



Facultad de Ciencias Agrarias
Universidad Nacional de Rosario

**ANÁLISIS DE CONSERVACIÓN Y
MICROSINTENÍA DE LA REGIÓN GENÓMICA
RESPONSABLE DE LA APOMIXIS (ACR) EN
*PASPALUM NOTATUM***

NICOLÁS LEANDRO SPOTO

Ingeniero Agrónomo

Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Agrarias

DIRECTOR: DR. JUAN PABLO AMELIO ORTIZ

CO-DIRECTORAS: DRA. JULIANA STEIN Y DRA. MARICEL PODIO

2020

**ANÁLISIS DE CONSERVACIÓN Y MICROSINTENÍA DE LA REGIÓN
GENÓMICA RESPONSABLE DE LA APOMIXIS (ACR) EN *PASPALUM*
*NOTATUM***

NICOLÁS LEANDRO SPOTO
Ingeniero Agrónomo - Universidad Nacional de Rosario

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Agrarias, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido previamente presentada para la obtención de otro título en ésta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en la Facultad de Ciencia Agrarias de la UNR, durante el período comprendido entre abril de 2015 y diciembre de 2020, bajo la dirección del Dr. Juan Pablo Amelio Ortiz y la co-dirección de la Dra. Juliana Stein y la Dra. Maricel Podio.

Nicolás L. Spoto
Tesista

Juan Pablo A. Ortiz
Director

Juliana Stein
Co-directora

Maricel Podio
Co-directora

Defendida el: _____

Agradecimientos

Estimado lector:

El desarrollo de la Tesis que está por leer es mucho más que un aporte académico, esto representó un logro personal de gran importancia en mi vida. Enfocarme en las labores doctorales me permitió recuperarme del profundo pesar de lo que fue la tragedia vial más grave ocurrida en la provincia de Santa Fe. Y es que mucho de lo descrito en estas páginas nunca hubiera visto la luz sin el incondicional apoyo, cariño y paciencia de personas valerosas que me rodearon en los momentos más oscuros.

En primer lugar quiero agradecer a mis directores, Juan Pablo, Juliana y Maricel, por ser mis guías en este apasionante y efervescente universo de las Ciencias, donde la camaradería es transversal y ubicuas en cada espacio. Los Pipeteadores: Vale Palmieri, Alvarito Larrán, Caro Colono, Marianitux Soliman, Cele Azzaro, Lucas Demarchi, Vale Perotti, Lulú Monasterolo, Alber Gauna, y la pequeña Andre Martinatto—colegas del Laboratorio de Biología Molecular—, fueron el crisol de experiencias fabulosas y siempre con tinte dadaista.

Agradezco al equipo del CIFASIS-CONICET, liderado por la Dra. Elizabeth Tapia: Nati Iglesias, Nacho García, Joaco Ezpeleta, Javi Murillo, Flavia Krsticevic —a distancia—, Lau Angelone, Pili Bulacio, José Coronel, Pao Cacchiarelli y Flavio Spetale —el *disk-jockey* de los viernes—. Nunca tuvieron reparo alguno en hacerme parte integral desde el momento cero, y aconsejarme ferozmente en tantos tópicos que me son innumerables. Jamás creí conocer a personas tan colaborativas y desinteresadas, y estoy en deuda con ellos. Buena parte de los análisis los hice en su compañía, quienes me iniciaron en el mundo pensado por Alan Turing.

No puedo dejar de mencionar a la comunidad GNU/Linux: incalculables desarrolladores, miembros de foros, aprendices y expertos de diversas ramas, que publican a diario sus soluciones y tutoriales de forma altruista. Es, tal vez, una de las comunidades que pasa más desapercibida, principalmente por su forma intangible, pero es la que más se acerca al comportamiento que tendrá la sociedad del futuro. Me es imposible listar lo que me enseñaron y en tan poco tiempo. Esta Tesis se desarrolló casi completamente con programas de la comunidad, y es tranquilizador saber que la mayor parte del progreso científico global contemporáneo funciona gracias a sus engranajes; desde este simple procesador

de código \LaTeX hasta los más ciclópeos servidores que trabajan silenciosamente y sin descanso.

Ya bajando al plano terrenal, una multitud de pequeños gestos sirvieron de viento en las velas para nunca encallar. Claudia Alzugaray, junto con Miriam Bueno, contribuyeron con el grano de arena más precioso ante la intrínquilis de querer abandonar la carrera de Ingeniería. Sin su aporte, mi historia no hubiera sido tan rica en aventuras. Verónica Anibalini, me dio el mejor abrazo cuando todos se alejaron. El grupo de víctimas de la tragedia MONTICAS, ocho personas de todas la edades que decidimos unirnos para sanar. Alicia Ravassi, Norber Luchetta, Agus Brazi, Andre Dittler, Andre Giovanettone, Dani Berni, Lea Primavera, Eli Ollacarisqueta. Las comidas y las mateadas cumplieron nuestro lema: *Juntos, más fuertes*. Darién Prado, Hernán Maturo, Mica y Brenda —de posgrado—, Luciana Delgado, ambas Silvinas, Martita Bianchi, Gusti Rodríguez, Rosana Rotondo y la estimada Vanina Cravero aplaudieron cada logro por más simple que fuera. Qué impotante fue eso para ponerme de pie. Los Citogenetistas y Mejoradores de Misiones, Corrientes y Tucumán, un grupo que brindó cariño y que estuvo pendiente en cada paso de la recuperación, entre ellos Carlos Acuña, Pato y Sabi Novo, Vale Páez, Camilo Quarín, Eric Martínez, Fabi Eckers, Orlando Rodríguez Mata, Anita Gianini, Vere Reutemann, Ana Honfi, Julio Daviña y una multitud de personas entrañables.

Quiero finalizar por agradecer a dos grupos de personas de diferentes países que se unieron durante estos años doctorales. Por un lado, a mi familia de siempre: mis papás, mi hermana Tolita, mis abuelos, Kiara, y Lucy, quién brilla con diamantes desde el cielo. Ellos me dieron todo. Y por otro lado, quiero agradecer a la familia de John, mi persona favorita y compañero de vida: *cada paso que damos va narrando un cuento*.

*Esto va dedicado a mi Nona: «Tanto, tanto te gustaban
las plantas que ¡mirá hasta donde llegamos!».*

Publicaciones y presentaciones a congresos

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

1. I Reunión Transdisciplinaria en Ciencias Agropecuarias (Casilda, Santa Fe, septiembre de 2016): presentación del póster «*Caracterización molecular de proteínas PPIasas asociadas a la apomixis en Paspalum notatum*».
2. V Ciclo de Seminarios sobre Avances en la Caracterización Genética y Molecular de la Apomixis (Bahía Blanca, Buenos Aires, noviembre de 2016): presentación oral en inglés de avance de Tesis.
3. IV Taller de Biología celular y del Desarrollo 2018 (Chascomús, Buenos Aires, octubre de 2018): presentación del póster «*Análisis de transcriptos ortólogos a PPIasas de arroz en Paspalum notatum y su posible relación con la apomixis*».
4. VI Ciclo de Seminarios sobre Avances en la Caracterización Genética y Molecular de la Apomixis (Zavalla, Santa Fe, noviembre de 2018): presentación oral en inglés de avance de Tesis.
5. XVII Congreso Latinoamericano de Genética (ALAG, Mendoza Capital, Mendoza octubre de 2019). Presentación del póster «*Identification of the apomixis-controlling region (ACR) in the genome of the diploid cytotype of Paspalum notatum*».
6. Publicación «*A plant-specific TGS1 homolog influences gametophyte development in sexual tetraploid Paspalum notatum ovules*» por Colono CM, Ortiz JPA, Permingeat HR, Souza ED, Siena LA, **Spoto NL**, Galdeano F, Espinoza F, Leblanc O, y Pessino SC, en *Frontiers in Plant Science* (2019).
7. VII Ciclo de seminarios sobre Avances en la Caracterización Genética y Molecular de la Apomixis. «*Identificación de transcriptos de PPIasas expresados durante el desarrollo reproductivo de Paspalum notatum y su relación con la apomixis*» por Stein J, **Spoto N**, Podio M, Ortiz JPA. (Modalidad virtual, diciembre de 2020).

Índice general

Abreviaturas y símbolos	XII
Resumen	XIII
Abstract	XVI
1. Introducción	1
1.1. Apomixis y reproducción sexual en las angiospermas	1
1.1.1. Tipos de apomixis	3
1.1.2. Ventajas de la apomixis en los cultivos	4
1.2. El género <i>Paspalum</i>	7
1.2.1. <i>Paspalum notatum</i>	8
1.2.2. Características del ACR en especies de <i>Paspalum</i>	13
1.3. Sintenia y colinealidad en los genomas vegetales	14
1.3.1. Sintenia en la familia <i>Poaceae</i>	16
1.3.2. <i>Oryza sativa</i> como modelo de estudio de la familia <i>Poaceae</i>	17
1.3.3. Estudios de sintenia en el ACR asociados al <i>locus</i> responsable de la apomixis en gramíneas	19
1.4. Estrategias para el estudio de la apomixis	21

1.4.1.	Identificación de genes asociados al fenotipo apomítico por análisis de mutantes	25
1.4.2.	Estrategias basadas en el estudio de sistemas apomíticos naturales	27
1.4.2.1.	Identificación de genes asociados al carácter por estudios de genética directa en <i>P. notatum</i>	28
1.4.2.2.	Identificación de genes diferencialmente expresados entre genotipos sexuales y apomíticos	29
1.4.2.3.	Estudios de secuencias no codificantes asociadas al ACR	30
1.4.2.4.	Características de las peptidil-prolil <i>cis/trans</i> isomerasas de tipo FKBP	32
1.4.3.	Aproximaciones transcriptómicas y genómicas	33
2.	Hipótesis y Objetivos	36
3.	Materiales y métodos	38
3.1.	Material vegetal	38
3.2.	Análisis citoembriológicos	40
3.3.	Análisis moleculares	41
3.3.1.	Extracción de ADN genómico	41
3.3.2.	Clasificación del modo reproductivo por medio del marcador SCAR SPNA2	42
3.3.3.	Validación de la asociación del segmento del cromosoma 2 de arroz con el ACR de <i>P. notatum</i>	43
3.3.4.	Clonado y secuenciación de fragmentos <i>PPI</i>	46
3.3.5.	Extracción de ARNm, síntesis de ADNC y reacciones de amplificación de RT-PCR	47
3.3.6.	Amplificación del gen <i>PPI QUIM</i>	47
3.4.	Estudios de sintenia	48

3.5.	Mapeo <i>in silico</i> de transcritos expresados diferencialmente durante el desarrollo reproductivo sexual y apomítico de <i>P. notatum</i> en el genoma de arroz	50
3.6.	Identificación de secuencias genómicas de <i>Paspalum notatum</i> asociadas al ACR	52
3.6.1.	Anotación de los <i>scaffolds</i> de <i>P. notatum</i> y análisis de sintenia . .	57
3.6.2.	Identificación, análisis y anotación funcional de genes candidatos	58
4.	Resultados	60
4.1.	Caracterización del material vegetal y validación de la asociación entre secuencias del cromosoma 2 de arroz y el ACR de <i>P. notatum</i>	60
4.1.1.	Clasificación de los individuos según el modo de reproducción .	60
4.1.2.	Descripción del gen <i>PPI</i> y sus secuencias homólogas	63
4.1.3.	Identificación de transcritos de <i>PPIs</i> expresados durante el desarrollo reproductivo de <i>P. notatum</i> y su relación con la apomixis .	68
4.1.4.	Detección del gen <i>PPI</i> localizado en el ACR de <i>P. notatum</i>	70
4.1.5.	Análisis de las secuencias <i>PPI</i> ligadas al ACR	73
4.1.6.	El transcripto <i>PPI QUIM</i> , su relación con el ACR y su expresión durante el desarrollo reproductivo en <i>P. notatum</i>	74
4.2.	Análisis de macro y microsintenia de las regiones cromosómicas de arroz asociadas al ACR de <i>P. notatum</i>	80
4.2.1.	Comparación con <i>B. distachyon</i> , <i>S. italica</i> y <i>S. bicolor</i>	80
4.2.2.	Análisis de colinearidad génicas en las regiones asociadas al ACR	86
4.2.3.	Análisis de bloques sinténicos	93
4.3.	Determinación de los patrones de expresión de los genes presentes en los bloques de sintenia asociados al ACR	98
4.4.	Estudios genómicos del ACR en <i>Paspalum notatum</i>	108

4.4.1.	Determinación de la conservación de la estructura del ACR a nivel diploide	108
4.4.2.	Caracterización del contenido génico y relación sinténica de los <i>scaffolds</i> de <i>P. notatum</i> con el genoma de arroz	112
4.4.3.	Mapeo de transcritos de <i>P. notatum</i> sobre los <i>scaffolds</i> del citotipo diploide	117
4.4.4.	Identificación, análisis y anotación funcional de genes candidatos	120
5.	Discusión	127
6.	Conclusiones	142
7.	Bibliografía	145
8.	Anexos	179

Abreviaturas, símbolos y anglicismos

®	Marca registrada.
©	Programa con <i>copyright</i> , derechos de autor reservados.
⊕	Programa de código abierto con licencia <i>open source</i> o base de datos con <i>copyleft</i> bajo licencias <i>Creative Commons</i> .
°C	Grados Celsius.
2n	Número cromosómico diploide de una especie.
aa	Aminoácidos.
ABA	Acrónimo de <i>Abscisic Acid</i> , equivalente a ácido abscísico, hormona vegetal implicada en el desarrollo, crecimiento y la respuesta estrés.
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ADNC	Ácido desoxirribonucleico copia.
ADng	Ácido desoxirribonucleico genómico.
AFLP	Acrónimo de <i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i> , equivalente a polimorfismos en la longitud de los fragmentos.
ARN	Ácido ribonucleico.
ARNasa	Ribonucleasa.
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero.
BACS	Acrónimo de <i>Bacterial Artificial Chromosome</i> , equivalente a cromosomas bacterianos artificiales.
<i>Bi</i>	Acrónimo de Banda informativa. Es una secuencia de ADN de <i>P. notatum</i> de 536 pb que se encuentra completamente ligada a la apomixis. Fue descubierta en la presente Tesis a partir de amplificaciones de PCR y constituye un nuevo marcador del carácter apomítico para la especie.
BLAST	Acrónimo de <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> , equivalente a herramienta informática de búsqueda de alineamiento de secuencias de tipo local.
BLASTn	Búsqueda BLAST que compara secuencias de nucleótidos contra una base de la misma naturaleza.
BLASTx	Búsqueda BLAST que compara secuencias nucleotídicas traducidas contra una base de aminoácidos.
tBLASTn	Búsqueda BLAST que compara secuencias aminoacídicas traducidas contra una base de nucleótidos traducidos.
<i>Bm</i>	Acrónimo de Banda monomórfica. Es una secuencia de ADN de <i>P. notatum</i> de 521 pb con segregación independiente del carácter apomítico. Es amplificada por PCR utilizando los mismos cebadores que generan el amplicón <i>Bi</i> .
BSA	Acrónimo de <i>Bulked Segregant Analysis</i> , equivalente a análisis de segregantes en grupo.
<i>buffer</i>	Solución reguladora, amortiguadora o tampón.

CDS	Acrónimo de <i>Coding Sequence</i> , equivalente a secuencia codificante.
CMM	Acrónimo de Célula Madre de la Megáspora.
cm	Centímetros.
cM	CentiMorgan unidad de mapeo que equivale a un 1 % de frecuencia de recombinación.
contig	Contiguo o conjunto de lecturas de ADN solapadas que conforman un concenso de una región genómica.
CTAB	Bromuro de cetiltrimetil amonio.
dATP	Desoxiadenosina trifosfato.
dCTP	Desoxicitosina trifosfato.
DAE	Acrónimo de Desarrollo Autónomo del Endosperma.
DIC	Acrónimo de <i>Differential Interference Contrast microscopy</i> , equivalente a contraste de interferencia diferencial. Es una técnica de microscopía que aumenta el contraste óptico de muestras no teñidas o tejidos translucidos.
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato.
dTTP	Desoxitimina trifosfato.
e-value	Valor esperado, también denominado como <i>parámetro E</i> . El número esperado de alineamientos en caso de interrogar a la base de datos con una secuencia aleatoria. El menor <i>e-value</i> es el más significativo.
EcoRI	Enzima endonucleasa aislada desde <i>Escherichia coli</i> . En biología molecular se utiliza como enzima de restricción.
EDTA	Ácido etilendiamino-tetracético.
F₁	Primera generación en un cruzamiento.
FAA	Fijador molecular compuesto por formaldehído, alcohol y acético.
FDR	Acrónimo de <i>False Discovery Rate</i> , proporción esperada de error de tipo 1 en una comparación múltiple.
g	Gramo.
Gb	Gigabit (1×10^9 bites).
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno.
IA	Acrónimo de célula Inidiadora de la Aposporia.
isotig	Variante alélica o de <i>splicing</i> de un gen.
isogroup	Conjunto de <i>isotigs</i> pertenecientes a un mismo gen.
kpb	Kilo pares de bases (1×10^3 pb).
l	Litro.
LB	Acrónimo de <i>Lysogeny Broth</i> , equivalente a caldo de lisogenia. Medio rico en nutrientes para el crecimiento de bacterias.
lncRNA	Acrónimo de <i>Long non-coding RNA</i> , equivalente a ARN largo no codificante.
Log₂FC	Proveniente de <i>Log₂Fold-Change</i> . Representa al logaritmo de base 2 de la razón encontrada entre las medias de los <i>reads</i> de dos bases de datos.
M	Molar.
mA	Miliamperio.
MF	Acrónimo de Megáspora Funcional.
mg	Miligramo (1×10^{-3} g).
mg/ml	Miligramos por mililitro.
MgCl₂	Cloruro de magnesio.
ml	Mililitro (1×10^{-3} l).
mM	Milimolar (1×10^{-3} m).
Mpb	Mega pares de base (1×10^6 pb).
n	Número cromosómico haploide de una especie.

N	Normal.
NaCl	Cloruro de sodio.
ng	Nanogramo (1×10^{-9} g).
nm	Nanómetro (1×10^{-9} m).
ORF	Acrónimo de <i>Open Reading Frame</i> , equivalente a marco abierto de lectura.
P/v	Peso en volumen.
p-value	Probabilidad asociada. Valor de probabilidad asociada a un análisis estadístico.
pb	Pares de bases.
PCR	Acrónimo de <i>Polymerase Chain Reaction</i> , equivalente a reacción en cadena de la polimerasa.
pellet	Porción de material aglomerado que se logra separar mediante centrifugación.
pg	Picogramo (1×10^{-12} g).
pH	Potencial de hidrógeno, es una medida de acidez o alcalinidad de una solución.
PM	Peso molecular.
pM	Picomolar (1×10^{-12} molar).
RAPD	Acrónimo de <i>Random Amplified Polymorphic DNA</i> , equivalente a polimorfismos por amplificación al azar del ADN.
RFLP	Acrónimo de <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> , equivalente a polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción.
rpm	Revoluciones por minuto.
RT-PCR	Acrónimo de <i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i> , equivalente a reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa.
SCAR	Acrónimo de <i>Sequence-Characterized Amplified Region</i> , equivalente a regiones amplificables caracterizadas por secuencia.
scaffold	Secuencias consenso obtenidas mediante el ensamblado de <i>contigs</i> .
SEA	Acrónimo de Saco Embrionario Apospórico.
SEM	Acrónimo de Saco Embrionario Meiótico.
SEMX	Ovarios mixtos. Presentan un saco embrionario meiótico junto con uno o más sacos embrionarios apospóricos.
T	Temperatura.
T_a	Temperatura de anillado, de alineamiento o de apareamiento. En una reacción de PCR, la T _a es utilizada para permitir que los cebadores puedan unirse a sus secuencias complementarias en la hebra molde de ADN en el proceso de anillamiento. Depende de la T _m de los cebadores y es usualmente unos grados (3-6 °C) más baja que esta.
TAE	Tris-ácido acético-EDTA.
Taq	Enzima polimerizante del ADN obtenida de <i>Thermus aquaticus</i> .
TE	Tris-EDTA.
T_m	Temperatura de <i>melting</i> , de templado o de fusión. Es la temperatura a la cual el 50 % de una doble hebra de ADN se desnaturaliza. Depende el largo y composición de la molécula de ADN.
Tris	N-tris-(hidroximetil)-aminoetano.
U	Unidad de actividad enzimática.
unitig	Contiguo de alta confianza que es totalmente coherente con todos los datos, incluidas las lecturas, las superposiciones y las restricciones de coincidencia.
UTR	Acrónimo de <i>Untranslated Region</i> , equivalente a región no traducida. Cada gen presenta dos regiones (5' UTR y 3' UTR) colindando su secuencia codificante.
UV	Ultravioleta.
V	Voltio.

v/v	Porcentaje volumen en volumen.
W	Watts.
WSB	Acrónimo de <i>White-Stigma Bahiagrass strain</i> , equivalente a línea con estigmas blancos del pasto Bahía. Es un carácter empleado como indicador en los cruza- mientos.
<i>x</i>	Número cromosómico básico de una especie.
X-Gal	Compuesto orgánico utilizado para corroborar la presencia de la encima β - galactosidasa en cultivos bacterianos.
μg	Microgramo (1×10^{-6} g).
$\mu\text{g/ml}$	Microgramo por mililitro.
μl	Microlitro (1×10^{-6} l).
μM	Micromolar (1×10^{-6} m).

Resumen

La apomixis es una forma de reproducción clonal por semillas que origina progenies genéticamente idénticas a la planta madre. Este carácter fija naturalmente cualquier combinación genética y por lo tanto es de gran interés para el mejoramiento. La apomixis está ampliamente difundida en las angiospermas, pero no se encuentra en las especies de gran cultivo. Solamente algunos géneros de gramíneas forrajeras subtropicales, el mango y las fresas presentan naturalmente este tipo de reproducción. La manipulación del carácter y su transferencia a los cultivos mayores puede tener un gran impacto en la agricultura. En la apomixis de tipo gametofítica, los embriones maternos se desarrollan por partenogénesis (sin fecundación) a partir de sacos embrionarios no reducidos (SEA) derivados de células somáticas del óvulo (aposporía), o de la propia célula madre de la megáspora (diplosporía) luego de una falla en la meiosis. Varios autores sugieren que la apomixis puede derivar de cambios genéticos o epigenéticos de vías claves de la sexualidad. *Paspalum notatum* es una gramínea rizomatosa perenne que forma complejos agámicos y multiploides en los cuales el citotipo diploide se reproduce sexualmente, mientras que el tetraploide se reproduce por apomixis de tipo apospórica. La apomixis está controlada por un *locus* complejo, localizado en una región genómica de aproximadamente 36 Mpb, denominado ACR (por *Apospory Controlling Region*), que presenta una segregación distorsionada, ausencia de recombinación y una alta metilación de citosinas. Este segmento cromosómico, está asociado (presenta sintenia) a regiones de los cromosomas 2 y 12 de arroz (*Os2* y *Os12*), pero su constitución génica y estructural es aún desconocida.

El objetivo de este trabajo fue determinar la conservación de los segmentos cromosómicos de arroz asociados al ACR en diferentes especies de gramíneas, determinar su contenido génico, analizar los posibles patrones de expresión de los genes presentes durante el desarrollo reproductivo e identificar regiones genómicas asociadas al ACR utilizando un borrador del genoma de un citotipo diploide de *P. notatum*.

Como material vegetal se utilizaron los genotipos tetraploides Q4188 (sexual) y Q4117 (apomítico), una población F₁ de 18 híbridos derivada del cruzamiento entre ellos y ocho genotipos apomíticos. La caracterización del modo reproductivo del material vegetal fue realizada mediante observaciones citoembriológicas de ovarios clarificados en estado de antesis y por análisis moleculares utilizando el marcador SCAR SPNA2, que se encuentra completamente ligado a la apomixis en la especie. Ambos estudios mostraron resultados concordantes en los individuos ensayados a excepción del genotipo Q3664 (un genotipo apomítico facultativo), el cual presentó SEA y ausencia del marcador. Este resultado indicaría que Q3664 sería un recombinante para el marcador utilizado y el ACR, en esa región. El genotipo presenta un bajo porcentaje de expresión de la aposporia (11 %) con respecto a los genotipos apomíticos obligados (65 a 89 %) que sí contienen el marcador.

A fin de validar la asociación del cromosoma Os2 con el ACR, se identificaron transcritos de *P. notatum* con homología al marcador de RFLP C932 (que mapea en dicha región de arroz y que codifica para un gen *PPI*) expresados en los transcriptomas reproductivos sexual y apomítico. Como resultado se obtuvieron cinco secuencias homólogas a partir del transcriptoma sexual y tres del apomítico, respectivamente. Mientras los cinco transcritos sexuales fueron semejantes al gen de arroz, los transcritos apomíticos resultaron variables; una de las formas mostró semejanzas con el gen funcional, otra resultó un pseudogen sin aparente capacidad codificante, y el tercero resultó un transcripto quimérico, codificante para los dominios PPI y DNAJ. El mapeo de las secuencias genómicas de cada transcripto en la población F₁ segregante, demostró que la forma quimérica del gen segrega completamente ligada al carácter apomixis. Este resultado confirmó la asociación del segmento del cromosoma Os2 con el carácter y determinó que la forma quimérica es la que se encuentra en el ACR. Los estudios de conservación de los segmentos de arroz demostraron que las regiones de los cromosomas Os2 y Os12 sinténicas al ACR de *P. notatum* presentan una alta conservación en el contenido y orden génico respecto a seis de las siete especies del género *Oryza* estudiadas (*O. sativa* grupo Indica, *O. barthii*, *O. brachyantha*, *O. glaberrima*, *O. glumipatula*, *O. punctata*). Sin embargo, para el caso de *Sorghum bicolor*, se identificó una inversión de 6 Mpb y en *Oryza nivara*, se detectaron bloques de sintenia translocados entre los cromosomas homólogos al Os2 y Os12.

A fin de analizar los posibles patrones de expresión de los genes presentes en los segmentos de arroz asociados al ACR se estudió un transcriptoma floral por estadios del desarrollo reproductivo apomítico y sexual de *P. notatum*. Este estudio reveló que la mayor parte de los transcritos codificantes diferenciales están sobrexpresados en el

genotipo apomítico. Además, se observó que en los cromosomas Os2 y Os12 se localiza una proporción mayor de transcritos sobreexpresados del genotipo apomítico que en el resto de los cromosomas. Un análisis similar mostró que el Os12 presenta la mayor proporción de transcritos no codificantes sobreexpresados en el genotipo apomítico.

A partir de la disponibilidad de un borrador del genoma de un citotipo diploide de *P. notatum*, se detectaron *scaffolds* asociados al ACR mediante el mapeo de 17 secuencias que cosegregan con la apomixis. Este análisis identificó 10 *scaffolds* que fueron caracterizados por su contenido génico. Las secuencias identificadas determinaron que presentan regiones sinténicas a las regiones cromosómicas de arroz asociadas al ACR, presentando además una alta conservación en el contenido y orden génico. Estos resultados indican que el genoma diploide contiene, al menos parcialmente, el ACR presente en los citotipos tetraploides. Uno de los *scaffolds* estudiados (utg001125l) contiene genes homólogos a genes de arroz localizados en las regiones sinténicas de los cromosomas Os2 y Os12, lo cual podría representar el sitio de yuxtaposición de la sintenía mixta del ACR. El escrutinio detallado de las secuencias de arroz identificadas en cada uno de los análisis nos permitió identificar una lista de 100 candidatos para futuros estudios referidos a la apomixis entre los cuales los genes *PPI*, *HUELLENLOS*, *EXS*, *TTG1* y *MT-A70* aparecen como los más relevantes.

