Mediante la tinción de Alexander, se realizó una evaluación cuantitativa de la producción de polen viable en las plantas transgénicas, en un control de transformación y en la planta sexual silvestre Q4188. Las líneas antisentido E2.9 y E2.13 mostraron un porcentaje de polen no viable de 40,76% (IC 95%: 39,51<P> 42,02) y 40,60% (IC 95%: 39,34<P> 41,87), respectivamente, mientras que el control de transformación y la planta Q4188 presentaron un 34% (IC 95%: 32,8<P> 35,2) y 38,5% (IC 95%: 37,5<P> 39,6), respectivamente. Al analizar la

viabilidad del polen, encontramos proporciones de polen viable y no viable similares en plantas con la construcción en antisentido de *PN_TGS1-like* E2.9 y E2.13, el control de transformación E1.4 y la planta de tipo salvaje Q4188 (ver Tabla V1.2 y Figura V1.9). El tamaño del polen fue uniforme y similar tanto para las líneas en antisentido como para el control, lo que sugiere una ausencia de polen no reducido.

Tabla V1.2: Análisis de viabilidad del polen

Planta	Número de PV	Número de PNV	Total	%PNV (IC 95%)
WT (Q4188)	5191	3250	8441	38,5 (37,5<P> 39,6)
E1.4 (control)	4047	2080	6127	34,0 (32,8<P> 35,2)
E2.9 (antisentido)	3519	2421	5940	40,76 (39,51<P> 42,02)
E2.13 (antisentido)	3464	2368	5832	40,60 (39,34<P> 41,87)

PV: polen viable, PNV: polen no viable, % NVP: porcentaje de polen no viable

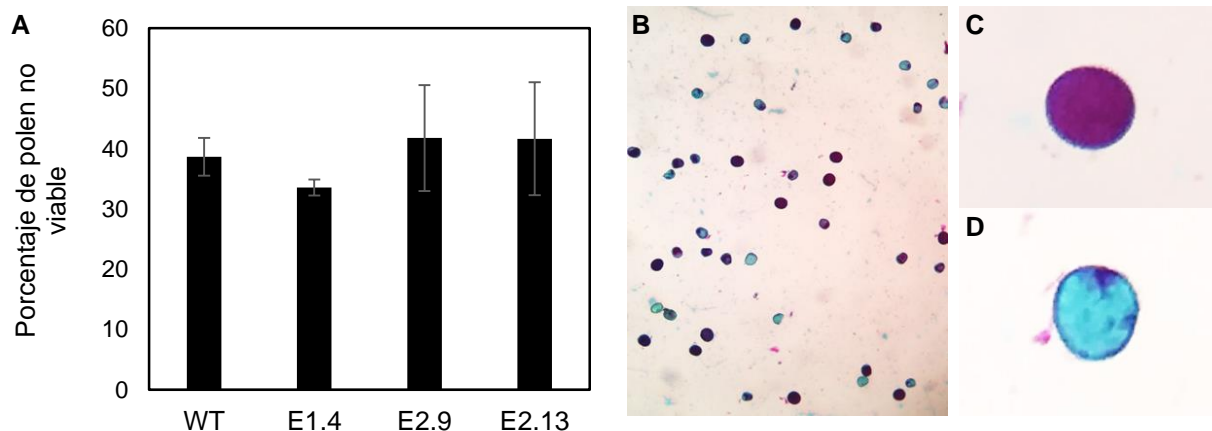


Figura V1.9: Análisis de la viabilidad del polen. A: Porcentaje de polen no viable en cada planta. B: polen teñido con la tinción de Alexander (planta E2.9). C: grano de polen viable. D: grano de polen no viable. WT: genotipo Q4188.

V.1.4.3- Análisis de fenotipos reproductivos en plantas transformantes *tgs1-like*

El análisis citoembriológico en antesis reveló diferencias notables entre las líneas en antisentido y las plantas controles (Tabla V1.3). Todos los óvulos viables de las plantas control contenían un único saco embrionario típico de la vía sexual (es decir, sacos embrionarios meióticos o SEM), con una ovocélula, una o dos células sinérgidas, una célula central con dos núcleos polares y una masa de células antipodales (Figura V1.10 A-B). En cambio, en las plantas transgénicas E2.9 y E2.13 observamos una proporción significativa de óvulos que presentaron sacos embrionarios de tipo apospórico (similares a SEA) (33/147 y 23/95, respectivamente) (Figura V1.10 E-F, Tabla V1.3). Estos sacos embrionarios similares a SEA mostraban una forma redondeada, núcleos polares prominentes y ausencia de antípodas. En la Figura V1.10 C-D se muestran planos adyacentes de un óvulo de la planta apomíctica natural Q4117 (control silvestre), en donde se observa la presencia de varios núcleos polares, que corresponden a diferentes sacos embrionarios de tipo SEA. En las líneas antisentido E2.9 y E2.13, el 34,7% y el 42,4% de los óvulos que portan sacos similares a SEAs también mostraron un SEM, respectivamente (Tabla V1.3), que generalmente se ubicó en una posición central, cerca de la micrópila. No se detectaron proembriones en los óvulos de las plantas transgénicas, ni en pre-antesis, ni tampoco en antesis. Por lo general, las especies apospóricas de *Paspalum* muestran proembriones en preantesis, lo que indica que tienen óvulos funcionales no reducidos capaces de sufrir partenogénesis (Figura V1.10 C-D). Finalmente, observamos la aparición esporádica (2,3%) de óvulos gemelos, presentando uno o ambos sacos embrionarios de tipo SEM o SEA (Figura V1.11 y Figura V1.12).

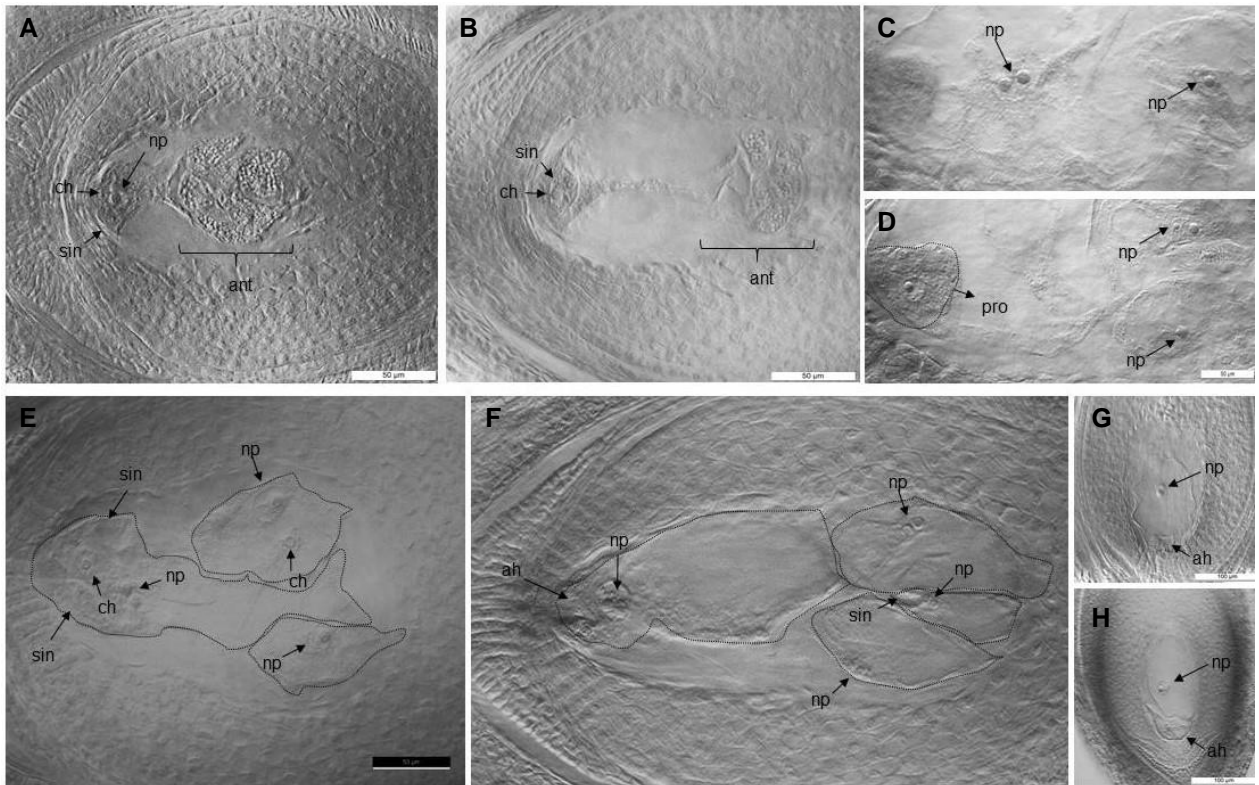


Figura V1.10: Análisis citoembriológico del modo reproductivo de las plantas antisentido y controles en anthesis. A, B: óvulos clarificados con un solo saco meiótico en el extremo chalazal. A: WT (control sexual), B: E1.4 (control de transformación). C, D: planos adyacentes de un óvulo de la planta apospórica obligada Q417, que presenta un SEA no reducido; Obsérvese la existencia de un proembrión (pro) que surge por partenogénesis. E, F: varios gametofitos sin antípodas (SEA-like) coexistiendo en el mismo óvulo. E: línea antisentido E2.9, F: línea antisentido E2.13. G, H: óvulos clarificados con un solo SEA-like, sin antípodas. G: línea antisentido E2.9. H: línea antisentido E2.13. np: núcleos polares, sin: sinérgidas, ant: antípodas, ch: célula huevo, ah: aparato del huevo, pro: proembrión.

Tabla V1.3: Desarrollo de los sacos embrionarios evaluados mediante análisis citoembriológicos en plantas transgénicas y controles.

Planta	Número de ovarios	% óvulos abortados (n)	% óvulos con SEM (n)	% óvulos con sacos SEM + SEA-like (n)	% óvulos con SEA-like solamente (n)	Proporción de sacos SEM/SEM + SEA-like (IC 95%) ^a	Proporción de sacos SEA-like/SEM + SEA-like (IC 95%) ^b
E2.9	147	23,13 (34)	54,42 (80)	9,52 (14)	12,93 (19)	0,64 (0,56-0,72)	0,22 (0,16- 0,30)
E2.13	95	15,79 (15)	60,00 (57)	8,42 (8)	15,79 (15)	0,68 (0,59-0,77)	0,24 (0,16-0,34)
E1.4	166	12,05 (20)	87,95 (146)	0 (0)	0 (0)	0,88 (0,82-0,92)	0,00 (0-0,03)
Q4188 ^c	472	23,94 (113)	76,06 (359)	0 (0)	0 (0)	0,76 (0,72-0,80)	0,00 (0-0,01)

^a Proporción de óvulos que presentaron solamente SEM + óvulos con SEM + SEA-like, seguido por el intervalo de confianza de 95% incluyendo la corrección de continuidad (Newcombe, 1998).

^b Proporción de óvulos que presentaron solamente SEA + óvulos con SEM + SEA-like, seguido por el intervalo de confianza de 95% incluyendo la corrección de continuidad (Newcombe, 1998).

^c Valores tomados de Quarin et al., 2003.

n: número absoluto

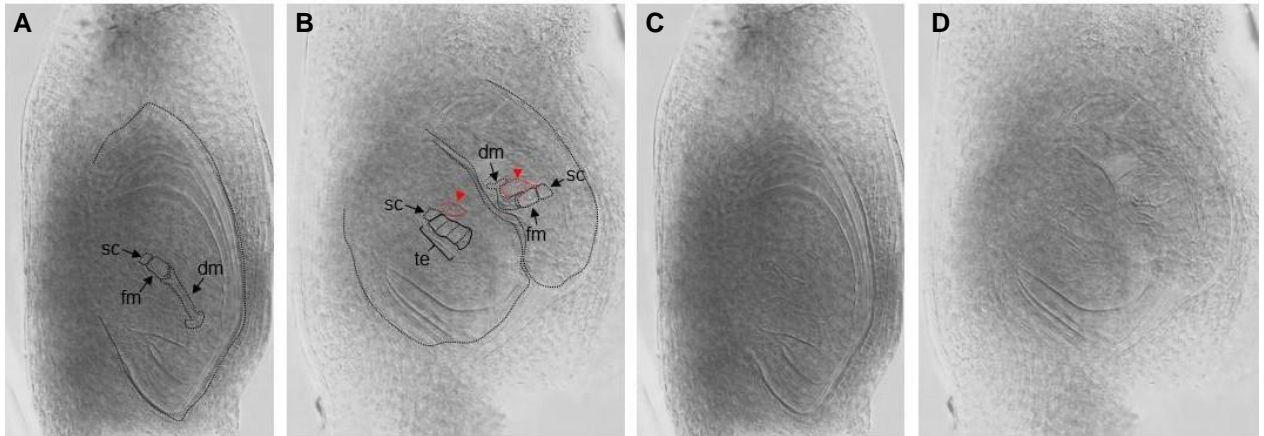


Figura V1.11. Las líneas antisentido forman óvulos gemelos. A: un óvulo simple con la célula stack, la megáspora funcional y las megásporas degeneradas. B: óvulos gemelos originados de la planta antisentido E2.9. El óvulo de la izquierda tiene la célula stack, una tétrada meiótica y dos núcleos adyacentes agrandados (flechas rojas/ líneas rojas punteadas). El óvulo de la derecha muestra la célula stack, la megáspora funcional, megásporas degeneradas y dos núcleos adyacentes agrandados (flechas rojas/ líneas rojas punteadas). C, D: las mismas imágenes que en A y B, respectivamente, pero los límites del óvulo no están marcados para una visualización más fácil de los límites de las células. sc: célula stack. mf: megaspora funcional. md: megaesporas degeneradas. te: tétrada meiótica.

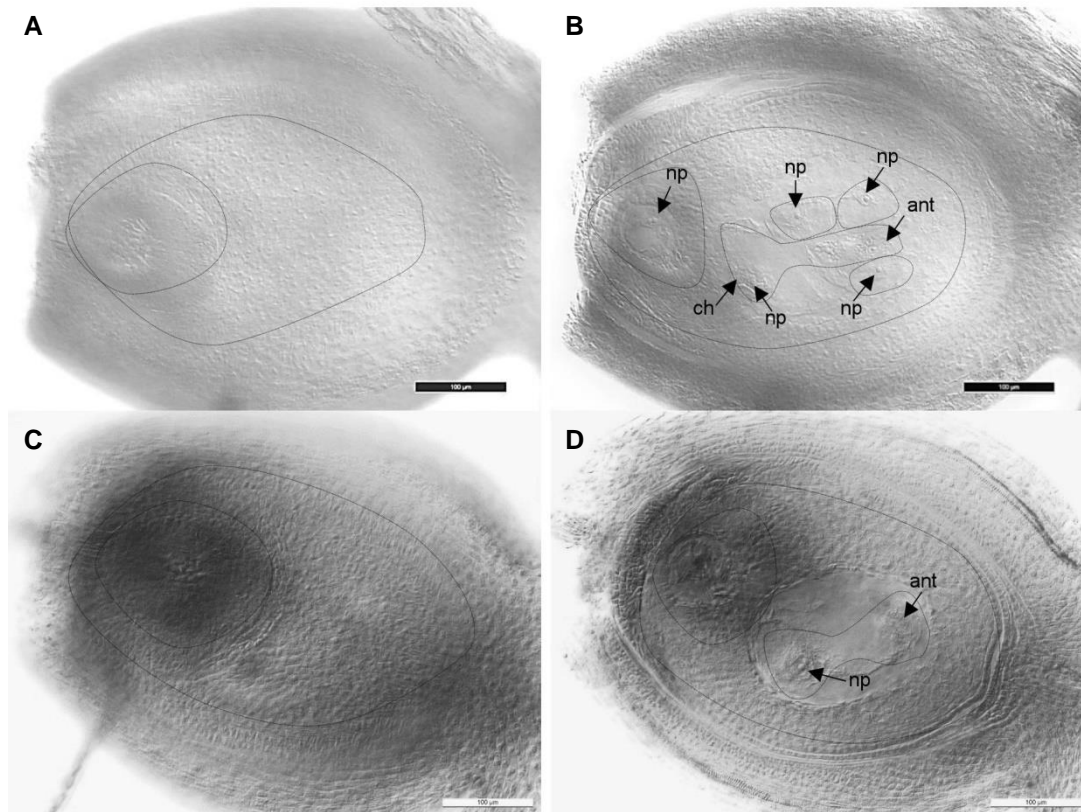


Figura V1.12: Óvulos gemelos observados en anthesis en la línea antisentido E2.9. A, B: Planos de enfoque adyacentes que revelan dos óvulos gemelos (óvulo 2). B: plano adyacente que revela tres SEA-like (sin antípodos) y un SEM dentro del óvulo más grande y un SEA-like en el ovario pequeño. (C, D) Planos de enfoque adyacentes que revelan dos óvulos gemelos (óvulo 109). D: plano adyacente que revela un SEM dentro de uno de los óvulos. np: núcleos polares, ch: célula huevo, ant: antípodos. Barras: 100 µm.

Para aclarar el origen de los sacos embrionarios supernumerarios detectados en la antesis, se examinaron 80 óvulos inmaduros originados de las plantas E2.9 (línea antisentido), Q4188 (control sexual) y E1.4 (control de transformación) en etapas tempranas del desarrollo (etapas I y II, según el calendario reproductivo de *P. notatum* de Laspina et al., 2008). En la línea antisentido E2.9, observamos la presencia de células madres de la magáspora (CMM) o díadas derivadas de CMM rodeadas por células similares a las iniciales de la aposporía (IA-like) con núcleos prominentes, que a veces muestran la morfología típica en forma de cuchillo alargada (Figura V1.13). E2.9 mostró 26/80 óvulos (32,5%, IC 95%: (0,227 <P> 0,44) con una o varias células similares a IAs alrededor de la CMM o de las díadas meióticas. Ninguna de estas supuestas iniciales de la aposporía fue detectada iniciando una meiosis (no se observaron eventos supernumerarios de meiosis). En contraste, los óvulos de Q4188 y E1.4 no presentaron células similares a IA (0%, IC 95%: 0 <P> 0,0571) en ninguno de los óvulos. En la línea antisentido también se detectaron otras alteraciones en el desarrollo reproductivo, como gametofitos de dos núcleos (fg2) que mostraban una morfología de tipo apospórico (Figura V1.14).

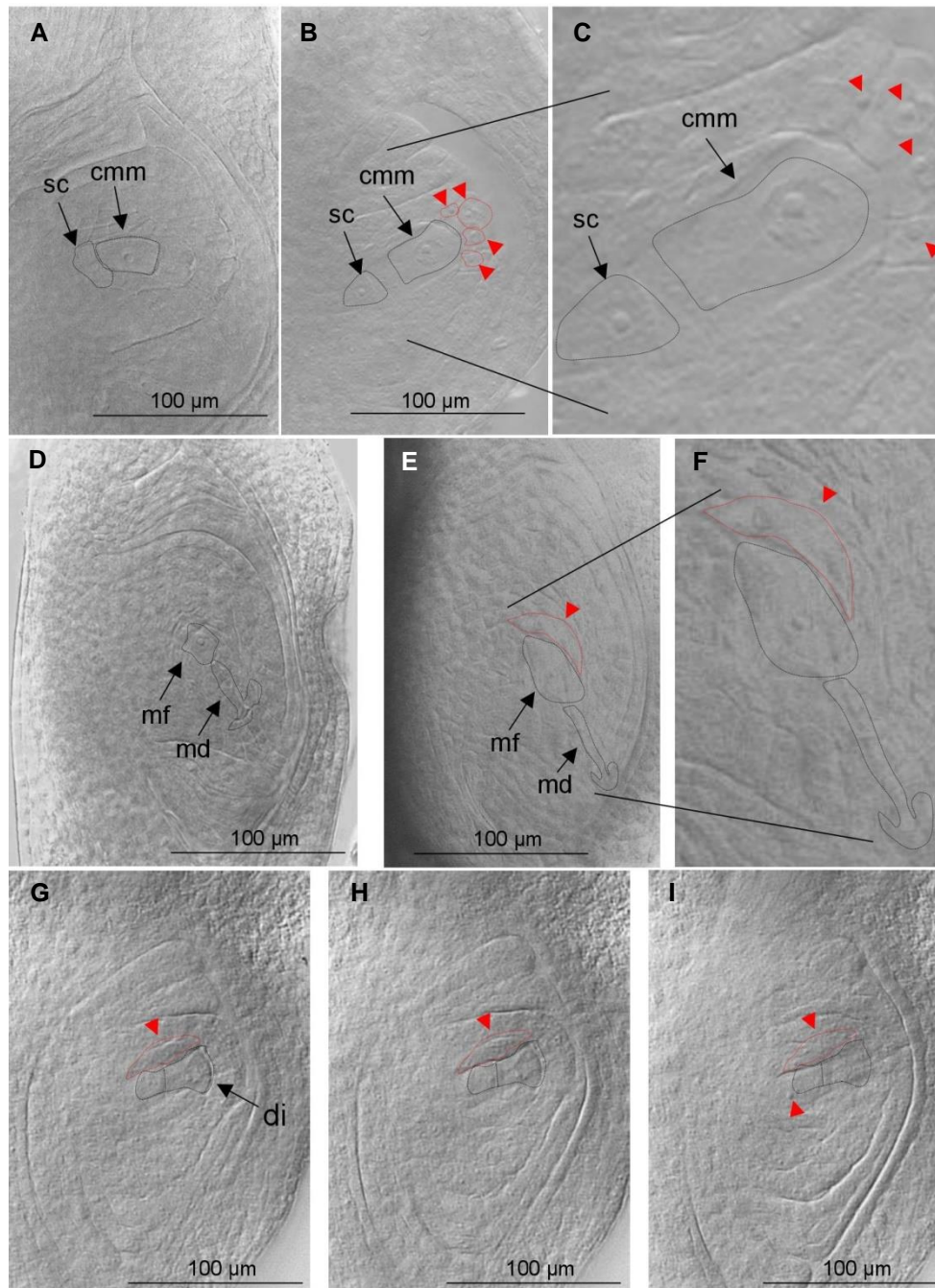


Figura V1.13: Etapas tempranas del desarrollo del óvulo en la línea antisentido E2.9. A: óvulo sexual de la planta control con una célula cmm y la célula basal stack típica. B: óvulo de planta antisentido E2.9 que muestra la cmm, la célula stack y varios núcleos agrandados en la parte superior (flechas rojas / líneas punteadas rojas). C: ampliación del panel B. D: óvulo sexual de la planta control con una megáspora funcional y megasporas degeneradas. E: óvulo de planta antisentido E2.9 con una megáspora funcional, megasporas degenerativas y una célula adyacente con núcleo agrandado (flechas rojas / líneas de puntos rojas). F: ampliación del panel E. G, H e I: planos adyacentes del mismo óvulo que contiene una diada meiótica rodeada por dos células con núcleos agrandados (flechas rojas/líneas punteadas en rojo). cmm: célula madre de la megáspora. sc: célula stack. mf: megáspora funcional. dm: megasporas degeneradas. di: diada meiótica.

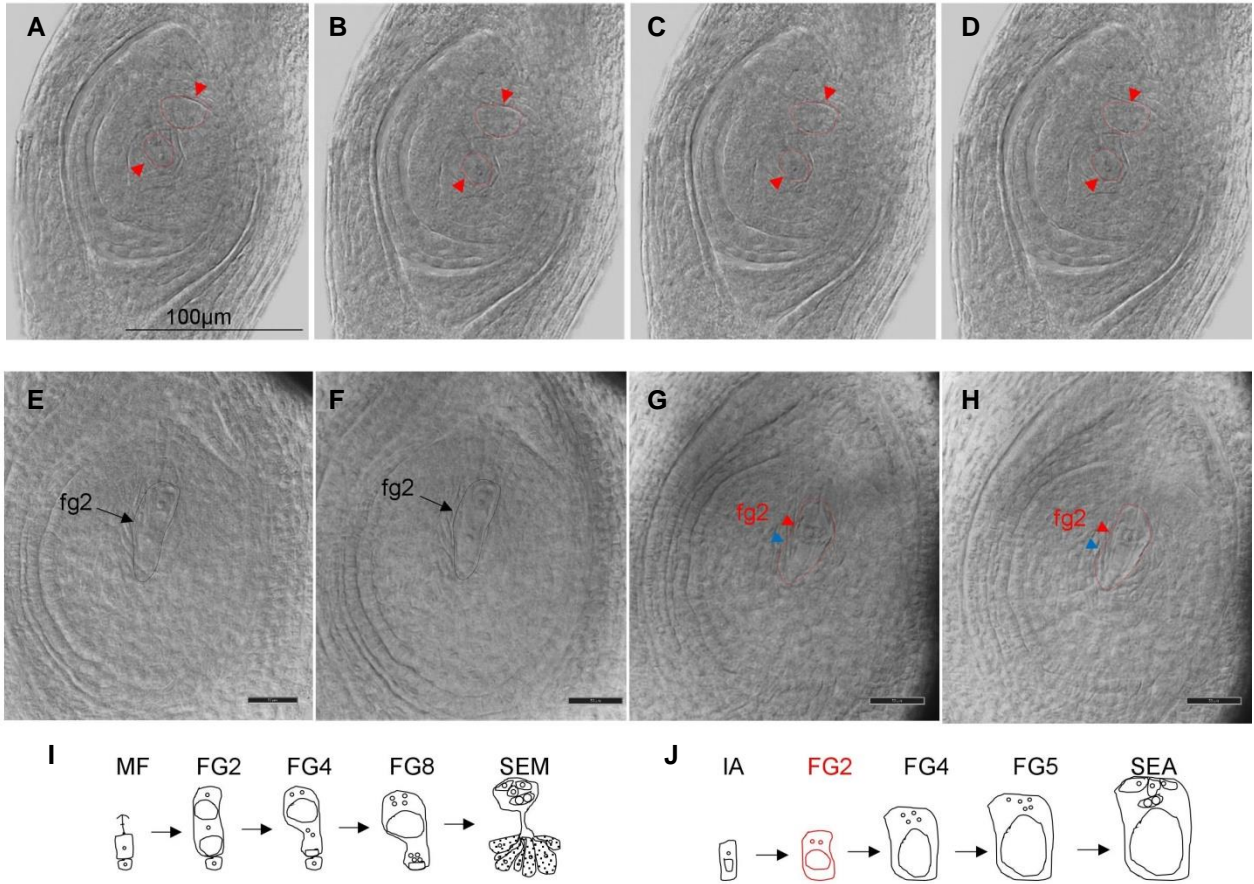


Figura V1.14: Alteraciones del desarrollo reproductivo que ocurren en la planta E2.9 en las primeras etapas de desarrollo. (A-D): planos adyacentes de un óvulo que muestran dos pares de núcleos agrandados (flechas rojas/línea punteada roja). No se detectaron megásporas degeneradas. E, F: planos adyacentes de un óvulo que contiene un gametofito de tipo meiótico en estadio fg2 (línea punteada negra). G, H: planos adyacentes de un óvulo que contiene un gametofito de tipo apospórico en estadio fg2 (línea punteada roja / flecha roja) con vacuola (flecha azul). I, J: representación esquemática de la gametogénesis femenina sexual (I) y apospórica (J). Los gametofitos detectados en (E, F) y (G, H) corresponden a la morfología fg2 sexual y apospórica, respectivamente. fg2: gametofito femenino de 2 núcleos. Barras: 50 μ m.

V.1.4.4- Citómetro de flujo

Para reconstruir la vía de desarrollo reproductivo de las plantas tanto antisentido como de los controles, utilizamos el método de detección de semillas por Citometría de Flujo (FCSS) (Matzk et al., 2000) para analizar semillas T_0 de la línea transgénica y del control. Las inflorescencias maduras de la línea antisentido E2.9, Q4188 (control de tipo salvaje) y E1.4 (control de transformación) fueron recolectadas, y las semillas vacías fueron descartadas utilizando un separador de viento. Tanto los controles como la línea antisentido mostraron una proporción similar de semillas llenas (0,09%-0,13%, Tabla V1.4). El análisis de las relaciones de contenido de ADN nuclear entre el embrión y el endospermo (100 semillas por genotipo) permitió evaluar si la semilla fue generada por sexualidad (relación embrión: endospermo 2C: 3C) o por apomixis (relación embrión: endospermo 2C: 5C). Como se esperaba, las líneas controles (Q4188 y E1.4) formaron semillas solo por sexualidad (Figura V1.15). Todas las semillas analizadas (100) de la línea antisentido E2.9 también mostraron un origen sexual (Figura V1.15).

Tabla V1.4: Proporción de cariopses llenos en líneas antisentido y controles

Planta	Semillas llenas	Semillas vacías	Proporción (IC 95%)
Q4188	26	223	0,10 (0,07-0,15)
R0.1	77	733	0,10 (0,07-0,11)
E1.4	51	335	0,13 (0,10-0,17)
E2.9	227	2251	0,09 (0,08-0,10)

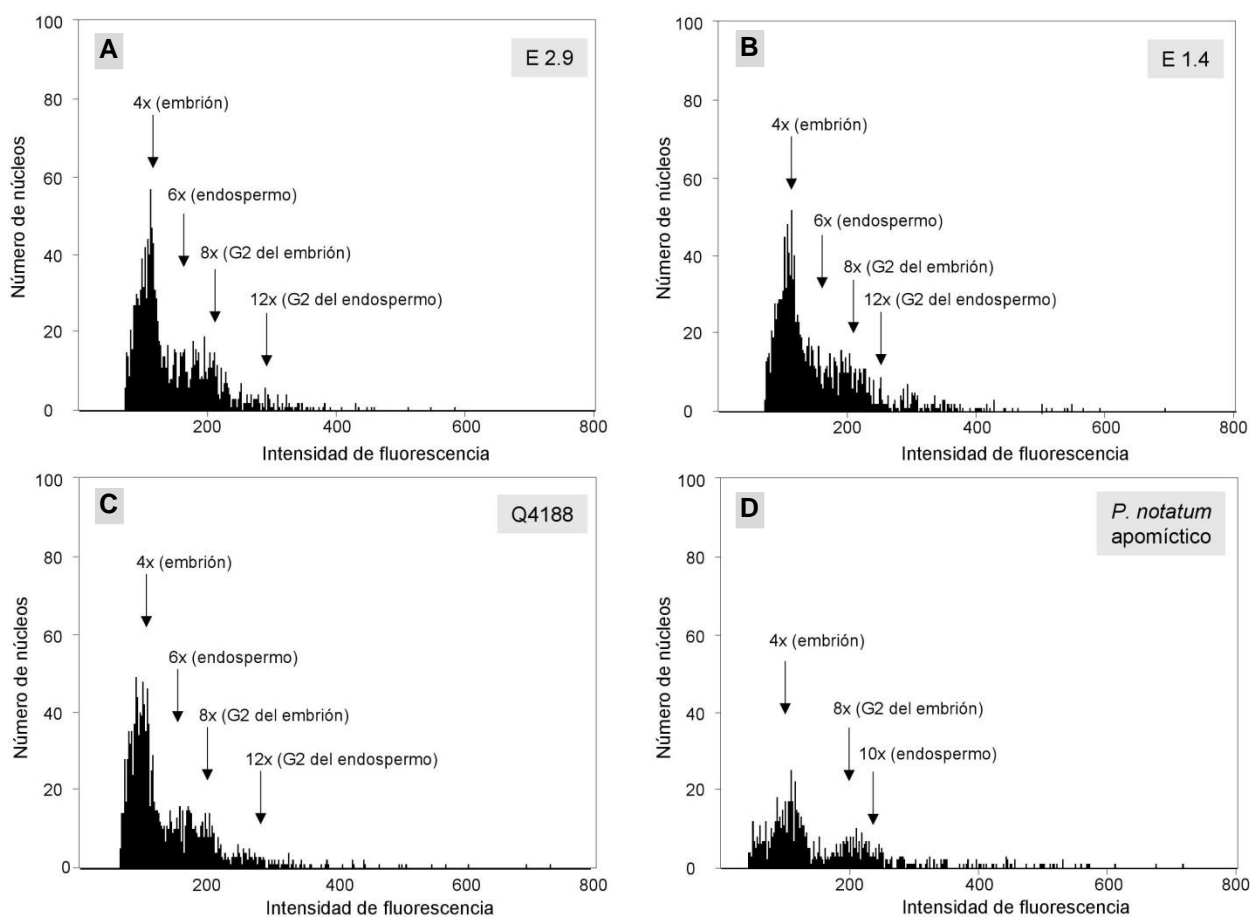


Figura V1.15. Prueba de la progenie mediante citometría de flujo. Las cariopses maduros se analizaron para determinar la proporción del contenido de ADN embrión: endospermo, que es diferente para las semillas originadas por sexualidad o por apomixis. (A): planta E2.9 (todas las semillas E2.9 mostraron el patrón sexual típico; número total de semillas analizadas: 100). (B): planta E1.4 (control de transformación sexual). (C): planta Q4188 (control de tipo salvaje sexual). (D): planta 4023 x 4117 (control de tipo salvaje apomítico). Se observa una distribución diferente en los picos de las semillas de origen apomítico con respecto a las sexuales: las semillas originadas a partir de apomixis carecen del pico típico de endospermo 6x, lo que conduce a un patrón discontinuo con un valle entre los picos 4x (embrión) y 8x (G2 del embrión).

V.1.4.5- Ensayo de germinación

Del total de 30 semillas (tres réplicas, ver Materiales y Métodos), un promedio de 24,66 ($\pm 0,57$) y 17,00 (± 1) de E1.4 y E2.9, respectivamente, germinaron durante la primera semana (Figura V1.16). Ninguna otra semilla germinó durante la segunda semana. La reducción de *PN_TGS1-like* causó una disminución moderada pero significativa de 25,55% en el porcentaje de germinación de semillas originadas por la sexualidad, ya que el porcentaje de germinación fue de 82,22% (72,43 <P> 89,19) para la planta E1.4 y 56,67% (45,82 <P> 66,94) para la planta

E2.9. Estos resultados sugieren que la actividad de *PN_TGS1-like* puede ser esencial para el desarrollo de embrión/endospermo y/o en las vías de germinación durante el desarrollo sexual.

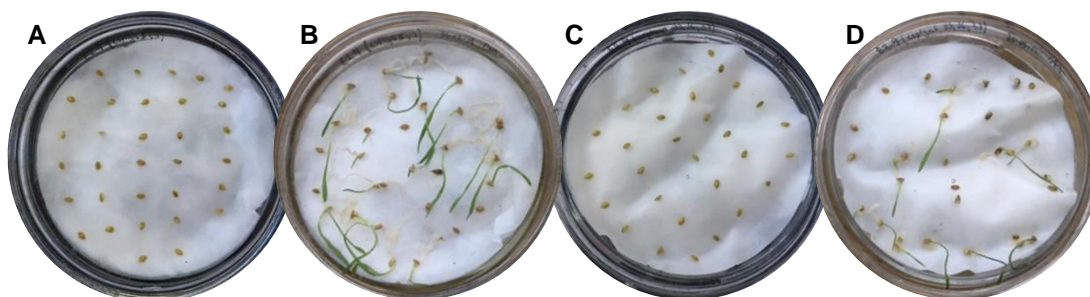


Figura V1.16. Germinación de semillas de plantas sexuales de *P. notatum* con expresión disminuida de *TGS1-like*. A, B: semillas del control de transformación (planta E1.4). C, D: semillas del antisentido *tgsl1-like* (planta E2.9). A y C: semillas escarificadas a tiempo cero. B y D: semillas germinadas en la primera semana de incubación.

Del ensayo de germinación se conservan 15 progenies de la planta E1.4 (control) y 8 progenies de la planta E2.9 (línea en antisentido), las cuales se mantienen en condiciones controladas de temperatura (28°C) y fotoperíodo (14 h de luz), y se utilizarán para estudiar la herencia del transgen.

V.1.5- Uso de un marcador molecular para la detección del ACR

Con el fin de investigar la ocurrencia de contaminación dentro del lote de semillas sexuales utilizado en los experimentos de transformación, se verificaron las líneas antisentido en busca de la presencia de un fragmento del gen *PPIASE* (*PEPTIDYL-PROLYL CIS-TRANS ISOMERASE*), el cual segrega estrictamente con la apomixis (Pupilli et al., 2004; Podio et al., 2012). Usando cebadores específicos dirigidos a una región genómica interna de la *PPIASE* de *P. notatum* (ver materiales y métodos, Tabla IV.1), analizamos el ADN de Q4188 (sexual), Q4117 (apomíctico), tres híbridos F1 apomícticos y tres sexuales originados del cruzamiento entre Q4188 x Q4117, el control de regeneración R0.1, dos controles de transformación (E1.1 y E1.4) y las tres líneas antisentido seleccionadas (E2.9, E2.13 y E2.14). El marcador de amplificación vinculado con la apomixis esperado de 570 pb se detectó sólo en Q4117 y en los tres híbridos F1 apomícticos (Figura V1.17) y estuvo ausente en la planta sexual Q4188, en las progenies F1 sexuales, en los controles de transformación y en las tres líneas antisentido

(Figura V1.17). Este resultado confirmó que las líneas transgénicas derivadas de semillas sexuales carecían de la región genómica responsable de la apomixis en la especie (región de control de la apomixis o ACR).

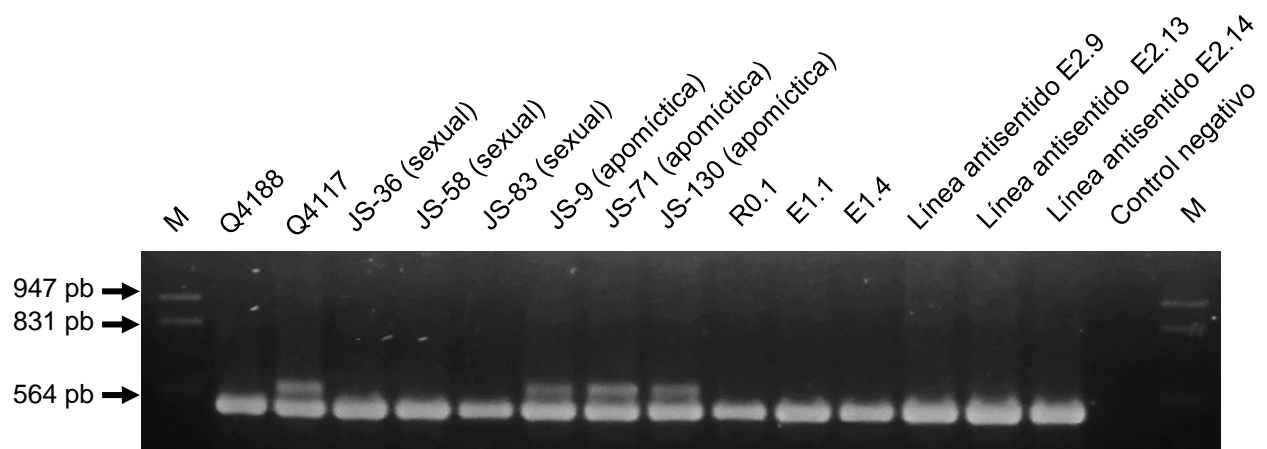


Figura V1.17: Amplificación de la región que controla la apomixis (ACR) sobre ADN genómico. Los genotipos usados fueron: Q4188 (sexual), Q4117 (apomictico), tres híbridos F1 sexuales (JS-36, JS-58, JS-83) y tres híbridos F1 apomicticos (JS-9, JS-71, JS-130), R0.1 (control de regeneración), E1.1 y E1.4 (controles de transformación), y E2.9, E2.13, E2.14 (líneas antisentido). Solo Q4117 y los tres híbridos F1 apomicticos amplificaron la banda específica de 570 pb.

Los resultados presentados en el objetivo 1 fueron publicados en Colono et al. (2019).

V.2- DETERMINACIÓN DE TRANSCRIPTOS QUE MUESTRAN VARIANTES DE PROCESAMIENTO DIFERENCIALES EN TEJIDOS REPRODUCTIVOS DE PLANTAS DE *P. NOTATUM* APOMÍCTICAS Y SEXUALES Y EN LAS LÍNEAS *tgs1-like* DEFECTIVAS

Para determinar si la ausencia de actividad del gen *PN_TGS1-like* en órganos reproductivos de plantas apomícticas está correlacionada con alteraciones en el clivado y empalme de genes, nos propusimos analizar la presencia de variantes de *splicing* en el transcriptoma floral de referencia Roche 454 de plantas apomícticas y sexuales (las cuales poseen naturalmente una expresión diferencial de *PN_TGS1-like*) y comparalas con las variantes de *splicing* presentes en las plantas *tgs1* antisentido.

V.2.1- Identificación de variantes de *splicing* en transcriptomas florales

Para analizar la presencia de variantes de *splicing* en el transcriptoma floral de plantas apomícticas y sexuales utilizamos bibliotecas de RNAseq previamente desarrolladas en nuestro laboratorio (ver Materiales y Métodos). Seleccionamos los 316 transcritos con expresión diferencial más probable ($FDR < 6,74 \times 10^{-10}$) de un total de 3732 transcritos diferencialmente representados entre bibliotecas apomícticas y sexuales ($p\text{-value} \leq 0.01$ y $\log FC \geq 3$; Ortiz et al., 2017, archivo adicional 6). Estos transcritos fueron seleccionados a partir de una base de datos de ensamblado global (base de datos sexual + apomíctica). Para cada uno de los isotigs diferenciales presentes en la base global se recuperaron las secuencias completas de los ARNm provenientes de plantas apomícticas y sexuales, de su respectiva base de datos. Mediante análisis de alineamiento, determinamos que 20 de ellas correspondían a posibles variantes de *splicing*. Seis fueron elegidos para estudiar su expresión en tres plantas apomícticas y tres sexuales, porque en ellos el procesamiento diferencial ocurría en secuencias internas de los transcritos (no en los extremos), que además representaban intrones en otras especies, y que estaban rodeadas del patrón cosenso del grupo I (GU-AG). Además, mediante análisis blastx en las bases no redundantes de plantas del NCBI se constató que en la misma posición existían intrones presentes en otras especies. Las anotaciones y probabilidad de expresión diferencial de dichos isotigs se listan en la Tabla V2.1. Según los datos recabados *in silico*, los isotigs 10779, 23387 y 22343 presentaban intrones no procesados en plantas

sexuales mientras que los isotigs 22630, 11548 y 24572 presentaban un intrón no procesado en plantas apomícticas (Figura V2.1). En la Figura V2.1 se muestran los alineamientos de nucleótidos realizados para cada uno de los seis isotigs diferenciales (blastn en el NCBI, alineamiento de dos o más secuencias), utilizando sus respectivos isotigs apomícticos y sexuales. El isotig que se utilizó como interrogante en cada uno de los alineamientos es el que presenta el intrón, y sobre el que se diseñaron los primers utilizados en los siguientes experimentos. Todos presentaron un intrón en su secuencia, salvo el isotig 10779 que presentó tres intrones, por lo que se diseñaron tres pares de primers para este transcripto. Mediante PCR cualitativa, observamos amplificaciones de la forma no procesada para los isotigs 10779, 23387, 22343, 11548 y 24572 en ambos tipos de plantas (apomícticas y sexuales) (Figura V2.2). El isotig 22630 no mostró amplificación de la forma no procesada en ninguno de los dos tipos de plantas, a pesar de que se probaron diferentes condiciones de ciclado. La ausencia de procesamiento no pudo ser confirmada experimentalmente en el isotig 22630, por lo que creemos que no representa una variante de *splicing*. En la Figura V2.2 se muestra solamente la amplificación correspondiente al primer intrón del isotig 10779, pero también se han obtenido amplificaciones correspondientes a los otros dos intrones (datos no mostrados). Nótese que dos isotigs (10779 y 23387) amplificaron una banda única, tanto en plantas apomícticas como sexuales, con los cebadores que detectaban la forma no procesada (Figura V2.2). Se consideró que en el caso de esos isotigs era posible realizar ensayos de qPCR en tiempo real usando los mismos cebadores. En estos ensayos, sólo para el isotig 23387 observamos diferencias significativas en la representación de las formas no procesadas entre ambos tipos de plantas (Figura V2.3). En el caso del isotig 10779 no hubieron diferencias de expresión entre las formas procesadas y no procesadas (Figura V2.4). De esta manera, corroboramos que el *splicing* diferencial está asociado con el modo de reproducción en el isotig 23387, ya que el alelo que porta el intrón resultó siempre más abundante en plantas sexuales con respecto a las apomícticas.

Tabla V2.1: Isotigs seleccionados que presentan intrones diferencialmente procesados

Isotig	Reads Apo	Reads Sex	Anotación	p-value	FDR
10779	139	458	Tetraketide alpha-pyrone reductase 1	8,99E-38	1,28E-34
22630	144	377	Strictosidine synthase	2,21E-23	1,18E-20
23387	490	235	Chlorophyll a-b binding protein 1B-21	2,98E-22	1,50E-19
11548	729	411	Chlorophyll a-b binding protein CP26	8,11E-22	3,99E-19
22343	164	397	LTP_2. Probable lipid transfer	1,84E-21	8,95E-19
24572	24	105	Dehydrin DHN1	8,14E-16	2,42E-13



Figura V2.1: Esquemas de alineamientos (blastn) en el NCBI para los seis isotigs seleccionados: 10779, 22630, 23387, 11548, 22343 y 24572. Los isotigs sexuales se representan en color negro y los apomicticos en color gris. Las flechas corresponden a los oligonucleótidos diseñados para los ensayos de PCR, que permiten amplificar la forma no procesada.

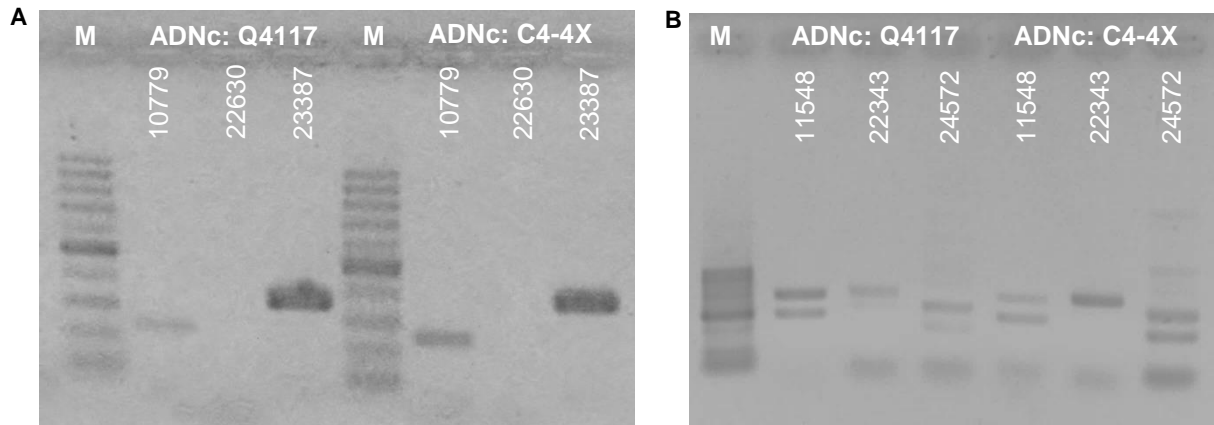


Figura V2.2: PCR a partir de ADNc de plantas apomícticas (ADNc: Q4117) y sexuales (ADNc: C4-4x). Panel A: amplificaciones de los isotigs 10779, 22630 y 23387. Panel B: amplificaciones de los isotigs 11548, 22343 y 24572. M: marcador de peso molecular CincuentaMarker (50 – 500 pb).