PALABRAS CLAVES:

APOMIXIS

SINTENÍA

PPIASA

Abstract

Apomixis in angiosperms means asexual reproduction by seeds. This trait generates progenies that are clones of the mother plant. Apomixis fix heterosis and thus is of great interest for breeding. This trait is widely distributed in angiosperms but is not found in major crops. Only some genera of subtropical forage grasses, the mango, and strawberries exhibit apomictic reproduction. Manipulation of the character and its transference to cereals or other important crops can have a great impact on agriculture. In gametophytic apomixis, maternal embryos develop by parthenogenesis (without fertilization) from non-reduced embryo sacs (AES) derived from somatic cells of the ovule (apospory), or from the megaspore mother cell (diplospory) after a failure in meiosis. Many authors consider that apomixis is derived from genetic and/or epigenetic deregulation of the key factors of the sexual pathway. *Paspalum notatum* is a perennial rhizomatous grass that forms a multiploid complex in which the diploid cytotype reproduces sexually, while the tetraploid one reproduces by pseudogamous aposporous apomixis. Apomixis in the species is controlled by a complex locus called ACR (Apospory Controlling Region), which exhibits distorted segregation ratio, absence of recombination, and high cytosine methylation. The ACR is syntenic to segments of rice chromosomes 2 (Os2) and 12 (Os12). Today, its genetic and structural constitution is still unknown.

The objective of this work was to determine the conservation, gene content, and expression patterns of genes located in the rice segments syntenic to the ACR, and identify associated genomic sequences in the diploid cytotype of *P. notatum*.

The tetraploid genotypes Q4188 (sexual) and Q4117 (apomictic), 18 F₁ hybrids, and eight apomictic genotypes were used. The mode of reproduction of each plant was analyzed by cytoembryological and molecular analysis. Both studies showed congruent results except for the facultative apomictic Q3664 genotype, which could be a recombinant for the ACR. To validate the association of the Os2 segment with the ACR, *P.*

notatum transcripts expressed during the reproductive development with homology to clone C932 (which maps on it and encodes a *PPI* gene) were analyzed. Five transcripts were retrieved from the sexual database, and three from the apomictic one. All sexual forms encode for PPIase proteins, but only one of the apomictic ones. The rest consisted of a non-coding and a chimeric transcript, respectively. The lastest encodes for a protein carrying both PPIase and DNAJ domains. Linkage analyses of the genomic sequences associated with the transcripts demonstrated that the chimeric form mapped in the ACR.

Analyses of the two ACR syntenic segments of rice showed that both regions present high levels of gene and gene-order conservation. Only a few rearrangements were detected, in *Sorghum bicolor* and *Oryza nivara*. The possible expression patterns of the genes present in the rice segments associated with the ACR was analyzed by using stage-specific transcriptome of the apomictic and sexual reproductive development of *P. notatum*. This study revealed that most of the 13,388 differential coding transcripts derives from the apomictic genotype. Moreover, both Os2 and Os12 showed a higher proportion of over-expressed transcripts than in the rest of the chromosomes. A similar analysis showed that Os12 has the highest proportion of non-coding over-expressed transcripts. Based on the availability of a genome draft of the diploid cytotype of the species and a group of genes and molecular markers linked to apomixis, 10 scaffolds associated with the ACR were identified. They also resulted syntenic to the rice regions analyzed, indicating that the diploid genome contains (at least partially) the ACR present in the tetraploid cytotype. One of the assemblies contains genes homologous to rice regions of chromosomes Os2 and Os12 and could represent the site of the juxtaposition of the mixed synteny of ACR. After the examination of the set of rice sequences identified in this work, a list of 100 candidates was proposed for further analysis. Among them, *PPI*, *HUELLENLOS*, *EXS*, *TTG1*, and *MT-A70* appears to be the most promising.

KEY WORDS:

APOMIXIS

SYNTENY

PPIASE

1. Introducción

1.1. Apomixis y reproducción sexual en las angiospermas

La apomixis es un tipo de reproducción asexual por semillas que involucra la formación de progenies genéticamente idénticas a la planta madre (Nogler, 1984). El término, surge del prefijo $\alpha\pi\omicron$ (apo: ausencia) y de la palabra griega $\mu\iota\chi\iota\varsigma$ (mixis: mezcla) resaltando la principal característica que distingue el proceso apomíctico de la vía sexual: la falta de unión de las gametas reducidas (la oósfera y la célula espermática) para formar el cigoto y, posteriormente, el embrión.

En las angiospermas, el proceso sexual involucra la generación de los gametofitos haploides (n) a partir de células somáticas del esporofito diploide ($2n$), que recombinan y reducen su complemento genético por meiosis y forman posteriormente por mitosis estructuras especiales que contienen a las gametas femenina y masculina, respectivamente (Asker y Jerling, 1992). El gametofito masculino (microgametofito o grano de polen), se origina a partir de la meiosis de las células madres del polen formadas en las anteras, que generan meiositos haploides. Luego de una mitosis, se forma el polen binucleado, que es rodeado por las capas intina y exina (**Figura 1.1A**). Al desprenderse de la antera, el grano de polen se encuentra en su fase madura y está conformado por tres células haploides: dos núcleos espermáticos y un núcleo vegetativo, que es el responsable del crecimiento del tubo polínico (Scott *et al.*, 2004). La formación de la contraparte femenina, el megagametofito, se inicia a partir de una célula especializada de la nucela, denominada célula arquesporial, que dará lugar a la célula madre de la megáspora (CMM). Esta última, se divide por meiosis para formar cuatro megásporas reducidas (n), de las cuales solo una dará lugar a una megáspora funcional (MF), la cual generará, mediante tres divisiones mitóticas, el megagametofito. El megagametofito, o saco embrionario (**Figura 1.1B**), es-

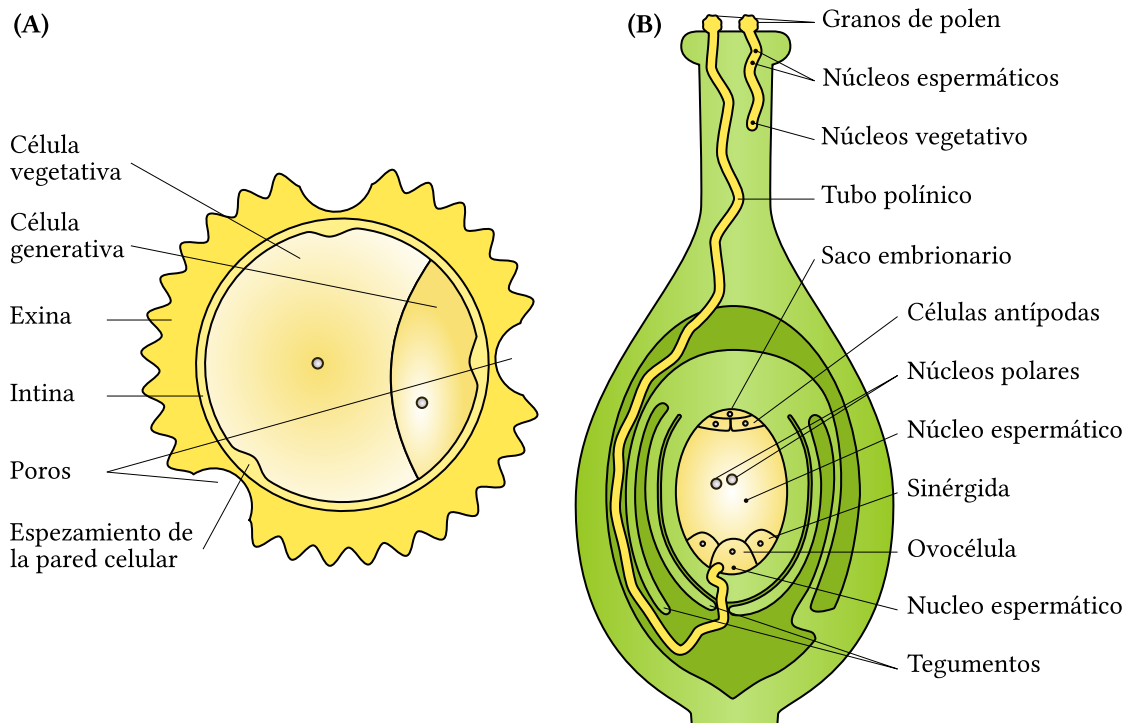


FIGURA 1.1: Gametofitos en especies del clado Anthofitas. **A)** Grano de polen binucleado tal cual se encuentra previo a la antesis. **B)** Doble fecundación en donde el tubo polínico del gametofito masculino (o grano de polen), crece a través del estilo y entra en un óvulo que contiene el gametofito femenino (saco embrionario). Uno de los núcleos espermáticos se fusiona con el núcleo de la ovocélula formando el cigoto. El otro núcleo se fusiona con los núcleos polares para generar el endosperma. Esquema adaptado de Johri y Rao (1984).

tá compuesto por siete células y ocho núcleos haploides: en el extremo micropilar, se encuentra la célula oófera, junto a dos células sinérgidas. En el extremo chalazal, se localizan las células antipodales (Webb y Gunning, 1990; Grossniklaus *et al.*, 2001). Este tipo de saco embrionario meiótico (SEM) está presente en más del 70 % de las angiospermas y se denomina de tipo Polygonum, ya que fue descrito inicialmente en plantas de *Polygonum convolvus* (Strasburger, 1908). Al depositarse el grano de polen sobre los estigmas, se produce la germinación del tubo polínico, que comienza a crecer por el estilo. Cuando el tubo polínico alcanza el saco embrionario, se produce la doble fecundación (**Figura 1.1B**), en donde uno de los núcleos espermáticos se fusiona con la ovocélula para dar origen al embrión ($2n$), mientras que el segundo núcleo espermático se fusiona a la célula central a partir del cual se desarrolla el endosperma (Navashin, 1898; Webb y Gunning, 1990).

El desarrollo de la semilla se completa con la formación de las cubiertas seminales internas y externas, originadas desde tejido materno y del desarrollo del fruto que la

contendrá hasta su dispersión. Previo a su madurez fisiológica, la simiente atraviesa un proceso de deshidratación orientado a aumentar su resistencia a condiciones ambientales adversas y sus probabilidades de generar una planta viable. De esta manera, la reproducción sexual permite la combinación de los caracteres genéticos presentes en los padres y su transmisión a los distintos individuos de la progenie. Este sistema, por lo tanto, genera variabilidad genética que le permite a la especie adaptarse a diferentes ambientes (Silvertown, 2008).

Contrariamente a la vía sexual, la apomixis conduce a la generación de progenies genéticamente idénticas a la planta madre (Nogler, 1984). La formación de semillas por esta vía puede ocurrir por diferentes mecanismos que tienen en común la formación de embriones maternos a partir de tejidos somáticos del óvulo sin fecundación (Koltunow y Grossniklaus, 2003; Ortiz *et al.*, 2013; Hand y Koltunow, 2014).

1.1.1. Tipos de apomixis

La apomixis presenta formas diferentes clasificándose en dos grandes clases dependiendo del origen de los embriones somáticos: la apomixis esporofítica y la apomixis gametofítica (**Figura 1.2**). En la apomixis esporofítica, también conocida como embriónía adventicia, los embriones somáticos se originan directamente a partir de células de la nucela o de los tegumentos del óvulo, sin que se forme un saco embrionario (Koltunow y Grossniklaus, 2003; Naumova, 1993). Las especies que presentan este tipo de reproducción, necesitan del endosperma formado a partir del saco embrionario meiótico (SEM) de origen sexual para desarrollarse. Entre ellas se encuentran especies ornamentales de la familia *Orchidaceae* (Teppner, 1996), frutales como el mango (*Mangifera indica*) y especies del género *Citrus* (Sachar y Chopra, 1957; Koltunow, 1993). Por otro lado, en la apomixis gametofítica, se forman siempre sacos embrionarios no reducidos ($2n$), cuyos núcleos no han pasado por el proceso de meiosis (apomeiosis). Dependiendo de cuál es la célula a partir de la que se origina este saco embrionario, la apomixis gametofítica se subdivide en dos tipos: diplosporía y aposporía. En el primer caso, el saco embrionario se origina a partir de la propia CMM luego de una falla u omisión de la meiosis. En este caso, el proceso sexual se ve completamente comprometido. En el caso de la aposporía, el saco embrionario se origina a partir de una célula somática de la nucela, adyacente a la CMM que se denomina célula Inicial de la Aposporía (IA; **Figura 1.2**). Esta composición permite que en muchas especies coexistan en el mismo óvulo ambos tipos de sacos: sacos

embrionarios de origen sexual (meióticos) y sacos embrionarios de origen apomítico (Hand y Koltunow, 2014).

Dado que los sacos embrionarios apomíticos (SEA) surgen de divisiones mitóticas, generalmente se distinguen morfológicamente de los sacos de origen sexual por su forma, tamaño y localización dentro de la nucela, y en algunos casos por la ausencia de antípodas (Hanna, 1991). Se han documentado diferentes estructuras de sacos apospóricos (Nogler, 1984; Caceres *et al.*, 1999). Los SEA del tipo *Panicum* son monopolares y contienen solo cuatro núcleos, por lo que queda conformado por la ovocélula, dos sinérgidas y una célula central de gran tamaño. Esta clase de sacos es común de gramíneas apomíticas del género *Cenchrus*, *Chloris*, *Digitaria*, *Eriochloa*, *Panicum*, *Sorghum* y *Pennisetum* (Nogler, 1984; Carman, 1997). Aunque en la mayoría de los casos la célula central es uninucleada, en *Paspalum notatum* se presenta una variante denominada «del tipo *Paspalum*» donde la célula central presenta dos núcleos polares (Burson y Bennett, 1970; Quarín *et al.*, 1996). De esta manera, las semillas derivadas de apomixis de tipo gametofíticas se forman mediante la combinación de tres procesos: I) apomeiosis, proceso en el cual se produce un saco embrionario no reducido; II) partenogénesis: formación del embrión de forma independiente, sin fertilización de la ovocélula; y III) desarrollo del endosmerma, ya sea en forma autónoma (DAE), o por fertilización de los núcleos polares (pseudogamia; Hand y Koltunow, 2014).

1.1.2. Ventajas de la apomixis en los cultivos

La apomixis ha sido observada en más de 400 géneros de angiospermas, siendo frecuentemente encontrada en las familias *Poaceae*, *Asteraceae*, *Rosaceae*, *Melastomataceae* y *Rutaceae* (Hanna y Bashaw, 1987; Grimanelli *et al.*, 2003; Hörandl y Hojsgaard, 2012; Mendes-Rodrigues y Oliveira, 2012; Burgess *et al.*, 2014; Hojsgaard y Hörandl, 2019). La presencia de la apomixis en distintos filos vegetales y de formas diferentes indica que el carácter ha surgido varias veces de forma independiente durante la evolución (Grimanelli *et al.*, 2001). A pesar de esto, ninguno de los principales cultivos de escala global (maíz, trigo, arroz, soja u otros) presentan este tipo de reproducción y la introgresión del carácter desde especies silvestres cercanas aún no ha sido fructífera (Savidan, 2000).

Se especula que el entendimiento de las bases moleculares de la apomixis significará una transformación radical en el mejoramiento genético vegetal, permitiendo a las nuevas variedades conservar caracteres agronómicamente valiosos mediante la repro-

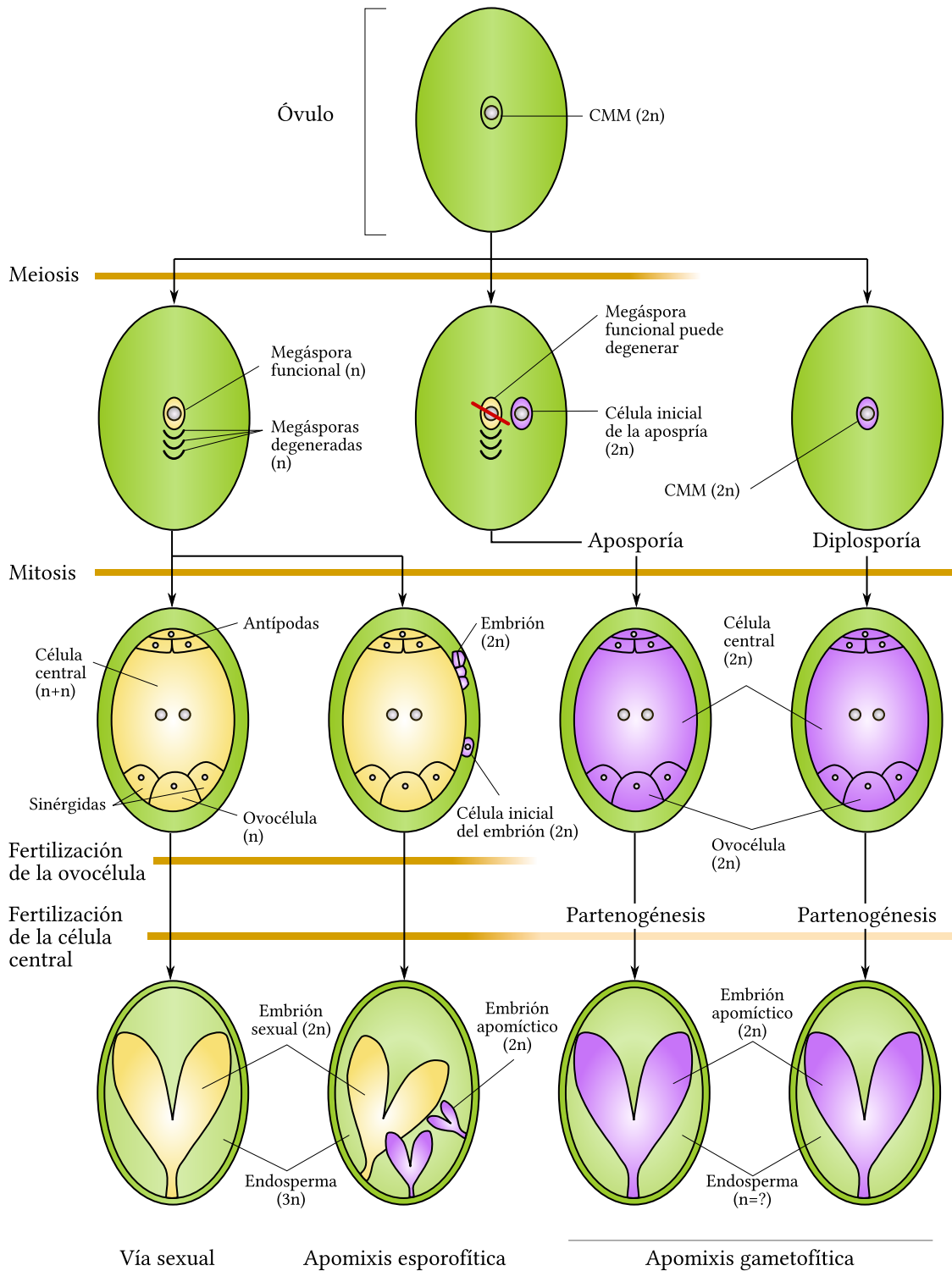


FIGURA 1.2: Mecanismos del desarrollo sexual y apomíctico adaptado de Hand y Koltunow (2014). Las flechas que atraviesan los procesos de meiosis, mitosis y fertilización indican que intervienen en una vía reproductiva dada. En la apomixis gametofítica, la formación del endosperma puede darse con o sin la fertilización de la célula central (esta posibilidad se representa con una línea horizontal más clara). En estos casos, la ploidía del endosperma (indicada con el signo ?) es variable y depende de diferentes factores. Los colores representan el origen sexual (naranja) o apomíctico (violeta) de los embriones y las estructuras intermedias de su desarrollo. CMM: célula madre de la megáspora

ducción clonal por semillas (Hofmann, 2010). Su introducción en los cultivos permitirá la fijación de genotipos obtenidos en las poblaciones F_1 donde se explota el vigor híbrido (heterosis), como es el caso de los cultivos del tomate (*Solanum lycopersicum*), el maíz (*Zea mays*), o el arroz (*Oryza sativa* grupo Japonica). En estos casos, los costos de la producción de semilla comercial son altos ya que involucran procesos de mantenimiento de líneas parentales endrocridadas, la emasculación de las líneas maternas y los cruzamientos dirigidos (Grossniklaus *et al.*, 1998). Se estima que la reducción de los costos de producción habilitará el uso de la comercialización de híbridos en las especies donde actualmente esta tecnología no resulta económicamente rentable (Savidan, 2000; Fiaz *et al.*, 2021).

Por otro lado, la utilización de la apomixis en especies de reproducción vegetativa, donde se utilizan propágulos como los tubérculos (cultivo de papa, *Solanum tuberosum*), rizomas (producción de frutilla, *Fragaria × ananassa*, o mandioca, *Manihot esculenta*), esquejes (especies florales y ornamentales) o yemas (árboles frutales), permitiría la multiplicación y comercialización de los mismos mediante el uso de semillas verdaderas de origen clonal, la cual proveerá diversos beneficios productivos y de comercialización (Barcaccia y Albertini, 2013; Leszczuk *et al.*, 2018; Spillane *et al.*, 2004; Bisognin *et al.*, 2009). Por mencionar un ejemplo, los gastos del cultivo tradicional de papa asociados al almacenamiento, traslado e implantación podrían reducirse a un décimo si en el cultivo se implementara el uso de semilla verdadera (Tiwari *et al.*, 2017). Además, mejoraría la sanidad de los propágulos, se prolongaría la vía útil de almacenaje y se acortarían los tiempos de las prácticas relacionadas con la implantación de los cultivos.

Los cruzamientos intergenéricos o interespecíficos son una herramienta de mejoramiento vegetal poco frecuente con resultados más impredecibles y más improbables que los cruzamientos intraespecíficos, fundamentalmente porque las distancias genéticas son mayores entre géneros que entre especies (Talmadge, 2018). La principal restricción para su uso en especies de producción es la esterilidad meiótica derivada de la diferencia entre los genomas parentales. Los mejoradores especulan que la apomixis mitigará este impedimento al no depender de la meiosis para la formación de semillas. Se especula que la utilización de cruzamientos de este tipo permitirá encontrar sinergismos genéticos a niveles más altos que los diploides, maximizando el multialelismo y/o la heterocigosidad (Vielle-Calzada *et al.*, 1996). La eliminación de la esterilidad meiótica de los cruzamientos interespecíficos e intergenéricos permitirá por lo tanto el uso de nuevos híbridos productivos que no pueden mantenerse por el proceso sexual.

Otra problemática que podría resolverse con la incorporación de la apomixis en los cultivos mayores es el escape de los transgenes vía polen. La hibridación de cultivos transgénicos con sus parientes silvestres genera un flujo potencial de transgenes hacia las poblaciones naturales que pueden alterar su ecología (Lu y Snow, 2005). Utilizando el carácter apomixis autónoma en conjunto con la androesterilidad, se podría mitigar la vía elemental del flujo de transgenes desde los cultivos comerciales y por lo tanto se mejoraría la coexistencia del sistema agrícola con su entorno ecológico (Albertini y Veronesi, 2017).

Pocas plantas de interés agronómico presentan naturalmente este tipo de reproducción. Dentro éstas se encuentran algunos frutales como el mango (*Mangifera indica*), el kuini (*Mangifera odorata*), la pomarrosa (*Eugenia jambos*), el jamborán (*Syzygium cumini*) y especies del género *Citrus*, como el limón (*C. limon*), la naranja (*C. sinensis*), la mandarina (*C. reticulata*) y el pomelo (*C. paradiso*). También se ha reportado apomixis en otras especies comerciales como *Poncirus trifoliata*, usada como pie de injerto de diferentes cítricos, y algunos géneros de orquídeas (Hand y Koltunow, 2014; Johri, 1982). Actualmente, los únicos cultivos comerciales donde se explota activamente el carácter apomítico son especies forrajeras domesticadas o semidomesticadas de los géneros *Penisetum*, *Cenchrus*, *Brachiaria* y *Paspalum* (Miles, 2007; Urbani *et al.*, 2017).

1.2. El género *Paspalum*

El género *Paspalum* L. pertenece a la familia *Poaceae*, subfamilia *Panicoideae*. Contiene alrededor de 350 especies, la mayoría distribuida en las zonas tropicales y subtropicales del continente americano (Rua *et al.*, 2010). Estas gramíneas se caracterizan por sus inflorescencias racimosas unilaterales, con espiguillas solitarias o apareadas con la gluma y flor inferior normalmente ausente o rudimentarias. Fisiológicamente son especies con el sistema fotosintético C₄ del subtipo NADP-ME (Brown, 1977), y la mayoría de ellas presentan un número cromosómico básico de $x = 10$ (Quarín y Burson, 1991; Quarín, 1992; Hojsgaard *et al.*, 2009). Dentro del género, la poliploidía es una característica usual que está presente en casi el 80 % de las especies, siendo la tetraploidía ($4x$) la más frecuente. La diversidad de los niveles de ploidía y la gran cantidad de estrategias reproductivas encontradas dentro de las especies —reproducción sexual (por auto y allogamia) y reproducción clonal (por apomixis y propagación vegetativa)— le ha permitido al género presentar un amplio rango de adaptaciones ecológicas (Quarín, 1992).

Dentro de las especies es común encontrar citotipos que se diferencian en sus niveles de ploidía; normalmente los citotipos diploides ($2n = 2x$) son sexuales obligados y autoincompatibles, y los poliploides ($3x$, $4x$, $5x$, etc.) son autofértiles y apomícticos (obligados o facultativos). Varias especies conforman complejos agámicos y multiploides donde se comprueba el flujo génico entre los diferentes niveles de ploidía mediante una serie de procesos combinados de hibridación y reproducción apomíctica (Daurelio *et al.*, 2004). Los complejos agámicos posibilitan la formación de microespecies que portan diferentes formas de recombinación de caracteres de las especies parentales. Pueden encontrarse individuos autopoliploides, generados por autogamia, y alopoliploides, generados por alogamia, y a su vez, ambos se pueden combinar propiciando un flujo génico hacia diversos niveles de ploidía (Nogler, 1984; Bayer, 1990). Se ha propuesto que estos flujos se producen en ambas direcciones —teoría de la transición de Carman (1997)—, permitiendo que haya una retroalimentación hacia los niveles de ploidía más bajos, donde la reproducción sexual posibilita la recombinación genética (Hörandl y Hojsgaard, 2012; Scataglini *et al.*, 2014).

El gran número de especies que componen el género, su distribución geográfica y las características de palatabilidad y producción de materia seca, hacen del género *Paspalum* uno de los más importantes y promisorios para el desarrollo de cultivares forrajeros adaptados a las regiones cálidas y templadas de América (Burton, 1974; Evers *et al.*, 2004; Giussani *et al.*, 2009). Aproximadamente la mitad de la producción ganadera mundial basa su alimentación en cultivos estivales en los países tropicales y subtropicales y cerca del 60 % de estas especies forrajeras se reproducen por apomixis (Jank *et al.*, 2011). Entre ellas, el pasto horqueta o pasto bahía (*P. notatum*) se ha convertido en una de las especies importantes tanto por sus características forrajeras como por su aptitud como césped (Acuña *et al.*, 2009) y es considerada en diferentes programas de mejoramiento (Zilli *et al.*, 2019).

1.2.1. *Paspalum notatum*

Paspalum notatum Flüggé, es una especie rizomatoza estival perenne nativa del continente americano que se encuentra distribuida desde México y las islas del Caribe hasta el centro de Argentina (Chase, 1929). Es un componente fundamental de los pastizales del sur de Brasil, Paraguay, Uruguay y noroeste argentino. La especie fue introducida en 1913 en el estado de Georgia, al sur de los Estados Unidos, como parte de un programa de mejoramiento vegetal, donde actualmente es el cultivo forrajero perenne de mayor

importancia (Acuña *et al.*, 2009; Rouquette *et al.*, 2020). Existen dos citotipos mayoritarios: el diploide (*var. Pensacola*; $2n = 2x = 20$) es de reproducción sexual estricta, de polinización cruzada y es endémico de las cuencas de los ríos Paraná y Uruguay en el centro-noreste de Argentina (Burton, 1955, 1967; Daurelio *et al.*, 2004) y el citotipo tetraploide (*var. común*; $2n = 4x = 40$), que presenta apomixis de tipo apospórica pseudógama y se distribuye en todo el rango ecológico de la especie (Gates *et al.*, 2004; Burton, 1948). Existen otros niveles de ploidía ocasionales como $3x$, $5x$ y $8x$ (Ortiz *et al.*, 2013). En el complejo agámico que conforman, las poblaciones diploides que se encuentran restringidas espacialmente proveen la fuente de variabilidad de la especie y cohabitan e hibridan con poblaciones poliploides, las cuales explotan la apomixis expandiéndose clonalmente dentro de los rangos ecológicos a los cuales están adaptadas (Daurelio *et al.*, 2004; Kearney, 2005; Hörandl, 2006).