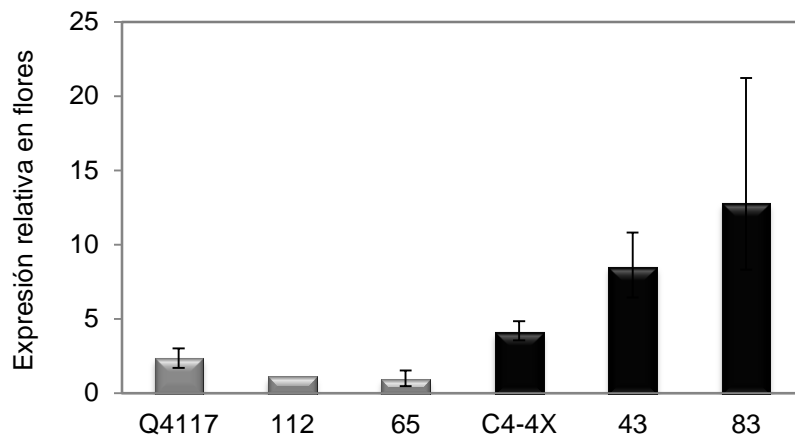


Figura V2.3: Cuantificación de la expresión relativa del isotig 23387 en flores. Plantas apomícticas en color gris (Q4117, #112, #65) y sexuales en negro (C4-4x, #43, #83).

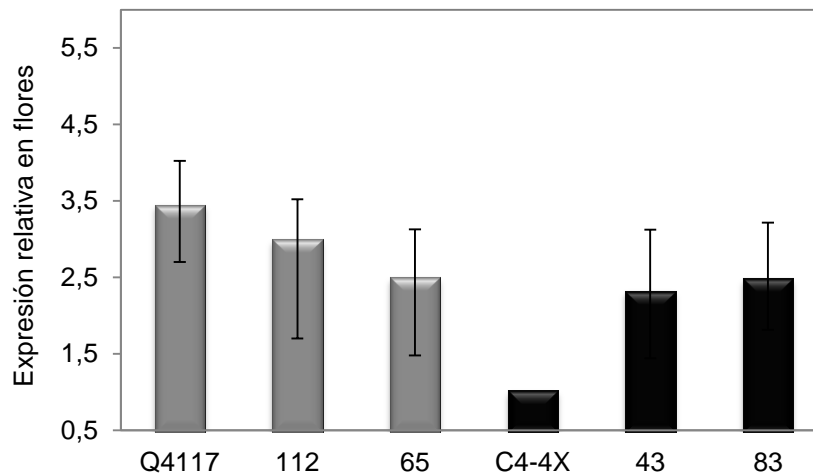


Figura V2.4: Cuantificación de la expresión relativa del isotig 10779 en flores.
Plantas apomícticas en color gris (Q4117, #112, #65) y sexuales en negro (C4-4x, #43, #83).

Estos experimentos prueban que la baja actividad del gen *TGS1-like* en plantas apomícticas está correlacionada con una disminución de la variante de *splicing* con intrón del transcrito 23387, pero no demuestran ninguna relación causal entre ambos eventos.

V.2.2- Estudio del isotig 23387 en las plantas antisentido *tgs1-like*

Como se confirmó previamente, el isotig 23387 presenta una variante de *splicing* asociada con el modo de reproducción, ya que la variante que porta el intrón es más abundante en plantas sexuales con respecto a las apomícticas. Por lo tanto decidimos estudiar la representación de las distintas formas del isotig 23387 en flores de las líneas antisentido *tgs1-like* E2.9 y E2.13 (la planta E2.14 aún no ha florecido) y en la planta sexual Q4188 (control). En este caso, se observó una expresión disminuida de la variante con intrón (no procesada) del isotig 23387 en las plantas transformantes E2.9 (Figura V2.5-A) y E2.13 (Figura V2.5-B), con respecto a la planta control Q4188. O sea, a pesar de que E2.9 y E2.13 poseen un fondo genético sexual (validado por la ausencia de amplificación de la región ACR), y la única alteración que se estableció fue la introducción de una construcción para silenciar al gen *PN_TGS1-like*, la variante de *splicing* típica de las plantas sexuales (variante con intrón) está

disminuida, como en plantas apomíticas. Estos resultados indican que el gen *TGS1-like* controla el *splicing* alternativo de al menos un transcripto, el isotig 23387, y confirman que es TGS1 el responsable de la disminución de la variante con intrón observada en plantas apomíticas.

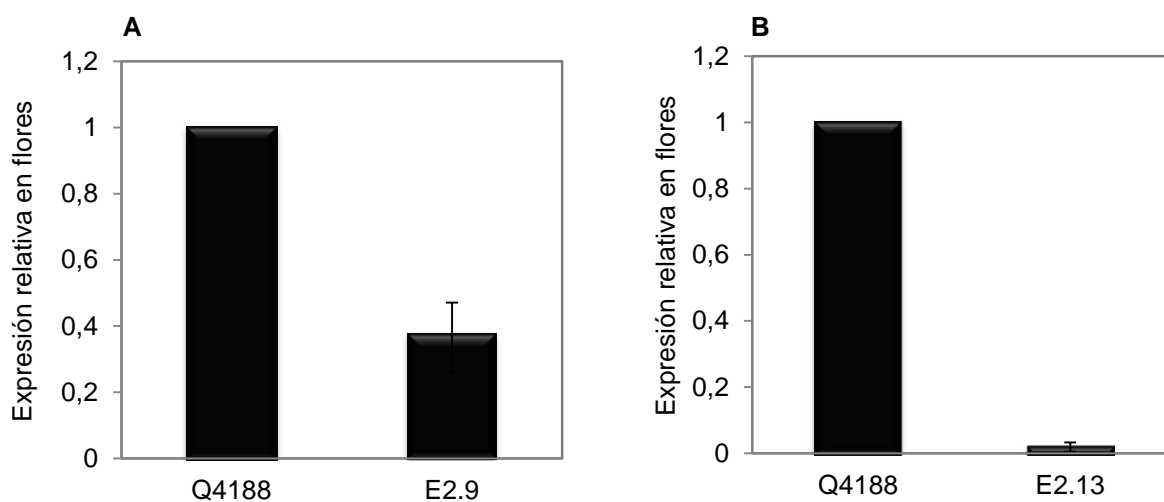


Figura V2.5: Cuantificación de la expresión relativa de la variante no procesada del isotig 23387 en flores de plantas Q4188 (control, planta sexual) y líneas antisentido *tgs1-like*. A: línea antisentido E2.9 y B: línea antisentido E2.13. Los cálculos estadísticos de la qPCR se encuentran en el anexo.

V.3- CONSTRUCCIÓN DE BIBLIOTECAS DEL TRANSCRIPTOMA FLORAL REFLEJANDO ESTADÍOS CONSECUTIVOS DEL DESARROLLO EN PLANTAS APOMÍCTICAS Y SEXUALES. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE *PN_TGS1-like* Y DE OTROS MIEMBROS DE LA MAQUINARIA DE *SPLICING*

Se construyeron bibliotecas de transcriptoma floral en diferentes estadios de desarrollo de *P. notatum*, que nos permitieron comparar los genes diferencialmente expresados en plantas apomícticas y sexuales y encontrar los genes candidatos en las distintas etapas características de la apomixis. En este trabajo de tesis, la base de datos se utilizó para analizar la expresión de *PN_TGS1-like* y su posible gen blanco (isotig 23387; *Chlorophyll a-b binding protein 1B-21*) en los diferentes estadios de desarrollo; y además para realizar comparaciones y estudiar la expresión de todos los genes que estén implicados en el proceso de clivado y empalme.

V.3.1- Construcción del transcriptoma floral de *P. notatum* estadio por estadio

Para construir el transcriptoma floral de *P. notatum* estadio por estadio, se extrajo el ARN total de flores de *P. notatum* en premeiosis, meiosis, posmeiosis y antesis (según Laspina et al., 2008). Dado que este estudio tuvo como objetivo comparar el desarrollo sexual y apomíctico, se recolectaron flores de dos genotipos diferentes con modos reproductivos contrastantes: C4-4x ($2n = 4x = 40$; sexual) y Q4117 ($2n = 4x = 40$; apomíctico obligado). Se crearon dos muestras diferentes (sexual y apomíctica) en premeiosis, meiosis, posmeiosis y antesis. Cada una de las muestras se realizó por triplicado, generando un total de 24 bibliotecas. De esta manera se construyó una base de datos de expresión cuantitativa a partir de la secuenciación Hiseq de bibliotecas Illumina Truseq florales para los cuatro estadios de desarrollo. La secuenciación de las 24 bibliotecas de los ovarios de *P. notatum* originó 292.647.558 lecturas, las cuales luego del ajuste y limpieza generaron un total de 234.957.559 lecturas útiles. Se consideraron dos grupos que fueron clasificados por el modo de reproducción, uno apomíctico y uno sexual, que contenían 12 bibliotecas cada uno. La calidad del ensamblaje del transcriptoma fue analizada por QUAST. Los resultados (Tabla V3.1) indicaron un buen rendimiento del ensamblado con 199.841 transcritos que poseen un tamaño promedio de 1.243,47 pb, un N50 de 1.698 y un %GC de 48,41%. Las regiones codificantes candidatas para todas las secuencias de transcritos expresadas se predijeron usando el

programa TransDecoder. Como resultado, 109.288 (54,69%) transcritos fueron predichos como secuencias proteicas. Para validar la autenticidad de los transcritos ensamblados, se realizó un blastn utilizando el transcriptoma floral de referencia Roche 454 FLX+ del que ya disponemos (Ortiz et al., 2017) como *subject*. El 94% de los transcritos mostraron homología con el transcriptoma Roche 454, y el 92% de ellos mostró más del 95% de identidad. Todos los estudios bioinformáticos, validaciones y análisis de las bases de datos fueron realizados por la Dra. Maricel Podio.

Tabla V3.1: Calidad del ensamblado del transcriptoma analizado por QUAST

Assembly	TriAySmod
# contiguos (>= 0 pb)	199.841
# contiguos (>= 1000 pb)	95.023
# contiguos (>= 5000 pb)	1.106
# contiguos (>= 10000 pb)	22
Largo total (>= 0 pb)	248.495.412
Largo total (>= 1000 pb)	182.045.445
Largo total (>= 5000 pb)	6.701.310
Largo total (>= 10000 pb)	258.017
# contiguos	199.841
Contiguo más largo	15.487
Largo total	248.495.412
%GC	48,40
N50	1.621
N75	955
L50	49.929
L75	99.453
# N's por 100 kpb	0,00

V.3.2- Estudio de la expresión de *PN_TGS1-like* y del isotig 23387 en las bibliotecas generadas para los diferentes estadios de desarrollo

Se utilizaron las bibliotecas de ARNseq generadas por secuenciación Illumina para estudiar la expresión de *PN_TGS1-like* y del isotig 23387 (AT3G54890). Según lo esperado, se observó mayor expresión de *PN_TGS1-like* en la planta sexual en comparación con la apomíctica en todos los estadios de desarrollo (Figura V3.1). Se analizó tanto la variante procesada (TRINITY_DN55922_c0_g3_i3) como la no procesada (TRINITY_DN55922_c0_g3_i8) del isotig diferencial 23387. Confirmamos que el transcritos

TRINITY_DN55922_c0_g3_i3 (sin intrón) está más expresado en plantas apomícticas con respecto a las plantas sexuales en antesis (Figura V3.2-A), mientras que el TRINITY_DN55922_c0_g3_i8 (con intrón) está más expresado en las plantas sexuales en antesis (Figura V3.2-B), lo cual valida los resultados obtenidos por real time PCR.

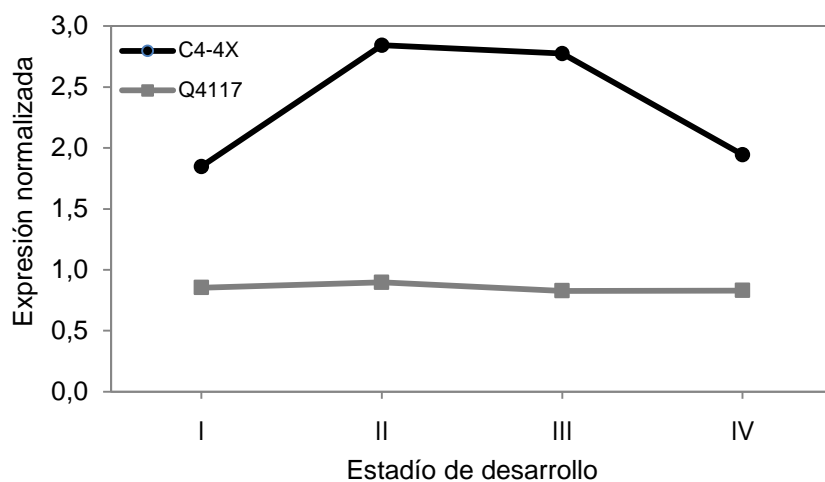


Figura V3.1: Expresión normalizada de *PN_TGS1-like* en premeiosis (I), meiosis (II), postmeiosis (III) y antesis (IV) de plantas sexuales (C4-4X, en negro) y apomícticas (Q4117, en gris).

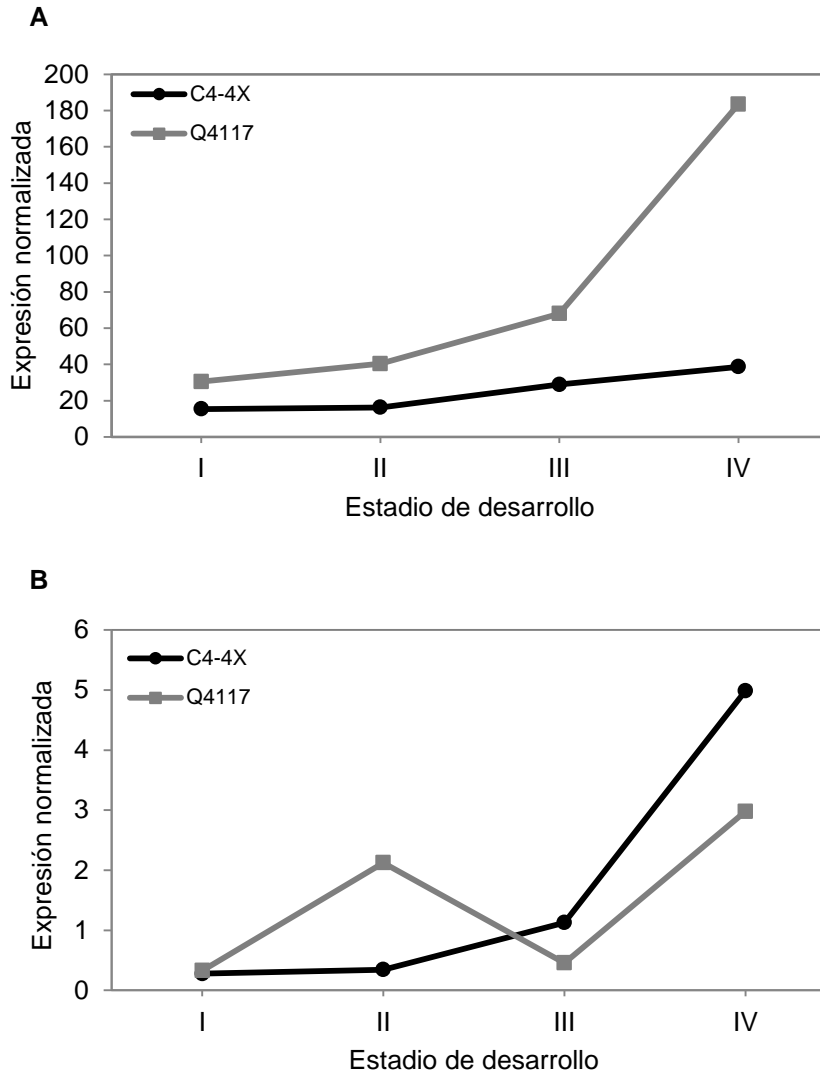


Figura V3.2: Expresión normalizada del isotig diferencial 23387 (*Chlorophyll a-b binding protein 1B-21*) en premeiosis (I), meiosis (II), postmeiosis (III) y antesis (IV) de plantas sexuales (C4-4X, en negro) y apomícticas (Q4117, en gris). A- TRINITY_DN55922_c0_g3_i3 (variante procesada del isotig 23387) y B- TRINITY_DN55922_c0_g3_i8 (variante no procesada del isotig 23387).

V.3.3- Identificación de todos los genes que participan en el *splicing* en los diferentes transcriptomas disponibles

Se analizaron los transcriptomas florales Roche 454 en búsqueda de otros genes de la maquinaria de *splicing* que presentaran una expresión diferencial en plantas apomícticas y sexuales de *P. notatum*, y se identificaron 24 candidatos. Todos ellos están involucrados en el *splicing* y procesamiento del ARN mensajero y corresponden a los isotigs que se listan en la Tabla V3.2. Se estudió la expresión de cada uno de esos 24 genes diferenciales en la base Illumina generada (Tabla V3.2). Además se buscaron otros genes que estén implicados en el procesamiento del ARNm.

La mayoría de los isotigs presentes en la base de datos Roche 454 mostró diferencias significativas en los cuatro estadios de desarrollo entre plantas apomícticas y sexuales. Diez transcriptos presentaron más expresión en plantas apomícticas (TRpn_121249, TRpn_176312, TRpn_168421, TRpn_113596, TRpn_157843, TRpn_125043, TRpn_179868, TRpn_135178, TRpn_186261, TRpn_125870); ocho transcriptos mostraron más expresión en las plantas sexuales (TRpn_69321, TRpn_107182, TRpn_17986, TRpn_43035, TRpn_12050, TRpn_24328, TRpn_135179 y TRpn_97369). El resto de los transcriptos reveló diferencias de expresión solamente para algunos de los estadios, y el transcripto TRpn_25063 no presentó diferencias de expresión en ninguna de las etapas estudiadas (Tabla V3.3).

Se realizó un análisis utilizando los ortólogos de estos genes en *Arabidopsis thaliana* (Tabla V3.4) con el programa STRING, para conocer la interacción entre todos estos genes implicados en el *splicing* y *PN_TGS1-like* (Figura V3.3). El gen *PN_TGS1-like* (ortólogo al gen AT1G45231 de *A. thaliana*) muestra interacciones predichas o comprobadas experimentalmente con 14 de estos genes (Figura V3.4), a saber: AT1G20580 (proteína de la familia de ribonucleoproteínas pequeñas nucleares), LSM6B (AT2G43810, componente de los complejos de proteínas LSM), LSM2 (AT1G03330, componente de las proteínas LSM), AT4G03120 (componente del snRNP U1), AT2G47640 (ribonucleoproteína nuclear pequeña Sm D2), AT4G02840 (proteína de la familia de las ribonucleoproteínas pequeñas nucleares), PRP40A (AT1G44910, proteína 40A implicada en el procesamiento de pre-ARNm), AT5G51300 (factor de *splicing* 1), AT1G31870 (factor de *splicing*), AT1G60200 (factor de *splicing* con dominio PWI que contiene un motivo de reconocimiento de ARN), ATU2AF65A (AT4G36690, U2 snRNP factor auxiliar de la subunidad grande), AT1G60900 (factor de *splicing* U2A65), THO1

(AT5G09860, codifica un componente del complejo THO/TREX) y DOT2 (AT5G16780, codifica una proteína que pertenece a la familia SART-1) (Figura V3.3).

Tabla V3.2: Isotigs diferenciales entre plantas apomícticas (APO) y sexuales (SEX) de *P. notatum* en el transcriptoma Roche 454 implicados en el procesamiento del ARNm y *splicing* del ARN.

Isotigs	Reads APO	Reads SEX	p-value	FDR	pfam or blastx
17173	102	0	2,56E-31	2,26E-28	<i>Cwf15/Cwc15 cell cycle control protein</i>
17174	0	80	3,86E-24	2,20E-21	<i>Cwf15/Cwc15 cell cycle control protein</i>
26514	3	48	2,07E-11	3,47E-09	<i>LSM domain. Small nuclear ribonucleoprotein complex</i>
26515	24	0	1,21E-07	1,05E-05	<i>LSM domain. Small nuclear ribonucleoprotein complex</i>
17398	10	0	0,0020	0,0456	<i>LSM domain. Small nuclear ribonucleoprotein complex</i>
11043	16	0	3,07E-05	0,00145	<i>Ribosomal protein L7Ae/L30e/S12e/Gadd45 family</i>
25437	16	0	3,07E-05	0,00145	<i>Serine/arginine-rich splicing factor RSZ23</i>
18848	13	0	0,0002	0,0085	<i>efThoc1. THO complex subunit 1 transcription elongation factor</i>
18849	0	13	0,0002	0,0085	<i>efThoc1. THO complex subunit 1 transcription elongation factor</i>
18625	11	0	0,0010	0,0261	<i>RRM_1/6. RNA recognition motif</i>
28881	310	166	9,98E-12	1,81E-09	<i>RRM_1/5/6. RNA recognition motif</i>
16317	9	0	0,0039	0,0780	<i>RRM_1/5/6. RNA recognition motif; KH_3/1: KH domain; zf-CCHC_3: Zinc knuckle</i>
37096	15	3	0,0076	0,1296	<i>RRM_6/1. RNA recognition motif</i>
44163	9	26	0,0060	0,1136	<i>RRM_1/5/6. RNA recognition motif</i>
46681	22	51	0,0013	0,0341	<i>U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm3</i>
16028	3	17	0,0026	0,0582	<i>Myb_DNA-binding. Myb-like DNA-binding domain</i>
19085	63	105	0,0026	0,0587	<i>Myb_DNA-binding. Myb-like DNA-binding domain</i>
33076	39	16	0,0027	0,0603	<i>Nuclear protein Es2</i>
16819	1	12	0,0034	0,0737	<i>Pre-mRNA-processing protein 40A</i>
15881	19	5	0,0066	0,1219	<i>Splicing factor U2af small subunit A. RRM_1/5/6: RNA recognition motif</i>
18190	13	32	0,0067	0,1220	<i>Pre-mRNA-splicing factor CWC22 homolog</i>
27972	59	34	0,0068	0,1245	<i>Xpo1: Exportin 1-like protein</i>
29183	27	10	0,0077	0,1296	<i>CRS1_YhbY. CRS1 / YhbY (CRM) domain</i>
23265	0	8	0,0078	0,1296	<i>cwf18. cwf18 pre-mRNA splicing factor</i>

Tabla V3.3: Expresión normalizada de los genes diferenciales en diferentes estadios de desarrollo para la planta sexual (C4-4x) y la apomíctica (Q4117). I: premeiosis, II: meiosis, III: postmeiosis, IV: antesis. Los valores de expresión corresponden al promedio de las tres réplicas.

ROCHE (isotig)	ILLUMINA	Q4117				C4-4X			
		I	II	III	IV	I	II	III	IV
17173	TRpn_121249	2.255,7	2.911,3	2.695,3	2.895,0	0,0	0,0	61,3	91,0
17174	TRpn_69321	22,3	46,7	31,3	92,0	1.761,7	2.350,0	2.321,3	1.589,3
28881	TRpn_3003	589,7	1276,7	1121,3	198,7	567,3	631,33	590,0	61,3
26514	TRpn_107182	428,3	387,67	338,67	396,7	2.663,0	2.301,0	2.999,0	1.028,7
	TRpn_75770	17,3	0,0	20,0	19,7	143,3	82,7	37,0	0,0
26515	TRpn_176312	1.175,0	734,0	823,7	693,3	0,0	0,0	10,7	15,7
11043	TRpn_168421	710,3	610,7	615,3	787,0	262,7	216,7	495,3	207,0
	TRpn_17986	4,7	11,0	4,7	41,3	620,3	546,7	934,0	357,7
25437	TRpn_113596	304,0	265,7	383,0	329,7	0,0	0,0	9,0	7,3
18848/9	TRpn_157843	277,0	260,0	304,7	290,7	15,7	14,7	25,3	31,0
	TRpn_43035	0,0	2,0	4,7	2,0	107,3	146,0	205,0	115,3
18625	TRpn_125043	59,0	99,7	96,7	53,7	3,3	2,0	5,7	2,0
46681	TRpn_12050	138,3	108,7	128,0	127,7	968,0	757,0	1.155,7	415,0
17398	TRpn_179868	144,3	137,3	173,7	145,0	0,0	0,0	0,0	5,3
16028	TRpn_99684	2,0	14,3	2,3	22,7	33,3	17,3	81,0	34,0
19085	TRpn_50299	1,0	144,7	6,0	691,7	2,7	9,3	160,0	2.131,3
33076	TRpn_25063	77,0	65,3	56,0	46,3	52,0	46,0	61,7	23,7
16819	TRpn_24328	0,0	0,0	1,33	7,3	226,67	314,3	176,0	117,7
16317	TRpn_18697	149,7	244,0	286,3	213,7	232,3	263,0	217,0	149,3
44163	TRpn_135178	156,3	169,0	175,7	176,0	0,0	0,0	7,3	6,0
	TRpn_135179	34,3	25,0	26,7	43,0	139,3	106,3	179,3	60,0
15881	TRpn_186261	481,0	1.072,0	1.054,0	1.101,0	302,3	383,3	812,0	1.044,0
18190	TRpn_113527	83,0	97,0	117,7	110,7	75,3	74,3	63,0	49,0
27972	TRpn_64675	22,0	127,0	85,3	56,0	88,0	119,0	118,7	78,3
37096	TRpn_125870	103,7	72,3	115,3	76,0	0,0	0,0	6,0	6,3
29183	TRpn_25898	16,3	27,3	38,3	10,0	64,7	82,7	15,3	17,0
23265	TRpn_97369	6,7	4,7	18,7	14,3	99,33	97,3	63,3	44,0

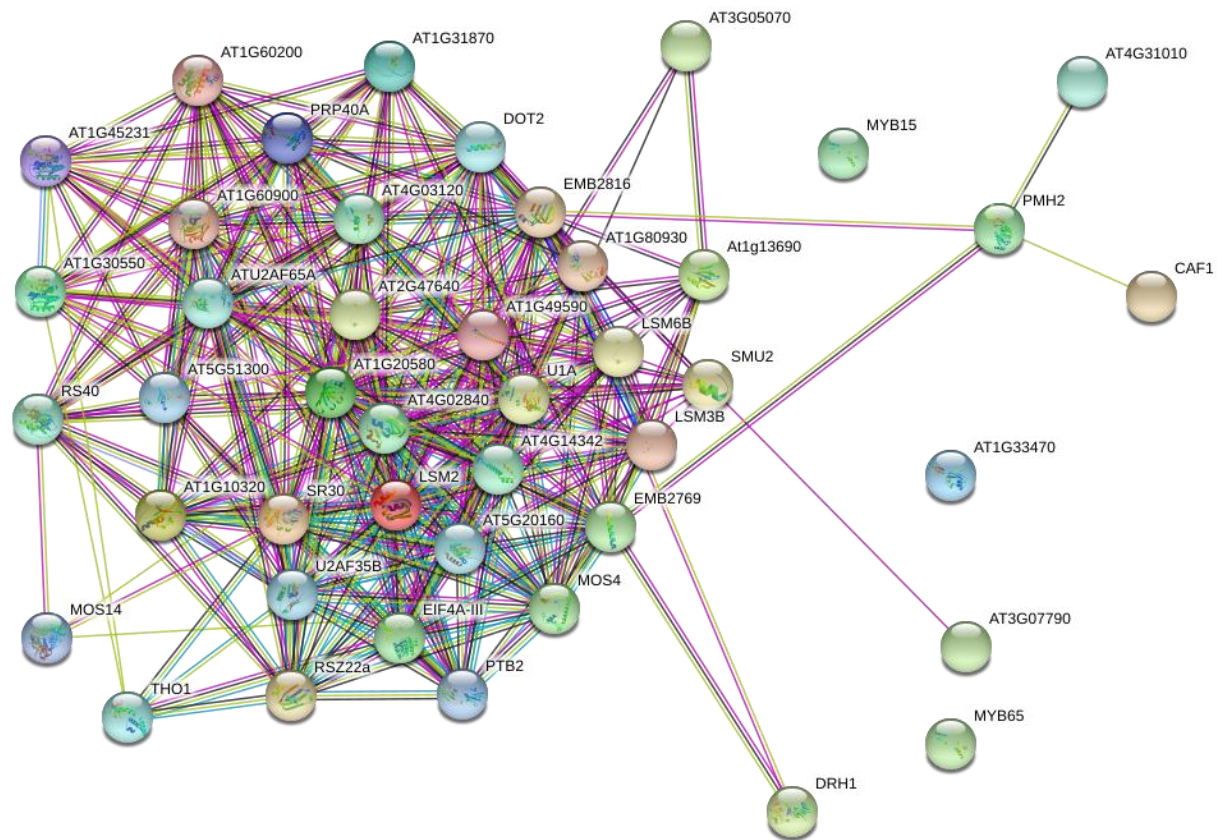
Tabla V3.4: Genes implicados en el procesamiento del ARNm y el *splicing* presentes en la base Illumina, con sus correspondientes ortólogos y anotaciones en *A. thaliana*.

<i>P. notatum</i>	<i>A. thaliana</i>	Descripción
TRpn_121249	AT3G13200	<i>EMB2769; Cwf15/Cwc15 cell cycle control family protein</i>
TRpn_69321	AT3G13200	<i>EMB2769; Cwf15/Cwc15 cell cycle control family protein</i>
TRpn_3003	AT1G33470	<i>RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein</i>
TRpn_107182	AT3G62840	<i>Small nuclear ribonucleoprotein family protein</i>
TRpn_75770	AT3G62840	<i>Small nuclear ribonucleoprotein family protein</i>
TRpn_176312	AT3G62840	<i>Small nuclear ribonucleoprotein family protein</i>
TRpn_168421	AT5G20160	<i>Ribosomal protein L7Ae/L30e/S12e/Gadd45 family protein</i>
TRpn_17986	AT5G20160	<i>Ribosomal protein L7Ae/L30e/S12e/Gadd45 family protein</i>
TRpn_113596	AT2G24590	<i>AT-RSZ22A, Serine/Arginine-Rich Protein Splicing Factors (SR proteins)</i>
TRpn_157843	AT5G09860	<i>ATHPR1, ATTHO1, HPR1, THO1. Encodes a component of the THO/TREX complex</i>
TRpn_43035	AT5G09860	<i>ATHPR1, ATTHO1, HPR1, THO1. Encodes a component of the THO/TREX complex</i>
TRpn_125043	AT1G33470	<i>RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein</i>
TRpn_12050	AT1G76860	<i>LSM3B, SM-LIKE 3B. Small nuclear ribonucleoprotein family protein</i>
TRpn_179868	AT4G02840	<i>SMD1B. Smd1b is one of two Yeast Smd1 orthologs</i>
TRpn_99684	AT3G23250	<i>ATMYB15, ATY19, MYB DOMAIN PROTEIN 15, MYB15. Member of the R2R3 factor gene family</i>
TRpn_50299	AT3G11440	<i>ATMYB65, MYB DOMAIN PROTEIN 65, MYB65. Member of the R2R3-MYB gene family</i>
TRpn_25063	AT3G07790	<i>DGCR14-like protein</i>
TRpn_24328	AT1G44910	<i>ATPRP40A, PRE-MRNA-PROCESSING PROTEIN 40A, PRP40A. Binds the carboxyl-terminal domain (CTD) of the largest subunit of RNA polymerase II</i>
TRpn_18697	AT5G51300	<i>ARABIDOPSIS SF1 HOMOLOG, ATSF1. Encodes a nuclear localized splicing factor homolog</i>
TRpn_135178	AT1G13690	<i>AtE1 - stimulates the ATPase activity of DnaK/DnaJ</i>
TRpn_186261	AT5G42820	<i>atU2AF35b. U2 auxiliary factor small subunit.</i>
TRpn_113527	AT1G80930	<i>MIF4G domain-containing protein / MA3 domain-containing protein</i>
TRpn_64675	AT5G62600	<i>MODIFIER OF SNC1-1, 14, MOS14. Encodes a nuclear importer of serine-arginine rich (SR) proteins</i>
TRpn_125870	AT4G36690	<i>ATU2AF65A. Regulates flowering time and displays a role in pollen tube growth</i>
TRpn_25898	AT2G20020	<i>ATCAF1, CAF1. Promotes the splicing of chloroplast group II introns.</i>
TRpn_97369	AT3G05070	<i>Cwf18 pre-mRNA splicing factor</i>
TRpn_143890	AT1G03330	<i>LSM2, SM-LIKE 2. Small nuclear ribonucleoprotein family protein</i>
TRpn_24963	AT1G09140	<i>AT-SR30, ATSRP30, SR30. Encodes a serine-arginine rich RNA binding protein</i>
TRpn_182967	AT1G20580	<i>Small nuclear ribonucleoprotein family protein</i>
TRpn_161060	AT1G60900	<i>Putative U2A65 splicing factor which functions in abscisic acid mediated flowering via</i>
TRpn_174810	AT2G26460	<i>SUPPRESSORS OF MEC-8 AND UNC-52 2. Encodes SMU2, a protein involved in RNA splicing</i>

Continuación Tabla V3.4

TRpn_28747	AT2G47580	<i>SPLICEOSOMAL PROTEIN U1A, U1A. encodes spliceosomal protein U1A</i>
TRpn_81019	AT3G01540	<i>RNA HELICASE DRH1</i>
TRpn_68172	AT3G18165	<i>Encodes MOS4 (Modifier of snc1, 4). MOS4 interacts with AtCDC5 and PRL1</i>
TRpn_121279	AT3G19760	<i>Encodes an RNA helicase that may be a component of the Exon Junction Complex</i>
TRpn_174640	AT3G22330	<i>ATRH53, PMH2. DEAD-box protein required for efficient group II intron splicing</i>
TRpn_154379	AT4G14342	<i>Splicing factor 3B subunit 5/RDS3 complex subunit 10</i>
TRpn_192676	AT4G36690	<i>ATU2AF65A .Regulates flowering time and displays a role in pollen tube growth</i>
TRpn_171748	AT5G16780	<i>DEFECTIVELY ORGANIZED TRIBUTARIES 2. Encodes a protein belonging to SART-1 family</i>
TRpn_2507	AT5G42820	<i>U2AF35B, ATU2AF35B. U2 auxiliary factor small subunit</i>
TRpn_25983	AT5G53180	<i>PTB2. Encodes one of the two polypyrimidine tract-binding (PTB) protein</i>
TRpn_1350045	AT2G43810	<i>LSM6B. Small nuclear ribonucleoprotein family protein</i>
TRpn_122804	AT4G03120	<i>C2H2 and C2HC zinc fingers superfamily protein</i>
TRpn_21384	AT2G47640	<i>Small nuclear ribonucleoprotein family protein</i>
TRpn_125370	AT1G31870	<i>Pre-mRNA-splicing factor of RES complex protein</i>
TRpn_3868	AT1G60200	<i>Splicing factor PWI domain-containing protein / RNA recognition motif (RRM)-containing protein</i>
TRpn_63029	AT4G31010	<i>CRS2-associated factor 1. Group II intron splicing</i>
TRpn_189767	AT1G49590	<i>Zinc finger protein ZOP1</i>
TRpn_128108	AT2G03870	<i>Sm-like protein LSM7</i>
TRpn_111014	AT4G25500	<i>Serine/arginine-rich splicing factor RS40</i>
TRpn_193686	AT1G10320	<i>Zinc finger CCCH domain-containing protein 5</i>

En el programa STRING, los nodos de la red corresponden a proteínas, mientras que las líneas corresponden a diferentes asociaciones entre las proteínas presentes en la red (ver referencias debajo de la Figura V3.3), ya sea interacciones conocidas (obtenidas de base de datos o experimentalmente), interacciones predichas u otro tipo de interacciones como co-expresión. Hay muchos genes que presentan evidencia experimental de asociación con *TGS1-like* (líneas de color rosado). Esta evidencia sugiere que existe un enlace funcional entre *TGS1* y algunos genes que participan en el proceso y clivado de genes. Estos resultados también indican que existen numerosos genes relacionados con la maquinaria de clivado y empalme que muestran actividad diferencial durante la apomixis, y que éstos genes integran una red de interacciones funcionales.



REFERENCIAS

Interacciones conocidas

- De bases de datos confiables
- Determinado experimentalmente

Interacciones predichas

- Genes cercanos
- Fusión de genes
- Co-ocurrencia de genes

Otras interacciones

- Extracción de textos
- Co-expresión
- Homología proteica

Figura V3.3: Interacciones entre todos los genes con expresión diferencial involucrados en el *splicing* y procesamiento del ARNm y *PN_TGS1-like*.

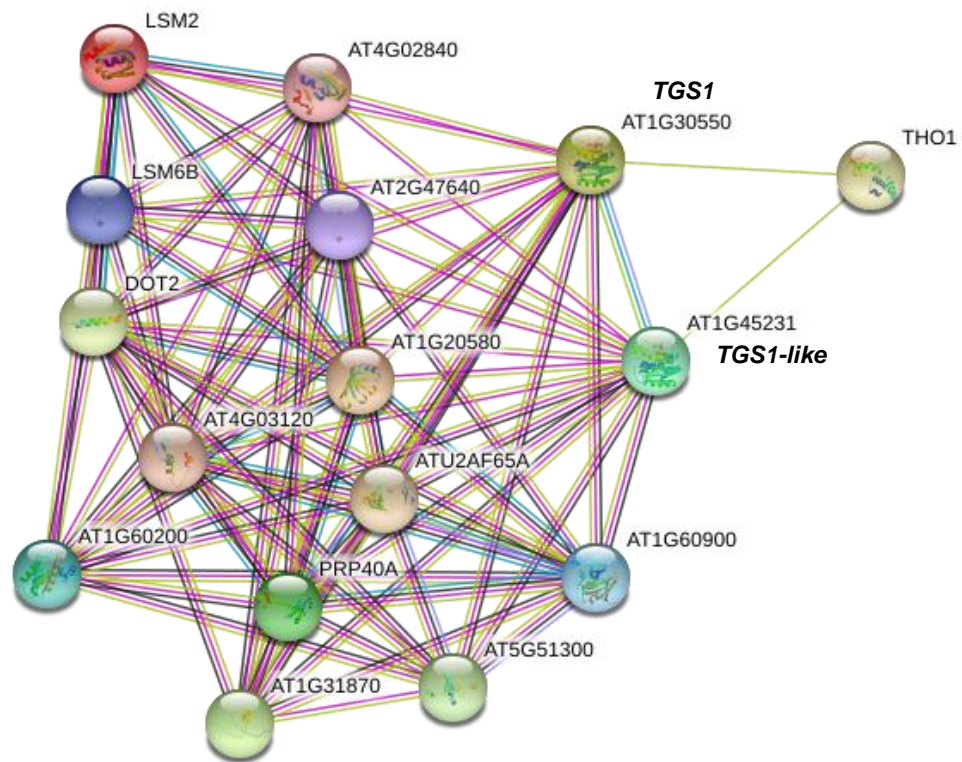


Figura V3.4: Genes con expresión diferencial involucrados en el *splicing* y procesamiento del ARNm que interactúan con *PN_TGS1-like* (AT1G45231). Además se muestra el gen canónico *TGS1* (AT1G30550).

V.4- IDENTIFICACIÓN DEL NÚMERO DE COPIAS Y DE LA SECUENCIA COMPLETA DEL GEN *PN_TGS1-like* EN EL GENOMA DE *PASPALUM NOTATUM*

Los genomas de plantas contienen al menos dos genes diferentes que codifican proteínas similares a *TGS1*. El primero, que se conserva en todos los eucariotas, incluye sólo el dominio metiltransferasa, mientras que el segundo, al que llamamos *TGS1-like*, es una forma exclusiva de plantas e incluye el dominio de ARN metiltransferasa asociado con un dominio WW (Siena et al., 2014b). En esta parte del trabajo, se utilizó el ADN genómico de *P. notatum* para caracterizar la estructura genómica de *PN_TGS1-like* e identificar si en ésta gramínea existen las dos copias del gen (*TGS1* y *TGS1-like*).

V.4.1- Caracterización de la estructura genómica de *PN_TGS1-like*

Se utilizó la base de secuencia genómica de *Paspalum* disponible en nuestro laboratorio para identificar la secuencia completa del gen *PN_TGS1-like*. En un genoma con una cobertura predicha de 100x (Illumina) y 48x (Nanopore) (Juan Pablo Ortiz, comunicación personal), se identificó un solo ensamblado contiguo (contig), de 4793pb, lo que indica que el gen está en copia única en el genoma de *Paspalum* diploide sexual. La única secuencia identificada fue utilizada junto con las secuencias de ARNm de la base de datos Illumina para predecir la estructura genómica completa de *PN_TGS1-like*. Encontramos que el mismo presentaría 10 exones y 9 intrones (Figura V4.1). En la Figura V4.2 se observa un alineamiento realizado entre el contig generado para *PN_TGS1-like* (*Query*) y las secuencias de ARNm obtenidas de la base de datos Roche 454 e Illumina para *PN_TGS1-like*. En ésta figura se observa que el gen presentaría dos variantes de transcritos en las plantas apomícticas, ya que hay dos isoformas que carecen del exón número cuatro.

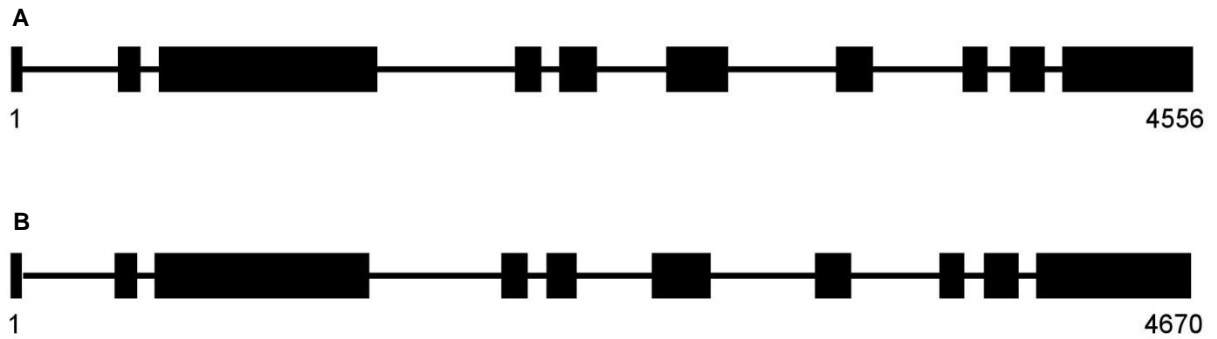


Figura V4.1: Exones (cajas) e intrones (líneas) predichos para el gen *PN_TGS1-like* de plantas apomícticas (A) y sexuales (B) de *Paspalum notatum*.

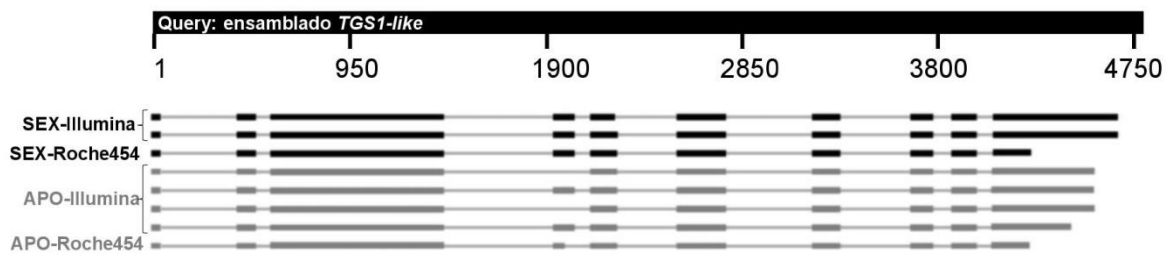


Figura V4.2: Exones presentes en el transcriptoma de la flor de *Paspalum notatum* apomíctico (APO) y sexual (SEX). Query: contig de *PN_TGS1-like*. Subjects: ARNm de diferentes bases de datos (Roche454 e Illumina)

V.5- ANÁLISIS DE LA POSIBILIDAD DE QUE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE *PN_TGS1-like* OBSERVADA EN ÓVULOS DE PLANTAS APOMÍCTICAS Y SEXUALES, OCURRA BAJO EL CONTROL DE UN MECANISMO DE SILENCIAMIENTO TRANSCRIPCIONAL O POSTRANSCRIPCIONAL

El gen *PN_TGS1-like* se expresa más en la nucela del óvulo de plantas sexuales que en la de plantas apomícticas (Siena et al., 2014b). Debido a esto, se analizaron las bibliotecas del componente pequeño del transcriptoma floral del que disponemos (Ortiz et al., 2019), para determinar si *PN_TGS1-like* está siendo silenciado por mecanismos mediados por ARN pequeños.

V.5.1- Análisis de las bibliotecas florales del componente pequeño (sRNA) de *P. notatum*

Se recurrió a las bibliotecas florales del componente pequeño de *P. notatum* derivadas de genotipos apomícticos y sexuales obtenidas en nuestro laboratorio (Ortiz et al., 2019). Se buscó el número de *reads* que mapean en los isotigs homólogos a *PN_TGS1-like* (isotigs 35977 y 41533), provenientes de las bibliotecas apomícticas (Apo) y sexuales (Sex). No se encontraron ARN pequeños asociados al gen en ninguna de las bibliotecas. Tampoco se detectaron miRNA asociados a *PN_TGS1-like* en el reporte de Ortiz et al. (2019). Estos resultados indican que el silenciamiento de *PN_TGS1-like* observado en el ovulo de plantas apomícticas no está mediado por un mecanismo relacionado con la generación de ARN pequeños.