Las plantas de *P. notatum* presentan rizomas fuertes, subsuperficiales y horizontales compuestos por internudos cortos recubiertos por vainas foliares secas. Los tallos son ascendentes, con internudos largos y pueden alcanzar los 60 cm de altura (**Figura 1.3A**). Las vainas de las hojas son aquilladas, se superponen en las bases, y los márgenes foliares son glabros aunque pueden presentar ciliat hacia su ápice. Las láminas foliares son lineares lanceoladas de 3 a 30 cm de largo y de 3 a 12 mm de ancho, y normalmente se encuentran plegadas longitudinalmente hacia su base. Presentan pubescencia en toda su longitud a excepción de la sección basal. Las inflorescencias están dispuestas en espiguillas con un pedicelo común muy corto y casi imperceptible. Las mismas se disponen en racimos ascendentes curvos (dos o raramente tres por pedúnculo) de 3 a 14 cm de longitud (**Figura 1.3B**). El raquis es glabro, flexuoso de coloración verdosa a purpúrea. Las espiguillas bifloras son solitarias, dispuestas en dos filas de un solo lado del raquis. Son aovadas, brillosas, glabras, de 2,5 a 4 mm de longitud y de 2 a 2,8 mm de ancho (**Figura 1.3C**). Dentro de las mismas se disponen dos antecios de los cuales el inferior es estéril y de él solo persiste su lemma (**Figura 1.3D**). La gluma inferior es rudimentaria por lo que la espiguilla queda delimitada por la gluma superior y la lemma del antecio inferior. El antecio superior es funcional y se encuentra cubierto por su lemma y palea. Las anteras y los estigmas usualmente son púrpuras y el fruto cariopse es ovalado (**Figura 1.3E**), amarillento a la madurez, y con un tamaño promedio de 1,8 mm de longitud y 1,2 mm de ancho (Gates *et al.*, 2016).

El mecanismo de reproducción apomíctico de esta especie requiere del proceso de polinización, ya que el endosperma de la semilla agámica se desarrolla únicamente luego de la fertilización de los núcleos polares. Esto ocurre independientemente del nivel

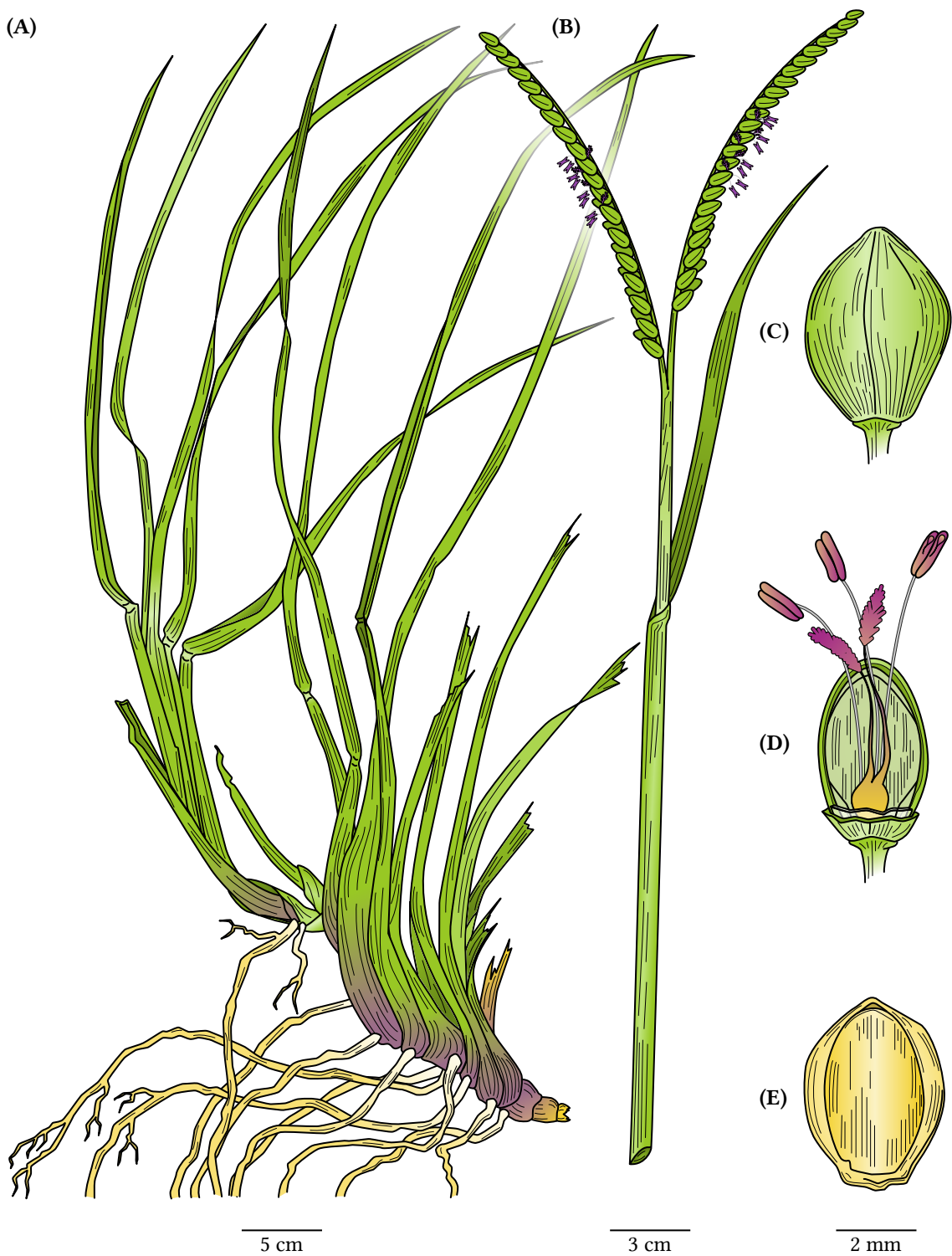


FIGURA 1.3: Ilustración de una planta tipo de *Paspalum notatum*. **A)** Rizoma de una planta con sus raíces adventicias y macollos decumbentes. **B)** Inflorescencia iniciando la antesis. **C)** Espiguilla en estadio de preantesis. **D)** Interior de una espiguilla en antesis (sin la gluma superior y lemma del antecio funcional) donde se observa el gineceo y el androceo. **E)** Espiguilla madura conteniendo el fruto cariopse.

de ploidía del parental estaminado (dador de polen), incluso de la polinización con especies emparentadas como *Paspalum cromyorrhizon* Trin (Quarín, 1999). Se estima que la variabilidad natural encontrada en el biotipo común (tetraploides de reproducción apomítica) resulta de los procesos de poliploidización recurrente (Normann *et al.*, 1989; Siena *et al.*, 2008). En la teoría del puente triploide, propuesta por Normann *et al.* (1989), se postula que los citotipos triploides ($3x$) se generarían a partir de la fertilización de gametas femeninas no reducidas producidas (en una muy baja proporción) por los individuos diploides ($n = 2x$) con gametas masculinas reducidas ($n = x$) de diploides cercanos. A su vez, gametas no reducidas de los nuevos triploides ($n = 3x$), que en general son apomíticos, podrían dar origen a descendencias tetraploides apomíticas ($4x$) mediante nuevos cruzamientos con polen reducido de las poblaciones diploides (Quarín, 1992; Daurelio *et al.*, 2004; Siena *et al.*, 2008). Esto implica que los genes controladores de la apomixis existirían al nivel diploide a pesar de no expresar (al menos a niveles detectables) el carácter. Respecto a esto, Quarín *et al.* (2001) obtuvieron individuos apomíticos facultativos luego de duplicar el número cromosómico de plántulas de un citotipo diploide sexual mediante tratamientos de colchicina. Fuerte evidencia en apoyo a la teoría del puente triploide fue aportada experimentalmente en *Paspalum rufum* por Siena *et al.* (2008) y Delgado *et al.* (2014). Este sistema genético explica no solo la gran variabilidad observada entre poblaciones apomíticas sino el hecho de que los individuos apomíticos sean altamente heterocigotas. Los estudios anteriores corroboraron que, aunque los factores que desencadenan el carácter se encuentran al nivel diploide, su expresión requiere un contexto genómico poliploide.

A pesar de la importancia agronómica de la especie, el mejoramiento de las razas tetraploides (*var. común*) ha tenido poco desarrollo debido al modo de reproducción apomítico que presentan y a que en la naturaleza no se han encontrado individuos tetraploides completamente sexuales (Ortiz *et al.*, 2013). Asimismo, los estudios genéticos de la apomixis en *P. notatum* no fueron posibles hasta que se obtuvieron los primeros genotipos sexuales al nivel tetraploide. La obtención artificial de los mismos (Quarín *et al.*, 2001, 2003; Quesenberry *et al.*, 2010) permitió la generación de poblaciones segregantes para el modo reproductivo mediante cruzamientos controlados de genotipos sexuales \times apomíticos. Entre ellos se pueden mencionar los genotipos C₄-4 \times (Quarín *et al.*, 2001) y Q₄₁₈₈ (Quarín *et al.*, 2003), que fueron utilizados en el presente trabajo de Tesis. La disponibilidad de estos materiales y la generación de poblaciones segregantes posibilitaron no solo el estudio de la herencia de la apomixis sino la utilización del carácter en el mejoramiento de cultivares de *P. notatum*. Recientemente, a partir de cruzamientos experimentales entre tetraploides altamente sexuales y biotipos apomíticos naturales,

se ha desarrollado en la Facultad de Ciencias Agrarias¹ de la Universidad Nacional del Nordeste (UNNE²) y el Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE³), Corrientes, el primer cultivar apomíctico híbrido de la especie, llamado Boyero-UNNE (Urbani *et al.*, 2017).

Los trabajos sobre la herencia del carácter determinaron que la apomixis se transmite como un carácter simple dominante (*Aaaa*), frecuentemente con segregación distorsionada 2,8–8,1:1 (sexualidad:apomixis; Martínez *et al.*, 2001; Stein *et al.*, 2004, 2007; Zilli *et al.*, 2015). El menor número de individuos apomícticos recuperado en los cruzamientos del tipo sexual × apomíctico fue asociado a alguno de los siguientes factores: I) efectos pleiotrópicos que generan penetrancia incompleta del carácter; II) efectos pleiotrópicos de letalidad parcial; o III) factores letales ligados a las gametas que transmiten la apomixis (Martínez *et al.*, 2001; Zilli *et al.*, 2014). Asimismo, a partir de cruzamientos entre individuos diploides como parentales femeninos y un citotipo triploide apomíctico como dador de polen, fue posible detectar mecanismos que eliminan gametos e impiden la transmisión del carácter por gametos monoploides (Martínez *et al.*, 2007). Por otra parte, análisis citogenéticos detectaron anomalías meióticas en la microesporogénesis y una menor viabilidad del polen en los genotipos apomícticos en comparación con los sexuales (Stein *et al.*, 2004). Estas características fueron atribuidas a rearreglos cromosomales (inversiones y/o translocaciones) que incluirían al cromosoma que transmite el carácter y afectan la transmisión de la apomixis (Podio *et al.*, 2012b).

En *P. notatum* se observó una gran variación en la expresividad de la apomixis (estimada a partir del porcentaje de sacos de tipo apospórico) en familias de hermanos completos, derivados de cruzamientos experimentales entre un progenitor femenino completamente sexual y un apomíctico obligado (Acuña *et al.*, 2011). En este caso, solo un bajo porcentaje de híbridos apomícticos mostraron una alta expresividad del carácter. Por otro lado, grandes diferencias en la distorsión de la segregación del carácter (1–7:1; sexual:apomíctico) fueron observados en cruzamientos realizados con distintos genotipos parentales (Zilli *et al.*, 2015). Asimismo, se determinó una baja correlación ($r = 0,23$) entre la distancia genética de los parentales (medida con el índice de Jaccard, 1908) con la expresividad de la aposporia (Zilli *et al.*, 2015). El conocimiento de los factores que controlan la expresividad de la apomixis constituye una herramienta importante para el mejoramiento ya que, por más que el nivel de correlación entre ambas variables sea bajo, la selección de los parentales incluyendo este factor generaría efectos beneficiosos para cualquier programa de mejoramiento (Zilli *et al.*, 2015). Diferencias en la expresi-

¹Página institucional disponible en www.agr.unne.edu.ar

²Página institucional disponible en www.unne.edu.ar

³Página institucional disponible en www.ibone.unne.edu.ar

vidad del carácter fueron también informadas en *Poa pratensis* (Matzk *et al.*, 2005) y en *Boechera spp.* (Aliyu *et al.*, 2010). En esta última especie se encontró que las poblaciones segregantes con las que trabajaron, poseían una amplia variación en la expresividad de la apomixis; desde individuos no apomícticos (sexuales obligados) hasta individuos apomícticos obligados. Dentro de este último grupo, se apreció una distribución bimodal, en donde se marcaron con mayor frecuencia genotipos con bajos y altos niveles de apomeiosis, y con una menor frecuencia individuos con expresividades medias (Aliyu *et al.*, 2010). De la misma forma, Zilli *et al.* (2015) encontraron curvas de distribuciones bimodales en sus estudios de expresividad de la apomixis en híbridos F₁ de *P. notatum*.

En relación a otras especies de la familia *Poaceae*, *P. notatum* presenta un contenido de ADN reducido, con valores de $1C = 0,58-0,60$ pg (560 Mb) para citotipos diploides (Jarret *et al.*, 1995; Galdeano *et al.*, 2016). Esta característica, sumada a la posibilidad de trabajar con poblaciones segregantes para el modo reproductivo, y al control de la apomixis por parte de una región genómica que actúa como un *locus* único, hacen de la especie un modelo biológico útil para el estudio de las vías moleculares que desencadenan este carácter (Hojsgaard *et al.*, 2011).

1.2.2. Características del ACR en especies de *Paspalum*

La región cromosómica que controla la apomixis (ACR, por *Apomixis Controlling Region*) posee una fuerte restricción de la recombinación y apareamiento preferencial de cromosomas (Martínez *et al.*, 2003; Stein *et al.*, 2004). Diversos trabajos identificaron marcadores moleculares completamente ligados a la apomixis no solo en *P. notatum*, sino también en *Paspalum simplex* y *Paspalum guenoarum* (Martínez *et al.*, 2003; Stein *et al.*, 2004, 2007; Pupilli *et al.*, 2004; Aguilera *et al.*, 2015). La utilización de marcadores moleculares de AFLP permitió la construcción de un mapa de ligamiento genético, a nivel tetraploide de *P. notatum*, en donde pudo localizarse el ACR y estimar su tamaño en aproximadamente 36 Mb (Stein *et al.*, 2007). El análisis de secuencias específicas de esta región posibilitó la identificación de genes de copia única y secuencias repetitivas (Podio *et al.*, 2012a).

El análisis de las secuencias únicas presentes en el ACR mostró homología con una serie de genes que potencialmente podrían estar involucrados en la apomixis, entre ellos genes que codifican para proteínas con dominios KH, una peptidyl-prolil *cis/trans* isomerasa, una metiltransferasa, y una proteína homóloga a *APETALA 2* (Podio *et al.*, 2012a).

Asimismo, se detectaron en este segmento abundancia de secuencias repetitivas como retrotransposones tipo *gypsy* y *Ty1-copia* (Hojsgaard *et al.*, 2013; Podio *et al.*, 2012a). Del conjunto de secuencias identificadas dentro del ACR de *P. simplex*, pocos han mostrado tener potencial para codificar para proteínas funcionales. De hecho, la mayoría de ellos presenta codones de terminación prematuros y mutaciones que corren los marcos de lectura transformándolos en pseudogenes o secuencias no codificantes (Calderini *et al.*, 2006).

Estudios citogenéticos y de inmunolocalización indicaron que la ACR de *P. notatum* se encuentra en una región altamente heterocromatinizada y con un alto nivel de metilación de citosinas (Podio *et al.*, 2012a). Posteriormente, se determinó que la desmetilación artificial con 5'-azacitidina no afecta los niveles de apomeiosis, pero disminuyen significativamente la tasa de partenogénesis (Podio *et al.*, 2014a). Estos antecedentes sugieren que los factores claves que afectan la partenogénesis estarían bajo un control epigenético, siendo la metilación de citosinas uno de los mecanismos por el cual se controla la expresión de este carácter (Podio *et al.*, 2014a).

Estas particularidades sugieren que el ACR posee características de heterocromatina, similares a los cromosomas *Y* de las plantas dioicas los cuales se habrían originado a partir de cromosomas autosómicos mediante la supresión inicial de la recombinación en las regiones que contienen los genes que controlan la reproducción sexual y más adelante, por la migración de genes determinantes masculinos (Bergero y Charlesworth, 2009). Desde un punto de vista funcional, la evolución del cromosoma *Y* induce tanto el silenciamiento de los genes femeninos como el desarrollo de la función masculina por la acción de genes específicos. Estas características estructurales complican las estrategias tendientes a la identificación y clonado de genes por los métodos tradicionales de genética directa y mapeo genético (Ortiz *et al.*, 2013).

1.3. Sintenia y colinealidad en los genomas vegetales

El término sintenia (en inglés: *synteny*) se originó en 1971 y su concepto ha ido evolucionando conforme se perfeccionaron los distintos estudios evolutivos y de mapeo cromosómico basados en marcadores moleculares (Kilian *et al.*, 1995). El término surge del prefijo $\sigma\upsilon\nu$ (syn: mismo) y la palabra griega $\tau\epsilon\nu\epsilon$ (tene: hilo), haciendo referencia, en su concepto inicial, a regiones cromosómicas de especies diferentes que contenían genes ortólogos localizados en el mismo cromosoma (Passarge *et al.*, 1999; Paterson *et*

al., 2012). Se supone que este tipo de arreglos genéticos surgieron de un ancestro común y se han mantenido relativamente constante durante la evolución de las especies.

Las primeras relaciones de sintenia entre especies se establecieron utilizando marcadores moleculares de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*; Moore *et al.*, 1995). Los niveles de sintenia o conservación en el contenido de genes ortólogos, varían enormemente dependiendo de la distancia evolutiva entre los *taxa* y permiten detectar cambios globales de la sintenia ocasionados por rearrreglos cromosómicos mayores, como fusiones y fisiones cromosómicas ocurridos durante la evolución de las especies (Kilian *et al.*, 1995). Cuando las técnicas de genética comparativa alcanzaron niveles más altos de sofisticación, fue necesario no solo describir el contenido génico en los cromosomas sino también el ordenamiento de los genes a escalas cada vez menores (< 1 Mb; Gaut, 2002). Actualmente, el concepto de sintenia tiene un uso más general y es utilizado para describir la conservación de secuencias genómicas entre dos especies (Tang *et al.*, 2008; Paterson *et al.*, 2012). A su vez, el término colinealidad es considerado como un caso especial de sintenia en donde los grupos de genes conservan no solo su contenido sino también su ordenamiento entre genomas de especies diferentes. Esta información es de gran importancia ya que ha permitido hacer inferencias de ortología entre las especies (Paterson *et al.*, 2012).

Debido a que los organismos actuales se originaron a partir de un ancestro común, cualquier par de genomas presenta ciertas similitudes de secuencias que dependen fuertemente de la distancia evolutiva entre ellas (Doolittle, 2000). La similitud entre dos regiones genómicas ortólogas pueden ser representadas por semejanzas locales, donde además se observa colinealidad. Sin embargo, cuando son consideradas todas las similitudes entre ambas cadenas, normalmente pueden encontrarse secciones locales donde la colinealidad se interrumpe. De esta manera, dos especies filogenéticamente distantes presentarán un ordenamiento génico linear (microcolinealidad) pobremente preservado (Paterson *et al.*, 1996). Por lo contrario, la microcolinealidad tiende a encontrarse preservada si los genomas comparados son evolutivamente cercanos (Eckardt, 2001).

La conservación global del contenido y orden génico es descripta por la macrocolinealidad (Bossolini *et al.*, 2007). A este nivel, de cientos o miles de kilobases (kb), pueden detectarse procesos evolutivos que alteran los cromosomas a gran escala. Ejemplos de estos son las duplicaciones, inversiones, transposiciones y convergencias cromosómicas ocurridas durante la especiación. La conservación de la macrocolinealidad implica normalmente la conservación de la microcolinealidad, debido a que los procesos men-

cionados que operan sobre los segmentos cromosómicos ocurren con mayor frecuencia que aquellos que alteran la microcolinealidad. Por su parte, la microcolinealidad puede verse afectada mediante procesos como las inversiones, translocaciones, duplicaciones y deleciones génicas (Rossberg *et al.*, 2001).

De esta forma, la microcolinalidad de un segmento podría estar conservada pero no así su ordenamiento al nivel macro. Un ejemplo de estos casos son las inversiones cromosómicas, que interrumpen la macrocolinealidad pero el ordenamiento génico linear interno se mantiene (Bossolini *et al.*, 2007).

1.3.1. Sintenia en la familia *Poaceae*

La familia *Poaceae* ha sido utilizada como modelo para realizar estudios de genética y genómica comparativa durante los últimos veinticinco años (Moore *et al.*, 1995; Hodkinson, 2018). Se ha propuesto que las especies que componen la familia tienen un origen monofilético, es decir, que se originaron desde un ancestro común (Moore, 1995; Bennetzen, 2007). Los primeros estudios realizados con marcadores moleculares de RFLP y sus posteriores análisis de secuencias, determinaron que dentro de esta familia existe un importante nivel de conservación del contenido y orden génico (micro y macrosintenia), aún entre especies con divergencias evolutivas de más de 60 millones de años. Este hecho refleja el origen común de todas las especies que componen la familia (Ahn y Tanksley, 1993; Barakat *et al.*, 1997; Tarchini *et al.*, 2000; Keller y Feuillet, 2000; Ware *et al.*, 2002). Sin embargo, tanto el tamaño genómico como el número de cromosomas que lo componen varían ampliamente (Ahn y Tanksley, 1993; Moore *et al.*, 1993; Devos *et al.*, 1995, 1998; Gale y Devos, 1998).

Se estima que la radiación de los clados mayores de las *Poaceae* ocurrió hace 70 millones de años y que, previamente, ya había ocurrido un evento de duplicación genómica completa (Wang *et al.*, 2015), lo cual en parte explicaría las variaciones mencionadas. Sin embargo, los eventos de duplicación y poliploidización por sí mismos, no dan respuesta a los cambios radicales en el tamaño genómico (Bennett, 1998). Esta falta de correlación entre la complejidad de las especies y el tamaño de su genoma («paradoja del valor c», propuesta por Thomas Jr en 1971) podría ser explicada por el rol de los elementos transponibles durante la evolución de esta familia, ya que existe una correlación positiva entre el tamaño del genoma y el contenido de los elementos genéticos móviles (Bennetzen, 2000; Panaud *et al.*, 2002; Pellicer *et al.*, 2018).

El mapeo comparativo estudia la presencia y orden de genes (alineamiento) en los mapas genéticos de especies que poseen marcadores en común. Los mapas comparativos proveen información de la evolución cromosómica y permiten identificar, en las distintas especies, fenotipos equivalentes controlados por genes ortólogos. En estos análisis, el arroz fue usado desde un primer momento como modelo genómico para el estudio de los genomas de mayor tamaño y complejidad provenientes de otras especies de la familia (Messing y Llaca, 1998). Su genoma relativamente pequeño (valor $2c = 0,81 \text{ pg} \sim 450 \text{ Mb}$; Bennetzen, 2000; Ohmido *et al.*, 2000) y su importancia agronómica fueron las principales razones para ser la primera especie de la familia en ser secuenciada completamente (International Rice Genome Sequencing Project, 2005).

1.3.2. *Oryza sativa* como modelo de estudio de la familia *Poaceae*

Generalmente, en la genética comparativa se utilizan dos categorías de elementos funcionales (Zeng *et al.*, 2008). Los elementos ultraconservados corresponden a secuencias de pocos cientos de bases que muestran una identidad del 100 % respecto a otros elementos ortólogos de genomas cercanos. Ejemplo de estos elementos son los marcadores moleculares de RFLP y clones de ADNC de diversas especies. La segunda categoría se refiere a segmentos de decenas de kilobases que no muestran porcentajes de identidad de secuencia elevados pero su contenido y orden de los genes que contienen se encuentran conservados. Estos elementos son denominados bloques de sintenia (Zeng *et al.*, 2008).

El trabajo pionero que introdujo el concepto de bloque de sintenia fue el propuesto por Moore *et al.* en 1995. Su investigación permitió referenciar con marcadores moleculares los genomas de diferentes especies de la familia con 19 segmentos cromosómicos del genoma de arroz ($2n = 2x = 24$). Sus análisis concluyeron que los genomas de estas especies pueden reconstruirse en base a duplicaciones y reordenamientos de diferentes bloques cromosómicos de arroz como si se tratasen de «bloques de LEGO®». En este trabajo, incluso propone la reconstrucción del genoma ancestral de las Poaceas a partir de la combinación de los 19 bloques de sintenia que identificaron. El esquema que diseñaron, conocido como el «circulo de cultivos», es una representación de los genomas de seis cereales donde se grafican sus cromosomas como círculos concéntricos referenciados a los 12 cromosomas de arroz (Moore, 1995; Moore *et al.*, 1997). Este gráfico permitió visualizar que los grupos de genes tienden a mantener su posición en la misma región cromosómica conservando su microcolinealidad, a pesar de los eventos genómicos de reestructuración cromosómica y pérdida de genes que ocurrieron luego de las duplica-

ciones genómicas globales. Desarrollos posteriores concluyeron que en la familia hay altas relaciones sinténicas con relativamente poca frecuencia de rearrreglos cromosómicos de gran escala, y que los mismos se dan con más frecuencia en regiones cercanas a los centrómeros (Devos, 2005; Bennetzen y Chen, 2008; Bolot *et al.*, 2009).

En los últimos años, con el advenimiento de las técnicas de secuenciación masiva, se han secuenciado los genomas de arroz (*International Rice Genome Sequencing Project*, 2005; Choi *et al.*, 2020), *Z. mays* (Schnable *et al.*, 2009; Bukowski *et al.*, 2018), *S. bicolor* (Paterson *et al.*, 2009; McCormick *et al.*, 2018), *Setaria italica* (Zhang *et al.*, 2012), y *B. distachyon* (Huo *et al.*, 2009; *The International Brachypodium Initiative*, 2010) y se dispone de varias secuencias preliminares de genomas de *Hordeum vulgare* y *Triticum aestivum* (Brenchley *et al.*, 2012; Berkman *et al.*, 2013; Jia *et al.*, 2013; Ling *et al.*, 2013; *The International Wheat Genome Sequencing Consortium*, 2014). Esta información permitió realizar estudios de genómica comparativa en donde es posible alcanzar una mayor resolución en cuanto a la identificación de secuencias ortólogas y mejorar notablemente la descripción de las relaciones microsinténicas entre las especies (Stein *et al.*, 2018; Reuscher *et al.*, 2018; Collins, 2018; Li *et al.*, 2020b). La gran cantidad de información de secuencias disponible propició el surgimiento de múltiples algoritmos de ensamblado genómico y alineamientos de secuencias. Sin embargo, en la mayoría de los casos, las mutaciones, los rearrreglos cromosómicos, y las adiciones y deleciones de bases que ocurrieron durante la especiación, hacen que sea difícil lograr una correcta alineación entre ellos a nivel de secuencia (Collins, 2018).

Un método práctico para simplificar estos análisis consiste en la identificación de bloques de sintenia (descriptos como un conjunto de genes u otro tipo de marcadores contiguos) cuya colinealidad evolutiva se encuentra conservada (Sinha y Meller, 2007). Para esto, se han desarrollado programas informáticos de anotación automática de genes y reconocimiento de ortologías génicas entre genomas específicos que posibilitan la detección de bloques sinténicos dentro de un contexto genómico dado (Ghiurcuta y Moret, 2014; Liu *et al.*, 2018a).

El alineamiento y reconocimiento de los bloques de sintenia de ocho gramíneas de importancia económica (*Aegilops tauschii*, *B. distachyon*, *S. italica*, *H. vulgare*, *O. sativa*, *S. bicolor*, *Triticum urartu* y *Z. mays*) posibilitó recientemente la reconstrucción del genoma ancestral de las *Poaceae* y contribuyó al entendimiento de la divergencia y especiación de las mismas (Wang *et al.*, 2015). En base a los estudios realizados, los autores reforzaron la idea de tomar al genoma de arroz como referencia para estudios de sintenia comparativos

debido a que presenta un ritmo de evolución lento, ha preservado mejor el cariotipo del genoma ancestral, mostrando pocos cambios en la estructura, y se dispone actualmente de varios genomas secuenciados por diferentes tecnologías (Shimamoto y Kyojuka, 2002; Wang *et al.*, 2015).

1.3.3. Estudios de sintenia en el ACR asociados al *locus* responsable de la apomixis en gramíneas

Como se describió previamente, la apomixis en gramíneas está controlado por un *locus* dominante que en varios casos presenta una segregación distorsionada y restricción de la recombinación (Ozias-Akins y van Dijk, 2007). Estudios de mapeo comparativo realizados por Pupilli *et al.* (2001) mediante la utilización de marcadores de RFLP de arroz, determinaron que la región controladora de la apomixis en *P. simplex* (especie que presenta apomixis al nivel tetraploide como *P. notatum*) se corresponde con un segmento cromosómico sinténico del brazo largo del cromosoma 12 de arroz (Os12). Recientemente, Galla *et al.* (2019) analizaron los rearrelos genómicos a nivel estructural y funcional del ACR de *P. simplex* mediante estudios de sintenia con *S. italica*, *S. bicolor*, *Z. mays*, *B. distachyon* y *O. sativa*. En ese trabajo se emplearon clones de BACS (*Bacterial Artificial Chromosome*) de *P. simplex* obtenidos por Calderini *et al.* (2006) que resultaron positivos para diferentes marcadores moleculares completamente ligados a la apomixis en *P. notatum*. Las secuencias de los BACS fueron usadas para identificar los marcos abiertos de lectura y a partir de ellos determinar las posibles regiones codificantes para proteínas. Los genes predichos fueron empleados para identificar y localizar en el genoma los genes ortólogos de las especies tomadas como referencia. El estudio demostró que la región responsable de la apomixis de *P. simplex* presenta sintenia con las regiones teloméricas del cromosoma Os12 de arroz, 8 de *S. bicolor* (Sb8), 3 de *S. italica* (Si3), 4 de *B. distachyon* (Bd4) y 1 de *Z. mays* (Zm1).

Las comparaciones entre especies apomícticas filogenéticamente relacionadas determinaron que las regiones cromosómicas asociadas a la apomixis (ACRS) se encuentran altamente conservadas. Por ejemplo, el ACR de *Pennisetum squamulatum*, otra especie apospórica, presenta una alta microcolinealidad respecto al ACR de líneas apomícticas de *Cenchrus ciliaris* (Roche *et al.*, 2002; Goel *et al.*, 2006). En el género *Paspalum*, Pupilli *et al.* (2004) documentaron que el ACR de *P. simplex* se encuentra casi completamente conservado con la región ortóloga de *Paspalum malacophyllum* —otra especie apomíctica estrechamente relacionada— y en *P. notatum*. En esta última especie, los análisis con

marcadores de RFLP determinaron que la región del ACR es parcialmente sinténica al ACR de *P. simplex* debido a que hallaron clones de arroz ligados a la apomixis correspondientes a bloques sinténicos del Os12 y a un segmento del brazo largo del cromosoma 2 de arroz (Os2; Pupilli *et al.*, 2004). Estos resultados llevaron a postular una hipótesis que indica que el ACR de *P. notatum* se encuentra inserto en un segmento cromosómico híbrido, formado por bloques del cromosoma 2 y 12 de arroz Pupilli *et al.* (2004). A pesar de que la asociación entre el cromosoma 2 de arroz y el ACR solo fue reportada para *P. notatum* (Pupilli *et al.*, 2004; Ortiz *et al.*, 2013), la hipótesis del segmento híbrido fue reforzada por estudios posteriores que hallaron nuevos clones de arroz tanto del Os2 como del Os12 y secuencias de los cromosomas 3 y 5 de *Z. mays* (Zm3 y Zm5, respectivamente) que resultaron completamente ligados a la apomixis en la especie (Martínez *et al.*, 2003; Hojsgaard *et al.*, 2011; Rebozzio *et al.*, 2012; Podio *et al.*, 2012a).

A pesar de la congruencia entre los estudios sinténicos de los ACRs de estas tres especies de *Paspalum* (*P. simplex*, *P. malacophyllum* y *P. notatum*), en otras especies apomícticas, los segmentos controladores de la apomixis mostraron relaciones de sintenia diversas. Worthington *et al.* (2016) hallaron relaciones sinténicas entre la región controladora de la apomixis de *Brachiaria decumbens* y regiones centroméricas del cromosoma 5 de *S. italica* (Si5). Asimismo, Worthington *et al.* (2019) demostró que existen regiones sinténicas al ACR de *Brachiaria humidicola*, en los cromosomas 1 y 7 de *S. italica*. En *Eragrostis curvula*, especie con apomixis diplospórica, Zappacosta *et al.* (2019) hallaron marcadores moleculares de AFLP ligados al ACR, cuyas secuencias mapearon en los cromosomas 5 de *O. sativa* (Os5), Si3 de *S. italica*, y 6 y 8 de *Z. mays* (Zm6 y Zm8, respectivamente). El ACR de *P. squamulatum* presentó sintenia con el cromosoma 2 de *S. italica* (Si2), con el cromosoma 2 de *S. bicolor* (Sapkota *et al.*, 2016), y con una región pericentromérica del cromosoma 11 de *O. sativa* (Os11; Gualtieri *et al.*, 2006). Otra especie apospórica de la misma familia, *C. ciliaris*, mostró sintenia del ACR con los cromosomas 4 de *S. bicolor* (Sb4), Zm1 y Zm3 de *Z. mays* (Jessup *et al.*, 2002), y con el Os11 de *O. sativa* (Gualtieri *et al.*, 2006). A su vez, el ACR de *Brachiaria brizantha* contiene marcadores de RFLP con homología con secuencias tanto con el cromosoma Os2, como con el Zm5 (Pessino *et al.*, 1997, 1998).

Se ha propuesto que las diferencias halladas respecto a la sintenia del ACR de las distintas especies apomícticas se atribuye a que el carácter podría haberse originado múltiples veces y de forma independiente durante la evolución (Jessup *et al.*, 2002). Esta teoría se contrapone con los estudios de genómica comparativa en diferentes especies de los clados *Pennisetum* y *Cenchrus*, que indican un único evento originario para el

carácter apomítico que posteriormente se habría propagado hacia otras especies mediante hibridaciones (Ozias-Akins y van Dijk, 2007; Akiyama *et al.*, 2011). Además, un estudio reciente propone que apomixis y sexualidad podrían constituir caracteres ancestrales polifénicos, es decir, fenotipos alternativos inducidos por el ambiente (Albertini *et al.*, 2019). Esta visión sugiere que la apomixis podría potencialmente expresarse en todos los linajes sexuales, y que la ausencia del carácter en muchos de éstos es debido a modificaciones genéticas o epigenéticas operadas por el ambiente, que han silenciado el interruptor sexualidad-apomixis, o porque se han perdido genes clave que disparan la vía (Albertini *et al.*, 2019). Aun así, el estudio y la caracterización de las regiones sinténicas al ACR en las especies modelos es de gran importancia y constituye una de las estrategias empleadas para desentrañar las vías moleculares de la apomixis. Estas regiones, que se encuentran altamente caracterizadas al nivel molecular, podrían contener los genes claves que desencadenan el carácter (Ortiz *et al.*, 2013). Por esta razón, en 2018 se ha iniciado un proyecto dedicado a la caracterización detallada del genoma de *P. notatum* mediante la utilización de tecnologías de secuenciación de tercera generación.

1.4. Estrategias para el estudio de la apomixis

En los últimos años se han desarrollado dos estrategias principales para el estudio de los determinantes moleculares de la apomixis. Por un lado, diferentes grupos se han enfocado en la caracterización de mutantes de especies modelos sexuales que muestran alguno de los componentes de la apomixis (como por ejemplo la formación del endosperma en forma autónoma o el desarrollo del embrión sin fecundación). Por otro lado, existen grupos de trabajo que analizan el carácter directamente en las especies naturalmente apomíticas y basan sus estudios en la disección de las regiones cromosómicas ligadas con el carácter y/o en reconocer los genes diferencialmente expresados entre individuos sexuales y apomíticos (Ortiz *et al.*, 2013, 2020). En la Tabla 1.1 se presentan algunos de los genes más importantes relacionados con la apomixis y se detallan los procesos reproductivos en los que intervienen.

TABLA 1.1: Genes asociados la reproducción en angiospermas mencionados en esta Tesis por su vinculación con la apomixis

Gen	Descripción	Organismo estudiado	Referencia
<i>AGO9</i>	<i>ARGONAUTA 9</i> controla el destino gamético de las células nucleares del ovario.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Olmedo-Monfil <i>et al.</i> (2010)
<i>AGO104</i>	<i>ARGONAUTA 104</i> es un gen homólogo a <i>AGO9</i> . Su silenciamiento aumenta el desarrollo de gametas no reducidas en un 70 %.	<i>Zea mays</i>	Singh <i>et al.</i> (2011)
<i>BBM1</i>	<i>BABY BOOM 1</i> produce partenogénesis al inducir su sobreexpresión.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Khanday <i>et al.</i> (2019)
<i>CENH3</i>	<i>CENTROMERIC HISTONE 3</i> participa en la segregación de los cromosomas durante la anafase I. El cruzamiento del mutante para el gen <i>CENH3</i> con el fenotipo MiMe logra un triple mutante que genera semillas clonales.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Marimuthu <i>et al.</i> (2011)
<i>DMT103</i> , <i>DMT104</i>	Mutantes para <i>DNA METHYLTRANSFERASE 103</i> y <i>DNA METHYLTRANSFERASE 104</i> evidencian gametas no reducidas y formación de múltiples sacos embrionarios. La expresión de estos genes es significativamente diferente entre genotipos sexuales y apomícticos de los híbridos estudiados.	<i>Zea mays</i> × <i>Tripsacum sp.</i>	García-Aguilar <i>et al.</i> (2010)
<i>EXS</i>	<i>EXTRA SPOROGENOUS CELLS</i> se expresa de forma localizada en tejidos ováricos diferentes entre plantas sexuales y apomícticas. En las últimas, el gen <i>EXS</i> se expresa únicamente en células circundantes a los sacos embrionarios.	<i>Paspalum notatum</i>	Podio (2013)
<i>FIS1 (MEA)</i> , <i>FIS2</i> , <i>FIS3 (FIE)</i>	Los genes <i>FERTILIZATION-INDEPENDENT SEED 1 (MEA O MEDEA)</i> , <i>FERTILIZATION-INDEPENDENT SEED 2</i> y <i>FERTILIZATION-INDEPENDENT SEED 3</i> (O <i>FERTILIZATION-INDEPENDENT ENDOSPERM</i>) previene el desarrollo autónomo del endosperma (DAE) sin intervención de la fecundación de los núcleos polares del saco embrionario. Los genes <i>FIS1</i> y <i>FIS3</i> son genes del tipo Polycomb y <i>FIS2</i> codifica para un factor de transcripción.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Luo <i>et al.</i> (2000); Collinge <i>et al.</i> (2004)
<i>LEC1</i> , <i>LEC2</i>	<i>LEAFY COTYLEDON 1</i> y <i>LEAFY COTYLEDON 2</i> promueven la formación de embriones somáticos de forma espontánea y su expresión es reprimida por <i>PKL</i> .	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Hecht <i>et al.</i> (2001)

TABLA 1.1: Genes asociados la reproducción en angiospermas mencionados por su vinculación con la apomixis (continuación)

Gen	Descripción	Organismo estudiado	Referencia
<i>HUELLENLOS</i>	<i>HUELLENLOS</i> codifica para una proteína mitocondrial, similar a L14 de eubacterias esencial para el normal desarrollo del óvulo en <i>Arabidopsis thaliana</i> .	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Skinner <i>et al.</i> (2001)
<i>LORELEI</i> , <i>LORELEI-like</i>	Ambos genes permiten la adecuada fusión de la ovocélula y el núcleo espermático del polen en <i>Arabidopsis thaliana</i> . En <i>Paspalum notatum</i> el gen está expresado diferencialmente entre genotipos sexuales y apomícticos.	<i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Paspalum notatum</i>	Capron <i>et al.</i> (2008); Felitti <i>et al.</i> (2011)
<i>MSI1</i>	Mutantes para <i>MULTICOPY SUPPRESSOR OF IRA 1</i> evidencian desarrollo embrionario a partir de megásporas normales sin intervención de la fecundación por parte del polen.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Guitton y Berger (2005)
<i>MT-A70</i>	Mutantes para <i>MT-A70</i> evidencian la detención en el desarrollo del embrión.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Zhong <i>et al.</i> (2008)
<i>ORC3</i>	<i>ORIGIN RECOGNITION COMPLEX 3</i> controla el inicio del complejo de replicación del ADN. Mutantes para este gen evidenciaron la detención en el desarrollo del embrión.	<i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Paspalum simplex</i>	Collinge <i>et al.</i> (2004); Siena <i>et al.</i> (2016)
<i>PAIR1</i>	<i>HOMOLOGOUS PAIRING ABERRATION IN RICE MEIOSIS 1</i> es uno de los tres genes silenciados que generan el fenotipo MiMe. La represión del gen <i>PAIR1</i> evita la recombinación meiótica de la CMM.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Nonomura <i>et al.</i> (2004)
<i>REC8</i>	<i>MEIOTIC RECOMBINATION PROTEIN 8</i> es de los tres genes silenciados que generan el fenotipo MiMe. Mutantes para este gen evidencian alteraciones en la separación de los cromosomas homólogos durante la meiosis I.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Bhatt <i>et al.</i> (1999)
<i>OSD1</i>	<i>OMISSION OF SECOND DIVISION</i> es uno de los tres genes silenciados que generan el fenotipo MiMe. El silenciamiento del gen <i>OSD1</i> evita la última división meiótica de la CMM.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	d'Erfurth <i>et al.</i> (2009)

TABLA 1.1: Genes asociados la reproducción en angiospermas mencionados por su vinculación con la apomixis (continuación)

Gen	Descripción	Organismo estudiado	Referencia
<i>PKL</i>	<i>PIKCLE</i> codifica para un factor de remodelado cromatínico del grupo <i>CHD3</i> . Mutantes para este gen evidencian ebrigiénesis somática en tejidos ováricos.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Ogas <i>et al.</i> (1999)
<i>PnTGS1-like</i>	<i>TRIMETHYLGUANOSINE SYNTHASE 1 like</i> se encuentra sobreexpresado en genotipos sexuales respecto a los apomícticos de <i>Paspalum notatum</i> . En estos últimos, la expresión del gen está correlacionada negativamente con los porcentajes de apomixis. Mutantes para este gen evidencian sacos embrionarios similares a los sacos apospóricos.	<i>Paspalum notatum</i>	Siena <i>et al.</i> (2014); Colono <i>et al.</i> (2019)
<i>QGJ</i>	El silenciamiento de <i>QUI-GON JINN</i> provoca una reducción del desarrollo de sacos SEA. Un gen <i>lncRNA</i> expresado únicamente en genotipos apomícticos podría estar actuando como regulador del gen <i>QGJ</i> .	<i>Paspalum notatum</i>	Mancini <i>et al.</i> (2018)
<i>SERK</i>	<i>SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE</i> fue asociado a la embriogénesis somática en distintas especies.	<i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Daucus carota</i> , <i>Paspalum notatum</i>	Schmidt <i>et al.</i> (1997); Tucker <i>et al.</i> (2003); Albertini <i>et al.</i> (2005); Ochogavía <i>et al.</i> (2011); Podio <i>et al.</i> (2014b)
<i>SWI</i>	Mutantes para <i>SWITCH</i> evidencian gametos no reducidos.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Ravi <i>et al.</i> (2008)

1.4.1. Identificación de genes asociados al fenotipo apomíctico por análisis de mutantes

Estudios de mutantes de *A. thaliana*, llevados adelante por Ogas *et al.* (1999) demostraron que las plantas defectivas para el gen *PICKLE* (*PKL*) mostraban una pérdida del control del programa de desarrollo embrionario luego de la embriogénesis. Los mutantes *pk1* evidencian alteraciones como la expresión de genes de proteínas de almacenamiento de las semillas y genes implicados en el depósito de almacenamiento de lípidos, luego de la germinación. Además, los tejidos vegetativos mostraron una capacidad anormal de producir embriones somáticos espontáneamente. Estos estudios llevaron a postular que *PKL* es necesario para reprimir la identidad embrionaria y contribuir a la transición del desarrollo embrionario al postembrionario (Ogas *et al.*, 1999). El clonado de *PKL* determinó que codifica para una proteína del tipo CHD3 las cuales forman parte de factores de remodelación de la cromatina implicados en la represión de la transcripción. Los autores postularon que *PKL* reprime a los genes *LEC1* y *LEC2*, lo cual impide la formación de embriones somáticos de forma espontánea. Otro gen asociado a la embriogénesis somática fue detectado por Hecht *et al.* (2001), quienes aislaron y demostraron el rol del gen *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE 1* (*AtSERK1*) en *A. thaliana*. La expresión del gen *AtSERK1* se observa en tejidos nucelares durante la megasporogénesis, en células del saco embrionario hasta el momento de la fertilización, y en las células embrionarias hasta el estadio de corazón. Posteriormente el gen deja de expresarse. Sin embargo, al inducir la sobreexpresión del ARNm de *AtSERK1* en *A. thaliana*, se produce un aumento en la inducción de embriogénesis somática de hasta cuatro veces. Por otro lado, Guitton y Berger (2005) observaron que mutantes para el gen *MULTICOPY SUPPRESSOR OF IRA 1* (*MSI1*), perteneciente al grupo Polycomb y codificante para una proteína con repeticiones WD40, inician un desarrollo embrionario partenogénético (sin fecundación) a partir de ovocélulas originadas por meiosis. Mutantes para genes de la familia *FIS/FIE* permiten el desarrollo parcial del endosperma sin requerir de la fecundación de los núcleos polares de manera similar a la apomixis autónoma (Luo *et al.*, 2000). En condiciones normales, la formación del endosperma se encuentra reprimida en ausencia de la doble fecundación por la expresión de tres genes de esta familia: *FIS1* (*SEA*), *FIS2* y *FIS3*.

En otro estudio, Ravi *et al.* (2008) detectaron mutantes del gen *DYAD/SWITCH* (*SWI*) de *A. thaliana*, que generan gametos no reducidos y mantienen el mismo grado de heterosis que la planta materna. Este trabajo mostró por primera vez evidencia experimental de que la mutación de un único gen de una planta sexual puede reproducir uno de los

componentes de la reproducción apomíctica. Sin embargo, dado que la proporción de gametas viables en la mutante *dyad* es extremadamente baja (0,24 %) y sólo genera progenies triploides, este sistema recrea sólo parcialmente uno de los componentes de la apomixis.

Por otro lado, Olmedo-Monfil *et al.* (2010) determinaron que las mutantes deficientes para el gen que codifica para la proteína AGO9 de *A. thaliana*, presentan un fenotipo similar a la aposporía, en donde varias células nucleares del ovario inician la gametogénesis. Las proteínas de la familia ARGONAUTA (AGO) participan de las vías de metilación del ADN guiadas por ARN (*RNA-directed DNA methylation*; rdDM). Estas proteínas actúan como transportadoras de ARN pequeños de interferencia (*siRNAs*) en un mecanismo denominado «reprogramación epigenética». El proceso es fundamental para el silenciamiento de transposones durante el desarrollo del embrión sexual y controla el destino gamético de las células del ovario de *A. thaliana*. Curiosamente, ARN pequeños intervinientes en este sistema (*tasRNAs*) se originan principalmente en retrotransposones de tipo *gypsy* y *Ty1-copia*, los cuales fueron identificados en el ACR de *P. notatum* (Podio *et al.*, 2012a).

El fenotipo MiMe («Mitosis en lugar de Meiosis») es una combinación de mutaciones que interrumpen el proceso normal de meiosis que ocurre en la CMM, dando lugar a la formación de una megáspora no reducida. Para originar el fenotipo MiMe son alterados tres genes: I) la expresión del gen *SPO11-1* o *PAIR1* se anula, lo cual impide la recombinación meiótica (Nonomura *et al.*, 2004); II) la mutación en *REC8*, gen involucrado en la recombinación y segregación de los cromosomas homólogos durante la primera división meiótica, impide la separación de los mismos (Bhatt *et al.*, 1999); y III) la alteración del gen *OSD1* saltea completamente la última división meiótica. Como consecuencia, se producen gametas diploides, tanto femeninas como masculinas, genéticamente idénticas a la planta madre y, por lo tanto, la ploidía se duplica en cada generación (d'Erfurth *et al.*, 2009). El cruzamiento del fenotipo MiMe con un parental mutante para el gen *CENH3* (que participa en la segregación de los cromosomas durante la anafase I) origina un cigoto en donde el genoma paterno es eliminado. De esta forma la generación siguiente es una copia idéntica del genotipo de la planta madre. Si bien, este sistema logra la generación de semillas clonales, la penetrancia del genotipo triple mutante es muy baja y por lo tanto la producción de semillas maternas es escasa (<1 %; Marimuthu *et al.*, 2011).

En *Z. mays*, Singh *et al.* (2011) realizaron un muestreo genético e identificaron mutantes que producían gametas femeninas no reducidas. El *locus* alterado en estos individuos codificaba para la proteína AGO104, la cual se acumula en las células somáticas acom-

pañantes de la CMM y actúa sobre esta última por medio de ARN pequeños produciendo un silenciamiento génico a través de cambios en el epigenoma. En la especie también se estudiaron los fenotipos de mutantes para *DMT104* y *DMT103*, genes desregulados en híbridos apomícticos de *Z. mays* × *Tripsacum sp.* Los mutantes presentaron gametas no reducidas y formación de múltiples sacos embrionarios, fenotipo semejante a los de especies con reproducción apospórica (García-Aguilar *et al.*, 2010). En situaciones normales, ambos genes se expresan en una zona específica circundante al saco embrionario y están asociados al silenciamiento mediante la metilación del ADN.

En arroz, la sobreexpresión del gen *BABY BOOM 1 (BBM1)* en la ovocélula es suficiente para producir la partenogénesis (Khanday *et al.*, 2019). También se han diseñado estrategias para obtener el fenotipo MiMe utilizando mutantes triples y cuádruples (Mieulet *et al.*, 2016; Xie *et al.*, 2019) o mediante edición génica con CRISPR-Cas9 de los genes *REC8*, *PAIR1*, *OSD1* y *MATRILINEAL (MTL)*, con lo que se obtuvieron híbridos de arroz que se propagan clonalmente por semilla (Wang *et al.*, 2019).

La utilización de esta estrategia ha realizado grandes aportes a la temática y a posibilitado la identificación de genes clave relacionados al proceso sexual que podrían formar parte de las alteraciones moleculares que conducen a la reproducción apomíctica. Sin embargo, dada la baja penetrancia de la apomixis sintética (obtenida por combinaciones de mutantes), y a la posible participación de factores epigenéticos en la determinación y expresividad del mismo, la recreación del fenotipo apomíctico en entornos sexuales no ha sido aún del todo exitosa (Hojsgaard, 2020).

1.4.2. Estrategias basadas en el estudio de sistemas apomícticos naturales

Esta estrategia se basa en determinar los mecanismos genéticos y moleculares que controlan el carácter en especies naturalmente apomícticas mediante la aplicación de técnicas de genética directa e inversa, y su posterior validación en sistemas modelo sexuales y/o en las propias especies bajo estudio. En las gramíneas, varios estudios se han llevado adelante en híbridos de *Z. mays* × *Tripsacum sp.*, *E. curvula*, *P. squamulatum*, *C. ciliaris*, *P. pratensis* y varias especies del género *Paspalum*, (Ozias-Akins y van Dijk, 2007).

1.4.2.1. Identificación de genes asociados al carácter por estudios de genética directa en *P. notatum*

Dada la complejidad estructural de la región responsable de la apomixis en las especies mencionadas anteriormente (ausencia de recombinación, alto nivel de heterocromatinización y presencia de secuencias repetitivas), diferentes grupos de trabajo se centraron en el aislamiento de clones de BACS portando marcadores completamente ligados al carácter (Roche *et al.*, 2002; Pupilli *et al.*, 2004; Fang *et al.*, 2004; Gualtieri *et al.*, 2006; Calderini *et al.*, 2006, 2011; Akiyama *et al.*, 2011) o en la realización de caminatas cromosómicas partiendo de marcadores específicos del ACR identificados previamente (Gualtieri *et al.*, 2006; Podio *et al.*, 2014b). En todos estos trabajos, se han detectado un gran número de secuencias repetitivas, elementos transponibles, potenciales genes codificantes para proteínas y también pseudogenes o secuencias no codificantes (Ortiz *et al.*, 2013; Ocho-gavía *et al.*, 2018; Mancini *et al.*, 2018). Varios de estos genes se han encontrado además diferencialmente expresados entre plantas sexuales y apomícticas (Polegri *et al.*, 2010).

En *P. notatum*, la extensión de las secuencias de los marcadores ligados completamente al ACR posibilitaron la identificación de genes candidatos. A partir del fragmento *PnMAI3* (Podio *et al.*, 2012a) y mediante caminatas cromosómicas se aisló un segmento con homología a una N⁶-adenosil-metiltransferasa (*MT-A70*) de *Z. mays*. Mutantes de este gen en *A. thaliana* mostraron una detención en el desarrollo del embrión (Zhong *et al.*, 2008). Se determinó también que la secuencia del marcador de RFLP C932, proveniente del cromosoma Os2, presenta homología con un gen codificante para una peptidyl-prolil *cis/trans* isomerasa (PPIasa; Podio *et al.*, 2012a). A su vez, se identificó un gen *EXS* de *P. notatum*, con homología a un marcador de RFLP del cromosoma Os12 de arroz (R2241) cercano al marcador C1069. El gen *PnEXS* (*EXTRA SPOROGENOUS CELLS*) no presenta expresión diferencial entre genotipos sexuales y apomícticos, sin embargo, estudios de hibridación *in situ* mostraron expresiones espacialmente contrastantes. *PnEXS* fue identificado en tejidos ováricos del genotipo sexual, mientras que en el genotipo apomíctico el gen se expresa únicamente en células que rodean a los sacos embrionarios, por lo que podría estar diferencialmente regulado entre plantas apomícticas y sexuales (Podio, 2013).

1.4.2.2. Identificación de genes diferencialmente expresados entre genotipos sexuales y apomícticos

Tanto el desarrollo sexual como el apomíctico están controlados por mecanismos dinámicos que regulan la transcripción, traducción y actividad proteica (Schmidt, 2020). Estas regulaciones pueden estar dadas tanto por vías epigenéticas, controles en el ciclo celular, cascadas de señales y vías hormonales (Zühl *et al.*, 2019). Debido a que ambos procesos reproductivos parecieran involucrar activaciones y represiones de diversos programas moleculares, muchos estudios se han centrado en descifrar las vías metabólicas que se contrastan comparando los perfiles transcriptómicos de genotipos sexuales con apomícticos.

En el caso particular de *P. notatum*, Laspina *et al.* (2008) realizaron un ensayo de *differential display* en el que compararon los transcriptos expresados durante las primeras etapas del desarrollo reproductivo apomíctico y sexual en la especie. Como resultado de este análisis se detectaron 65 secuencias expresadas diferencialmente. Cuarenta y cinco de ellos fueron genes codificantes de proteínas y 20 no mostraron ninguna homología con secuencias conocidas. Uno de los transcriptos derivados de este trabajo (la secuencia nombrada como N20), mostró homología con los genes *LORELEI* y *LORELEI-like*, que en *A. thaliana* permiten la adecuada fusión de la ovocélula y el núcleo espermático del polen (Capron *et al.*, 2008). En *P. notatum* este gen mostró una cosegregación parcial con la aposporía y una sobreexpresión en individuos apomícticos en etapas desde premeiosis hasta antesis (Felitti *et al.*, 2011).