DISCUSIÓN

VI- DISCUSIÓN

VI.1- El gen específico de plantas *PN_TGS1-like* influye en el desarrollo de los gametofitos en óvulos de *Paspalum notatum* tetraploides sexuales

PIMT (proteína que interactúa con PRIP con un dominio metiltransferasa)/ TGS1 se identificó por primera vez como un coactivador transcripcional de una proteína que interactúa con PRIP (Zhu et al., 2001) y ha sido ampliamente estudiado en levaduras, moscas y mamíferos. La proteína canónica PIMT/TGS1 contiene un dominio metiltransferasa y dos dominios de unión, que permiten su interacción con los ARN blanco y con el sustrato S-adenosil-L-metionina, el dador de metilos en la reacción catalizada por la enzima (Zhu et al., 2001). Participa en varias vías moleculares que afectan el crecimiento y el desarrollo: 1) catalizando la conversión post-transcripcional de 7-metilguanosa (m^7G) en 2,2,7-trimetilguanosa (m^3G) en los ARN pequeños nucleares y nucleolares y en el ARN de la telomerasa, con consecuencias directas en el clivado y empalme del ARNm, el procesamiento del ARNr y el mantenimiento de la estructura de los telómeros (Mouaikel et al., 2002; Franke et al., 2008); 2) modulando la transcripción en varios contextos, al interactuar y co-localizar en el núcleo con coactivadores transcripcionales que contienen histona acetil transferasa (HAT) como CBP/Ep300, y coactivadores que no contienen HAT como la subunidad Mediator Med1 (proteína de unión a PPAR; PBP/TRAP220/DRIP205) y PRIP (Zhu et al., 2001; Misra et al., 2002; Kornberg, 2007). Se ha propuesto que PIMT podría servir como un puente molecular entre los complejos transcripcionales que contienen HAT y los que no lo contienen, y así controlar la transcripción mediada por el receptor nuclear. La fosforilación por una cascada ERK2 en la Ser²⁹⁸ de PIMT/TGS1 induce la actividad transcripcional de algunos promotores, lo que sugiere un papel directo para las vías de transducción de señales en la modulación de la transcripción (Kapadia et al., 2013); 3) trimetilizar las caperuzas de 7-metilguanosa (m^7G) de un grupo de pri-miARNs inducidos por quiescencia, que se unen a Exportina-1 en los fibroblastos humanos (Martínez et al., 2017). La eliminación de la Exportina-1 o de TGS1 inhibe la correcta biogénesis de los correspondientes miARNs maduros (Martínez et al., 2017). Estos pri-miARN dependientes de Exportina-1 se encuentran en el citoplasma durante el periodo de quiescencia

de los fibroblastos, junto con una isoforma más pequeña de Drosha (Martínez et al., 2017). Se propuso que en las células quiescentes existe una vía alternativa de biogénesis de miARN que involucra a TGS1 y a la Exportina-1 que procesa y transporta selectivamente un conjunto específico de miARN, que podría ser esencial para el arresto reversible de G0 (Martínez et al., 2017).

Por el contrario, *TGS1* permanece pobremente caracterizado en plantas. Curiosamente, estos organismos presentan un miembro extra de la familia de genes *TGS1*, más largo, que incluye una extensión N-terminal con un dominio WW de interacción con proteínas (Siena et al., 2014b), lo que sugiere la adquisición de funciones específicas de plantas. En las plantas subtropicales de *P. notatum*, esta versión específica (*PN_TGS1-like*) se expresa a lo largo del desarrollo reproductivo femenino en las células de la nucela y en los integumentos de los óvulos de los biotipos sexuales, mientras que no se detecta expresión en los óvulos de las plantas apomícticas (Siena et al., 2014b). Además, la expresión de *PN_TGS1-like* se correlaciona positivamente con la tasa de sexualidad en biotipos facultativos (Siena et al., 2014b). La regulación diferencial de *PN_TGS1-like* involucra sólo a los óvulos, ya que no se detectó el mismo fenómeno en hojas o raíces de los genotipos apomícticos y sexuales (Siena et al., 2014b). Recientemente se demostró que se requiere *TGS1-like* para la tolerancia al frío de la planta, ya que el crecimiento vegetativo y reproductivo de mutantes *tgs1-like* de *Arabidopsis* (con expresión defectuosa de AT1G45231) se vio gravemente comprometido bajo esta condición (Gao et al., 2017).

Para obtener líneas antisentido con una expresión reducida de *PN_TGS1-like*, primero aislamos un fragmento específico del gen (llamado F1) ubicado en el extremo 5' del transcripto, y ausente de otras secuencias parcialmente homólogas. F1 se clonó bajo el control del promotor *Act1* del arroz, que permite una expresión constitutiva del gen en las Gramíneas (Zhang et al., 1991; Mancini et al., 2014, 2018). Tres líneas antisentido con una expresión reducida de *PN_TGS1-like* crecieron normalmente a 26 °C, mostrando desarrollo de hojas, color y forma indistinguibles de las del tipo silvestre. Sin embargo, se formaron tricomas largos en la superficie adaxial de las hojas que fueron fácilmente observables a simple vista. La aparición del último rasgo (que está ausente de las plantas de tipo silvestre tanto sexuales como apomícticas) podría estar asociada con la represión de *PN_TGS1-like* en las hojas de las plantas transgénicas debido al uso del promotor constitutivo *Act1* de arroz. En los genotipos apomícticos, *PN_TGS1-like* se regula negativamente solo en los óvulos, mientras que la expresión en las hojas es equivalente a la observada en las plantas sexuales (Siena et al.,

2014b). Esto podría explicar la ausencia de tricomas largos en la superficie adaxial de las hojas tanto en plantas sexuales como apomícticas. Además, la desregulación de *PN_TGS1-like* causó una representación anormal de los núcleos gametofíticos en óvulos maduros. Estos núcleos atípicos podrían estar asociados con la existencia de uno o varios gametofitos con una morfología de tipo apospórico y/o representar un proceso de diferenciación erróneo, que implica la proliferación y/o cambios del destino del desarrollo celular. Desafortunadamente, no se dispone de métodos confiables destinados a estimar el nivel de ploidía dentro del gametofito femenino en *Paspalum*. Sin embargo, los análisis del desarrollo reproductivo femenino en las primeras etapas de desarrollo premeiótico/meiótico revelaron la aparición de células agrandadas con núcleos prominentes adyacentes a la CMM o a los productos meióticos. Estas células diferenciadas nunca ingresan en meiosis, según observamos en estadíos tempranos. La ausencia de eventos meióticos simultáneos en los óvulos inmaduros de las plantas antisentido apoya una naturaleza no reducida para los gametofitos/núcleos adicionales detectados en la etapa de antesis, aunque también podrían provenir del desarrollo de más de una megáspora legítima (reducida). También se detectaron gametofitos fg2 con la morfología típica de los sacos apospóricos, aunque estos fueron difíciles de encontrar en la orientación apropiada que permite observar la vacuola central. Nuestra interpretación es que tanto los SEA inmaduros como los gametofitos supernumerarios de las líneas antisentido ocurren en todas las orientaciones posibles, es decir, cuando las primeras etapas de los óvulos se ven desde un plano sagital (lateral), los SEM se detectan en los planos morfológicos frontales, pero los SEA se puede visualizar alternativamente en las perspectivas sagital, frontal o transversal. Ninguna de las líneas transformadas (antisentido) portaba la región de control de apomixis (ACR) en su genoma, como se demostró por la ausencia de un fragmento de *PPIASE* específico del ACR. Por lo tanto, la aparición del fenotipo reproductivo se puede asignar únicamente a la desregulación del gen *PN_TGS1-like*, y no a una capacidad intrínseca de las plantas estudiadas para la reproducción apomíctica. No se observaron proembriones en la etapa de preantesis/antesis, y los análisis de citometría de flujo de semillas revelaron que solo la vía reproductiva sexual permitía formar semillas en las plantas transgénicas. Los dos últimos hallazgos apuntan a la ausencia de partenogénesis y/o desarrollo de endospermo de los sacos supernumerarios. Sin embargo, se necesitarán más experimentos para probar esta hipótesis, como el control de la formación de proembriones después de la emasculación y el cruzamiento de las plantas en antisentido *PN_TGS1-like* con líneas mutantes/transformantes para el desarrollo autónomo del endospermo, entre otros. Los escasos valores de formación de

semillas llenas tanto para las plantas silvestres como antisentido pueden provenir de la autopolinización, que reduce el número de semillas en el germoplasma tetraploide sexual (Zilli et al., 2018), las condiciones desfavorables del invernadero, la expresión reducida de *PN_TGS1* o una combinación de todos estos factores.

A primera vista, la ausencia de híbridos BIII ($2n + n$) en la progenie de las plantas antisentido podría tomarse como una indicación de que los sacos embrionarios supernumerarios detectados en las plantas transgénicas se originaron a partir de eventos de meiosis, incluso cuando estos últimos no se identificaron en el análisis citoembriológico en las primeras etapas de desarrollo. Si los sacos embrionarios adicionales eran no reducidos, y sus óvulos no fueron capaces de partenogénesis, debería esperarse una mayor tasa de formación de BIII. Sin embargo, debemos considerar que la proporción de formación de híbridos BIII en *Paspalum* está influenciada por el tiempo de polinización (Martínez et al., 1994; Espinoza et al., 2002). La polinización en la antesis (la etapa utilizada aquí para producir el conjunto de semillas) genera una proporción insignificante de progenie BIII (1/97, ver Espinoza et al., 2002), incluso en apomícticos completos, en los que el porcentaje de óvulos que presentan sacos embrionarios no reducidos está cerca del 100%. La tasa de formación de BIII en ausencia total de partenogénesis nunca se analizó hasta el momento, ya que en *P. notatum* la aposporía y la partenogénesis nunca se desacoplan. El único registro que informa un aumento de la tasa de formación de BIII asociado a una disminución inducida de partenogénesis son los resultados reportados por Podio et al. (2014a), que utilizó tratamientos con 5-azacitidina para desmetilar el genoma completo de *Paspalum*. Al comparar los datos, se debe prestar atención a las proporciones: en Podio et al. (2014a) informan, que de 33 progenies no maternas, 8 eran híbridos BIII (24,24%, $0,1174 > P < 0,4263$); En este trabajo analizamos 100 ovarios, de los cuales ninguno era un híbrido BIII (0%, $0,000 > P < 0,0461$). Si bien los conjuntos de datos parecen significativamente diferentes, debe tenerse en cuenta el hecho de que la planta apomíctica natural utilizada por Podio et al. (2014a) era apomíctica obligada y forma gametas femeninas no reducidos en casi todos sus óvulos, y que en las plantas antisentido transgénicas generadas aquí solo un 22,45% - 24,21% de ellas presentan sacos embrionarios apospóricos. Se deben planificar análisis de citometría de flujo adicionales que involucren un mayor número de óvulos. Además, no podemos descartar que una modificación de la expresión de *TGS1* pueda afectar la fertilización de gametos no reducidos.

De los pocos genes candidatos de la apomixis previamente identificados por transcriptómica comparativa, genómica y genética reversa, solo el *MAP3K QUI GON JINN*

(*QGJ*) parece estar involucrado en el desarrollo de sacos embrionarios apospóricos (Mancini et al., 2018). Tanto *PN_TGS1-like* como *PN_QGJ* se expresan en la nucela del óvulo de *P. notatum* en la etapa premeiótica (Siena et al., 2014b; Mancini et al., 2018), pero mientras *PN_TGS1* se sobreexpresa en la nucela del óvulo de las plantas sexuales, *PN_QGJ* está sobreexpresado en el mismo lugar, pero en las plantas apospóricas. Curiosamente, la desregulación de *PN_QGJ* perjudica la formación de SEA en la nucela de un genotipo apomíctico obligado (Mancini et al., 2018). Por el contrario, aquí mostramos que la desregulación de *PN_TGS1-like* induce la formación de SEA-like en la nucela de genotipos sexuales. Estos resultados sugieren la existencia de dos vías antagónicas relacionadas con la megagametogénesis que operan en la nucela del óvulo de *Paspalum*, una de ellas induce la aposporia (controlada por *QGJ*, expresado solo en plantas apospóricas) y la otra la reprime (controlada por *TGS1*, expresada solo en plantas sexuales). La conexión entre estas vías podría analizarse adicionalmente determinando la expresión de *PN_QGJ* en líneas antisentido *PN_TGS1-like*, y viceversa. Los cruzamientos de las líneas antisentido y ARNi podrían usarse para analizar cuál de estas moléculas de control es dominante. Dado que tanto las plantas ARNi *PN_QGJ* como las antisentido *PN_TGS1-like* están disponibles en nuestro laboratorio, podemos realizar estas cruces para iniciar a relacionar las vías moleculares que controlan el desarrollo apospórico.

Se ha reportado solo un trabajo anterior (Zhao et al., 2017) que identifica una vía molecular que controla el número de sacos embrionarios maduros formados dentro del óvulo. Zhao y col. (2017) determinaron que los inhibidores de CDK de la clase KRP se expresan dentro de célula madre de la megáspora para restringir la inactivación del homólogo de RETINOBLASTOMA de *Arabidopsis* RBR1. Una función de RBR1 es la represión directa del factor de células madre WUSCHEL (WUS), un proceso necesario para permitir la entrada de la CMM en un destino meiótico. En los mutantes triples *rbr1* y *krp*, WUS se acumula ectópicamente en los meiocitos designados, induciéndolos a sufrir varias divisiones mitóticas antes de iniciar la meiosis. En consecuencia, se forman múltiples sacos embrionarios reducidos dentro del óvulo. La reducción de WUS en mutantes *rbr1* restaura la formación de un solo meiocito y un solo saco embrionario derivado. Curiosamente, la ovocélula/célula central de los sacos embrionarios supernumerarios reducidos formados en la triple mutante *rbr1* y *krp* fallan parcialmente en experimentar plasmogamia con células espermáticas, sugiriendo que la vía molecular controlada por KRP también está involucrada en el proceso de fertilización. A diferencia del caso de RBR1 y KRP, *PN_TGS1-like* actuaría evitando que las células

adyacentes a la célula madre de la megáspora adopten un destino de línea germinal, en lugar de evitar que la CMM sufra una o más divisiones mitóticas previas a la división meiótica. Por lo tanto, aunque tanto la supresión de RBR1/KRP como la de PN_TGS1 conducen a la formación de sacos supernumerarios, ambos genes parecen desencadenar diferentes mecanismos de control, igualmente necesarios para garantizar que la planta que se reproduce sexualmente forme un solo embrión que dispondrá de todo el tejido nutritivo (es decir, el endospermo). Mientras tanto, en mutantes que tienen una expresión defectuosa de *ARGONAUTE 9 (AGO9)*, se describió también (como en el caso de PN_TGS1) la formación de gametas supernumerarias a partir de células de la nucela (Olmedo-Monfil et al., 2010). Sin embargo, las mutantes *ago9* no forman sacos embrionarios maduros completos, incluso cuando varias células de la línea germinal se diferencian de las células nucelares. En el futuro cercano, será de interés explorar el vínculo funcional entre *AGO9* y *PN_TGS1-like*, ya que ambos genes intervienen en la regulación de la actividad de ciertos miRNA (Martínez et al., 2017).

La apomixis se ha considerado durante mucho tiempo un rasgo valioso desde la perspectiva del fitomejoramiento, ya que permite la fijación del vigor híbrido (Hanna, 1995). De hecho, el uso combinado de la apomixis y la sexualidad en los programas de reproducción permite la generación rápida de genotipos superiores, cuya heterosis se puede fijar y heredar permanentemente a través de semillas (Spillane et al., 2004). Actualmente, este tipo de esquemas de reproducción se están aplicando en América para mejorar gramíneas forrajeras apomícticas naturales de los géneros *Paspalum* y *Brachiaria* (Acuña et al., 2007, 2009, 2011; Quesenberry et al., 2010; Barrios et al., 2013). El éxito de esta metodología ha acelerado la producción de cultivares híbridos adaptados y está impulsando rápidamente la ganadería en áreas que tradicionalmente habían sido consideradas marginales. Por otra parte, en la última década se han desarrollado estrategias moleculares avanzadas para permitir la producción de semillas clonales artificiales en el arroz, imitando las consecuencias del desarrollo apomíctico (Khanday et al., 2019; Wang et al., 2019). El concepto de que la apomixis podría ser inducida en especies de cultivos mayores sexuales se vuelve aún más interesante cuando se consideran las hipótesis planteadas recientemente que apuntan a que ambos modos reproductivos tienen un origen polifénico (Albertini et al., 2019), ya que la identificación de un interruptor de desarrollo perdido por las especies sexuales a través de la evolución podría permitir pasar de una ruta reproductiva a la otra a voluntad. En este contexto, la identificación y caracterización de moléculas como *PN_TGS1-like*, que pueden usarse solas o en combinación para inducir

alteraciones particulares en el desarrollo de los gametofitos, representa un paso importante hacia una modulación efectiva del modo reproductivo con consecuencias para el mejoramiento.

VI.2- Determinación de transcritos que presentan variantes de clivado y empalme del ARN en flores de plantas de *P. notatum*, y estudio del posible blanco de *PN_TGS1-like*

Se analizó la representación de variantes de *splicing* en el transcriptoma floral de referencia Roche 454 de plantas apomícticas y sexuales (Ortiz et al., 2017), para determinar si la ausencia de actividad del gen *PN_TGS1-like* en órganos reproductivos de plantas apomícticas estaba correlacionada con alteraciones en el clivado y empalme de algunos genes. Mediante diferentes análisis bioinformáticos (alineamientos de secuencias, blastx entre las bases no redundantes del NCBI), se estudiaron 316 transcritos diferencialmente expresados entre plantas apomícticas y sexuales, todos ellos con un FDR < 6,74 E-10. Luego del análisis individual de cada uno de ellos, seis fueron seleccionados para ser examinados en varias plantas sexuales y apomícticas, debido a que detectamos en esos transcritos la presencia de variantes de *splicing* que estaban también presentes en los ortólogos de esos genes en otras especies. Según los datos recabados *in silico*, los isotigs 10779, 23387 y 22343 presentaban intrones no procesados en plantas sexuales mientras que los isotigs 22630, 11548 y 24572 presentaban un intrón no procesado en plantas apomícticas. De todos estos isotigs, el único que pudo ser confirmado experimentalmente con base estadística como una variante de *splicing* diferencialmente expresada entre plantas apomícticas y sexuales fue el 23387. Además confirmamos que la variante no procesada del isotig 23387 está menos expresada en las plantas transgénicas E.2.9 y E2.13 con respecto a la planta control sexual Q4188. Esto prueba que el gen *TGS1-like* controla el *splicing* alternativo de al menos un transcripto, el isotig 23387, que puede ser considerado uno de sus posibles blancos. De todos modos, se necesitarán más experimentos para confirmar la relación entre *PN_TGS1* y el transcripto 23387, como analizar la expresión de la variante no procesada del isotig 23387 en la planta en antisentido E2.14 (que aún no ha florecido) y en mutantes defectivas de *A. thaliana tgs1-like*. Ese isotig, al igual que el isotig 11548, corresponde a un gen que codifica un componente del complejo de captación de luz asociado al fotosistema I (LHCA1, *PHOTOSYSTEM I LIGHT HARVESTING COMPLEX GENE 1*) (Wientjes y Croce, 2011). Aunque 23387 no exhibe una anotación relacionada con la reproducción, es un candidato interesante sobre todo considerando los últimos informes que relacionan a la cadena de transporte de electrones fotosintética con la regulación del *splicing* alternativo (Petrillo et al., 2014; Godoy Herz et al., 2019). En *Arabidopsis*, *LHCA1* presenta 4 variantes de *splicing* (AT3G54890.1, AT3G54890.2, AT3G54890.3 y AT3G54890.4). La variante sexual de *P. notatum* es homóloga a la variante de *splicing* 4 de *A. thaliana*. Por el contrario, la

variante apomíctica es homóloga a la variante 1. El gen AT3G54890 se expresa en estomas, tricomas, células de la epidermis de la raíz, hojas, óvulos y embriones inmaduros.

Por otra parte, mutantes del desarrollo de *A. thaliana* con defectos en estomas (células de la guarda) y tricomas fueron asociadas con una expresión diferencial del gen *LHCA1* (Gilding y Marks, 2010). Un estudio de los transcriptomas de tricomas de plantas mutantes *gl3-sst* (estos tricomas raramente terminan la expansión y el engrosamiento de la pared celular) mostró que la expresión de AT3G54890 (*LHCA1*) estaba reducida casi cinco veces (p-value: 0,02219) respecto a plantas control. Esto sugiere que *LHCA1* está asociado directa o indirectamente a alguna de las seis etapas en las que se divide el desarrollo de tricomas en *Arabidopsis thaliana* (Esch et al., 2003). A su vez el gen *TGS1-like* no fue detectado en la mutante *gl3-sst*, confirmando que podría existir una asociación funcional entre ambos genes. Es interesante el hecho de que las plantas transformantes *tgs1-like* generadas en esta tesis muestran abundantes tricomas en sus hojas, ausentes en las plantas control. Para analizar en qué etapa de la vía de desarrollo de tricomas está implicado *TGS1*, y relacionarlo con el isotig 23387, se debería en el futuro estudiar los genes que participan en esta ruta en hojas de las plantas transgénicas *tgs1-like*.

VI.3- Construcción de bibliotecas del transcriptoma floral reflejando estadios consecutivos del desarrollo en plantas apomícticas y sexuales. Análisis de expresión de *PN_TGS1-like* y de otros miembros de la maquinaria de *splicing*

El desarrollo del primer transcriptoma floral de referencia, ensamblado *de novo* a partir de lecturas largas FLX Roche 454 de *Paspalum notatum* sexual y apomíctico (Ortiz et al., 2017) dio pie a nuevas oportunidades para la investigación de las bases moleculares que controlan la transición entre la apomixis apospórica y la sexualidad (Ortiz et al., 2017). Estas bases transcriptómicas brindaron información clave para comprender los posibles genes involucrados en la vía apospórica, generando un marco teórico sobre el cual estudiar sus bases moleculares. Si bien las bibliotecas de referencia FLX Roche 454 son útiles para rescatar las secuencias completas sólidamente ensambladas de un número considerable de genes candidatos, su uso como herramienta para revelar expresión diferencial es más limitado, ya que el alto costo de secuenciación condiciona la generación de las réplicas necesarias para un análisis estadístico confiable y obliga al agrupamiento de material genético proveniente de distintos estadios de desarrollo. Así, numerosas representaciones contrastantes pueden resultar enmascaradas, debido a: 1) la profundidad limitada de la técnica utilizada; 2) la mezcla de estadios, que borra los rastros de cualquier expresión heterocrónica en muestras sexuales y apomícticas; y/o 3) la disminución de lecturas de transcritos que aparecen en una etapa de desarrollo muy particular y/o células individuales, debido a la agrupación obligatoria del material proveniente de diferentes estadios. Para lograr una evaluación precisa de la expresión diferencial, se deben utilizar enfoques de cobertura más profundos, como la secuenciación de Illumina, que deben ser aplicados a muestras colectadas en estadios particulares.

La construcción de bases de datos generadas estadio por estadio, usando una tecnología de muy alto rendimiento (Illumina TruSeq/HiSeq 1500), nos permitió aumentar el número de transcritos totales secuenciados y el número de réplicas biológicas utilizadas, posibilitando de esta manera un análisis más profundo de la expresión génica, con base estadística. Además, esta tecnología permite la diferenciación de la hebra sentido de la antisentido, simplificando la identificación de lnc-RNAs y transcritos expresados a partir de pseudogenes, que pueden estar actuando en fenómenos de silenciamiento. Construimos diferentes bibliotecas, representando cuatro estadios de desarrollo (premeiosis, meiosis, postmeiosis y antesis), tanto en genotipos apomícticos como sexuales, lo que nos permitió discriminar a los transcritos expresados en etapas específicas de gran importancia para el

desarrollo de la apomixis, como la apomeiosis y la partenogénesis. El transcriptoma floral producido por lecturas largas publicado por Ortiz et al. (2017), que ostenta un ensamblado muy sólido, se usó como referencia para ensamblar con precisión los datos obtenidos por secuenciación con lecturas cortas (Illumina). Si bien la tecnología Illumina presenta una cobertura profunda, lo que la convierte en el método de elección para la cuantificación certera de transcriptos diferencialmente expresados, la escasa extensión de las lecturas no permite realizar ensamblados *de novo* de calidad, por lo que la existencia previa de un transcriptoma de referencia resulta de gran importancia. Por otra parte, nuestro grupo de investigación ya había identificado en la década anterior varias secuencias de genes diferencialmente expresados en flores de plantas apomícticas y sexuales por análisis transcriptómico diferencial (Laspina et al., 2008). Algunos de estos candidatos se localizan específicamente en la región genómica que controla la apomixis en esta especie (ACR). La disponibilidad de los transcriptomas 454 e Illumina nos permitió conocer la secuencia completa de todos los alelos/parálogos/variantes de *splicing* expresados en los diferentes estadios de desarrollo de la flor, una información de fundamental importancia para caracterizar con más exactitud las diferencias previamente detectadas.