La caracterización del transcripto N69 reveló que pertenece al gen *TRIMETHYLGUANOSINE SYNTHASE 1 (TGS1)*. Este codifica para una metiltransferasa dependiente de S-adenosil-L-metionina y está asociado a la biogénesis de ARN pequeños nucleolares (snRNAs), el *splicing* de ARNm, y a la coactivación del PPAR (activador del peroxisoma) en mamíferos y levaduras (Siena *et al.*, 2014). En *P. notatum*, este gen (*PnTGS1-like*), resultó sobreexpresado en flores de genotipos sexuales, mientras que en genotipos apomícticos, su expresión está correlacionada negativamente con los porcentajes de apomixis. Recientemente, Colono *et al.* (2019) demostraron que plantas sexuales con una construcción antisentido que regula negativamente al gen *PnTGS1-like*, desarrollan tricomas en las hojas, formación ocasional de óvulos gemelos, y sacos embrionarios similares a los sacos apospóricos.

Podio *et al.* (2014b) estudiaron la expresión de dos ortólogos al gen *SERK* de *P. pratensis*, que había sido asociado previamente con el carácter apomixis (Albertini *et al.*, 2005). Los genes *SERK* (*SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE*) que codifican para proteínas quinasas con repeticiones ricas en leucina (LRR-RLK) fueron identificados en cultivos en suspensión de zanahoria (*Daucus carota*) asociados a la embriogénesis somática (Schmidt *et al.*, 1997). Los genes *SERK* también han sido relacionados a la apomixis en *Hieracium sp.* (Tucker *et al.*, 2003) y *P. pratensis* (Albertini *et al.*, 2005). En *A. thaliana*, la sobreexpresión de *AtSERK1* indujo la embriogénesis somática (Hecht *et al.*, 2001). Respecto a *P. notatum*, *PnSERK1* y *PnSERK2* presentan expresiones diferentes entre sí. Por un lado, *PnSERK1* muestra niveles de expresión inferiores al *PnSERK2*, y a su vez, este último presenta alteraciones en su expresión entre genotipos sexuales y apomícticos, que se diferencian tanto cronológica como espacialmente. En la planta sexual, el gen se expresa en células circundantes a la MMC, mientras que en la planta apomíctica se presenta baja expresión en todo el óvulo (Podio *et al.*, 2014b).

1.4.2.3. Estudios de secuencias no codificantes asociadas al ACR

Diversos autores han identificado en el ACR de *Paspalum spp.* secuencias no codificantes para proteína con homología a genes funcionales (Calderini *et al.*, 2006). Ocho-gavía *et al.* (2011) caracterizaron transcritos diferencialmente expresados entre plantas sexuales y apomícticas de *P. notatum* y determinaron que dos de ellos, los transcritos N17 y N22, se expresaban desde secuencias genómicas similares a retrotransposones de tipo LTR conteniendo segmentos transduplicados de genes codificantes para *SERK*. Estas secuencias ya habían sido previamente asociadas al desarrollo apomíctico. Los nuevos resultados indicaron que las secuencias N17 y N22 se expresaban en los tejidos ováricos del genotipo sexual, por lo que estos elementos podrían estar participando en vías regulatorias relacionadas con la apomixis.

Otro gen probablemente regulado mediante mecanismos que involucran secuencias no codificantes es la subunidad 3 del *ORIGIN RECOGNITION COMPLEX 3* (*ORC3*). Este gen está vinculado con la replicación del ADN, la modificación de la estructura cromatínica y el silenciamiento génico (Remus y Diffley, 2009). Trabajos en *A. thaliana*, demostraron que el gen interactúa con la proteína MEDEA, perteneciente al grupo Polycomb, que previene el desarrollo espontáneo del endosperma previo a la fertilización (Collinge *et al.*, 2004). En *P. simplex*, *ORC3* está representado por tres copias, de las cuales *PsORC3a* es un pseudogen presente solo en los genotipos apomícticos, *PsORC3b* codifica para la proteína canónica

funcional y *PsORC3c* codifica para una proteína truncada. *PsORC3a* se expresa constitutivamente a bajos niveles a lo largo del desarrollo reproductivo en flores apomícticas. *PsORC3b* se expresa en ambos tipos de flores pero su patrón de expresión difiere entre el genotipo sexual y el apomíctico, mostrando un pico de expresión fundamentalmente durante el desarrollo del endosperma de sacos sexuales. Por otro lado, por experimentos de hibridación *in situ* se detectó una expresión exclusiva del transcrito antisentido en las células germinativas del genotipo apomíctico. Las mutantes defectivas *orc3* de arroz y *A. thaliana* mostraron la detención en el desarrollo del embrión y el endosperma en estadios tempranos del desarrollo. Estos resultados sugieren que *PsORC3a* está asociado con el silenciamiento de su homólogo funcional y a través de este mecanismo con el desarrollo del endosperma apomíctico (Siena *et al.*, 2016).

El transcrito N46, hallado por Laspina *et al.* (2008) por tener expresión diferencial entre ovarios apomícticos y sexuales en el estadio de meiosis, codifica para una proteína del tipo MAP3K (MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE KINASE KINASE). En *P. notatum*, este gen, denominado *QUI-GON JINN*, se expresa en la nucela de genotipos apomícticos únicamente y al inhibir su expresión la proporción de sacos SEA se reduce respecto a los controles (Mancini *et al.*, 2018). *PnQGJ* segrega independientemente del carácter apomíctico, sin embargo, se identificó una secuencia genómica con homología al mismo contenida en el ACR de la especie. Este gen, denominado *PnLNC_QGJ*, codifica para un ARN largo no codificante (*lncRNA*) y se expresa únicamente en flores de genotipos apomícticos, por lo que podría tener un potencial rol de regulación de la copia funcional *PnQGJ* durante el desarrollo de los sacos embrionarios apospóricos.

La presencia de secuencias no codificantes asociadas al ACR de *Paspalum spp.* con sectores de alta homología a genes funcionales de arroz, así como la presencia de genes predichos sin homología en las bases públicas del NCBI[®], indican que éstas secuencias han sido afectadas por el movimiento de elementos transponibles que pueden causar grandes rearrreglos cromosomales. En algunos casos, la pérdida de la capacidad codificante de estas secuencias respecto a sus ortólogos en arroz es debida principalmente a pequeños rearrreglos, como ser deleciones (1-5 nucleótidos) y mutaciones puntuales que introducen nuevos codones de finalización (Calderini *et al.*, 2006). El rol de estos pseudogenes como reguladores transcripcionales de los genes codificantes canónicos sigue siendo una incógnita a resolver (Ortiz *et al.*, 2013, 2020).

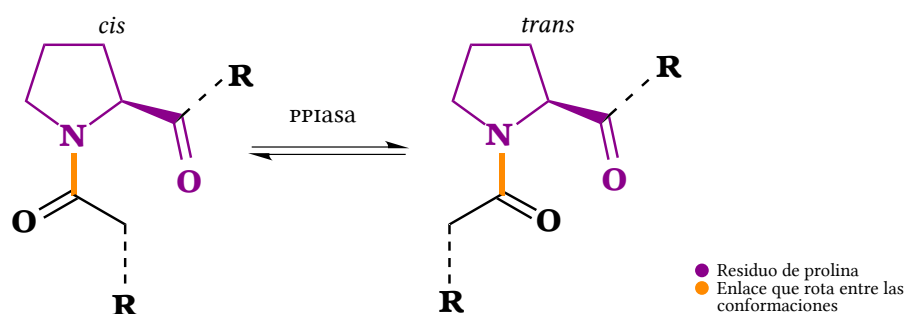


FIGURA 1.4: Isomerización *cis/trans* de la prolina catalizada por enzimas PPIasas. El cambio conformacional afecta directamente la función de la proteína y es un proceso lento que puede ser acelerado radicalmente por las enzimas PPIasas. La letra *R* indica cualquier aminoácido a excepción de la serina y la treonina. Ilustración adaptada de Lu *et al.* (2007).

1.4.2.4. Características de las peptidil-prolil *cis/trans* isomerasas de tipo FKBP

El clon C932 es uno de los marcadores del ACR de *P. notatum* que se encuentran localizados en el Os2. Esta secuencia es un segmento interno del gen OS02G0760300, codificante para una peptidil-prolil *cis/trans* isomerasa (PPIasa) de tipo FKBP.

La modificación postraduccional de proteínas es un control reversible y dinámico, en donde enzimas como las PPIasas participan activamente (Dilworth *et al.*, 2012). La unión peptídica establecida con un residuo de prolina puede adoptar dos conformaciones (*cis* y *trans*) que difieren por 180° en el ángulo Ω (Figura 1.4), y por lo tanto, un cambio conformacional en dicha unión modifica dramáticamente la estructura tridimensional del péptido (Dilworth *et al.*, 2012). La transición entre las conformaciones *cis* y *trans* del enlace peptídico entre una prolina y el aminoácido siguiente es un proceso lento que puede ser radicalmente acelerado por enzimas PPIasas (Lu *et al.*, 2007). La aceleración de estos cambios conformacionales, les permite actuar como controladoras de procesos celulares y, por lo tanto, tienen un rol crítico en la determinación del momento y la duración de diversas cascadas de señales involucradas en la proliferación celular (Lu *et al.*, 2007).

Hay tres grandes familias de PPIasas: las parvulinas, las ciclofilinas y las FKBP (o proteínas de unión al inmunosupresor FK506; Dilworth *et al.*, 2012). En diferentes organismos, los miembros de esta última familia están involucrados en; I) el plegado proteico The UniProt Consortium (2015); II) el *splicing* de ARN (Shaw, 2007); III) la interacción de diferentes factores de transcripción (Dilworth *et al.*, 2012); IV) la regulación de la maquinaria ARN Pol II (Shaw, 2007); y V) la regulación de la cromatina (Lu *et al.*, 2007). Particularmente en plantas, los miembros de la familia FKBP están involucrados en di-

versos procesos celulares incluyendo el desarrollo, la respuesta a estrés, la regulación de la transcripción y el funcionamiento de los cloroplastos (Gollan *et al.*, 2012). Estas proteínas se caracterizan por tener al menos un dominio FKBP de 110 aa aproximadamente que adopta una estructura tridimensional conservada. En *A. thaliana* hay descritas 23 isoformas y en *O. sativa* 29 de PPIAsas del tipo FKBP. Presentan un tamaño variable entre 12 kDa (la isoforma *AtFKBP12* de *A. thaliana*) y 77 kDa (la de trigo, *wFKBP77*). Pueden contener un único dominio FKBP o pueden ser multidominio presentando tres repeticiones del FKBP y en algunos casos pueden tener dominios extra como ser repeticiones de teratricopéptido (TRP), dominios de unión a calmodulina y dominios de anclaje a membrana. La isoforma FKBP12 es la más chica descrita en plantas y se localiza en el citosol. En *A. thaliana* interacciona con otra proteína (*AtFIP37*) que es a su vez una proteína de unión a ADN involucrada en el *splicing* de ARNm, regulación del ciclo celular y desarrollo del embrión (Vespa *et al.*, 2004). En base a este y otros estudios en coníferas (Yu *et al.*, 2011), a la FKBP12 se le asigna el rol de regular la translocación al núcleo de proteínas de unión a ADN (Gollan *et al.*, 2012).

1.4.3. Aproximaciones transcriptómicas y genómicas

Los transcriptomas son considerados como recursos importantes para las futuras investigaciones en apomixis en especies no modelos, debido a que no se requiere la construcción de bibliotecas de ADNc ni el conocimiento previo del genoma de la especie (Xiao *et al.*, 2013). En 2017, Ortiz *et al.* —pertenecientes al grupo de investigación de Desarrollo Reproductivo de Plantas (DREP⁴) del Instituto IICAR⁵ (CONICET-UNR)— generaron un transcriptoma de referencia de los genes expresados durante del desarrollo reproductivo de plantas apomícticas y sexuales, mediante la secuenciación por el sistema ROCHE[®] 454. Las bibliotecas sexual y apomíctica fueron generadas a partir de una mezcla equilibrada de ARN extraído de espiguillas enteras en cuatro estadios del desarrollo floral (premeiosis, meiosis, postmeiosis y antesis). El mismo grupo de investigación logró el ensamblado de un total de 43.888 *isotigs* (transcriptos) de la muestra sexual y 47.569 para la muestra apomíctica. El análisis de ambas bases determinó que 3.732 *isotigs* estaban diferencialmente representados entre ambos modos de reproducción, siendo 1.666 sobrepresados en el genotipo sexual y 2.066 sobrepresados en el genotipo apomíctico. Esto señala que mu-

⁴Página institucional disponible en www.iicar-conicet.gob.ar/grupos-de-investigacion/desarrollo-reproductivo-de-plantas/

⁵Página institucional disponible en www.iicar-conicet.gob.ar

chos de los genes normalmente silenciados durante el desarrollo sexual se ven activados en un contexto apomítico.

Estos transcriptomas constituyen herramientas fundamentales para la identificación de genes asociados al modo de reproducción (Bocchini *et al.*, 2018; Mancini *et al.*, 2018; Ochogavía *et al.*, 2018; Galla *et al.*, 2019). Los investigadores del grupo DREP también generaron una base de datos de transcriptomas por estadio reproductivo secuenciada por el sistema ILLUMINA[®], la cual permite identificar cuantitativamente transcritos diferenciales entre genotipos apomíticos y sexuales durante las diferentes etapas del desarrollo reproductivo (premeiosis, meiosis, postmeiosis y antesis; Podio *et al.*, 2021).

Por otro lado, recientemente, se ha iniciado la construcción de un borrador del genoma (secuenciación y ensamblado) de *P. notatum* utilizando un citotipo diploide denominado R1-Cayastá (Ortiz *et al.*, 2019). Este individuo posee cierta capacidad para formar sacos embrionarios apospóricos (Quarín *et al.*, 2001). Este genoma será utilizado como referencia para el ensamblado de un genoma tetraploide y la reconstrucción del ACR. La elección de esta estrategia se basó en: i) el menor contenido de ADN del citotipo diploide —valor $c = 0,6 \text{ pg} \sim 560 \text{ Mb}$; Galdeano *et al.*, 2016— ; ii) los avances recientes en tecnologías de secuenciación de moléculas únicas y algoritmos de ensamblaje *de novo* que permiten trabajar con genomas altamente heterocigotas; y iii) la posibilidad de determinar si la estructura del ACR se encuentra al nivel diploide o es consecuencia de la poliploidización. Para el ensamblaje del genoma se utilizaron datos de secuencias derivadas de lecturas largas obtenidas por el sistema OXFORD NANOPORE[®] y lecturas cortas generadas por ILLUMINA[®] HiSeq-1500 en combinación con programas informáticos como MaSurCa (Maryland Super-Read Cabog Assembler; Zimin *et al.*, 2013), Canu (Koren *et al.*, 2017), SMARTdenovo[®] (Istace *et al.*, 2017) y Shasta[®] (Shafin *et al.*, 2020). Las pruebas de ensamblado realizados hasta la fecha han conseguido delimitar el genoma a alrededor de 3.000 *scaffolds* (ensamblados), que cubren el 95 % de los genes esperados por el programa BUSCO[®] (Simão *et al.*, 2015; Ortiz *et al.*, 2019) La obtención del genoma diploide de *P. notatum* permitirá realizar un análisis sinténico detallado y la búsqueda de regiones que contengan genes candidatos para el modo de reproducción.

A pesar de los avances realizados hasta la fecha y la identificación de genes física y funcionalmente relacionados con la apomixis en especies del género *Paspalum*, hasta el presente no se conoce la estructura del ACR en detalle ni la lista completa de genes que se encuentran dentro en esta región genómica. En este contexto, los estudios de conservación y microsinténica de la región sinténica al ACR de *P. notatum* en especies

modelos como arroz, permitirían una aproximación a los genes potenciales presentes en dicha región. Si ambas regiones presentan un alto grado de conservación de la sintenia, la aproximación planteada podría ser de gran utilidad, a pesar de estar localizando genes en un contexto genómico diferente. El conocimiento tanto de la estructura como de la conservación del contenido génico del ACR puede aportar conocimiento sobre los genes principales que cosegregan con este tipo de reproducción y su posible función sobre el modo reproductivo.

2. Hipótesis y Objetivos

Las **hipótesis** del presente trabajo de Tesis son:

1. Los bloques cromosómicos de arroz que presentan sintenia con el ACR de *P. notatum* están conservados en los genomas de otras gramíneas.
2. Transcritos de *P. notatum* homólogos a genes de arroz localizados en las regiones sinténicas al ACR presentan expresión diferencial entre individuos sexuales y apomícticos.
3. La estructura del ACR de *P. notatum* que incluye bloques de los cromosomas 2 y 12 de arroz es específica de la especie y se encuentra conservada entre los niveles diploide y tetraploide.

El **objetivo general** de este trabajo de Tesis es determinar la conservación en el contenido y orden de génico de las regiones genómicas de arroz sinténicas al *locus* responsable de la apomixis en diferentes especies de gramíneas, analizar los patrones de expresión de los transcritos homólogos expresados durante el desarrollo reproductivo sexual y apomíctico de *P. notatum* y localizar las regiones genómicas asociadas al ACR en el borrador del genoma diploide de la especie.

Los **objetivos específicos** son:

1. Validar la asociación entre la región del cromosoma 2 de arroz con el ACR de *P. notatum* y analizar la expresión genes *PPI* en el transcriptoma del desarrollo reproductivo.
2. Analizar la conservación de los bloques de sintenia presentes en segmentos de arroz (aproximadamente 10 Mpb) asociados a la apomixis en *P. notatum* en seis especies del género *Oryza* y tres gramíneas completamente secuenciadas.

3. Determinar los patrones de expresión de los transcritos homólogos a los genes presentes en los bloques de sintenia expresados en los transcriptomas reproductivos de *P. notatum*.
4. Identificar el ACR en un borrador del genoma diploide de *P. notatum* y determinar su contenido génico.
5. Postular genes candidatos asociados a componentes de la apomixis presentes en el ACR de *P. notatum*.

3. Materiales y métodos

3.1. Material vegetal

El material vegetal empleado en esta Tesis estuvo integrado por ocho genotipos tetraploides ($2n = 4x = 40$) de *P. notatum* y 18 híbridos F_1 de una población segregante por el modo de reproducción (**Tabla 3.1**). Los genotipos Q4117, Q3775, Q4012, Q4064 y U47 corresponden a accesiones apomícticas colectadas de poblaciones naturales de Argentina, Brasil y México (Martínez *et al.*, 2001; Espinoza *et al.*, 2006); Q3664 es un genotipo tetraploide experimental apomíctico facultativo generado en Tifton, Georgia (EEUU) con un alto grado de sexualidad (Quarín *et al.*, 1984; Ortiz *et al.*, 1997); Q4188 y Q4205 son genotipos tetraploides completamente sexuales (sin capacidad de apomixis) obtenidos experimentalmente (Martínez *et al.*, 2001; Quarín *et al.*, 2003).

Los individuos F_1 (**Tabla 3.1**) corresponden al remanente de una población de mapeo derivada del cruzamiento entre Q4188 (parental pistilado) y Q4117 (dador de polen) generada por Stein *et al.* (2007). A fin de descartar problemas de contaminación, todos los materiales utilizados fueron reclasificados en cuanto a su modo de reproducción (sexual o apomíctico) mediante la utilización de técnicas embriológicas y moleculares. Se estudiaron los híbridos F_1 : #8, #9, #32, #36, #40, #56, #57, #58, #70, #71, #83, #96, #117, #118, #119, #123, #129 y #130. Los últimos seis híbridos fueron obtenidos durante esta Tesis a partir de la germinación de semillas derivadas del cruzamiento de los mismos progenitores a fin de aumentar la cantidad de individuos evaluados.

Todo el material vegetal forma parte del banco de germoplasma del IBONE (CONICET-UNNE), Corrientes. Réplicas de estas plantas y la población F_1 son mantenidas en el IICAR (CONICET-UNR), en la Facultad de Ciencias Agrarias¹ de la Universidad Nacional de Ro-

¹Página institucional disponible en www.fcagr.unr.edu.ar

sario² (FCA-UNR), Zavalla, Santa Fe. El material se conserva en macetas plásticas de 10 litros dispuestas sobre el suelo y expuestas en el exterior a las mismas condiciones ambientales, de riego y fertilización durante toda la época en estudio (veranos de 2015, 2016 y 2017). Las actividades culturales consistieron en: riego a demanda (usualmente un riego semanal en invierno y tres en verano), fertilización previa a la época de floración —50 mg por maceta de fertilizante triple 15 NPK (nitrógeno, fósforo y potasio)—, desmalezado mensual, poda bianual y transplante anual con descarte rizomas muertos e incorporación de tierra de almácigo. Las plantas reservadas para extracción de material genético se mantienen en macetas de un litro en invernáculo equipado con calefacción de encendido automático contra el régimen de heladas.

TABLA 3.1: Material vegetal utilizado

Accesión	Origen	Modo de reproducción	Expresividad de la aposporia (%)	Referencia
Q4188	Experimental	Sexual	0,00	Quarín <i>et al.</i> (2003)
Q4205	Experimental	Sexual	0,00	Quarín <i>et al.</i> (2003)
Q4117	Río Grande do Sul, Brasil	Apomixis	96,30	Ortiz <i>et al.</i> (1997)
U47	Corrientes, Parque Mitre	Apomixis	76,60	Espinoza <i>et al.</i> (2006)
Q4064	Corrientes, Saladas	Apomixis	78,40	Espinoza <i>et al.</i> (2006)
Q3775	Tamaulipas, México	Apomixis	96,81	Espinoza <i>et al.</i> (2006)
Q4012	Tres Lagoas, Brasil	Apomixis	100,00	Espinoza <i>et al.</i> (2006)
Q3664 [†]	Experimental	Apomixis	11,20	Quarín <i>et al.</i> (1984)
# 8	F ₁ experimental	Sexual	0,00	Stein <i>et al.</i> (2007)
# 32	F ₁ experimental	Sexual	0,00	Stein <i>et al.</i> (2007)
# 36	F ₁ experimental	Sexual	0,00	Stein <i>et al.</i> (2007)
# 56	F ₁ experimental	Sexual	0,00	Stein <i>et al.</i> (2007)
# 57	F ₁ experimental	Sexual	0,00	Stein <i>et al.</i> (2007)
# 58	F ₁ experimental	Sexual	0,00	Stein <i>et al.</i> (2007)
# 70	F ₁ experimental	Sexual	0,00	Stein <i>et al.</i> (2007)
# 83	F ₁ experimental	Sexual	0,00	Stein <i>et al.</i> (2007)
# 96	F ₁ experimental	Sexual	0,00	Stein <i>et al.</i> (2007)
# 9	F ₁ experimental	Apomixis	100,00	Stein <i>et al.</i> (2007)
# 40	F ₁ experimental	Apomixis	80,00	Stein <i>et al.</i> (2007)
# 71	F ₁ experimental	Apomixis	100,00	Stein <i>et al.</i> (2007)
#117	F ₁ experimental	s/c	-	-
#118	F ₁ experimental	s/c	-	-

²Página institucional disponible en www.unr.edu.ar

TABLA 3.1: Material vegetal utilizado (continuación)

Accesión	Origen	Modo de reproducción	Expresividad de la aposporía (%)	Referencia
#119	F ₁ experimental	s/c	-	-
#123	F ₁ experimental	s/c	-	-
#129	F ₁ experimental	s/c	-	-
#130	F ₁ experimental	s/c	-	-

Se consideró modo de reproducción apomixis tanto para los individuos apomícticos obligados como para los facultativos. †: Q3664 fue generado por cruzamientos controlados entre un tetraploide sexual inducido por colchicina a partir de *Paspalum notatum* var. *saurae* (2x) y un tetraploide apomíctico de estigmas blancos (wsb). s/c: sin clasificación

3.2. Análisis citoembriológicos

Con el fin de determinar el modo reproductivo (sexualidad/apomixis) de los materiales experimentales utilizados en este trabajo, se colectaron espiguillas en estado de anthesis (a primera hora del día, antes de la emergencia de las anteras) y se fijaron en FAA (90 % etanol; 5 % ácido acético; 5 % formaldehído) durante al menos 48 horas a 4 °C. Posteriormente, las inflorescencias fueron transferidas a una solución de etanol 70 % v/v y almacenadas hasta su uso. Las observaciones citoembriológicas se realizaron mediante el clarificado de ovarios utilizando el método propuesto por Young *et al.* (1979). Brevemente, los pistilos de cada flor fueron extraídos bajo lupa y deshidratados mediante la incubación en: I) 24 horas en etanol 70 %; II) 150 minutos con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) de 10 volúmenes; y III) 30 minutos en soluciones de etanol al 50, 70, 95 y 100 %, respectivamente. Posteriormente, los ovarios se clarificaron mediante incubaciones en soluciones 1:1, 3:1, 5,5:1 de metilsalicilato:etanol, respectivamente. Finalmente, las muestras se conservaron en metilsalicilato al 100 % hasta el momento de la observación. Los ovarios fueron dispuestos en filas de a diez sobre un portaobjeto, cubiertos con un cubreobjeto y observados utilizando un microscopio LEICA® DIASTAR equipado con el sistema de contraste de interferencia diferencial (DIC). Se analizaron aproximadamente 100 ovarios por planta.

Para asignar el modo reproductivo de cada individuo se evaluó la cantidad de óvulos que presentaron; I) sacos embrionarios de tipo Polygonum (meióticos, SEM): formados partir de la división reduccional de la célula arqueosporial y caracterizados por la presencia de un aparato oosférico en el extremo micropilar (una ovocélula y dos sinérgidas),

una célula central con dos núcleos polares y varias antípodas en el extremo chalazal del óvulo; II) sacos embrionarios apospóricos (SEA): originados a partir de células nucelares no reducidas y caracterizados por poseer en un extremo una ovocélula, dos sinérgidas, una célula central muy vacuolizada, con dos núcleos polares y ausencia de antípodas; y III) sacos embrionarios de tipo Polygonum junto con uno o más sacos embrionarios apospóricos (SEM). Todas las plantas que mostraron la presencia de SEAs, ya sea solo, o acompañado por un saco de tipo meiótico, fueron clasificadas como apomícticas, mientras que aquellos individuos que mostraron exclusivamente sacos embrionarios de tipo Polygonum fueron clasificadas como sexuales (Martínez *et al.*, 2001). En los casos en donde se observaron sacos embrionarios con escaso desarrollo y no fue posible determinar su origen sexual o apomíctico fueron clasificados como abortados. La expresividad de la aposporia se calculó como el porcentaje de ovarios con sacos apospóricos sobre el total de ovarios viables según la siguiente fórmula (Zilli *et al.*, 2015).

$$\text{Expresividad de la aposporia} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de ovarios con sacos apospóricos}}{\text{n}^\circ \text{ de ovarios totales viables}} \times 100 \quad (3.1)$$

3.3. Análisis moleculares

3.3.1. Extracción de ADN genómico

La extracción del ADN genómico fue realizada siguiendo el protocolo del CTAB (Saghai-Marooif *et al.*, 1984). Brevemente, se cortaron hojas jóvenes y sanas en la primera hora del día, colectándolas en tubos de ensayo de polipropileno estériles de 15 ml. Las muestras se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se conservaron hasta el momento de la extracción. Aproximadamente 2,5 g del tejido foliar enfriado con nitrógeno líquido fue triturado en mortero hasta obtener un polvo fino. Las muestras procesadas se transfirieron a los tubos de 15 ml donde se mantuvieron en frío hasta su procesamiento. La extracción del ADN genómico se realizó mediante el agregado de 8 ml de *buffer* de extracción (NaCl 0,7 M; EDTA 0,05 M; Tris 0,1 M; β -mercaptoetanol 0,14 M; CTAB 2 % m/v; pH 8) e incubación a 65 °C durante una hora con agitaciones suaves cada 10 minutos. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas (2.000 rpm a 4 °C durante 20 minutos) y la fase acuosa (aproximadamente 7,5 ml) fue transferida a un tubo limpio. Las extracciones fueron purificadas mediante dos pasos de incubación con 1 volumen de cloroformo frío

y centrifugadas a 20 °C y 3.500 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante (7 ml) fue luego transferido a tubos nuevos adicionando 1 volumen de isopropanol frío para precipitar el ovillo de ADN. Las muestras fueron incubadas durante 12 horas a -20 °C. Los ovillos fueron colectados con varillas de vidrio, dispuestos durante 10 minutos en una solución de lavado (alcohol 76 %; acetato de sodio 0,2 M) y secados en campana de flujo laminar. Las muestras se resuspendieron en 250 µl de TE (EDTA 0,001 M; Tris 0,01 M; pH 8). El ARN fue removido mediante un tratamiento con ARNasa A (0,1 mg/ml) durante 90 minutos en baño seco a 37 °C. Cada muestra se precipitó durante 2 horas a -80 °C añadiendo 5 % V/V de NaCl y dos volúmenes de etanol absoluto. Las muestras se centrifugaron a 12.000 rpm por 20 minutos, se lavaron con 250 µl de etanol al 70 % por 10 minutos y se volvieron a centrifugar. Finalmente, los precipitados de ADN se secaron durante toda una noche y se resuspendieron en 250 µl de agua destilada estéril. La concentración de cada muestra se estimó por espectrofotometría realizando lecturas de absorbancia a 260 nm. La pureza de la extracción de determinó mediante el índice de absorbancia 260/280 nm. La integridad del ADN se verificó por electroforesis en geles de agarosa al 1 % P/v teñidos con bromuro de etidio 10 mg/ml (Sambrook y Maniatis, 1989).