La disponibilidad de la base de datos de secuencias que se generó permitirá la caracterización de numerosos genes responsables de importantes vías metabólicas y/o biológicas y su transferencia a diferentes entornos genéticos por cruzamiento tradicional o ingeniería genética. Además, nuestro grupo de trabajo ha establecido una plataforma de transformación biolística para *P. notatum* tetraploide (Mancini et al., 2014), una herramienta que es muy útil para estudiar funcionalmente los genes candidatos relacionados con la reproducción, que surgen a partir de toda la información generada de la secuenciación del ARN.

Dado que el gen candidato para la apomixis estudiado en esta tesis (*TGS1*) participa del ensamblado de la maquinaria de clivado y empalme, decidimos utilizar los transcriptomas florales, el de referencia reportado por Ortiz et al. (2017) y el generado recientemente por secuenciación Illumina (Podio et al., en preparación), para analizar éste y otros transcriptos diferencialmente expresados entre plantas apomícticas y sexuales implicados en el procesamiento del ARNm y *splicing* del ARN. En el transcriptoma floral Roche 454, se localizaron 24 transcriptos con diferente expresión en plantas apomícticas y sexuales. Catorce de ellos estaban más representados en plantas apomícticas y diez en plantas sexuales. Además ocho transcriptos no presentaron ninguna lectura en las librerías sexuales, mientras que otros tres isotigs no se encontraron en las plantas apomícticas. Corroboramos la expresión

de esos 24 transcritos en la base de datos Illumina, y hallamos que algunos de ellos presentaban diferencias entre plantas sexuales y apomícticas en todos los estadios estudiados, mientras que para otros sólo había diferencias de expresión en algún estadio en particular. Además en la base de datos Illumina, pudimos identificar otros genes que presentaban diferencias de expresión entre plantas apomícticas y sexuales, debido a la mayor profundidad que presenta este tipo de secuenciación. Por otra parte, se identificaron catorce genes diferencialmente expresados entre plantas apomícticas y sexuales que interaccionan con *TGS1-like* y están implicados en el procesamiento del ARNm y *splicing*. Los ortólogos a los genes de *P. notatum* en *A. thaliana* que interaccionan con *TGS1-like* son: AT1G20580, AT2G43810, AT1G03330, AT4G03120, AT2G47640, AT4G02840, AT1G44910, AT5G51300, AT1G31870, AT1G60200, AT4G36690, AT1G60900, AT5G09860 y AT5G16780. Se han descrito en *S. cerevisiae* varias proteínas relacionadas funcionalmente con *TGS1 in vivo* (Hausmann et al., 2008; Qiu et al., 2011), entre ellas Mud2 y Nam8, que interaccionan fuertemente con TGS1 y provocan letalidad embrionaria (Qiu et al., 2011). Mud2 es homólogo a U2AF65 (*metazoan splicing factor*), corresponde al gen AT4G36690 de *A. thaliana* (*U2 snRNP auxiliary factor, large subunit, splicing factor*) y está más expresado en plantas apomícticas con respecto a las sexuales en ambas bases de datos (Roche454 e Illumina).

VI.4- Identificación de la secuencia completa del gen *PN_TGS1-like* en el genoma de *Paspalum notatum*

En los genomas de levaduras, mamíferos y *Drosophila* existe una sola copia de *TGS1* (*TRIMETILGUANOSINA SINTASA 1*). Por otro lado, los genomas de plantas contienen al menos dos genes diferentes que codifican proteínas similares a *TGS1*. El primero, que se conserva en todos los eucariotas, incluye sólo el dominio metiltransferasa (como GRMZM2G151887, OS06T0187100 y AT1G30550, respectivamente en maíz, arroz y *A. thaliana*), mientras que el segundo, al que llamamos *TGS1-like*, es una forma exclusiva de plantas, más larga en el extremo 5' terminal, e incluye el dominio de ARN metiltransferasa asociado con un dominio WW, el cual está involucrado en interacciones proteína-proteína (GRMZM2G347808, OS03T0396900 y AT1G45231, respectivamente en maíz, arroz y *A. thaliana*) (Siena et al., 2014b). Más aún, el *TGS1* de humanos también tiene una secuencia más larga en el extremo 5', como ocurre en las plantas, pero no codifica para un dominio WW (Gao et al., 2017).

Aprovechando la existencia de bases de datos genómicos recientemente generadas en nuestro laboratorio (genotipo R1: 2x, sexual con apomixis vestigial), recuperamos todas las lecturas homólogas para *PN_TGS1* y luego de realizar el ensamblado detectamos un solo contiguo para este gen. Hasta el momento, y con la cobertura que disponemos (100x para la secuenciación Illumina y 48x para la tecnología Nanopore), podemos decir que en el genoma de *P. notatum* diploide sexual existe solamente una copia para *TGS1*, y esta copia contiene el dominio WW (*PN_TGS1-like*), a diferencia de lo que se observa en otras plantas como maíz, arroz y *A. thaliana* que presentan tanto el gen canónico de todos los eucariotas *TGS1* como el *TGS1-like*. Las implicancias de la existencia de una copia única del gen *TGS1* en el genoma debería ser investigada en genotipos apospóricos y en otras especies apospóricas, además de *P. notatum*.

Además de las secuencias genómicas del genotipo R1 (2x, sexual con apomixis vestigial), se están secuenciando las secuencias genómicas de otros genotipos, Q4188 (4x, sexual), Q3646 (4x, apomíctico facultativo), Q4117 (4x, apomíctico full) usando una combinación de las técnicas Illumina HiSeq y Oxford Nanopore y están disponibles en el servidor informático del IICAR, CONICET-UNR (Rosario, Argentina) e IRD (Montpellier, Francia) (Juan Pablo Ortiz, comunicación personal). La ACR está siendo identificada en los genotipos apomícticos por mapeo *in silico* con sondas 100% ligadas al carácter. En estudios posteriores,

se determinará por análisis de BLAST si una o más copias de *TGS1-like* está/n localizada/s dentro de la ACR (no se ha logrado establecer una asociación entre TGS1 y la ACR por mapeo genético, por falta de marcadores moleculares informativos) y se recuperará su secuencia completa. Además, una vez que dispongamos de las coberturas necesarias para las secuencias genómicas de todos los genotipos secuenciados, se analizarán las secuencias de *TGS1* en *P. notatum* apomítico y sexual y se verificará si en los genomas de esta gramínea están presentes las dos copias del gen, como se observan en otras especies de plantas, o si solo existe el *TGS1-like*.

VI.5- El gen *PN_TGS1-like* no es silenciado postranscripcionalmente por pequeños ARNs en plantas apomícticas

En plantas apomícticas el gen *TGS1* está inhibido naturalmente, como lo reportaron Siena et al. (2014b), y como fue confirmado en el objetivo 3, en donde luego de analizar la expresión de *TGS1* en transcriptoma floral estadio por estadio, se vio que el gen estaba más expresado en plantas sexuales. La evidencia reciente surgida a partir de estudios en especies modelo y no modelo sugiere que la apomixis podría estar modulada por mecanismos epigenéticos que involucran ARN pequeños (sRNA). Ortiz et al. (2019) describieron los sRNAs florales presentes genotipos de *Paspalum notatum* apomícticos y sexuales, información que resulta útil para identificar las vías moleculares bajo control epigenético involucradas en la transición sexualidad-apomixis. En este trabajo de tesis, se analizaron las bibliotecas florales de sRNA de *P. notatum* y no se encontraron pequeños ARN asociados al gen *TGS1-like*, por lo que concluimos que el gen no está siendo silenciado por mecanismos postranscripcionales en las plantas apomícticas. La expresión disminuida de este gen en plantas apomícticas puede deberse a una regulación diferencial mediada por factores de transcripción, o a otro tipo de regulación postranscripcional.

CONCLUSIONES

VII- CONCLUSIONES

Nuestros resultados indican que una disminución de la expresión de *PN_TGS1-like* en plantas sexuales de *Paspalum* tiene poco efecto en el desarrollo somático (excepto por el desarrollo de tricomas en la superficie de las hojas) y en la reproducción masculina. Sin embargo, se observa un retraso en la floración, inflorescencias anómalas y aparición de sacos embrionarios de tipo apospórico en aproximadamente un 15% de los óvulos analizados. El 32% de los óvulos en etapas tempranas del desarrollo muestran células similares a las iniciales de la aposporia que rodean a la célula madre de la megáspora, que no inician divisiones meióticas. Entre los óvulos maduros (en antesis), se observa una proporción de 0,22 (0,16 <P> 0,30) que contienen sacos similares a SEAs, posiblemente originados a partir de las AIs observadas en estadíos tempranos. Supuestamente estos sacos serían no reducidos, ya que nunca se observaron meiosis contiguas en estadíos tempranos. Entre los sacos maduros que contienen SEAs, una proporción considerable (cerca del 40%) carece de SEM, lo que sugiere una diferencia en la competitividad entre ambos tipos de sacos. No se observan proembriones en las líneas antisentido, en preantesis ni en antesis, lo que apunta a la falta de partenogénesis, ya que estos proembriones se detectan comúnmente en las plantas apospóricas de *P. notatum* antes de la fertilización de los núcleos polares (pseudogamia). Todas las semillas derivadas de la línea antisentido E2.9 se originan por sexualidad, lo que indica que los sacos similares a SEAs no completan el proceso de apomixis (i.e. confirma que no llevan adelante partenogénesis o no logran desarrollar endosperma viable).

Además, existen al menos cinco genes diferencialmente expresados en flores de plantas apomícticas y sexuales de *P. notatum* que presentan un clivado y empalme alternativo en sus intrones. Solamente para uno de ellos, *Chlorophyll a-b binding protein 1B-21* (CHLORO), se corroboró que el *splicing* diferencial está correlacionado con el modo de reproducción, ya que el alelo que porta el intrón fue más abundante en plantas sexuales que en apomícticas. CHLORO codifica para una proteína LHCA1 (*Chlorophyll a-b binding protein 1B-21*) en *Arabidopsis*. Nuestros resultados indican que *TGS1-like* participa del proceso de *splicing* y uno de sus genes blancos es el gen *Chlorophyll a-b binding protein 1B-21*. Además localizamos otros genes del

splicing con actividad diferencial en el proceso de apomixis, que conforman una red de interacciones entre ellos y con *TGS1-like*. Catorce de ellos interaccionan directamente con *TGS1-like*. Se confirmó que *TGS1-like* no está siendo silenciado postranscripcionalmente por snRNA y que *P. notatum* presenta una sola copia de TGS1 representada por dos variantes de transcritos en plantas apomícticas y sexuales.

BIBLIOGRAFÍA

VIII- BIBLIOGRAFÍA

- Abovich N, Liao XC, Rosbash M (1994) The yeast *MUD2* protein: an interaction with *PRP11* defines a bridge between commitment complexes and U2 snRNP addition. *Genes Dev.* 8: 843–854.
- Acuña CA, Blount AR, Quesenberry KH, Hanna WW, Kenworthy KE (2007) Reproductive characterization of bahiagrass germplasm. *Crop Science* 47: 1711-1717.
- Acuña CA, Blount AR, Quesenberry KH, Kenworthy KE, Hanna WW (2009) Bahiagrass tetraploid germplasm: Reproductive and agronomic characterization of segregating progeny. *Crop Science* 49: 581-588.
- Acuña CA, Blount AR, Quesenberry KH, Kenworthy KE, Hanna WW (2011) Tetraploid bahiagrass hybrids: Breeding technique, genetic variability and proportion of heterotic hybrids. *Euphytica* 179: 227-235.
- Agashe B, Prasad CK, Siddiqi I (2002) Identification and analysis of DYAD: a gene required for meiotic chromosome organisation and female meiotic progression in Arabidopsis. *Development (Cambridge, England)* 129: 3935-43.
- Akiyama Y, Conner JA, Goel S, Morishige DT, Mullet JE, Hanna WW, Ozias-Akins P (2004) High-resolution physical mapping in *Pennisetum squamulatum* reveals extensive chromosomal heteromorphism of the genomic region associated with apomixis. *Plant Physiol* 134: 1733-1741.
- Akiyama Y, Goel S, Conner JA, Hanna WW, Yamada-Akiyama H, Ozias-Akins P (2011) Evolution of the apomixis transmitting chromosome in *Pennisetum*. *BMC evolutionary biology* 11: 289.
- Akiyama Y, Hanna WW, 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 17. *Theor.Appl.Genet.* 111: 1042-1051.
- Albertini E, Barcaccia G, Carman JG, Pupilli F (2019) Did apomixis evolve from sex or was it the other way around?. *Journal of experimental botany* 70: 2951-2964.

-
- Albertini E, Marconi G, Barcaccia G, Raggi L y Falcinelli M (2004) Isolation of candidate genes for apomixis in *Poa pratensis*. *Plant Molecular Biology* 56:879-894.
- Albertini E, Marconi G, Reale L, Barcaccia G, Porceddu A, Ferranti F, Falcinelli M (2005) *SERK* and *APOSTART*. Candidate genes for apomixis in *Poa pratensis*. *Plant Physiol* 138: 2185-2199.
- Albertini E, Porceddu A, Ferranti F, Reale L, Barcaccia G, Romano B, Falcinelli M (2001) Apospory and parthenogenesis may be uncoupled in *Poa pratensis*: a cytological investigation. *Sexual Plant Reproduction* 14: 213-217.
- Alexander MP (1980) Differential staining of aborted and non- aborted pollen. *Stain Technol* 44: 117-122.
- Aliscioni S (2002) Contribución a la Filogenia del Género *Paspalum* (Poaceae: Panicoideae: Paniceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 89: 504-523.
- Amiteye S, Corral JM, Vogel H, Sharbel TF (2011) Analysis of conserved microRNAs in floral tissues of sexual and apomictic *Boechera* species. *BMC Genomics*. 12:500.
- Araujo ACG, Mukhambetzhannov S, Pozzobon MT, Santana EF, Carneiro VTC (2000) Female gametophyte development in apomictic and sexual *Brachiaria brizantha* (Poaceae). *Rev Cytol Biol Veg – Le Botaniste Tome XXIII*: 13–28.
- Asker SE, Jerling L (1992) Apomixis in plants. *CRC Press*.
- Barcaccia G, Albertini E (2013) Apomixis in plant reproduction: a novel perspective on an old dilemma. *Plant reproduction* 26: 159-179.
- Barcaccia G, Varotto S, Meneghetti S, Albertini E, Porceddu A, Parrini P, Lucchin M (2001) Analysis of gene expression during flowering in apomeiotic mutants of *Medicago* spp.: cloning of ESTs and candidate genes for 2n eggs. *Sexual Plant Reproduction* 14: 233-238.
- Barrios SCL, Do Valle CB, Alves GF, Simeão RM, Jank L (2013) Reciprocal recurrent selection in the breeding of *Brachiaria decumbens*. *Trop. Grasslands-Forrajes Trop*. 1: 52–54.
- Berger F, Hamamura Y, Ingouff M, Higashiyama T (2008) Double fertilization - caught in the act. *Trends Plant Sci* 13: 437-443.
- Bicknell R, Catanach A, Hand M, Koltunow A (2016) Seeds of doubt: Mendel's choice of *Hieracium* to study inheritance, a case of right plant, wrong trait. *Theoretical and applied genetics* 129: 2253-2266.
- Bicknell RA, Borst NK, Koltunow AM (2000) Monogenic inheritance of apomixis in two *Hieracium* species with distinct developmental mechanisms. *Heredity* 84: 228-237.

-
- Boisson-Dernier A, Frietsch S, Kim TH, Dizon MB, Schroeder JI (2008) The Peroxin Loss-of-Function Mutation abstinence by mutual consent Disrupts Male-Female Gametophyte Recognition. *Current Biology* 18: 63-68.
- Bourc'his D, Voinnet O (2010) A small-RNA perspective on gametogenesis, fertilization, and early zygotic development. *Science* 330: 617-622.
- Brukhin V (2017) Molecular and genetic regulation of apomixis. *Russian Journal of Genetics* 53: 943-964.
- Burton GW (1967) A search for the origin of Pensacola bahiagrass. *Econ Bot* 21: 379-382.
- Calderini O, Chang SB, de Jong H, Busti A, Paolucci F, Arcioni S, de Vries SC Abma-Henkens MHC, Klein Lankhorst RN, Donnison IS, Pupilli F (2006) Molecular cytogenetics and DNA sequence analysis of an apomixis-linked BAC in *Paspalum simplex* reveal a non pericentromere location and partial microcolinearity with rice. *Theor.Appl.Genet.* 112: 1179-1191.
- Carballo J, Santos BACM, Zappacosta D, Garbus I, Selva JP, Gallo CA, Díaz A, Albertini E, Caccamo M, Echenique V (2019) A high-quality genome of *Eragrostis curvula* grass provides insights into Poaceae evolution and supports new strategies to enhance forage quality. *Sci Rep.* 9:10250.
- Carman JG (1997) Asynchronous expression of duplicate genes in angiosperms may cause apomixis, bispority, tetraspority, and polyembryony. *Biological Journal of the Linnean Society* 61: 51-94.
- Carman JG (2007) Do duplicate genes cause apomixis?. Apomixis: evolution mechanisms Perspectives researchgate.net.
- Carman JG, Jamison M, Elliott E, Dwivedi KK, Naumova TN (2011) Apospority appears to accelerate onset of meiosis and sexual embryo sac formation in sorghum ovules. *BMC Plant Biology* 11: 9.
- Catanach AS, Erasmuson SK, Podivinsky E, Jordan BR, Bicknell R (2006) Deletion mapping of genetic regions associated with apomixis in *Hieracium*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 103: 18650.
- Chase A (1929) The North American species of *Paspalum*. *Cont. U.S. Natl. Herb.* 28: 1-310.
- Chase A (1939) *Paspalum* of South America. Unpublished manuscript. Hitchcock and Chase Library, Botany Department Smithsonian Institution, Washington DC.

-
- Colau G, Thiry M, Leduc V, Bordonné R, Lafontaine DLJ (2004) The small nucleolar RNA cap trimethyltransferase is required for ribosome synthesis and intact nucleolar morphology. *Mol Cell Biol* 24: 7976-7986.
- Colono C, Ortiz JPA, Permingeat HR, Souza Canada ED, Siena LA, Spoto N, Galdeano F, Espinoza F, Leblanc O, Pessino SC. (2019). A plant-specific *TGS1* homolog inhibits the formation of multiple embryo sacs in sexual tetraploid *Paspalum notatum* ovules. *Front. Plant Sci.* 10:1566.
- Conner JA, Goel S, Gunawan G, Cordonnier-Pratt MM, Johnson VE, Liang C, Wang H, Pratt L, Mullet J, Debarry J, Yang L, Bennetzen J, Klein P, Ozias-Akins P (2008) Sequence analysis of bacterial artificial chromosome clones from the apospory-specific genomic region of *Pennisetum* and *Cenchrus*. *Plant Physiol* 147: 1396-1411.
- Conner JA, Mookkan M, Huo H, Chae K, Ozias-Akins P (2015) A parthenogenesis gene of apomict origin elicits embryo formation from unfertilized eggs in a sexual plant. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112: 11205-11210.
- Conner JA, Podio M, Ozias-Akins P (2017) Haploid embryo production in rice and maize induced by *PsASGR-BBML* transgenes. *Plant reproduction* 30: 41-52.
- Crane CF (2001) Classification of apomictic mechanisms. En Savidan, Y., Carman, J. G., Dresselhaus, T. (eds.), *The flowering of Apomixis: From mechanism to genetic engineering*, pp. 24-43. CIMMYT, Mexico, DF (Mexico).
- D'Erfurth I, Jolivet S, Froger N, Catrice O, Novatchkova M, Mercier RR (2009) Turning meiosis into mitosis. *PLoS biology* 7: e1000124.
- Daurelio DL, Espinoza F, Quarín CL, 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: 189–199.
- Del Gatto-Konczak F, Bourgeois CF, Le Guiner C, Kister L, Gesnel M, Stévenin J, Breathnach R (2000) The RNA-binding protein TIA-1 is a novel mammalian splicing regulator acting through intron sequences adjacent to a 5' splice site. *Mol. Cell. Biol.* 20: 6287–6299.
- do Valle C, Newsl CG (1993) Towards defining the inheritance of apomixis in *Brachiaria*. *Apomixis Newst.* 7: 42-43.
- Doell JC (1877) Paniceae. *In Flora Brasiliensis* vol. 2 no. 2, ed. C. F. P. Martius. Munich, Vienna: F. Fleischer, Monachii et Lipsiae. Pp. 33-358.

-
- Dujardin G, Lafaille C, de la Mata M, Marasco LE, Muñoz MJ, Le Jossic-Corcós C, Corcos L, Kornblihtt AR (2014) How Slow RNA Polymerase II Elongation Favors Alternative Exon Skipping. *Molecular Cell* 54: 683-690.
- Dujardin M, Hanna WW (1983) Apomictic and sexual pearl millet X Pennisetum squamulatum hybrids. *Journal of Heredity* 74: 277-279.
- Ebina M, Nakagawa H, Yamamoto T, Araya H, Tsuruta S, Takahara M, Nakajima K (2005) Co-segregation of AFLP and RAPD markers to apospory in Guinea grass (*Panicum maximum* Jacq.). *Grassland Science* 51: 71-78.
- Enünlü I, Pápai G, Cserpán I, Udvardy A, Jeang K, Borors I (2003) Different isoforms of PRIP-interacting protein with methyltransferase domain/ trimethylguanosine synthase localizes to the cytoplasm and nucleus. *Biochem Biophys Res Commun* 309:44-51.
- Esch JJ, Chen M, Sanders M, Hillestad M, Ndkium S, Idelkope B, Neizer J, Marks MD (2003) A contradictory GLABRA3 allele helps define gene interactions controlling trichome development in *Arabidopsis*. *Development* 130: 5885-5894.
- Espinoza F, Pessino SC, Quarín CL, Valle EM (2002) Effect of pollination timing on the rate of apomictic reproduction revealed by RAPD markers in *Paspalum notatum*. *Ann.Bot.* 89: 165-170.
- Fei X, Shi J, Liu Y, Niu J, Wei A (2019) The steps from sexual reproduction to apomixis. *Plant* 249: 1715-1730.
- Felitti SA, Seijo JG, González AM, Podio M, Laspina N V, Siena L, Ortiz JPA, Pessino SC (2011) Expression of *lorelei-like* genes in aposporous and sexual *Paspalum notatum* plants. *Plant Molecular Biology* 77: 337-354.
- Feng S, Jacobsen SE, Reik W (2010) Epigenetic reprogramming in plant and animal development. *Science* 330: 622-627.
- Filipowicz W, Pogačič V (2002) Biogenesis of small nucleolar ribonucleoproteins. *Current Opinion in Cell Biology* 14: 319-327.
- Fischer U, Lührmann R (1990) An essential signaling role for the m3G cap in the transport of U1 snRNP to the nucleus. *Science* 249: 786-790.
- Fong N, Kim H, Zhou Y, Ji X, Qiu J, Saldi T, Diener K, Jones K, Fu K, Bentley DL. (2014) Pre-mRNA splicing is facilitated by an optimal RNA polymerase II elongation rate. *Genes & development* 28: 2663-76.

-
- Forbes I Jr, GW Burton (1961) Cytology of diploids, natural and induced tetraploids, and intraspecies hybrids of bahiagrass, *Paspalum notatum* Flugge. *Crop Sci* 1: 402-406.
- Franke J, Gehlen J, Ehrenhofer-Murray A E (2008) Hypermethylation of yeast telomerase RNA by the snRNA and snoRNA methyltransferase TGS1. *J. Cell. Sci.* 121: 3553–3560.
- Galdeano F, Urbani MH, Sartor ME, Honfi AI, Espinoza F, Quarín CL (2016) Relative DNA content in diploid, polyploid, and multiploid species of *Paspalum* (Poaceae) with relation to reproductive mode and taxonomy. *Journal of Plant Research* 129: 697-710.
- Gao J, Wallis JG, Jewell JB, Browse J (2017) *Trimethylguanosine synthase 1 (TGS1)* is essential for chilling tolerance. *Plant Physiology* 174: 1713-1727.
- Garbus I, Romero JR, Selva JP, Pasten MC, Chinestra C, Carballo J, Zappacosta DC, Echenique V (2017) De novo transcriptome sequencing and assembly from apomictic and sexual *Eragrostis curvula* genotypes. *PLoS ONE* 12(11): e0185595.
- García R, Asíns MJ, Forner J, Carbonell EA (1999) Genetic analysis of apomixis in Citrus and Poncirus by molecular markers. *Theoretical and Applied Genetics* 99: 511-518.
- García-Aguilar M, Michaud C, Leblanc O, Grimanelli D (2010) Inactivation of a DNA methylation pathway in maize reproductive organs results in apomixis-like phenotypes. *The plant cell* 22: 3249-3267.
- Gates RN, Quarín CL, 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.
- Ghosh A, Lima CD (2010) Enzymology of RNA cap synthesis. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* 1:1-7.
- Gifford EM, Foster AS (1989) *Morphology and evolution of vascular plants* / Ernest M. Gifford, Adriance S. Foster. WH Freeman and Company.
- Gilding EK, Marks MD (2010) Analysis of purified *glabra3-speshifter* trichomes reveals a role for NOECK in regulating early trichome morphogenic events. *Plant Journal* 64: 304-317.
- Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular cloning- A laboratory manual* (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Giussani LM, Zuloaga FO, Quarín CL, Cota-Sánchez H, Ubayasena K, Morrone O (2009) Phylogenetic relationships in the genus *Paspalum* (Poaceae: Panicoideae: Paniceae): an assessment of the Quadrifaria and Virgata informal groups. *Systematic Botany* 34: 32–43.

-
- Godoy Herz MA, Kornblihtt AR (2019) Alternative splicing and transcription elongation in plants. *Frontiers in Plant Science* 10: 309.
- Godoy Herz MA, Kubaczka MG, Brzyżek G, Servi L, Krzyszton M, Simpson C, Brown J, Swiezewski S, Petrillo E, Kornblihtt AR (2019) Light Regulates Plant Alternative Splicing through the Control of Transcriptional Elongation. *Molecular Cell* 73: 1066-1074.e3.
- Gottschalk A, Tang J, Puig O, Salgado J, Neubauer G, Colot HV, Mann M, Séraphin B, Rosbash M, Lührmann R, Fabrizio P (1998) A comprehensive biochemical and genetic analysis of the yeast U1 snRNP reveals five novel proteins. *RNA*. 4: 374–393.
- Grimanelli D (2012) Epigenetic regulation of reproductive development and the emergence of apomixis in angiosperms. *Current Opinion in Plant Biology* 15: 57-62.
- Grimanelli D, Leblanc O, Espinosa E, Perotti E, Gonzalez de LD, Savidan Y (1998) Mapping diplosporous apomixis in tetraploid *Tripsacum*: one gene or several genes? *Heredity* 80: 33-39.
- Grimanelli D, Leblanc O, Perotti E, Grossniklaus U (2001) Developmental genetics of gametophytic apomixis. *Trends Genet.* 17: 597-604.
- Grossniklaus U, Nogler GA, Van Dijk PJ (2001) How to avoid sex: The genetic control of gametophytic apomixis. *The Plant Cell*. 13: 1491-1497.
- Gustafsson A (1946) Apomixis in higher plants.
- Hand ML, Koltunow AMG (2014) The genetic control of apomixis: asexual seed formation. *Genetics* 197: 441-450.
- Hanna WW (1995) Use of Apomixis in Cultivar Development. En *Advances in Agronomy*, pp. 333-350.
- Hanna WW, Bashaw EC (1987) Apomixis: its identification and use in plant breeding. *Crop Sci* 27: 1136-1139.
- Hausmann S, Zheng S, Costanzo M, Brost RL, Garcin D, Boone C, Shuman S, Schwer B (2008) Genetic and biochemical analysis of yeast and human cap trimethylguanosine synthase: Functional overlap of 2,2,7-trimethylguanosine caps, small nuclear ribonucleoprotein components, pre-mRNA splicing factors, and RNA decay pathways. *Journal of Biological Chemistry* 283: 31706-31718.
- Hernández-Lagana E, Rodríguez-Leal D, Lúa J, Vielle-Calzada J-PP (2016) A multigenic network of *ARGONAUTE4* clade members controls early megaspore formation in *Arabidopsis*. *Genetics* 204: 1045-1056.

-
- Higashiyama T, Yabe S, Sasaki N, Nishimura Y, Miyagishima SY, Kuroiwa H, Kuroiwa T (2001) Pollen tube attraction by the synergid cell. *Science* 293: 1480-1483.
- Hojsgaard D, Klatt S, Baier R, Carman JG, Hörandl E (2014) Taxonomy and Biogeography of Apomixis in Angiosperms and Associated Biodiversity Characteristics. *Critical Reviews in Plant Sciences* 33: 414-427.
- Hörandl E, Hojsgaard D (2012) The evolution of apomixis in angiosperms: A reappraisal. *Plant Biosystems* 146: 681-693.
- Huang BQ, Russell SD (1992) Female Germ Unit: Organization, Isolation, and Function. *International Review of Cytology* 140: 233-293.
- Huber M, Hahn R, Hess D (2002) High transformation frequencies obtained from a commercial wheat (*Triticum aestivum* L. cv. 'Combi') by microbombardment of immature embryos followed by GFP screening combined with PPT selection. *Molecular Breeding* 10: 19-30.
- Iwamasa M, Ueno I, Nishiura M (1967) Inheritance of nucellar embryony in Citrus. *Bull Horticult Jpn Ser B* No. 7.
- Jessup RW, Burson BL, Burow GB, Wang YW, Chang C, Li Z, Paterson AH, Hussey MA (2002) Disomic Inheritance, Suppressed Recombination, and Allelic Interactions Govern Apospory in Buffelgrass as Revealed by Genome Mapping. *Crop Science* 42: 1688.
- Jia Y, Viswakarma N, Crawford SE, Sarkar J, Sambasiva Rao M, Karpus WJ, Kanwar YS, Zhu YJ, Reddy JK (2012) Early embryonic lethality of mice with disrupted transcription cofactor *PIMT/NCOA6IP/Tgs1* gene. *Mech Dev* 129:193-207.
- Johri B, Ambegaokar K, Srivastava P (1992) Comparative Embryology of Angiosperms. *Berlin: Springer*.
- Judziewicz E (1990) Poaceae. In: Görts-Van Rijn ARA. ed. Flora of the Guianas, Series A: Phanerogams, Vol. 8. Königstein: Koeltz Scientific Books, 1–127.
- Kapadia B, Viswakarma N, Parsa KVL, Kain V, Behera S, Suraj SK, Babu PP, Kar A, Panda S, Zhu Y, Jia Y, Thimmapaya B, Reddy JK, Misra P (2013) *ERK2*-Mediated Phosphorylation of Transcriptional Coactivator Binding Protein *PIMT/NCoA6IP* at Ser298 Augments Hepatic Gluconeogenesis. *PLoS ONE* 8: e83787.
- Kessler SA, Grossniklaus U (2011) She's the boss: Signaling in pollen tube reception. *Current Opinion in Plant Biology* 14: 622-627.
- Khanday I, Skinner D, Yang B, Mercier R, Sundaresan V (2019) A male-expressed rice embryogenic trigger redirected for asexual propagation through seeds. *Nature* 565: 91-95.

-
- Koltunow AM (1993) Apomixis: Embryo Sacs and Embryos Formed without Meiosis or Fertilization in Ovules. *The plant cell* 5: 1425-1437.
- Koltunow AM, Bicknell RA, Chaudhury AM (1995) Apomixis: molecular strategies for the generation of genetically identical seeds without fertilization. *Plant Physiology* 108: 1345-1352.
- Koltunow AM, Grossniklaus U (2003) Apomixis: a developmental perspective. *Annual Review of Plant Biology* 54: 547-574.
- Koltunow AM, Hidaka T, Robinson SP (1996) Polyembryony in Citrus: Accumulation of seed storage proteins in seeds and in embryos cultured in vitro. *Plant Physiology* 110: 599-609.
- Koltunow AM, Johnson SD, Okada T (2011) Apomixis in hawkweed: Mendel's experimental nemesis. *J.Exp.Bot.* 62: 1699-1707.
- Koltunow, A M, Ozias-Akins P, Siddiqi I (2013) Apomixis. In P. W. Bercraft (Ed.) Seed genomics (pp. 83–110). New York: Wiley.
- Komonyi O, Pápai G, Enünlü I, Muratoglu S, Pankotai T, Kopitova D, Maróy P, Udvardy A, Boros I (2005) DTL, the *Drosophila* homolog of PIMT/Tgs1 nuclear receptor coactivator-interacting protein/RNA methyltransferase, has an essential role in development. *J Biol Chem* 280:12397-12404.
- Kornberg RD (2007) The molecular basis of eukaryotic transcription. *P. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104: 12955–12961.
- Kumar S, Singh A (2016) Epigenetic regulation of abiotic stress tolerance in plants. *Adv Plants Agric Res* 5: e00179.
- Laspina N V, Vega T, Seijo JG, González AM, Martelotto LG, Stein J, Podio M, Ortiz JPA, Echenique CV, Quarín CL, Pessino SC (2008) Gene expression analysis at the onset of aposporous apomixis in *Paspalum notatum*. *Plant Molecular Biology* 67: 615-628.
- Law JA, Jacobsen SE (2010) Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nature Reviews Genetics* 11: 204-220.
- Leblanc O, 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* 126:49-58.

-
- Leblanc O, Duenas M, Hernandez M, Bello S, Garcia V, Berthaud J, Savidan Y (1995) Chromosome doubling in *Tripsacum*: the production of artificial, sexual tetraploid plants. *Plant breeding* 114: 226-230.
- León-Martínez G, Vielle-Calzada JP (2019) Apomixis in flowering plants: Developmental and evolutionary considerations. *En Current Topics in Developmental Biology*, pp. 565-604. Academic Press Inc.
- Li C, Williams MM, Loh YT, Lee GI, Howe GA (2002) Resistance of cultivated tomato to cell content-feeding herbivores is regulated by the octadecanoid-signaling pathway. *Plant Physiol* 130: 494-503.
- Linnaeus C (1759) *Systema naturae*, 10^o edición, Holmie, Impensis Direct, Laurentii Salvii ed., Estocolmo.
- Lippman Z, Gendrel A, Black M, Vaugn M, Dedhia N, Mccomble R, Lavine K, Mittal V, May B, Kasschau K, Carrington J, Doerge R, Colot V, and Martienssen R (2004) Role of transposable elements in heterochromatin and epigenetic control. *Nature* 430: 471–476.
- Liu DD, Dong QL, Sun C, Wang QL, You CX, Yao YX, Hao YJ (2012) Functional characterization of an apple apomixis-related *MhFIE* gene in reproduction development. *Plant science* 185: 105-11.
- Liu X, Castro C, Wang Y, Noble J, Ponvert N, Bundy M, Hoel C, Shpak E, Palanivelu R (2016) The Role of *LORELEI* in Pollen Tube Reception at the Interface of the Synergid Cell and Pollen Tube Requires the Modified Eight-Cysteine Motif and the Receptor-Like Kinase FERONIA. *The plant Cell* 28: 1035-1052.
- Lovell JT, Aliyu OM, Mau M, Schranz ME, Koch M, Kiefer C, Song B-H, Mitchell-Olds T, Sharbel TF (2013) On the origin and evolution of apomixis in *Boechera*. *Plant Reproduction* 26: 309–315.
- Maheshwari P (1950) An introduction to the embryology of angiosperms. (No. 582.130433). McGraw-Hill.
- Mallory A, Vaucheret H (2010) Form, function, and regulation of ARGONAUTE proteins. *Plant Cell* 22: 3879-3889.
- Mancini M, Permingeat H, Colono C, Siena L, Pupilli F, Azzaro C, de Alencar Dusi DM, Tavares de Campos Carneiro V, Podio M, Seijo JG, González AM, Felitti SA, Ortiz JPA, Leblanc O, Pessino SC (2018) The MAP3K-Coding *QUI-GON JINN (QGJ)* Gene Is Essential to the Formation of Unreduced Embryo Sacs in *Paspalum*. *Frontiers in Plant Science* 9: 1547.

-
- Mancini M, Woitovich N, Permingeat HR, Podio M, Siena LA, Ortiz JP, Pessino SC, Felitti SA (2014) Development of a modified transformation platform for apomixis candidate genes research in *Paspalum notatum* (bahiagrass). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 50: 412-424.
- Marimuthu MPA, Jolivet S, Ravi M, Pereira L, Davda JN, Cromer L, Wang L, Nogué F, Chan SWL, Siddiqi I, Mercier R (2011) Synthetic clonal reproduction through seeds. *Science* 331: 876.
- Martínez EJ, Espinoza F, Quarín CL (1994) BIII Progeny (2n + n) From Apomictic *Paspalum notatum* Obtained Through Early Pollination. *Journal of Heredity* 85: 295-297.
- Martínez EJ, Urbani MH, Burton GW, Hack CM, Quarín CL, Quesenberry KH, Blount AR (2003) Registration of Q4188 and Q4205, sexual tetraploid germplasm lines of bahiagrass. *Crop Science* 43: 745-746.
- Martínez EJ, Urbani MH, Quarín CL, Ortiz JPA (2001) Inheritance of apospory in bahiagrass, *Paspalum notatum*. *Hereditas* 135: 19-25.
- Martinez G, Köhler C (2017) Role of small RNAs in epigenetic reprogramming during plant sexual reproduction. *Current Opinion in Plant Biology* 36: 22-28.
- Martínez I, Hayes KE, Barr JA, Harold AD, Xie M, Bukhari SIA, Vasudevan S, Steitz JA, DiMaio D (2017) An Exportin-1-dependent microRNA biogenesis pathway during human cell quiescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114: E4961-E4970.
- Mattaj IW (1986) Cap trimethylation of U snRNA is cytoplasmic and dependent on U snRNP protein binding. *Cell* 46: 905-911.
- Matzk F, Meister A, Schubert I (2000) An efficient screen for reproductive pathways using mature seeds of monocots and dicots. *Plant J.* 21: 97-108.
- Meier M, Zappacosta D, Selva JP, Pessino S, Echenique V (2011) Evaluation of different methods for assessing the reproductive mode of weeping lovegrass plants, *Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees. *Australian Journal of Botany* 59: 253-261.
- Miles JW, Escandón ML (1997) Further evidence on the inheritance of reproductive mode in *Brachiaria*. *Canadian Journal of Plant Science* 77: 105-107.
- Misra P, Qi C, Yu S, Shah SH, Cao WQ, Sambasiva Rao M, Thimmapaya B, Zhu Y, Reddy JK (2002) Interaction of PIMT with transcriptional coactivators CBP, p300, and PBP differential role in transcriptional regulation. *Journal of Biological Chemistry* 277: 20011-20019.

-
- Mouaikel J, Verheggen C, Bertrand E, Tazi J, Bordonné R (2002) Hypermethylation of the cap structure of both yeast snRNAs and snoRNAs requires a conserved methyltransferase that is localized to the nucleolus. *Mol. Cell.* 9:891–901.
- Newcombe RG (1998) Two-sided confidence intervals for the single proportion: comparison of seven methods. *Statistics in medicine* 17: 857-872.
- Nicora EG, Rógolo de Agrasar ZE (1987) Los géneros de gramíneas de América. Editorial Austral, Buenos Aires, pg. 611.
- Nogler GA (1984) Gametophytic apomixis. En *Embryology of angiosperms*. Springer-Verlag: Berlin, pp. 475-518. Springer.
- Nogler GA (1995) Genetics of apomixis in *Ranunculus auricomus*. VI. Epilogue. *Bot Helv* 105: 111-115.
- Nogler GA (2006) The Lesser-Known Mendel: His Experiments on *Hieracium*. *Genetics* 172: 1-6.
- Norrman GA, Quarín CL, Burson BL (1989) Cytogenetics and reproductive behavior of different chromosome races in six *Paspalum* species. *Jour Hered* 80: 24-28.
- Noyes RD, Rieseberg LH (2000) Two independent *loci* control agamospermy (Apomixis) in the triploid flowering plant *Erigeron annuus*. *Genetics* 155: 379-390.
- Ochiai-Fukuda T, Takahashi-Ando N, Ohsato S, Igawa T, Kadokura K, Hamamoto H, Nakasako M, Kudo K, Shibata T, Yamaguchi I, Kimura M (2006) A fluorescent antibiotic resistance marker for rapid production of transgenic rice plants. *Journal of biotechnology* 122: 521-7.
- Ochogavía A, Seijo J, González A, Podio M, Laspina N, Duarte Silveira E, Machado Lacerda A, Tavares de Campos Carneiro V, Ortiz JPA, Pessino SC (2011) Characterization of retrotransposon sequences expressed in inflorescences of apomictic and sexual *Paspalum notatum* plants. *Sexual Plant Reproduction* 24: 231-246.
- Ochogavía AC, Cervigni G, Selva JP, Echenique VC, Pessino SC (2009) Variation in cytosine methylation patterns during ploidy level conversions in *Eragrostis curvula*. *Plant Molecular Biology* 70: 17-29
- Ogawa D, Johnson SD, Henderson ST, Koltunow AMG (2013) Genetic separation of autonomous endosperm formation (AutE) from the two other components of apomixis in *Hieracium*. *Plant reproduction* 26: 113-123.

-
- Ohad N, Yadegari R, Margossian L, Hannon M, Michaeli D, Harada JJ, Goldberg RB, Fischer RL (1999) Mutations in *FIE*, a WD polycomb group gene, allow endosperm development without fertilization. *The plant cell* 11: 407-415.
- Olmedo-Monfil V, Duran-Figueroa N, Arteaga-Vazquez M, Demesa-Arevalo E, Autran D, Grimanelli D, Slotkin RK, Martienssen RA, Vielle-Calzada JP (2010) Control of female gamete formation by a small RNA pathway in *Arabidopsis*. *Nature* 464: 628-632.
- Ortiz JP, Quarin CL, Pessino SC, Acuña C, Martínez EJ, Espinoza F, Hojsgaard DH, Sartor ME, Cáceres ME, Pupilli F (2013) Harnessing apomictic reproduction in grasses: what we have learned from *Paspalum*. *Annals of Botany* 112: 767–787
- Ortiz JP, Revale S, Siena LA, Podio M, Delgado L, Stein J, Leblanc O, Pessino SC (2017) A reference floral transcriptome of sexual and apomictic *Paspalum notatum*. *BMC genomics* 18: 318.
- Ortiz JPA, Leblanc O, Rohr C, Grisolia M, Siena LA, Podio M, Colono C, Azzaro C, Pessinno SC (2019) Small RNA-seq reveals novel regulatory components for apomixis in *Paspalum notatum*. *BMC Genomics* 20: 487.
- Ortiz JPA, Pessino SC (2002) Apomixis and its potential role in agriculture. *AgboitechNet* 4. ABN 081.
- Ortiz JPA, Pessino SC, Leblanc O, Hayward MD, Quarin CL (1997) Genetic fingerprinting for determining the mode of reproduction in *Paspalum notatum*, a subtropical apomictic forage grass. *Theoretical and Applied Genetics* 95: 850-856.
- Otte L, Wiedemann U, Schlegel B, Pires JR, Beyermann M, Schmieder P, Krause G, Volkmer-Engert R, Schneider-Mergener J, Oschkinat H (2003) WW domain sequence activity relationships identified using ligand recognition propensities of 42 WW domains. *Protein Sci* 12: 491–500.
- Ozias-Akins P (2006) Apomixis: developmental characteristics and genetics. *Critical Reviews in Plant Sciences* 25: 199-214.
- Ozias-Akins P, Roche D, Hanna WW (1998) Tight clustering and hemizyosity of apomixis-linked molecular markers in *Pennisetum squamulatum* implies genetic control of apospory by a divergent *locus* that may have no allelic form in sexual genotypes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95: 5127-5132.
- Ozias-Akins P, van Dijk PJ (2007) Mendelian genetics of apomixis in plants. *Annu.Rev.Genet.* 41: 509-537.

-
- Parlevliet JE, Cameron JW (1959) Evidence on the inheritance of nucellar embryony in Citrus. *Proc Am Soc Hortic Sci* 74: 252–260.
- Parodi LR (1969) Estudios sistemáticos sobre las Gramineae-Paniceae argentinas y uruguayas. *Darwiniana* 15: 65–109.
- Pessino SC, Espinoza F, Martínez EJ, Ortiz JPA, Valle EM, Quarin CL (2001) Isolation of cDNA clones differentially expressed in flowers of apomictic and sexual *Paspalum notatum*. *Hereditas* 134: 35–42.
- Pessino SC, Ortiz JPA, Leblanc O, do Valle CB, Evans C, Hayward MD (1997) Identification of a maize linkage group related to apomixis in *Brachiaria*. *Theoretical and Applied Genetics* 94: 439-444.
- Petrillo E, Godoy Herz MA, Fuchs A, Reifer D, Fuller J, Yanovsky MJ, Simpson C, Brown JWS, Barta A, Kalyna M, Kornblihtt AR (2014) A chloroplast retrograde signal regulates nuclear alternative splicing. *Science* 344: 427-430.
- Pichot C, Liens B, Nava JL, Bachelier JB, El MM (2008) Cypress surrogate mother produces haploid progeny from alien pollen. *Genetics* 178: 379-383.
- Pilger R (1940) Gramineae. III: Unterfamilie Panicoideae. In Die Natürlichen Pflanzenfamilien, Zweite Auflage ed. 2, 14e, eds. A. Engler and K. Prantl. Leipzig: Engelmann. Pp. 1-208.
- Podio M, Rodríguez MP, Felitti S, Stein J, Martínez EJ, Siena LA, Quarin CL, Pessino SC, Ortiz JPA (2012) Sequence characterization, in silico mapping and cytosine methylation analysis of markers linked to apospory in *Paspalum notatum*. *Genet.Mol.Biol.* 35: 827-837.
- Podio M, Cáceres ME, Samoluk SS, Seijo JG, Pessino SC, Ortiz JP, Pupilli F (2014a) A methylation status analysis of the apomixis-specific region in *Paspalum* spp. suggests an epigenetic control of parthenogenesis. *Journal of experimental botany* 65: 6411-6424.
- Podio M, Felitti SA, Siena LA, Delgado L, Mancini M, Seijo G, González AM, Pessino SC, Ortiz JPA. (2014b). Characterization and expression analysis of *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE (SERK)* genes in sexual and apomictic *Paspalum notatum*. *Plant Mol. Biol.* 84: 479–495.
- Polegri L, Calderini O, Arcioni S, Pupilli F (2010) Specific expression of apomixis-linked alleles revealed by comparative transcriptomic analysis of sexual and apomictic *Paspalum simplex* Morong flowers. *Journal of Experimental Botany* 61: 1869–1883.
- Pozzobon MT, Valls JFM (1997) Chromosome number in germoplasma accessions of *Paspalum notatum* (Gramineae). *Braz J Genetics* 20: 29.34.