3.3.2. Clasificación del modo reproductivo por medio del marcador SCAR SPNA2

La caracterización del modo reproductivo se complementó mediante el análisis del marcador SCAR SPNA2 que genera una banda de 182 pb completamente ligada al carácter apomixis en la especie (Rebozzio *et al.*, 2012). Las reacciones de PCR fueron realizadas usando 100 ng de ADN genómico, 30 ng de cada cebador (directo: 5'—CAATTCACCAAGTCAGTCAA—3'; reverso: 5'—TATTCACCCAAGTCTAACG—3'), 1× *buffer* de reacción, 0,2 mM de cada dNTP, 1 mM de MgCl₂ y 1 U de GoTaq® (PROMEGA®) en un volumen final de 25 µl. La amplificación se realizó en una termocicladora MJ RESEARCH® PTC-150 MINICYCLER programada con una iniciación a 94 °C por 2 minutos, seguido de siete ciclos a 94 °C, 62 °C y 72 °C de 1 minuto de duración cada uno, en donde la temperatura de apareamiento (T_a) desciende un grado por ciclo (*touchdown*), seguido de 25 ciclos de 94, 62 y 72 °C por 1 minuto cada uno y una incubación final a 72 °C por 5 minutos. Los productos de amplificación fueron resueltos por electroforesis en geles de poliacrilamida al 5 % durante 1 hora (2.700 V, 90 mA y 60 W) y revelados por tinción con nitrato de plata (PROMEGA®). Las imágenes escaneadas de los geles luego de la electroforesis se editaron

con el programa GIMP[®] v2.10.12³ usando los procesos de inversión cromática y corrección logarítmica de contraste (Chastain y Pfaffman, 2006). Los pesos moleculares de las bandas obtenidas se estimaron con la herramienta GelAnalyzer[®] v2010a⁴ (Lazar y Lazar, 2012). Las plantas que amplificaron el marcador SPNA2 fueron clasificadas como apomíticas y las que no la amplificaron se catalogaron como sexuales.

3.3.3. Validación de la asociación del segmento del cromosoma 2 de arroz con el ACR de *P. notatum*

Dado que la asociación entre el cromosoma 2 de arroz y el ACR solo fue reportada para *P. notatum* (Pupilli *et al.*, 2004; Laspina *et al.*, 2008; Ortiz *et al.*, 2013), como primer paso para realizar los análisis de sintenia se decidió validar esta asociación mediante experimentos de ligamiento con un mayor número de individuos.

Estudios previos de mapeo comparativo con marcadores de RFLP determinaron que dos sondas del cromosoma 2 de arroz (C560 y C932) mostraron polimorfismos estrictamente ligados a la apomixis en *P. notatum* (Pupilli *et al.*, 2004). Estos marcadores, correspondientes a una proteína ribosomal 60S (C560) y a una peptidil-prolil *cis/trans* isomerasa del tipo FKBP (PPIasa, C932), generaron fragmentos de restricción/hibridación ligados a la apomixis exclusivos en esta especie (Hojsgaard *et al.*, 2011; Ortiz *et al.*, 2013). A partir de estos resultados se ha sugerido que el *locus* que controla la apomixis en *P. notatum* está inmerso en una región cromosómica híbrida formada por segmentos de los cromosomas 2 y 12 de arroz (ver Sección 1.3.3). Con el fin de validar la asociación entre la región del cromosoma 2, donde mapean estos genes, y el *locus* que controla la apomixis en *P. notatum* se realizaron experimentos de mapeo utilizando los genotipos parentales Q4188 (sexual) y Q4117 (apomítico) y la población segregante por el modo de reproducción (Stein *et al.*, 2007). De los dos genes posibles se seleccionó el codificante para la PPIasa debido a que proteínas de este tipo han sido asociadas al desarrollo y la respuesta a hormonas (Geisler y Bailly, 2007).

En primer lugar, se realizó una búsqueda de transcritos de *P. notatum* con homología al gen *PPI* de arroz (OS02G0760300), mediante la interrogación del transcriptoma del desarrollo reproductivo de *P. notatum* generadas por la tecnología de ROCHE[®] 454 FLX+ (Ortiz *et al.*, 2017). Se realizaron análisis de BLASTn/BLASTx (Altschul *et al.*, 1990)

³Disponible en www.gimp.org

⁴Disponible en www.gelanalyzer.com

utilizando como secuencia problema, la secuencia codificante (CDS) del gen de arroz OSO2G0760300. Los transcriptos resultantes fueron analizados con las plataformas bioinformáticas Pfam⁵ (El-Gebali *et al.*, 2019) y ExPasy⁶ (Artimo *et al.*, 2012) para identificar los marcos abiertos de lectura y los dominios que codifican. La predicción de las secuencias codificantes (CDS) de dichos transcriptos se realizó en el programa Fgenesh⁷ v2.6 (Solovyev *et al.*, 2006) de SoftBerry⁷. Las secuencias codificantes fueron analizadas mediante alineamientos múltiples realizados con el algoritmo iterativo MUSCLE⁸ v3.8.31⁸ (Edgar, 2004) operando sobre la plataforma bioinformática UGENE⁹ v1.32.0⁹ (Okonechnikov *et al.*, 2012). Las matrices obtenidas del alineamiento fueron utilizadas en el programa MEGA X¹⁰ v10.1.7¹⁰ para llevar a cabo análisis filogenéticos empleando el modelo estadístico MrBayes con criterios de optimización y con el modelo de sustitución HKY85, que es el seleccionado por defecto para el estudio de genes y proteínas (Kumar *et al.*, 2018). Para obtener un árbol consenso con raíz, se utilizó como grupo externo las secuencias codificantes del gen ortólogo de *A. thaliana* (AT5G64350). Posteriormente, se diseñaron cebadores específicos para cada uno de los transcriptos a evaluar, utilizando la herramienta Primer3¹¹ v2.4.0¹¹ (Rozen y Skaletsky, 1999). Se delimitaron sitios exclusivos de cada una de las secuencias en estudio mediante alineamientos múltiples de las mismas. En aquellos casos donde no fue posible determinar regiones únicas, se identificaron, probables sitios de inserción de intrones para diseñar cebadores flanqueantes a ellos. A fin de determinar las regiones a amplificar se realizaron alineamientos entre el CDS y el gen de arroz utilizando el programa MUSCLE⁸ (Edgar, 2004). Se diseñaron dos juegos de cebadores directos y reversos para cada transcripto sobre los extremos de exones y flanqueando intrones, a fin de aumentar las probabilidades de detectar polimorfismos entre los genotipos parentales que pudieran ser mapeados en la progenie. La longitud de los amplicones esperada (en pb) se estimó sobre la secuencia de arroz. La especificidad teórica de los cebadores se corroboró realizando experimentos de PCRS *in silico* en UGENE⁹ (Okonechnikov *et al.*, 2012).

Las reacciones de PCR se realizaron utilizando 90 ng de ADN, 0,2 μ M de cebadores específicos (**Tabla 3.2**), 1 U de Taq polimersa, 0,2 mM de dNTPs y 1,5 mM de MgCl₂ en un volumen final de 25 μ l. La determinación de la T_a óptima para cada par de cebadores se realizó utilizando una termocicladora BIO-RAD[®] T100 equipada con gradiente térmico.

⁵Disponible en <https://pfam.xfam.org/>

⁶Disponible en www.expasy.org

⁷Disponible en <http://www.softberry.com/berry.phtml>

⁸Disponible en www.drive5.com/muscle

⁹Disponible en www.ugene.net

¹⁰Disponible en www.megasoftware.net

¹¹Disponible en www.primer3plus.com

Las condiciones de ciclado fueron: 5 minutos a 98 °C y 35 ciclos de: 30 segundos a 94 °C, 1 minuto a la T_a específica para cada par de cebadores, y 2 minutos a 72 °C. El intervalo de extensión final fue a 72 °C durante 5 minutos. Los productos de amplificación se detectaron por electroforesis (2 horas a 55 V constantes) en geles de agarosa entre 1,5–3,5 %, y tinción con bromuro de etidio 10 mg/ml.

TABLA 3.2: Características de los cebadores diseñados para amplificar a los transcritos de *Paspalum notatum* con homología a la *PPI* de *Oryza sativa* (OS02G0760300)

Transcripto a amplificar	Par de cebadores	Secuencia	T_a (°C)
PPI SEX	1°	Directo: ATTCATAGTGCTGCCCATCC	57,8
		Reverso: GCATGATCGGCTCTGATACC	
	2°	Directo: TGCGGTTAGAAGTCAGTCC	57,8
		Reverso: AGCTATGGCCGAATAGTTGC	
PPI APO	1°	Directo: CCGGTCGCAGTACAACAGAA	59,0
		Reverso: TTTCTGGACAGATCACGATCC	
	2°	Directo: TGGGATGAGGGAGTTATGACC	58,5
		Reverso: GGTTGAATTCCTCCAGTTGC	
PPI QUIM	1°	Directo: TCAGTTTCAACATTGGTCTGGG	57,0
		Reverso: TGGACCTGATCGTCTCTCTCC	
	2°	Directo: TGGGATGAGGGAGTTATGACC	54,3
		Reverso: TGGTAGGCCTCGTTAATTTCC	
PPI PS	1°	Directo: CAGGTTGGCGCTTGCAGC	59,0
		Reverso: TGGGTATATTCGTTGCCCCC	
	2°	Directo: CTTGCAGCCGCCACCATG	59,0
		Reverso: ATTCGTTGCCCCAAGTCTT	

T_a : temperatura de apareamiento

En los casos en donde las amplificaciones de las secuencias *PPIs* mostraron polimorfismos entre los genotipos parentales, se realizó la detección de ligamiento con el modo reproductivo. Para esto se realizó en una primera etapa un análisis de segregantes en grupos o BSA (por *Bulk Segregant Analysis*, Michelmore *et al.*, 1991). Cada grupo (sexual y apomítico), se construyó mezclando *in vitro* 30 ng de ADN de tres individuos F_1 sexuales (#8, #36 y #58) y tres apomíticos (#9, #40 y #71), respectivamente.

La presencia de las bandas de interés asociadas a un grupo se confirmó, en una segunda etapa, ensayando los cebadores sobre ADN de los progenitores y de los 18 individuos de la población (13 sexuales y 5 apomíticos). La estimación del ligamiento se realizó considerando a la población de mapeo como una pseudo-retrocruza, y a la presencia del marcador y al carácter apomixis como *loci* dominantes (Stein *et al.*, 2007). Los ensayos in-

cluyeron también cinco accesiones naturales apomícticas (Q3664, Q3775, Q4012, Q4064 y U47) y un genotipo sexual (Q4205) a fin de corroborar si el polimorfismo era específico del genotipo parental (Q4117) o una característica conservada en la especie. Los pesos moleculares de las bandas obtenidas se estimaron con el programa GelAnalyzer[®] v2010a (Lazar y Lazar, 2012) utilizando como referencia el marcador de peso molecular λ EcoRI/HindIII.

3.3.4. Clonado y secuenciación de fragmentos *PPI*

Las bandas de interés fueron cortadas de los geles de agarosa, eluidas en 100 μ l de agua ultrapura estéril y reamplificadas por PCR utilizando las mismas condiciones de ciclado que en la amplificación original. Los productos de amplificación fueron ligados al vector pGEM[®]-T Easy (Robles y Doers, 1994) según el protocolo del proveedor (PROMEGA[®]). En el caso de las bandas que no pudieron ser aisladas, la ligación fue realizada utilizando directamente los productos de amplificación. Los productos de la ligación con el vector se emplearon para transformar células competentes de *Escherichia coli* DH5 α por el método del cloruro de calcio (Sambrook y Maniatis, 1989). Las colonias recombinantes se seleccionaron en placas de LB-agar conteniendo 100 μ g/ml de ampicilina y 15 μ l de X-Gal a 50 mg/ml por placa. Por cada clonado se seleccionaron unas 15 colonias blancas por placa y se realizaron minipreparaciones para la extracción de los plásmidos (Sambrook y Maniatis, 1989). La presencia del inserto se analizó mediante la digestión del plásmido con EcoRI seguidas de una electroforesis en geles de agarosa al 1,5 % y tinción con bromuro de etidio. Cinco clones de cada inserto fueron enviados a secuenciar a MACROGEN[®] (Corea). La identidad de los amplicones secuenciados se confirmó mediante análisis de BLASTn en la página del NCBI¹² y por alineamientos con el gen de arroz y/o los *isotigs* de *P. notatum* utilizando el programa ClustalW[®] de UGENE¹³ (Okonechnikov *et al.*, 2012). Para el análisis, en primer lugar, se descartaron los segmentos del plásmido pGEM[®]-T Easy con la herramienta VecScreen[®] del NCBI¹⁴. Para cada clonado, se obtuvo la secuencia consenso con al menos tres secuencias independientes mediante el apilamiento de las lecturas.

¹²Disponible en <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

¹³Disponible en www.ugene.net

¹⁴Disponible en www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/vecscreen/

3.3.5. Extracción de ARNm, síntesis de ADNC y reacciones de amplificación de RT-PCR

A fin de analizar los patrones de expresión en tejidos reproductivos de los transcritos de las *PPI* estudiados, se realizaron experimentos de RT-PCR sobre ADNC obtenido de diferentes estadios del desarrollo. Las muestras de ADNC disponibles en el Laboratorio de Biología Molecular de la FCA-UNR fueron obtenidas por la Ing. Celeste Azzaro. Brevemente, se colectaron inflorescencias en estadios de meiosis, postmeiosis y anthesis de los genotipos Q4188 y Q4117. La clasificación del estado de desarrollo de las inflorescencias se realizó siguiendo el calendario reproductivo descrito por Laspina *et al.* (2008) mediante la observación del desarrollo del polen teñido con carmín acético (45 %). Para la extracción del ARN se utilizó el método del TRIzol Reagent (INVITROGEN[®], Chomczynski, 1989). La síntesis de ADNC se realizó a partir de 1 µg de ARN total utilizando la enzima Superscript II (INVITROGEN[®]) siguiendo el protocolo del fabricante (Celeste Azzaro, comunicación personal).

Las reacciones de RT-PCR fueron realizadas usando 2 µl de ADNC como molde, 0,2 µM de cebadores específicos, 1 U de Taq polimersa (INBIO HIGHWAY[®]), 0,2 mM de dNTPS y 1,5 mM de MgCl₂ en un volumen final de 25 µl. Las reacciones de amplificación se realizaron en una termocicladora MJ RESEARCH[®] PTC-150 MINICYCLER. El ciclado consistió en una etapa inicial de desnaturalización a 94 °C por 1 minuto, seguida de 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C y 1 minuto 72°C y 5 minutos finales de elongación a 72 °C. Los productos de amplificación se resolvieron por electroforesis (50 V, 90 minutos) en geles de agarosa al 2 % y posterior tinción con SYBR-safe (INVITROGEN[®]). Como gen de referencia se utilizó un fragmento interno de la β-tubulina, debido a que en trabajos previos se demostró que su expresión es estable entre los diferentes estadios del desarrollo de órganos reproductivos de *P. notatum* (Felitti *et al.*, 2011; Ochogavía *et al.*, 2011; Podio *et al.*, 2014b). Para su amplificación se utilizaron los cebadores directo 5'—GTGGAGTGGATCCCCAACAA—3' y reverso 5'—AAAGCCTTCCTCCTGAACATGG—3'. Las reacciones de amplificación se realizaron en paralelo y bajo las mismas condiciones.

3.3.6. Amplificación del gen PPI QUIM

La presencia de la secuencia quimérica PPI QUIM a nivel genómico se estudió mediante amplificaciones con cuatro enzimas Taq polimerasas diferentes, dos de alta fidelidad (Taq

TAKARA® y LHF INBIO®) y dos de tipo estándar (GoTaq PROMEGA® y Taq INBIO HIGHWAY®). Las reacciones fueron realizadas usando 150 ng de ADN, 0,4 µM de cebadores, 1,5 U Taq polimerasa. Se probaron asimismo ciclados estándar a diferentes temperaturas de apareamiento y amplificaciones del tipo *touchdown*. Estas amplificaciones contemplaron una primera etapa de 10 ciclos de; 94 °C por un minuto, 65 °C por un minuto (disminuyendo de a un grado por ciclo) y 72 °C por un minuto. La segunda etapa estuvo comprendida por 25 ciclos de 94 °C por un minuto, 55 °C por un minuto y 72 °C por un minuto.

3.4. Estudios de sintenia

Los estudios de sintenia de los segmentos de arroz correspondientes a los cromosomas 2 y 12 asociados a la apomixis en *P. notatum* fueron realizados utilizando como referencia los genomas de *S. bicolor*, *S. italica* y *B. distachyon*. Inicialmente se identificaron los cromosomas con mayor homología, se identificaron los rearrreglos cromosómicos presentes sobre los mismos y posteriormente se realizó un estudio detallado de los bloques de sintenia de estos sectores. La determinación de los cromosomas homólogos al Os2 y Os12 en las gramíneas en estudio se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Salse *et al.* (2004), utilizando los siguientes criterios para definir ortología génica: i) poseer al menos 65 % de identidad sobre al menos 60 % de la longitud de las secuencias y ii) presentar alineamientos con un *e-value* < 0,005 (estadísticos de la búsqueda BLASTn). Para ello, se utilizaron las tablas de sintenia génica disponibles en la plataforma Gramene¹⁵ y la **Ecuación 3.2**, donde *CnA* es el cromosoma *n* de la especie *A*.

$$\% \text{ de homología de } CnA \text{ respecto a } Os2 = \frac{\text{Genes de } CnA \text{ homólogos al } Os2 \times 100}{\text{Genes totales de } A \text{ homólogos al } Os2} \quad (3.2)$$

El estudio de los rearrreglos sobre los cromosomas homólogos identificados se realizó mediante gráficos de dispersión generados con el lenguaje R® v4.0.4¹⁶ (R Core Team, 2013), utilizando los paquetes, dplyr vo.8.3¹⁷ (Wickham *et al.*, 2015), tidyr v1.0.0¹⁸ (Wick-

¹⁵Disponible en http://ensembl.gramene.org/Oryza_sativa/Info/Index

¹⁶Disponible en www.r-project.org

¹⁷Disponible en www.rdocumentation.org/packages/dplyr

¹⁸Disponible en <https://tidyr.tidyverse.org/>

ham *et al.*, 2019) y ggplot2 v3.2.1¹⁹ (Wickham, 2011) dentro del entorno gráfico RStudio[®] v1.1.463²⁰.

La caracterización detallada de los fragmentos de arroz se llevó a cabo sobre fracciones de aproximadamente 10 Mpb de cada cromosoma comprendidas entre Os2:22.882.165-32.517.155 y Os12:12:20.005.405–27.529.682. Los límites de ambos fragmentos de arroz se definieron en función de las localizaciones cromosómicas de los marcadores de RFLP completamente ligados a la apomixis en *P. notatum* C932, C560, C1069 y C0996 (Pupilli *et al.*, 2004; Podio *et al.*, 2012a). En este análisis se utilizaron los genomas de tres gramíneas (*S. bicolor*, *S. italica* y *B. distachyon*) y siete especies del género *Oryza* (*O. sativa* grupo Indica, *O. barthii*, *O. brachyantha*, *O. glaberrima*, *O. glumipatula*, *O. punctata* y *O. nivara*). Las regiones de estudio en cada especie, los genes que las flanquean y la longitud de las mismas pueden encontrarse en la **Tabla A.1** de los Anexos.

En primer lugar, se llevó a cabo un análisis de conservación de la colinealidad génica respecto a sus regiones ortólogas en las especies seleccionadas mediante gráficos de cuerdas. Los mismos se confeccionaron con el paquete circlize vo.4.6²¹ (Gu *et al.*, 2014), utilizando las siguientes funciones: `circos.track` y `circos.axis`: para representar los cromosomas en orientaciones opuestas y evidenciar los segmentos invertidos; `circos.genomicLink`: para trazar las relaciones entre genes ortólogos usando gradientes cromáticos en función de la localización cromosómica en arroz; y `circos.genomicLabels`: para etiquetar radialmente los bloques de sintenia, marcadores del ACR y rearrreglos cromosómicos. Las regiones centroméricas se trazaron utilizando los datos presentados por el *Rice Genome Annotation Project*²² (Ouyang *et al.*, 2007; **Tabla A.2**).

Posteriormente, se identificaron los bloques génicos de ambas regiones de arroz. En cada especie se reportaron únicamente los bloques que mostraron tres o más genes consecutivos con microcolinealidad conservada entre las especies de comparación (bloques de sintenia). Se utilizaron las tablas de sintenia disponibles en la plataforma Gramene²³ y el programa OrthoClusterDB[®] v2010²⁴ (Vergara y Chen, 2010) con los siguientes parámetros: `lower_bound = 3`; `upper_bound = 100.000`; `mismatches = 0`; `order = -rs`.

¹⁹Disponible en www.cran.r-project.org/web/packages/ggplot2

²⁰Disponible en www.rstudio.com

²¹Disponible en <https://cran.r-project.org/web/packages/circlize/>

²²Disponible en http://rice.plantbiology.msu.edu/annotation_pseudo_centromeres.shtml

²³Disponible en http://ensembl.gramene.org/Oryza_sativa/Info/Index

²⁴Disponible en <http://genome.sfu.ca/orthoclusterdb/>

Los bloques de sintenia se graficaron con el editor de imágenes vectoriales Inkscape® v0.92.4²⁵ (Harrington, 2004).

3.5. Mapeo *in silico* de transcriptos expresados diferencialmente durante el desarrollo reproductivo sexual y apomítico de *P. notatum* en el genoma de arroz

A fin de determinar la localización genómica en arroz de un grupo de transcriptos expresados diferencialmente durante el desarrollo reproductivo apomítico y sexual de *P. notatum*, se realizaron experimentos de mapeo *in silico* sobre el genoma utilizando una base de datos de los transcriptomas florales por estadio desarrollada recientemente en nuestro laboratorio (Podio *et al.*, 2021). Dicha base cuenta con alrededor de 190.000 transcriptos, incluyendo datos de anotación, isoformas y niveles de expresión (Podio *et al.*, 2021). El transcriptoma empleado fue construido por secuenciación ILLUMINA® TruSeq/HiSeq a partir de muestras de ARNm extraídas en los estadios del desarrollo premeiosis, meiosis, postmeiosis y anthesis de un individuo completamente sexual (C₄-4[×]) y un individuo apomítico (Q₄₁₁₇²⁶). Las muestras de cada estadio fueron procesadas por triplicado (24 bibliotecas en total). A partir de las lecturas de la secuenciación, el grupo de investigación del DREP realizó un ensamblado *de novo* para cada genotipo para generar los transcriptomas TRA (transcriptoma del genotipo apomítico Q₄₁₁₇) y TRS (transcriptoma del genotipo sexual C₄-4[×]). Posteriormente se realizó un ensamblado global (conteniendo las lecturas de las 24 bibliotecas), denominado como Transcriptoma PnTRAYsmod que contiene secuencias únicas, luego de la eliminación de los duplicados con el programa CD-HIT® (Li y Godzik, 2006). Mediante la utilización del programa R se identificaron los transcriptos diferenciales contenidos en la base PnTRAYsmod (Podio *et al.*, 2021). Los genes diferenciales entre los desarrollos apomítico y sexual fueron definidos utilizando un valor de *p-value* < 0,001, $\text{Log}_2FC > |2|$ y una probabilidad ajustada $\text{FDR} < 1 \times 10^{-5}$. Este conjunto de 13.388 secuencias conformó la base de transcriptos diferenciales DET. Dada la metodología de comparación, los transcriptos con valores de $\text{Log}_2FC < -2$ correspondieron a los sobreexpresados en la base sexual (Up Sex), mientras que aquellos con valores de $\text{Log}_2FC > 2$, resultaron los sobreexpresados en la base apomítica (Up Apo).

²⁵Disponible en www.inkscape.org

²⁶Datos disponibles en el repositorio SRA del NCBI®: [accesión PRJNA511813](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/PRJNA511813)

Adicionalmente, se utilizó el programa TransDecoder[®] v5.3.0²⁷ (Haas y Papanicolaou, 2017) para discriminar entre transcritos codificantes (cod) y no codificantes (no-cod; Podio *et al.*, 2021).

El mapeo sobre el genoma de arroz se realizó utilizando los paquetes informáticos Biostrings²⁸ (Pagès *et al.*, 2017), y rblast v0.99.2²⁹ (Hahsler y Nagar, 2015). Ambos paquetes están disponibles en el repositorio Bioconductor^{®30} y permitieron realizar las búsquedas de similitudes entre el genoma de arroz y los transcritos diferenciales utilizando como parámetros umbrales un *e-value* $< 1 \times e^{-50}$ y un *bit score* > 250 . Por otro lado, se cuantificaron las cantidades de genes de arroz con homología con secuencia de transcritos diferenciales de *P. notatum* y, simultáneamente, se analizaron las proporciones de transcritos que mapearon en cada cromosoma de arroz (**Ecuación 3.3**, donde *Cn* equivale al cromosoma *n* de arroz). Las proporciones de transcritos sobreexpresados respecto al número total de secuencias codificantes de cada cromosoma de arroz fueron evaluadas estadísticamente con el método de Newcombe (1998) utilizando un intervalo de confianza (IC) al 95 %.

$$\text{Prop. genes sobreexpresado en } Cn = \frac{\text{Genes de } Cn \text{ homólogos a transcr. sobreexpresados}}{\text{Total de genes codificantes en } Cn} \quad (3.3)$$

A fin de visualizar los resultados obtenidos, se realizaron gráficos circulares generados con el paquete circlize v0.4.6³¹ de R (Gu *et al.*, 2014), identificando la posición de los transcritos mapeados sobre los cromosomas de arroz y sus valores de Log_2FC , usando la función `circos.genomic.point`, y la cantidad de transcritos cada 1,1 Mpb, usando la función `circos.track.Hist`.

²⁷Disponible en www.github.com/TransDecoder

²⁸Disponible en www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/Biostrings.html

²⁹Disponible en www.github.com/mhahsler/rBLAST

³⁰Disponible en www.bioconductor.org

³¹Disponible en <https://cran.r-project.org/web/packages/circlize/>

3.6. Identificación de secuencias genómicas de *Paspalum notatum* asociadas al ACR

Nuestro grupo de trabajo —DREP, perteneciente al IICAR (UNR-CONICET)— dispone de un ensamblado borrador del genoma de *P. notatum* a nivel diploide realizado en el marco del proyecto de colaboración internacional PROCROP (H2020-MSCA-RISE-2014, *grant agreement number*: 645.674) en donde participan los laboratorios del *Institut de Recherche pour le Développement* (IRD³²), Universidad de Montpellier, Francia (UM³³); el *Institute of Biosciences and BioResources* (IBBR-CNR³⁴); y la Universidad de Perugia (UNIPG³⁵), Italia (Ortiz *et al.*, 2019). La secuenciación del genoma se realizó a partir de ADN de un citotipo diploide ($2n = 2x = 20$), denominado experimentalmente R1, que pertenece a la colección de germoplasma del IBONE, Corrientes, Argentina. Esta planta es autoincompatible y se reproduce principalmente por sexualidad, pero muestra una capacidad residual para la aposporía (1,26%; Quarín *et al.*, 2001). La secuenciación de R1 fue llevada a cabo usando las tecnologías HiSeq ILLUMINA® *pair-end* y OXFORD NANOPORE®, con una cobertura de $100\times$ (~ 68 Gb) y $48\times$ (~ 32.5 Gb), respectivamente. El ensamblado realizado con el programa Miniasm® v0.3³⁶ (Li, 2016) produjo 3.843 *scaffolds* (ensablados) de un largo promedio 214.03 kb ($N_{50} = 299,67$ kb). Este ensamblado se utilizó como referencia para identificar los *scaffolds* que presentaran homología a 17 secuencias genómicas específicas de ACR en la especie obtenidas previamente. En la **Tabla 3.3** se enumeran las secuencias que se utilizaron y en la **Figura 3.1** se ilustran las secuencias ligadas al ACR de *P. notatum* mapeadas sobre los cromosomas Os2, Os7, Os10 y Os12. Asimismo, se incorporaron aquellos *scaffolds* con similitud a las regiones de los cromosomas de otras especies de gramíneas que mostraron secuencias asociadas a la apomixis.