-
- Provart NJ, Alonso J, Assmann SM, Bergmann D, Brady SM, Brkljacic J, Browse J, Chapple C, Colot V, Cutler S, Dangl J, Ehrhardt D, Friesner JD, Frommer WB, Grotewold E, Meyerowitz E, Nemhauser J, Nordborg M, Pikaard C, Shanklin J, Somerville C, Stitt M, Torii KU, Waese J, Wagner D, McCourt P (2016) 50 years of *Arabidopsis* research: Highlights and future directions. *New Phytol* 209: 921–944.
- Puig O, Gottschalk A, Fabrizio P, Séraphin B (1999) Interaction of the U1 snRNP with non conserved intronic sequences affects 5' splice site selection. *Genes Dev.*13: 569–580.
- Pupilli F, Labombarda P, Cáceres ME, Quarn CL, Arcioni S (2001) The chromosome segment related to apomixis in *Paspalum simplex* is homoeologous to the telomeric region of the long arm of rice chromosome 12. *Molecular Breeding* 8: 53-61.
- Pupilli F, Martínez EJ, Busti A, Calderini O, Quarín CL, Arcioni S (2004) Comparative mapping reveals partial conservation of synteny at the apomixis locus in *Paspalum* spp. *Molecular Genetics and Genomics* 270: 539-548.
- Qiu ZR, Shuman S, Schwer B (2011) An essential role for trimethylguanosine RNA caps in *Saccharomyces cerevisiae* meiosis and their requirement for splicing of SAE3 and PCH2 meiotic pre mRNAs. *Nucleic Acids Research* 39: 5633-5646.
- Quarín CL (1992) The nature of apomixis and its origin in Panicoid grasses. *Apomixis Newsletter* 5: 8–15.
- Quarín CL, Burson BL (1991) Cytology of sexual and apomictic *Paspalum* species. *Cytologia* 56: 223-228.
- Quarín CL, Burson BL, GW Burton (1984) Cytology of intra- and interspecific hybrids between two cytotypes of *Paspalum notatum* and *P. cromyorrhizon*. *Bot Gaz* 145: 420-426.
- Quarín CL, Lombardo EP (1986) Niveles de ploidía y distribución geográfica de *Paspalum quadrifarium* (Gramineae). *Mendeliana* 7: 101-107.
- Quarín CL, Espinoza F, Martínez EJ, Pessino SC, Bovo OA (2001) A rise of ploidy level induces the expression of apomixis in *Paspalum notatum*. *Sex Plant Reprod* 13: 243-249.
- Quarín CL, GA Norrmann (1990) Interspecific hybrids between five *Paspalum* species. *Bot Gaz* 15: 366-369.
- Quarín 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.

-
- Quesenberry KH, Dampier JM, Lee YY, Smith RL, Acuña CA (2010) Doubling the chromosome number of bahiagrass via tissue culture. *Euphytica* 175: 43-50.
- Rabiger DS, Taylor JM, Spriggs A, Hand ML, Henderson ST, Johnson SD, Oelkers K, Hrmova M, Saito K, Suzuki G, Mukai Y, Carroll BJ, Koltunow AMG (2016) Generation of an integrated *Hieracium* genomic and transcriptomic resource enables exploration of small RNA pathways during apomixis initiation. *BMC Biol.* 14:86.
- Ravi M, Chan SWLL (2010) Haploid plants produced by centromere-mediated genome elimination. *Nature* 464: 615-618.
- Rebozzio RN, Sartor ME, Quarin CL, Espinoza F (2011) Residual sexuality and its seasonal variation in natural apomictic *Paspalum notatum* accessions. *Biologia Plantarum* 55: 391-395.
- Roche D, Cong P, Chen Z, Hanna WW, Gustine DL, Sherwood RT, Ozias-Akins P (1999) Short Communication: An apospory-specific genomic region is conserved between Buffelgrass (*Cenchrus ciliaris* L.) and *Pennisetum squamulatum* Fresen. *Plant J.* 19: 203-208.
- Rodrigues JCM, Cabral G, Dusi D, de Mello L, Rigden DJ, Carneiro VTC (2003) Identification of differentially expressed cDNA sequences in ovaries of sexual and apomictic plants of *Brachiaria brizantha*. *Plant Mol Biol* 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. Borntraeger, Berlin. 12:150.
- Rua GH, Speranza PR, Vaio M, Arakaki M (2010) A phylogenetic analysis of the genus *Paspalum* (Poaceae) based on cpDNA and morphology. *Plant Systematics and Evolution* 288: 227–243.
- Rutz B, Seraphin B (1999) Transient interaction of BBP/ScSF1 and Mud2 with the splicing machinery affects the kinetics of spliceosome assembly. *RNA* 5: 819–831.
- Saghai-Marouf MA, Soliman KM, Jorgensen RA, Allard RW (1984) Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81: 8014-8.
- Saldi T, Cortazar MA, Sheridan RM, Bentley DL (2016) Coupling of RNA Polymerase II Transcription Elongation with Pre-mRNA Splicing. *Journal of Molecular Biology* 428: 2623-2635.

-
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning. A laboratory manual. 2^o de. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sambrook J, Russell DW (2001) Molecular cloning- A laboratory manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Santos MO, Aragão FJL (2009) Role of *SERK* genes in plant environmental response, *Plant Signaling & Behavior* 4: 1111-1113.
- Sartor ME, Quarin CL, Urbani MH, Espinoza F (2011) Ploidy levels and reproductive behaviour in natural populations of five *Paspalum* species. *Plant Systematics and Evolution* 293: 31–41.
- Savidan Y (2000) Apomixis: genetics and breeding. *Plant breeding reviews* 18: 13-86.
- Savidan Y (2002) Transfer of apomixis through wide crosses. In Flowering of Apomixis: From Mechanisms to Genetic Engineering, Y. Savidan, J.G. Carman, and T. Dresselhaus, eds (Mexico: CIMMYT, IRD, European Commission DG VI), pp. 153–167.
- Schallau A, Arzenton F, Johnston AJ, Hähnel U, Koszegi D, Blattner FR, Altschmied L, Haberer G, Barcaccia G, Bäumlein H (2010) Identification and genetic analysis of the *APOSPORY* locus in *Hypericum perforatum* L. *Plant J.* 62: 773-784.
- Schmidt A, Schmid MW, Grossniklaus U (2015) Plant germline formation: common concepts and developmental flexibility in sexual and asexual reproduction. *Development* (Cambridge, England) 142: 229-241.
- Serbes I, Palovaara J, Groß-Hardt R (2018) Development and function of the flowering plant female gametophyte. *Elsevier* 131: 401-434
- Sezer F, Yüzbasioğlu G, Özbilen A, Taskin KM (2016) Genome-wide identification and expression analysis of *SWI1* genes in *Boechera* species. *Computational Biology and Chemistry* 62: 75-81.
- Sharbel T, Voigt M, Corral JM, Thiel T, Varshney A, Kumlehn J, Vogel H, Rotter B (2009) Molecular signatures of apomictic and sexual ovules in the *Boechera holboellii* complex. *The Plant Journal* 58: 870–882
- She W, Grimanelli D, Rutowicz K, Whitehead MWJ, Puzio M, Kotlinski M, Jerzmanowski A, Baroux C (2013) Chromatin reprogramming during the somatic-to-reproductive cell fate transition in plants. *Development* (Cambridge, England) 140: 4008-19.
- Sherwood RT, Berg CC, Young BA (1994) Inheritance of apospory in buffelgrass. *Crop Science* 34: 1490-1494.

-
- Shuman S (2001) The mRNA capping apparatus as drug target and guide to eukaryotic phylogeny. En Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, pp. 301-312. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Siena LA, Sartor ME, Quarin CL, Espinoza F, Ortiz JPA (2014a) Transference of wheat expressed sequence tag-simple sequence repeats to *Paspalum* species and cross-species amplification of *Paspalum notatum* simple sequence repeats: Potential use in phylogenetic analysis and mapping. *Crop Science* 54: 240-254.
- Siena LA, Ortiz JPA, Leblanc O, Pessino S (2014b) *PnTgs1*-like expression during reproductive development supports a role for RNA methyltransferases in the aposporous pathway. *BMC plant biology* 14: 297.
- Siena LA, Ortiz JP, Calderini O, Paolucci F, Cáceres ME, Kaushal P, Grisan S, Pessino SC, Pupilli F (2016) An apomixis-linked *ORC3*-like pseudogene is associated with silencing of its functional homolog in apomictic *Paspalum simplex*. *Journal of experimental botany* 67: 1965-1978.
- Singh S, Dhyani D, Ahuja PS (2011) Apomixis in Plants—Embryology, Genetics and Molecular Basis. *Journal of Cell and Plant Sciences* 2: 24-31.
- Smith J (1841) XXXII. Notice of a Plant which produces perfect Seeds without any apparent Action of Pollen. *Transactions of the Linnean Society of London* 18: 509-512.
- Soliman M, Espinoza F, Ortiz JPA, Delgado L (2018) Heterochronic reproductive developmental processes between diploid and tetraploid cytotypes of *Paspalum rufum*. *Ann. Bot.* 123: 901–915.
- Spillane C, Curtis MD, Grossniklaus U (2004) Apomixis technology development—virgin births in farmers' fields? *Nat. Biotechnol.* 22: 687-691.
- Spillane C, Steimer A, Grossniklaus U (2001) Apomixis in agriculture: The quest for clonal seeds. *Sex Plant Reprod* 14: 179–187.
- Spingola M, Ares M (2000) A Yeast Intronic Splicing Enhancer and Nam8p Are Required for Mer1p-Activated Splicing. *Mol. Cell.* 6: 329–338.
- Stein J, Pessino SC, Martínez EJ, Rodríguez MP, Siena LA, Quarin CL, Ortiz JPA (2007) A genetic map of tetraploid *Paspalum notatum* Flugge (bahiagrass) based on single-dose molecular markers. *Molecular Breeding* 20: 153-166.
- Stein J, Quarin CL, Martínez EJ, Pessino SC, Ortiz JPA, Martínez EJ, Pessino SC, Ortiz JPA (2004) Tetraploid races of *Paspalum notatum* show polysomic inheritance and preferential

-
- chromosome pairing around the apospory-controlling *locus*. *Theor.Appl.Genet.* 109: 186-191.
- Syed NH, Kalyna M, Marquez Y, Barta A, Brown JWS (2012) Alternative splicing in plants - coming of age. *Trends in Plant Science* 17: 616-623.
- Tashiro T, Ishida A, Hori M, Igisu M, Koike M, Méjean P, Takahata N, Sano Y, Komiya T (2017) Early trace of life from 3.95 Ga sedimentary rocks in Labrador, Canada. *Nature* 549: 516-518.
- Tischler CR, Burson BL (1995) Evaluating different bahiagrass cytotypes for heat tolerance and leaf epicuticular wax content. *Euphytica* 84: 229-235.
- Toenniessen GH (2001) Feeding the world in the 21st century: Plant breeding, biotechnology and the potential role of apomixis. En: Savidan Y, Carman JG, Dresselhaus T. eds. The flowering of apomixis: from mechanisms to genetic engineering. Mexico City: CIMMYT, IRD, European Commission DG VI (FAIR), 1-7.
- Tucker MR, Paech NA, Willemse MTM, Koltunow AMG (2001) Dynamics of callose deposition and *beta-1,3-glucanase* expression during reproductive events in sexual and apomictic *Hieracium*. *Plant* 212: 487-498.
- Urbani MH, Quarin CL, Espinoza F, Penteado MIO, Rodrigues IF (2002) Cytogeography and reproduction of the *Paspalum simplex* polyploid complex. *Plant Systematics and Evolution* 236: 99–105.
- Van Dijk PJ, Tas ICQ, Falque M, Bakx-Schotman T (1999) Crosses between sexual and apomictic dandelions (*Taraxacum*). II. The breakdown of apomixis. *Heredity* 83: 715-721.
- Verheggen C, Lafontaine DLJ, Samarsky D, Mouaikel J, Blanchard JM, Bordonné R, Bertrand E (2002) Mammalian and yeast U3 snoRNPs are matured in specific and related nuclear compartments. *EMBO Journal* 21: 2736-2745.
- Vielle-Calzada JP, Crane CF, Stelly DM (1996) Apomixis: the asexual revolution. *Science* 274: 1332–1333.
- Vijverberg K, Milanovic-Ivanovic S, Bakx-Schotman T, van Dijk PJ (2010) Genetic fine-mapping of *DIPLOSPOROUS* in *Taraxacum* (dandelion; Asteraceae) indicates a duplicated *DIP*-gene. *BMC.Plant Biol* 10: 154.
- Viswakarma N, Jia Y, Bai L, Vluggens A, Borensztajn J, Xu J, Reddy JK (2010) Coactivators in PPAR-regulated gene expression. *PPAR Res.*

-
- Wang C, Liu Q, Shen Y, Hua Y, Wang J, Lin J, Wu M, Sun T, Cheng Z, Mercier R, Wang K (2019) Clonal seeds from hybrid rice by simultaneous genome engineering of meiosis and fertilization genes. *Nature Biotechnology* 37: 283-286.
- Wang G, Köhler C (2017) Epigenetic processes in flowering plant reproduction. *Journal of Experimental Botany* 68: 797-807.
- Warmke HE (1954) Apomixis in *Panicum maximum*. *American Journal of Botany* 41: 5.
- Wen Xinshan, Ye Xiulin, Li Yuanqing, Chen Zelian, Xu Shixiong (1998) Embryological studies on apomixis in *Pennisetum squamulatum*. *Acta Botanica Sinica* 40: 598-604.
- Wientjes E, Croce R (2011) The light-harvesting complexes of higher-plant Photosystem I: Lhca1/4 and Lhca2/3 form two red-emitting heterodimers. *Biochemical Journal* 433: 477-485.
- Will CL, Lührmann R (2001) Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function. *Current Opinion in Cell Biology* 13: 290-301.
- Yadegari R, Drews GN (2004) Female gametophyte development. *The Plant cell* 16 Suppl: S133-41.
- Young BA, Sherwood RT, Bashaw EC (1979) Cleared-pistil and thick-sectioning techniques for detecting aposporous apomixis in grasses. *Can. J. Bot.* 57: 1668–1672.
- Yu YT, Schart EC, Smith CM, Seitz JA (1999) The growing world of small nuclear ribonucleoproteins. *The RNA World, Second Edition*.
- Zappacosta D, Gallardo J, Carballo J, Meier M, Rodrigo JM, Gallo CA, Selva, Stein J, Ortiz JPA, Albertini E, Echenique V (2019) A High-Density Linkage Map of the Forage Grass *Eragrostis curvula* and Localization of the Diplospory Locus. *Frontiers in Plant Science* 10: 918
- Zappacosta D, Ochogavía A, Rodrigo JM, Romero J, Meier M, Garbus I, Pessino S, Echenique V (2014) Increased apomixis expression concurrent with genetic and epigenetic variation in a newly synthesized *Eragrostis curvula* polyploid. *Scientific Reports (Nature-Publishing Group)* 4: 4223.
- Záveský L, Jarolímová V, Štěpánek J (2007) Apomixis in *Taraxacum paludosum* (section Palustria, Asteraceae): Recombinations of apomixis elements in inter-sectional crosses. *Plant Systematics and Evolution* 265: 147-163.
- Zhang W, McElroy D, Wu R (1991) Analysis of rice Act1 5' region activity in transgenic rice plants. *The Plant Cell* 3: 1155-1165.

-
- Zhao X, Bramsiepe J, Van Durme M, Komaki S, Prusicki MA, Maruyama D, Forner J, Medzihradzsky A, Wijnker E, Harashima H, Lu Y, Schmidt A, Guthörl D, Sahún Logroño R, Guan Y, Pochon G, Grossniklaus U, Laux T, Higashiyama T, Lohmann JU, Nowack MK, Schnittger A (2017) *RETINOBLASTOMA RELATED1* mediates germline entry in *Arabidopsis*. *Science* 356: eaaf6532.
- Zhu Y, Qi C, Cao WQ, Yeldandi A V., Rao MS, Reddy JK (2001) Cloning and characterization of PIMT, a protein with a methyltransferase domain, which interacts with and enhances nuclear receptor coactivator PRIP function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 10380-10385.
- Zilli AL, Acuña CA, Schulz RR, Marcón F, Brugnoli EA, Novo SF, Quarín CL, Martínez EJ (2019) Transference of natural diversity from the apomictic germplasm of *Paspalum notatum* to a sexual synthetic population. *Annals of Applied Biology* 175: 18-28.
- Zilli AL, Brugnoli EA, Marcón F, Billa MB, Ríos EF, Martínez EJ, Acuña CA (2015) Heterosis and Expressivity of Apospory in Tetraploid Bahiagrass Hybrids. *Crop Science* 55: 1189-1201.
- Zipperlen P, Fraser AG, Kamath RS, Martínez-Campos M, Ahringer J (2001) Roles for 147 embryonic lethal genes on *C.elegans* chromosome I identified by RNA interference and video microscopy. *EMBO* 20: 3984-3992.
- Zuloaga FO, Morrone O (2005) Revisión de las especies de *Paspalum* para América del Sur austral. *Annals of the Missouri Botanical Garden; Monographs in Systematic Botany* 102: 1–297.

ANEXOS

IX- ANEXOS

Anexo 1: Valores de expresión de Chloro en la línea transgénica E2.9

No.	Name	Take Off	Amplification	Comparative Conc.	Rep. Takeoff
1	Cloro1-1_Q4188	26.9	1.96	1.00E+00	26.9
2	Chloro1-2_Q4188	26.5	1.90	1.10E+00	26.5
3	Chloro1-3_Q4188	27.1	1.70	9.53E-01	27.1
1	Chloro1-1_Q4188	27.5	1.21	1.00E+00	27.5
2	Chloro1-2_Q4188	27.8	1.58	9.98E-01	27.8
3	Chloro1-3_Q4188	27.8	1.40	9.98E-01	27.8
4	Chloro2-1_E2.9	26.9	2.03	1.00E+00	26.9
5	Chloro2-2_E2.9	27.1	1.74	9.53E-01	27.1
6	Chloro2-3_E2.9	27.3	1.74	9.08E-01	27.3
4	Chloro2-1_E2.9	28.0	1.71	9.96E-01	28.0
5	Chloro2-2_E2.9	27.7	1.42	9.99E-01	27.7
6	Chloro2-3_E2.9	28.3	0.96	9.94E-01	28.3
7	Chloro3-1_B	40.1	0.71	4.13E-02	40.1
8	Chloro3-2_B	8.1	0.00	9.37E+01	8.1
9	Chloro3-3_B	18.1	0.17	8.38E+00	18.1
7	Chloro3-1_B	6.0	0.00	1.17E+00	6.0
8	Chloro3-2_B	7.4	0.00	1.16E+00	7.4
9	Chloro3-3_B	8.9	0.00	1.15E+00	8.9
10	Tub4-1_Q4188	21.0	1.74	4.16E+00	21.0
11	Tub4-2_Q4188	21.2	1.77	3.96E+00	21.2
12	Tub4-3_Q4188	21.3	1.68	3.87E+00	21.3
10	Tub4-1_Q4188	21.3	1.13	1.05E+00	21.3
11	Tub4-2_Q4188	21.2	3.12	1.05E+00	21.2
12	Tub4-3_Q4188	21.3	1.13	1.05E+00	21.3
13	Tub5-1_E2.9	19.1	1.81	6.58E+00	19.1
14	Tub5-2_E2.9	19.1	1.83	6.58E+00	19.1
15	Tub5-3_E2.9	19.1	1.92	6.58E+00	19.1
13	Tub5-1_E2.9	19.4	1.14	1.06E+00	19.4
14	Tub5-2_E2.9	19.6	1.43	1.06E+00	19.6
15	Tub5-3_E2.9	19.8	2.03	1.06E+00	19.8
16	Tub6-1_B	7.0	-0.01	1.22E+02	7.0
17	Tub6-2_B	28.1	0.08	7.48E-01	28.1
18	Tub6-3_B	39.1	0.16	5.25E-02	39.1
16	Tub6-1_B	10.1	0.00	1.14E+00	10.1
17	Tub6-2_B	38.1	0.95	9.24E-01	38.1

18	Tub6-3_B	36.3	1.05	9.36E-01	36.3
----	----------	------	------	----------	------

Resultados de la expresión relativa:

Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
chloro	TRG	0,6158	0,38	0,289 - 0,499	0,225 - 0,581	0	DOWN
Tubulina	REF	0,5617	1				

Interpretación: Chloro está DOWN-regulado en la muestra (en comparación con el grupo control) por un factor promedio de 0,380 (error estándar: 0,289-0,499). La muestra Chloro es diferente al grupo control. P(H1)=0,000.

Anexo 2: Valores de expresión de Chloro en la línea transgénica E2.13

No.	Name	Take Off	Amplification	Comparative Conc.	Rep. Takeoff
1	Chloro1-1_Q4188	26,2	2	1.00E+00	26.2
2	Chloro1-2_Q4188	26	1,91	1.05E+00	26.0
3	Chloro1-3_Q4188	26,6	1,38	9.07E-01	26.6
1	Chloro1-1_Q4188	26,6	1,61	1.00E+00	26.6
2	Chloro1-2_Q4188	26,6	1,46	1.00E+00	26.6
3	Chloro1-3_Q4188	27	1,58	8.85E-01	27.0
4	Chloro2-1_E2.13	35,3	1,53	1.08E-01	35.3
5	Chloro2-2_E2.13	35,2	2	1.10E-01	35.2
6	Chloro2-3_E2.13	35,8	1,74	9.52E-02	35.8
4	Chloro2-1_E2.13	35,7	1,46	6.24E-02	35.7
5	Chloro2-2_E2.13	35,2	1,61	7.27E-02	35.2
6	Chloro2-3_E2.13	34,4	1,67	9.27E-02	34.4
7	Chloro3-1_B	39,6	0,53	3.75E-02	39.6
8	Chloro3-2_B	27,1	-0,49	8.02E-01	27.1
9	Chloro3-3_B	17	0,08	9.52E+00	17.0
7	Chloro3-1_B	36,6	1,12	4.74E-02	36.6
8	Chloro3-2_B	40,1	0,55	1.63E-02	40.1
9	Chloro3-3_B	10,1	0,12	1.53E+02	10.1
10	Tub4-1_Q4188	19,5	1,79	5.16E+00	19.5
11	Tub4-2_Q4188	19,6	2	5.04E+00	19.6

12	Tub4-3_Q4188	18,6	1,61	6.44E+00	18.6
10	Tub4-1_Q4188	20	2,92	7.48E+00	20.0
11	Tub4-2_Q4188	20,3	1,76	6.82E+00	20.3
12	Tub4-3_Q4188	20,5	1,74	6.42E+00	20.5
13	Tub5-1_E2.13	20,3	1,92	4.24E+00	20.3
14	Tub5-2_E2.13	20,7	1,7	3.85E+00	20.7
15	Tub5-3_E2.13	20,4	2	4.14E+00	20.4
13	Tub5-1_E2.13	21	2,73	5.51E+00	21.0
14	Tub5-2_E2.13	21,4	1,91	4.88E+00	21.4
15	Tub5-3_E2.13	21,3	1,97	5.03E+00	21.3
16	Tub6-1_B	39,6	0,67	3.75E-02	39.6
17	Tub6-2_B	23,8	-0,02	1.80E+00	23.8
18	Tub6-3_B	24	0	1.71E+00	24.0
16	Tub6-1_B	28,1	0,03	6.33E-01	28.1
17	Tub6-2_B	13,1	0,1	6.13E+01	13.1
18	Tub6-3_B	25,2	0,09	1.53E+00	25.2

Resultados de la expresión relativa:

Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
Chloro	TRG	0,6625	0,023	0,013 - 0,041	0,011 - 0,076	0,002	DOWN
Tubulina	REF	0,8667	1				

Interpretación: Chloro está DOWN-regulado en la muestra (en comparación con el grupo control) por un factor promedio de 0,023 (error estándar: 0,013-0,041). La muestra Chloro es diferente al grupo control. P(H1)=0,002.