La identificación de los *scaffolds* portando secuencias asociadas al ACR se realizó mediante búsquedas BLASTn (*e-value* $< 1 \times 10^{-5}$; *max target sequences* = 10; *hsp* = 5; *bit score* > 200 ; *% identity* > 95), y alineamientos con el programa MUMMER® v4.0³⁷ (Marçais *et al.*, 2018). Se utilizó el *script* nucmer para generar un alineamiento nucleotídico utilizando la opción `-maxmatch`³⁸. Posteriormente, se usó el *script* dnadiff para cuantificar las diferencias entre las secuencias en comparación. Los *scaffolds* con coberturas de alineamiento

³²Página institucional disponible en www.en.ird.fr

³³Página institucional disponible en www.umontpellier.fr

³⁴Página institucional disponible en www.ibbr.cnr.it/ibbr

³⁵Página institucional disponible en www.unipg.it

³⁶Disponible en www.github.com/lh3/miniasm

³⁷Disponible en www.github.com/gmarcais/mummer

³⁸Manual de MUMMER® disponible en <https://mummer4.github.io/manual/manual.html>

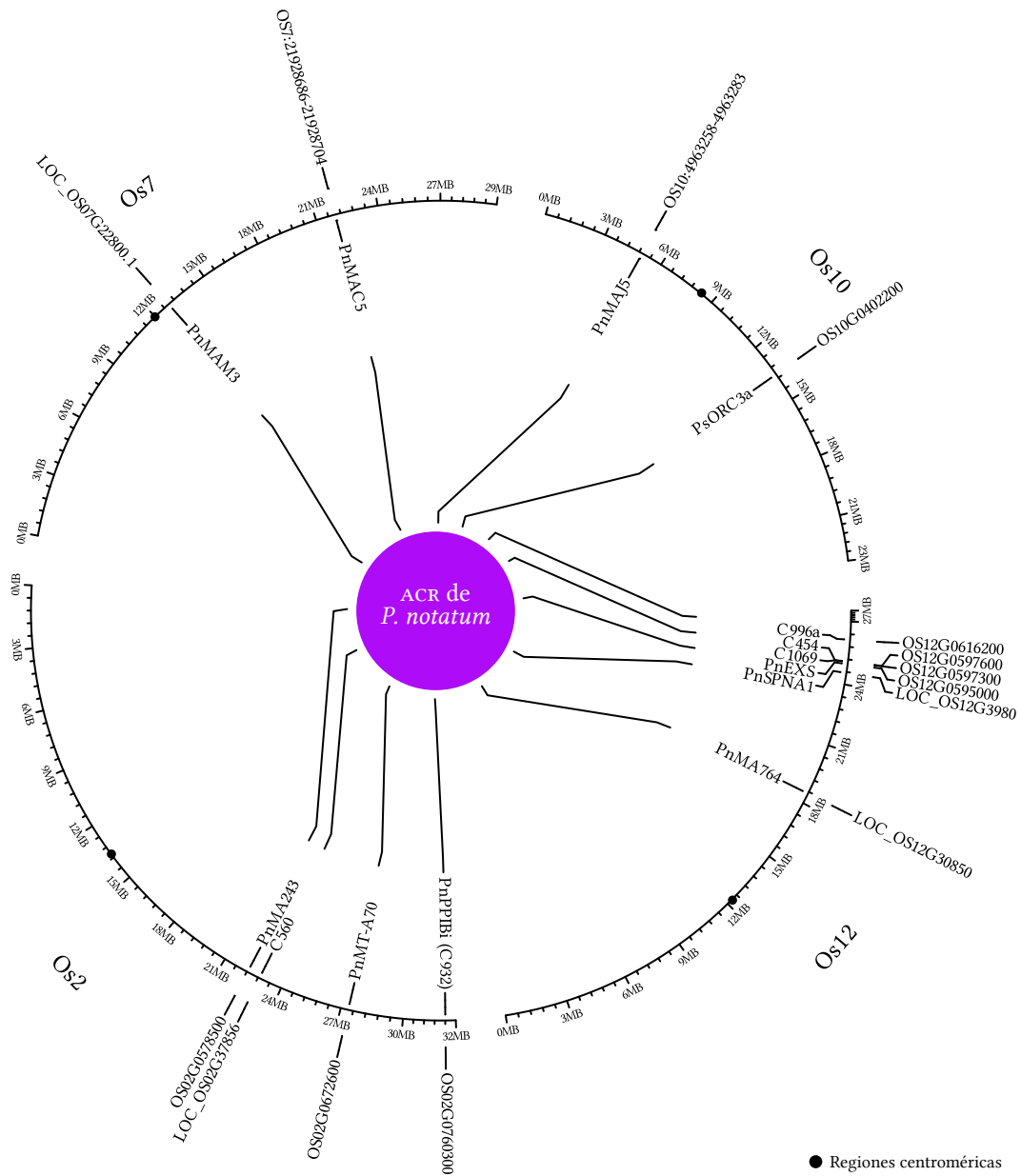


FIGURA 3.1: Mapeo sobre *Oryza sativa* de las secuencias ligadas al ACR de *Paspalum notatum*. Externamente se señalan los genes (o regiones) de *O. sativa* que presentan homología con las secuencias de *P. notatum* o clones ligados al ACR, los cuales se señalan en el interior del gráfico.

totales (sumatoria de los valores de largos de alineamiento de regiones no superpuestas) inferiores a 5.000 pb fueron descartados. Las representaciones gráficas se efectuaron usando el paquete ggplot2 v3.2.1³⁹ (Wickham, 2011).

TABLA 3.3: Secuencias ligadas al ACR de *Paspalum notatum*

Nombre de la secuencia ligada al ACR	Región o gen de arroz	Anotación funcional en arroz	Descripción de la secuencia
isotig11445	OS12G0597600	Proteína con dominio KH	Transcripto de <i>P. notatum</i> con homología al marcador C454 ^a (RFLP)
isotig17513	OS12G0597300	Proteína similar a transposasa tipo <i>mutator</i>	Transcripto de <i>P. notatum</i> con homología al marcador C1069 ^a (RFLP)
<i>PnLNC_QGJ</i> ^b	OS11G0207200, OS02G0555900, OS02G0666300, OS12G0597300	Proteína quinasa 3 activada por Mitogen	Transcripto de <i>P. notatum</i> correspondiente a un ARN largo no codificante (<i>lncRNA</i>) con homología a la proteína quinasa MAP3K
<i>PnPPI_Bi</i> ^c	OS02G0760300	Proteína peptidyl-prolyl cis-transisomerasa FKBP	Secuencia genómica de <i>P. notatum</i> con homología al marcador C932 ^a (RFLP)
<i>PnEXS</i> ^d	OS12G0595000	Proteína de la familia EXS	Secuencia genómica de <i>P. notatum</i>
<i>PnMT-A70</i> ^{e,f}	OS02G0672600	N ⁶ -adenosina-metiltransferasa (<i>MT-A70</i>)	Secuencia genómica de <i>P. notatum</i> derivada de una caminata cromosomal (<i>PnGSA3</i> ^d)

³⁹Disponible en www.cran.r-project.org/web/packages/ggplot2

TABLA 3.3: Secuencias ligadas al ACR de *Paspalum notatum* (continuación)

Nombre de la secuencia ligada al ACR	Región o gen de arroz	Anotación funcional en arroz	Descripción de la secuencia
<i>PnMA764</i> ^e	LOC_OS12G30850	Elemento transponible	Secuencia genómica de <i>P. notatum</i> derivada de una caminata cromosomal (<i>PnGSA1</i> ^d)
<i>PnSPNA1</i> ^g	LOC_OS12G39800	Proteína putativa de retrotransposones de la subclase <i>Ty1-copia</i>	Secuencia del fragmento SPNA1 (SCAR) cosegregante con la apomixis en <i>P. notatum</i>
<i>PnMA243</i> ^h	OS02G0578500	Proteína hipotética	Secuencia del fragmento BCU243-377 ^h (RAPD) cosegregante con la aposporia en <i>P. notatum</i>
<i>PnMAM3</i> ^{h-i}	LOC_OS07G22800.1	Proteína putativa de retrotransposones de la subclase <i>Ty1-copia</i>	Secuencia perteneciente al fragmento E36M37c ⁱ (AFLP) cosegregante con la aposporia en <i>P. notatum</i>
<i>PnMAC5</i> ^{h-i}	Os7:21928686-21928704	-	Secuencia del fragmento E32M33e _i (AFLP) cosegregante con la aposporia en <i>P. notatum</i>
<i>PnMAJ5</i> ^{h-i}	Os10:4963258-4963283	-	Secuencia del fragmento E33M42e ⁱ (AFLP) cosegregante con la aposporia en <i>P. notatum</i>
<i>PnMAI3</i> ^{h-i}	-	-	Secuencia del fragmento E33M32c ⁱ (AFLP) cosegregante con la aposporia en <i>P. notatum</i>

TABLA 3.3: Secuencias ligadas al ACR de *Paspalum notatum* (continuación)

Nombre de la secuencia ligada al ACR	Región o gen de arroz	Anotación funcional en arroz	Descripción de la secuencia
<i>PnMAJ7</i> ^{h-i}	-	-	Secuencia del fragmento E33M42g ⁱ (AFLP) cosegregante con la aposporía en <i>P. notatum</i>
<i>PnMAN1</i> ^{h-i}	-	-	Secuencia del fragmento derivada del E36M38a ⁱ (AFLP) cosegregante con la aposporía en <i>P. notatum</i>
<i>PnMAU16</i> ^{h-i}	-	-	Secuencia del fragmento E35M43p ⁱ (AFLP) cosegregante con la aposporía en <i>P. notatum</i>
<i>PSORC3a</i> ^j	OS10G0402200	Subunidad 3 del complejo de reconocimiento del origen <i>ORC3</i>	Secuencia genómica de <i>P. simplex</i> localizada en el clon de BAC 366H1 ^k ligado a la apomixis correspondiente a un pseudogen con homología a <i>ORC3</i>

- ^aPupilli *et al.* (2004);
^bMancini *et al.* (2018);
^cLa presente Tesis;
^dPodio (2013);
^ePodio *et al.* (2012a);
^fSiena *et al.* (2014);
^gRebozzio *et al.* (2012);
^hMartínez *et al.* (2003);
ⁱStein *et al.* (2004, 2007);
^jSiena *et al.* (2016);
^kCalderini *et al.* (2006)

3.6.1. Anotación de los *scaffolds* de *P. notatum* y análisis de sintenia

Los *scaffolds* de R1 identificados como resultado del análisis descripto anteriormente se analizaron mediante análisis de BLASTn utilizando la base de datos del NCBI® (organism = green plants; e-value < 1×10^{-5} ; database = genomic+transcript). La selección y extracción de secuencias codificantes se realizó utilizando las herramientas informáticas provistas en el grupo de programas Biostrings v2.52.0⁴⁰ y rBLAST v0.99.2⁴¹ (Pagès *et al.*, 2017; Hahsler y Nagar, 2015).

Las regiones codificantes de cada *scaffold* fueron predichas utilizando el programa Fgenesh® v2.6 de la plataforma Softberry®⁴² (Solovyev *et al.*, 2006), sobre la base de referencia de monocotiledóneas. En aquellos casos donde el programa identificó más de un gen presunto dentro de la misma región, se seleccionó como válido al gen predicho que generara la proteína con resultados más cercanos a las disponibles en las bases del NCBI® (mayor valor de *bit score*). Las relaciones sinténicas entre los *scaffolds* de *P. notatum* con los cromosomas de arroz se analizaron buscando los genes de arroz ortólogos a cada uno de los genes identificados mediante búsquedas tBLASTn contra las bases de plantas del NCBI. Los genes de esta base están indexados con una nomenclatura denominada locus_tag por lo cual fue necesario realizar una traducción al formato ensembl_gene_id, que es el sistema de identificación adoptado por la plataforma Gramene. Las conversiones masivas fueron hechas con la herramienta web DAVIES® v6.8⁴³ (Huang *et al.*, 2009). La identificación de ortología de secuencias con *O. sativa* se realizó utilizando la herramienta BioMart de la plataforma Ensembl®⁴⁴ (Kasprzyk, 2011) con los siguientes parámetros: dataset = plant genes 62; ID = gene stable ID; attributes = homologues; gene = ensembl/gene stable ID; y orthologues = Oryza sativa Japonica Group orthologues/gene stable ID. En los casos donde el gen consulta correspondió a más de un gen parálogo de arroz, se seleccionó aquel que estuviera relacionado directamente con las regiones de interés previamente definidas para los cromosomas 2 y 12 de arroz (Os2:22.882.165–32.517.155 y Os12::20.005.405–27.529.682). Para cada *scaffold* examinado se calcularon las densidades génicas que presentaban, las proporciones cubiertas por secuencias génicas e intergénicas, y las longitudes promedio de las secuencias intergénicas (**Ecuaciones 3.4 a 3.7**). Por otro lado, se utilizaron los transcritos de *P. notatum*

⁴⁰Disponible en www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/Biostrings.html

⁴¹Disponible en <https://github.com/mhahsler/rBLAST>

⁴²Disponible en www.softberry.com/fgenesh

⁴³Disponible en <https://david.ncifcrf.gov/>

⁴⁴Disponible en <http://ensembl.gramene.org/biomart/martview/>

de la base PnTriAySmod (ver Sección 3.6) para detectar las regiones expresadas dentro de los *scaffolds*. Las búsquedas BLASTn ($e\text{-value} < 1 \times 10^{-5}$) se realizaron usando como secuencia problema los 13.388 transcritos diferenciales contra las secuencias de los *scaffolds* seleccionados. Cada gen predicho de *P. notatum* fue correspondido con un único transcritos. En el caso de variantes transcripcionales de un mismo gen se seleccionó aquel transcritos con valores de longitud de cobertura mayores, menor número de errores de secuencia, y p-value más bajos, dándole prioridad a los transcritos diferencialmente expresados. Los resultados del BLAST fueron analizados con los paquetes `dplyr` v0.8.3⁴⁵ y `tidyr` v1.0.0⁴⁶ (Wickham *et al.*, 2015, 2019). Las representaciones gráficas de estos análisis fueron realizadas mediante un gráfico de segmentos generado con `ggplot2`.

$$\text{Densidad génica} = \frac{\text{Genes por ensamblado}}{\text{Long. del ensamblado}} \quad (3.4)$$

$$\text{Prop. sec. génicas} = \frac{\text{Long. del ensamblado cubierta por genes}}{\text{Long. del ensamblado}} \quad (3.5)$$

$$\text{Prop. sec. intergénicas} = 1 - \text{Prop. sec. génicas} \quad (3.6)$$

$$\text{Long. promedio sec. intergénicas} = \frac{\sum_{i=1}^n \text{Long. sec. intergénica}_i}{\text{Cantidad sec. intergénicas}} \quad (3.7)$$

3.6.2. Identificación, análisis y anotación funcional de genes candidatos

Los genes de arroz identificados en el mapeo de transcritos y aquellos detectados en los *scaffolds* asociados al ACR fueron analizados mediante sus categorías de ontología génica (GO[®]⁴⁷; Ashburner *et al.*, 2000). Los análisis se llevaron a cabo usando la base `org.At.tair.db`[®] v3.8.2⁴⁸ (Carlson, 2010) de *A. thaliana* y limitando el escrutinio al cuar-

⁴⁵Disponible en www.rdocumentation.org/packages/dplyr

⁴⁶Disponible en www.tidyr.tidyverse.org

⁴⁷Disponible en <http://geneontology.org/>

⁴⁸Disponible en www.bioconductor.org/packages/release/data/annotation/html/org.At.tair.db.html

to nivel de la clasificación GO mediante el paquete `clusterProfiler` v3.12.0⁴⁹ (Yu *et al.*, 2012). En el estudio se utilizaron los identificadores Ensemble⁵⁰ para convertirlos al correspondiente formato Entrez, requerido por el paquete `clusterProfiler`. La conversión entre formatos de identificadores génicos se realizó mediante la herramienta `web db2db`⁵¹ (Mudunuri *et al.*, 2009). Los genes ortólogos en arroz con GO de interés fueron seleccionados para realizar un análisis de relaciones funcionales en la plataforma String⁵² (Szklarczyk *et al.*, 2017) lo cual permitió predecir posibles rutas y/o vías en las cuales los genes candidatos pueden interactuar e interconectarse. Esta herramienta `web` correlaciona proteínas por su localización y función a través de enfoques teóricos y experimentales. Los diagramas de Venn utilizados para la descripción de los resultados se construyeron con la herramienta `web` InteractiveVenn⁵³ (Heberle *et al.*, 2015).

⁴⁹Disponible en <https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/clusterProfiler.html>

⁵⁰Disponible en www.ensembl.org/index.html

⁵¹Disponible en <https://biodbnet-abcc.ncifcrf.gov/db/db2db.php>

⁵²Disponible en www.string-db.org

⁵³Disponible en www.interactivenn.net

4. Resultados

4.1. Caracterización del material vegetal y validación de la asociación entre secuencias del cromosoma 2 de arroz y el ACR de *P. notatum*

4.1.1. Clasificación de los individuos según el modo de reproducción

Los genotipos parentales y doce individuos de la población F_1 fueron analizados en cuanto a su comportamiento reproductivo con el objetivo de confirmar su clasificación inicial (Stein *et al.*, 2007). Seis individuos de la población fueron clasificados por primera vez. Asimismo, otras seis accesiones apomícticas con diferente grado de expresividad de la apomixis, correspondientes al banco de germoplasma fueron reclasificados (Tabla 4.1). Como se mencionó anteriormente, en *P. notatum* es relativamente simple distinguir los sacos embrionarios apospóricos de los meióticos ya que los primeros no poseen antípodas, son más irregulares con respecto a su forma y pueden encontrarse sacos múltiples (más de un saco embrionario por ovario en combinación con otros sacos apospóricos o con uno meiótico). Como criterio de clasificación se consideraron apospóricos tanto a los individuos que mostraron ovarios con la presencia de sacos apospóricos únicamente como aquellos que mostraron sacos meióticos y apospóricos (mixtos). Se consideró como no apospórica (sexual) a toda planta que mostró únicamente sacos de tipo meiótico (de tipo Polygonum). La clasificación citoembriológica del material vegetal determinó que la población F_1 está compuesta por trece individuos sexuales y cinco apomícticos (Tabla 4.1). En estos últimos se hallaron los tres tipos de ovarios (meióticos, apospóricos y mixtos), evidenciándose un alto porcentaje de ovarios mixtos (Figura 4.1). El cálculo de la

expresión del carácter (**Ecuación 3.1**) mostró que los híbridos tienen una alta expresión de la aposporia con valores entre 73,3 y 86,2 %. Los genotipos ensayados correspondientes a diferentes accesiones de *P. notatum* probaron que Q4117 y cinco de los genotipos resultaron ser apomícticos con una expresión de la aposporia variable entre 11,2 y 87,2 % (ver **Tabla 4.1**).

TABLA 4.1: Clasificación del material vegetal según su modo de reproducción

Individuo	Reproducción documentada	Citoembriología			Expr. de la aposporia (%)	SCAR SPNA2	Clasificación	
		Ovarios clasificados	Porcentaje de sacos					
			SEM	SEA				SEMX
#8	Sex	115	100,00	0,00	0,00	0,00	-	Sex
#32	Sex	101	100,00	0,00	0,00	0,00	-	Sex
#36	Sex	97	100,00	0,00	0,00	0,00	-	Sex
#56	Sex	100	100,00	0,00	0,00	0,00	-	Sex
#57	Sex	100	100,00	0,00	0,00	0,00	-	Sex
#58	Sex	109	100,00	0,00	0,00	0,00	-	Sex
#70	Sex	102	100,00	0,00	0,00	0,00	-	Sex
#83	Sex	100	100,00	0,00	0,00	0,00	-	Sex
#96	Sex	122	100,00	0,00	0,00	0,00	-	Sex
#9	Apo	122	16,39	22,13	61,48	83,61	+	Apo
#40	Apo	124	13,71	29,84	56,45	86,29	+	Apo
#71	Apo	90	26,67	16,67	56,67	73,33	+	Apo
#117	s/c	100	100,00	0,00	0,00	0,00	-	Sex
#118	s/c	100	100,00	0,00	0,00	0,00	-	Sex
#119	s/c	100	100,00	0,00	0,00	0,00	-	Sex
#123	s/c	102	12,75	34,31	52,94	87,25	+	Apo
#129	s/c	100	100,00	0,00	0,00	0,00	-	Sex
#130	s/c	118	16,10	25,42	58,47	83,90	+	Apo
U47	Apo	108	33,33	7,41	59,26	66,67	+	Apo
Q4117	Apo	102	12,75	34,31	52,94	87,25	+	Apo
Q3775	Apo	100	11,00	35,00	54,00	89,00	+	Apo
Q4012	Apo	100	23,00	29,00	48,00	77,00	+	Apo
Q3664	Apo	107	88,79	0,93	10,28	11,21	-	Apo
Q4064	Apo	100	35,00	15,00	50,00	65,00	+	Apo
Q4188	Sex	100	100,00	0,00	0,00	0,00	-	Sex
Q4205	Sex	103	100,00	0,00	0,00	0,00	-	Sex

SEM: porcentaje de sacos embrionarios meióticos respecto al total analizado, SEA: porcentaje de sacos embrionarios apospóricos respecto al total analizado, "+": presencia del marcador, "-": ausencia del marcador, s/c: sin clasificación, Sex: sexual, Apo: apomíctico.

Las amplificaciones del marcador SPNA2 resueltas en geles de poliacrilamida mostraron el fragmento esperado en los individuos Q3775, Q4012, Q4064, Q4117, U47, #9,

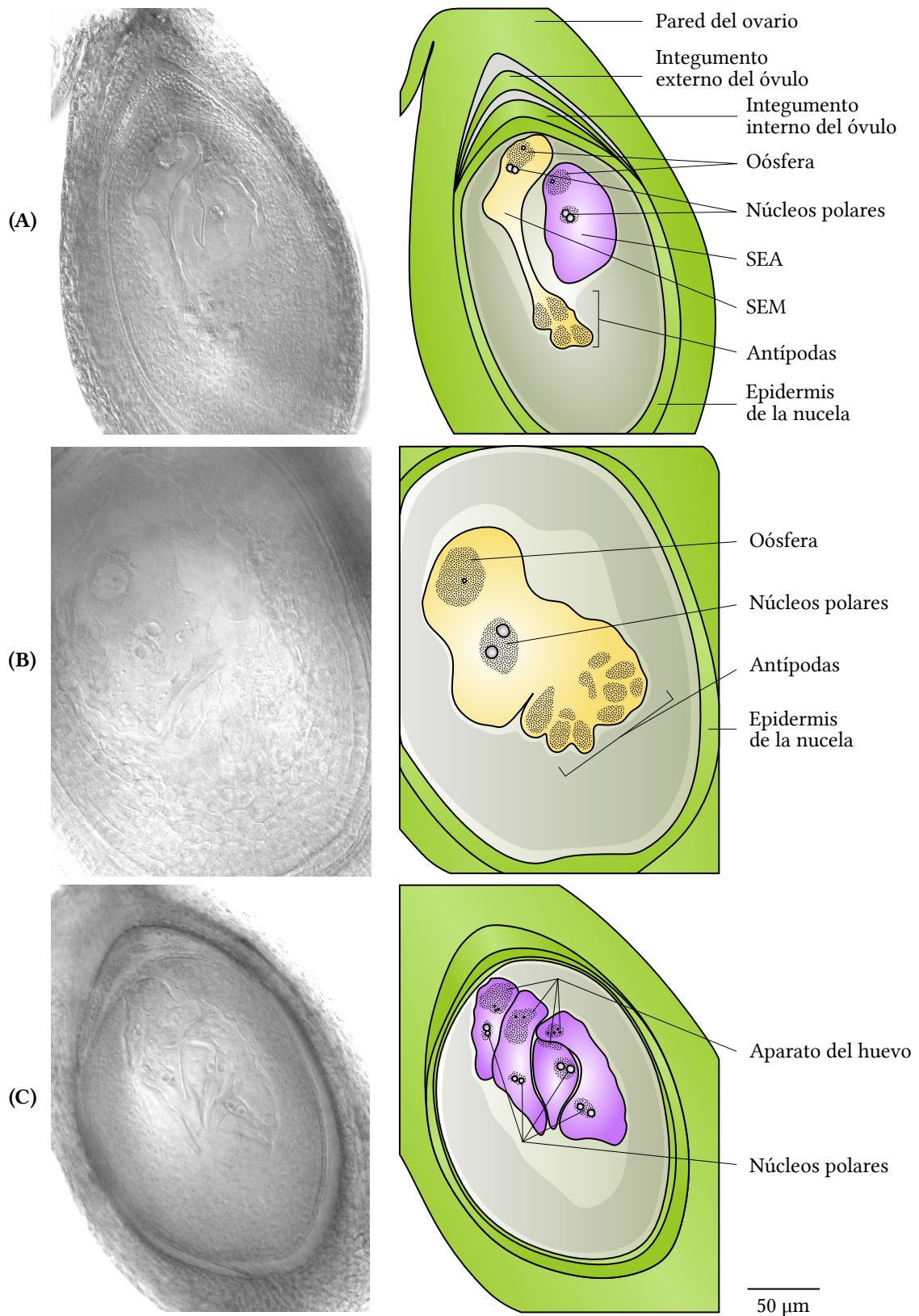


FIGURA 4.1: Fotografías de clarificados de ovarios de *Paspalum notatum* del individuo apomítico U47 (izquierda) e interpretación de la estructura de los mismos (derecha). **A)** ovario mixto con un saco SEM —saco embrionario meiótico— y un SEA —saco embrionario apospórico—; **B)** ovario sexual; **C)** ovario apospórico con cuatro SEA.

#40, #71, #123 y #130 (**Figura 4.2**). En todos los casos, los resultados de los análisis moleculares fueron coherentes con los estudios citoembriológicos (**Tabla 4.1**), con la excepción del genotipo Q3664, apomítico facultativo con baja expresión de la aposporia (11,21 %) en el cual no se observó amplificación con el marcador SCAR SPNA2.

A partir de estos resultados pudo confirmarse el modo de reproducción del material vegetal utilizado y se determinó que la población segregante F_1 está conformada por 13 individuos sexuales y 5 individuos apomíticos.

4.1.2. Descripción del gen *PPI* y sus secuencias homólogas

De acuerdo a lo descrito en la Introducción, el clon C932 es uno de los marcadores localizados en el segmento del Os2 que resultó completamente ligado al *locus* responsable de la apomixis en *P. notatum*. El clon corresponde a un fragmento interno del un gen peptidil-prolil *cis/trans* isomerasa (*PPI*, *locus* OS02G0760300) y abarca parcialmente la secuencia 5' UTR y los cinco exones del gen (**Figura 4.3**).

A fin de lograr una caracterización de esta secuencia y validar la asociación entre esta región genómica de arroz y el *locus* responsable de la apomixis en *P. notatum*, se realizó una caracterización estructural de este gen y sus posibles homólogos. La región codificante completa del *locus* OS02G0760300 fue obtenida a partir de las bases genómicas del Gramene[®]. La secuencia obtenida tiene un largo de 4.478 pb y codifica para una proteína de 112 aa con un dominio FKBP. La estructura génica se compone de cinco exones y cuatro intrones de 306, 299, 593 y 320 pb (**Figura 4.3**). Su secuencia puede observarse en la **Figura A.1**.

A partir de esta secuencia se buscaron los genes homólogos/parálogos localizados sobre el mismo cromosoma 2 de arroz. Como secuencia problema se utilizó la secuencia codificante CDS del gen OS02G0760300 en un análisis de BLASTn en la plataforma Gramene[®] contra la secuencia completa del cromosoma Os2. Este relevamiento detectó un total de ocho genes *PPIS*, cuatro en la región subteloamérica del brazo corto, uno en la región pericentromérica y tres en la región subteloamérica del brazo largo (**Tabla 4.2**). En este análisis se detectaron dos genes similares flanqueantes a OS02G0760300 (OS02G0751600 y OS02G0761100) muy cercanos físicamente que podrían corresponder a duplicaciones.

Las búsquedas de los dominios conservados en las proteínas predichas y los análisis de la estructura génica evidenciaron que probablemente estos genes no corres-



FIGURA 4.2: Patrón de amplificación sobre ADN_g de los parentales y parte de la población utilizando los cebadores del SCAR SPNA2 resuelto en un gel de acrilamida. ♀: parental femenino (Q4188); ♂: parental masculino (Q4117).

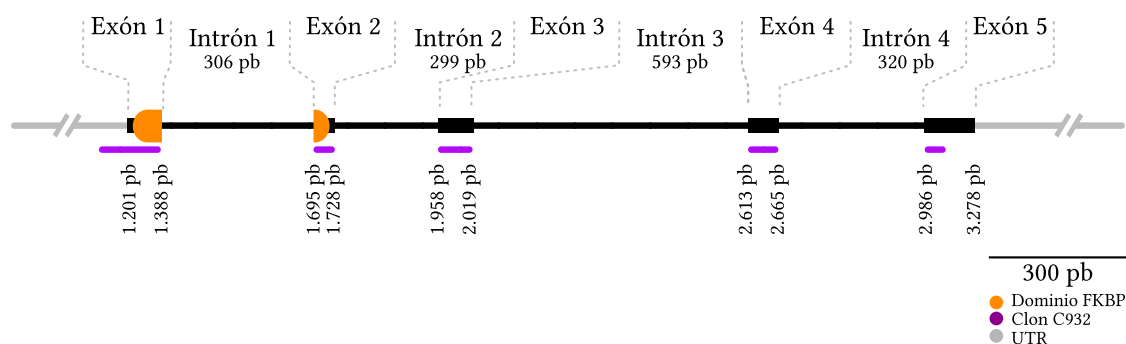


FIGURA 4.3: Esquema de la estructura del gen *PPI* de *Oryza sativa* OS02G0760300. Se observan los cinco exones del gen, representados con cajas negras, y los cuatro intrones del gen, representados con líneas grises. En gris se representan las regiones UTR. El clon C932 (línea violeta) hibrida parcialmente en la región 5' UTR y prácticamente en la totalidad de la región codificante. El dominio FKBP de la proteína (señalado en naranja) se encuentra codificado únicamente en los primeros dos exones del gen.

TABLA 4.2: Genes *PPIS* identificados en el cromosoma 2 de *Oryza sativa*

ID	Locación genómica	Largo del ADNg (pb)	Intrones	Largo de proteína (aa)	Dominios
OS02G0117600	2:924.542-926.386	1.845	3	242	FKBP
OS02G0121300	2:1.116.066-1.116.952	887	11	172	Cicloflina
OS02G0168700	2:3.711.186-3.713.407	2.222	7	213	FKBP
OS02G0199300	2:5.567.953-5.569.801	1.849	6	211	FKBP
OS02G0491400	2:17.156.517-17.160.895	4.379	5	682	(FKBP) × 3, TPR1
OS02G0751600	2:31.591.221-31.593.106	1.886	9	230	FKBP
OS02G0760300	2:32.017.761-32.019.838	2.078	4	112	FKBP
OS02G0761100	2:32.047.766-32.052.300	4.535	0	413	FKBP, TPR2

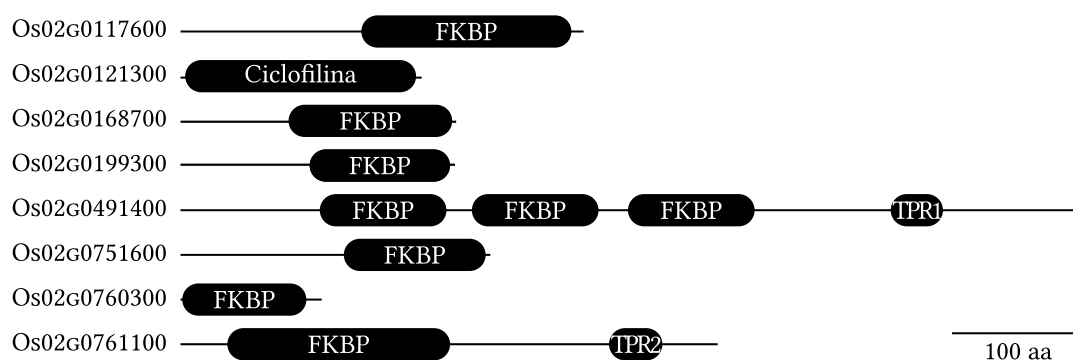


FIGURA 4.4: Esquema de las estructuras de las proteínas PPIasas detectadas sobre el cromosoma Osz de *Oryza sativa* y sus dominios conservados según el Pfam

TABLA 4.3: Resultados del BLASTn utilizando como secuencia problema el gen OS02G0760300 de *Oryza sativa* contra las bases génicas de *Arabidopsis thaliana*, *Sorghum bicolor*, *Setaria italica*, *Brachypodium distachyon* y *Zea mays*

Especie	Secuencia identificada	E-value	%ID
<i>A. thaliana</i>	FKBP12(AT5G64350)	$1,70e^{-17}$	92,60
<i>S. bicolor</i>	SORBI_3004G306200	$2,30e^{-25}$	90,86
<i>S. italica</i>	SETIT_018759mg	$4,70e^{-19}$	95,24
<i>B. distachyon</i>	BRADI_3G58255V3	$1,30e^{-24}$	90,60
<i>Z. mays</i>	ZM00001D018134	$1,10e^{-23}$	98,40

ponden a parálogos del gen OS02G0760300 debido a que todos difieren en número de exones/intrones, presentan distinto número de copias del dominio FKBP, y en casos particulares (OS02G0491400 y OS02G0761100), codifican para dominios adicionales de repeticiones tetratricopeptídicas (TPR, ver **Figura 4.4**). Estos resultados indican que estas proteínas derivarían de genes diferentes, la mayoría de los cuales comparte el dominio FKBP pero que tendrían funciones diferentes.

Posteriormente, se realizó un análisis similar en los genomas de *A. thaliana*, *B. distachyon*, *S. bicolor*, *S. italica*, y *Z. mays*. A partir de esto se encontraron genes de copia única ortólogos a la PPI OS02G0760300 en *A. thaliana* y en las cuatro especies gramíneas, todos ellos con altos porcentajes de identidad de secuencia ($> 90,50\%$) y bajos *e-vaules* ($< 1 \times 10^{-17}$; **Tabla 4.3**). Tanto la estructura génica, como el largo de la secuencia peptídica que codifican, incluidos los dominios FKBP, se encontraron altamente conservados (**Tabla 4.4**). El estudio de la filogenia de las secuencias ADNC de estos genes definió un grupo específico formado por las secuencias de *B. distachyon*, *S. bicolor*, *S. italica*, y *Z. mays* (especies de gramíneas más cercanas a *P. notatum*) separado de las secuencias de arroz y de *A. thaliana* (**Figura 4.5**).

TABLA 4.4: Proteínas similares a la PPIasa de *Oryza sativa* en *Arabidopsis thaliana*, *Sorghum bicolor*, *Setaria italica*, *Brachypodium distachyon* y *Zea mays*

ID	Especie	Locación genómica	Largo del ADNg (pb)	Intrones	Largo de proteína (aa)	Domínios
OS02G0760300	<i>O. Sativa</i>	2:32.017.761-32.019.838	2.078	4	112	FKBP
AT5G64350	<i>A. thaliana</i>	5:25.734.590-25.736.145	1.556	4	112	FKBP
SORBI_3004G306200	<i>S. bicolor</i>	4:64.451.754-64.453.755	2.002	4	112	FKBP
SETIT_018759MG	<i>S. italica</i>	1:38.825.135-38.827.229	2.095	4	112	FKBP
BRADI_3G58255V3	<i>B. distachyon</i>	3:57.589.902-57.593.169	3.268	5	200	FKBP
ZM00001D018134	<i>Z. mays</i>	5:215.050.035-215.052.015	1.981	4	112	FKBP

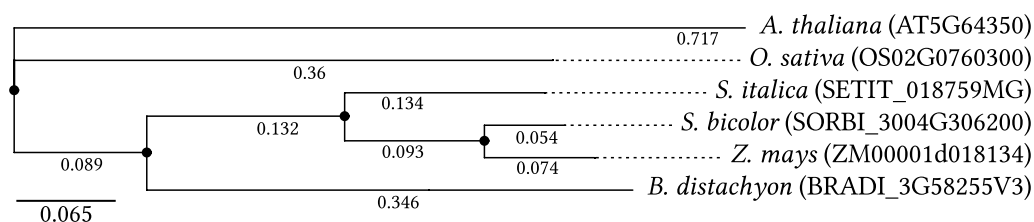


FIGURA 4.5: Filogenia de transcritos (ADNC) ortólogos a la PPI de *Oryza sativa* correspondientes a *Arabidopsis thaliana* y a cuatro especies de gramíneas. Escala expresada en distancia, que representa la proporción de diferencias entre secuencias.

TABLA 4.5: Transcritos del genotipo sexual y apomítico de *Paspalum notatum* con similitud de secuencias al gen *PPI* de *Oryza sativa* expresados durante el desarrollo floral

Base	Isotig	Isogroup	Largo (pb)	Score (bits)	E-Value	Codificación
Sexual	isotigo1380 (PPI SEX)	isogroup00104	3.113	333	6e ⁻⁹¹	Proteína
	isotigo1381 (PPI SEX2)		2.675	333	6e ⁻⁹¹	canónica de
	isotigo1382 (PPI SEX3)		2.594	333	6e ⁻⁹¹	arroz de 112
	isotigo1383 (PPI SEX4)		2.204	333	6e ⁻⁹¹	aa con
	isotigo1385 (PPI SEX5)		1.471	333	6e ⁻⁹¹	dominio
Apomítica	isotig35750 (PPI APO)	isogroup25305	631	325	2e ⁻⁸⁸	FKBP
	isotig33823 (PPI QUIM)	isogroup23378	683	240	8e ⁻⁶⁹	Dominio FKBP y DNAJ
	isotig32671 (PPI PS)	isogroup22226	716	82	4e ⁻¹⁵	Sin dominios

4.1.3. Identificación de transcritos de *PPIs* expresados durante el desarrollo reproductivo de *P. notatum* y su relación con la apomixis

Con el objetivo de validar experimentalmente la localización del gen *PPI* del tipo FKBP en el ACR de *P. notatum*, la secuencia codificante (CDS) del locus OS02G0760300 fue utilizada como secuencia problema en análisis BLASTn sobre las bases sexuales y apomíticas del transcriptoma de referencia del desarrollo reproductivo de *P. notatum* (Ortiz *et al.*, 2017). El análisis detectó cinco secuencias expresadas en el individuo sexual y tres secuencias expresadas en el individuo apomítico (Tabla 4.5). Los transcritos detectados en el genotipo sexual pertenecen al mismo *isogroup* (gen), por lo cual representarían variantes alélicas o de procesamiento postranscripcional (*splicing*) de un mismo gen. Las longitudes de los cinco transcritos variaron entre 1.471 y 3.113 pb, y las diferencias radicaron fundamentalmente en el extremo 5'. En todos los casos las secuencias codificaron para la proteína PPIasa de 112 aa predicha por el gen de arroz mostrando un dominio FKBP íntegro (Figura 4.6). Estos resultados indican que las secuencias del *isogroup00104* corresponden a los transcritos derivados del gen *PPI* de *P. notatum* ortólogo a OS02G0760300.

A diferencia de los transcritos sexuales, todos los transcritos hallados en el transcriptoma apomítico parecen derivar de diferentes genes (Tabla 4.5). La identificación de los marcos de lectura y dominios conservados mostró que solo uno de ellos (el iso-

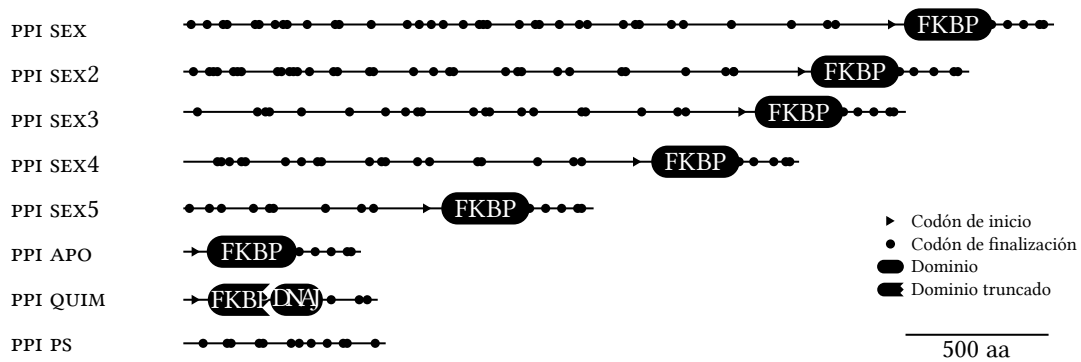


FIGURA 4.6: Transcritos con similitud de secuencias al gen *PPI* de *Oryza sativa* expresados durante el desarrollo floral de *P. notatum* en un individuo sexual y uno apomítico. Los dominios conservados fueron detectados con Pfam.

tig35750, denominado PPI APO) codifica para una proteína PPIasa similar a la forma de arroz de 112 aa con dominio FKBP. El transcritor isotig32671 no mostró codificación para ningún dominio conservado y el análisis de sus marcos de lectura evidenció la presencia de numerosos codones de terminación que impedirían la traducción a una proteína funcional. Dada estas características este transcritor fue considerado como derivado de un pseudogen no codificante para proteínas (PPI PS). El tercer transcritor, isotig33823, presentó homología desde el primero hasta el cuarto exón del gen de arroz y un dominio FKBP truncado que se interrumpe a partir del nucleótido 294. A partir de este sitio, el transcritor presenta homología con secuencias codificantes para un dominio DNAJ presente en chaperonas, conformando así un transcritor codificante para una supuesta proteína quimérica conteniendo dos dominios incompletos: FKBP y DNAJ. A esta secuencia se la denominó PPI QUIM.

El análisis filogenético de estos transcritos, utilizando como grupo externo al gen *PPI* ortólogo de *A. thaliana* (representado en la **Figura 4.7**), separó a los transcritos de *P. notatum* en un mismo grupo, distanciándolos de las secuencias de los modelos de referencia. Por su carácter de pseudogen, PPI PS fue distanciado del resto de los transcritos, mientras que PPI SEX, PPI SEX2, PPI SEX3, PPI SEX4, PPI SEX5 y PPI APO fueron ubicados en el mismo subgrupo.

Estos resultados muestran que en el transcriptoma del genotipo sexual se expresan cinco transcritos derivados de un gen *PPI* altamente similares al codificado por el gen de arroz (Os02G0760300). Sin embargo, en el transcriptoma del genotipo apomítico, se expresa solo un transcritor codificante para PPIasa similar a la forma de arroz (aunque con un extremo 5' UTR más corto), una forma truncada de la proteína y un presunto transcritor codificante para una proteína quimérica.

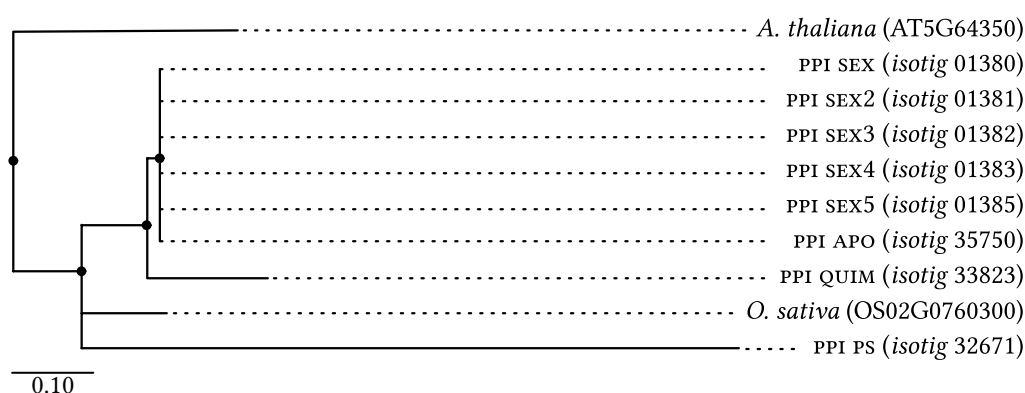


FIGURA 4.7: Árbol filogenético de las secuencias codificantes de los transcritos sexuales y apomícticos de *Paspalum notatum* con homología con secuencias del gen *PPI* de arroz. Se utilizó como grupo externo al gen ortólogo en *Arabidopsis thaliana*. Escala expresada en distancia, que representa la proporción de diferencias entre secuencias.

4.1.4. Detección del gen *PPI* localizado en el ACR de *P. notatum*

La estrategia para poder determinar cuál de los transcritos que se expresan en *P. notatum* corresponde al gen que está ligado al ACR se basó en diseñar cebadores específicos para las formas *PPI* SEX (representante de los transcritos sexuales), *PPI* APO, *PPI* PS y *PPI* QUIM y ensayarlos sobre muestras de ADN de Q4188 (sexual) y Q4117 (apomíctico). Como se mencionó en la introducción estos dos genotipos de *P. notatum* han sido ampliamente estudiados y se dispone de una población de mapeo segregante por el modo de reproducción, generada por el cruzamiento entre ambos. En la **Figura 4.8** se esquematizan los cuatro transcritos bajo estudio y se detalla la localización de los dos pares de cebadores específicos diseñados para cada uno, los probables sitios de inserción de intrones, y los tamaños estimados de los mismos, considerando las longitudes de los intrones del gen de arroz como referencia. La secuencia de los cebadores se muestra en la **Tabla 3.2**.

La detección del ligamiento con el ACR se realizó en dos etapas. Primero, se ensayaron los cebadores de la **Tabla 3.2** sobre ADN de los genotipos parentales: Q4188 y Q4177 y de grupos formados *in vitro* de plantas F_1 sexuales (GS) y apomícticas (GA), según se describe en Materiales y Métodos (pág. 45). Segundo, los marcadores que resultaron polimórficos entre los progenitores y ambos grupos fueron ensayados sobre los 18 individuos F_1 de la población segregante. Las condiciones experimentales como las temperaturas de apareamiento y condiciones de la electroforesis fueron ajustadas en cada caso. Los resultados obtenidos en el análisis de segregantes en grupo se observan en la **Tabla 4.6**. Seis de las ocho combinaciones ensayadas mostraron patrones polimórficos

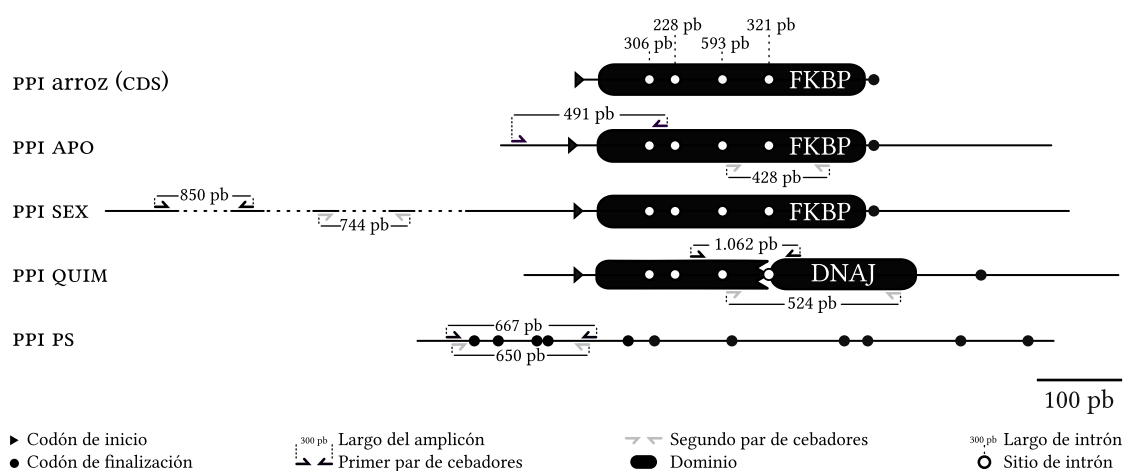


FIGURA 4.8: Localización de los cebadores específicos para la amplificación por PCR de las secuencias codificantes correspondientes a los transcritos similares a *PPI* expresados en el transcriptoma floral de *Paspalum notatum*

de amplificación entre ambos genotipos, pero sólo el par de cebadores PPI APO 1 (directo: 5'-CCGGTCGCAGTACAACAGAA-3'; reverso: 5'-TTTCTGGACAGATCACGATCC-3') mostró una banda polimórfica en el parental apomítico que se mantuvo en el GA (**Figura 4.9**). La amplificación de este transcrito sobre ambos genotipos parentales mostró una banda de 520 pb, presente en ambos genotipos, denominada *Bm* (por Banda monomórfica) y una banda de aproximadamente 540 pb, solo en el genotipo apomítico, denominada *Bi*, por Banda informativa (**Figura 4.9A**). El mismo ensayo sobre ADN de los 18 individuos F_1 de la población corroboró el ligamiento completo de la banda *Bi* al carácter apomixis (**Figura 4.9C**).

El mismo análisis llevado a cabo en un grupo de cinco accesiones apomíticas (Q3664, Q3775, Q4012, Q4064 y U47) y un genotipo sexual (Q4205) corroboró la presencia de la banda *Bi* en cuatro accesiones apomíticas y su ausencia en el genotipo sexual. El genotipo Q3664, con 11,21 % de sacos apospóricos, fue el único individuo apomítico que no presentó el marcador *Bi* (**Figura 4.9B**). Este individuo apomítico de origen experimental, podría ser un recombinante para el ACR, ya que no presenta ninguno de los marcadores ligados a la apomixis detectados en otros genotipos de la especie (Juan Pablo A. Ortiz, comunicación personal).

Cabe aclarar que si bien las combinaciones de cebadores para PPI QUIM y PPI PS ensayadas mostraron patrones polimórficos, en general se obtuvieron patrones inespecíficos con muchas bandas y en ningún caso se obtuvieron amplicones del tamaño esperado calculado considerando el tamaño de los intrones del gen de arroz.

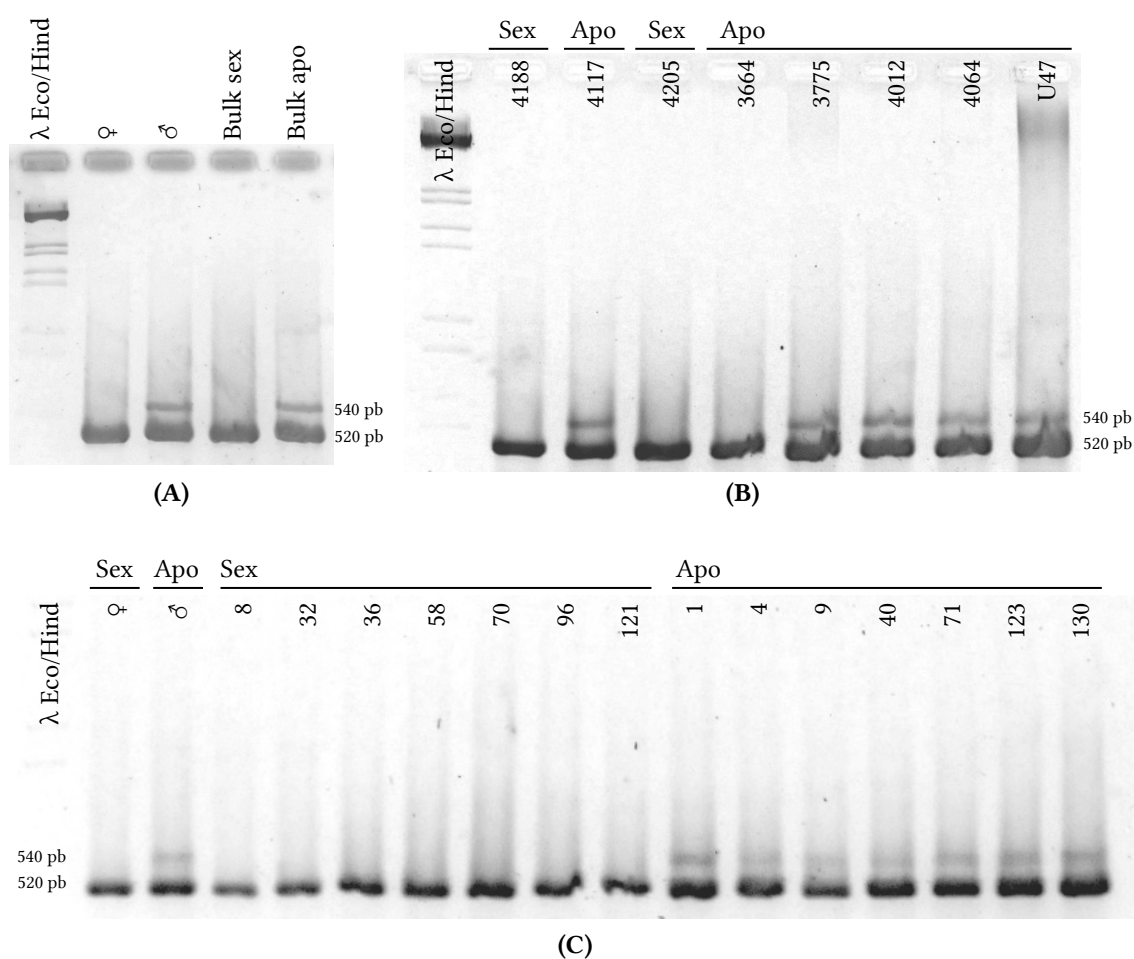


FIGURA 4.9: Patrón de amplificación sobre ADN_g utilizando la combinación de cebadores PPI APO 1. **A)** Análisis de segregantes en grupo. **B)** Genotipos de *P. notatum* con diferente expresividad de la aposporía. **C)** Genotipos parentales y muestra de la población segregante F₁. ♀: parental femenino (Q4188); ♂: parental masculino (Q4117).

TABLA 4.6: Condiciones y resultados de las amplificaciones por PCR

Transcripto a amplificar	Par de cebadores	T _a (°C)	Gel de agarosa (%)	Cantidad de bandas detectadas	Polimorfismo entre progenitores	Cosegregación con la aposporía en BSA
PPI QUIM	PPI QUIM-1	57	2,5	5	Si	No
	PPI QUIM-2	54,3	2,5	4	Si	No
PPI PS	PPI PS-1	59	2,5	9	Si	No
	PPI PS-2	59	2,5	4	Si	No
PPI SEX	PPI SEX-1	57,8	1,5	2	No	-
	PPI SEX-2	57,8	1,5	2	No	-
PPI APO	PPI APO-1	59	3,5	2	Si	Si
	PPI APO-2	58,5	2,5	10	Si	No

T_a: temperatura de apareamiento; BSA: análisis de segregantes en grupo

4.1.5. Análisis de las secuencias *PPI* ligadas al ACR

Con el fin de determinar la identidad de las bandas generadas a partir de la amplificación de la secuencia *PPI APO*, las bandas *Bm* y *Bi* fueron extraídas de los geles, clonadas y secuenciadas (**Figura 4.10**). Un total de 16 clones: tres clones *Bm* provenientes de las amplificaciones de cada uno de los parentales (Q4188 y Q4117) y diez bandas *Bi* amplificadas del parental apomítico fueron utilizadas para construir las secuencias consenso de cada tipo. Para definir la secuencia de la banda *Bm* se realizaron dos consensos primarios; por un lado, se alinearon las tres secuencias del parental sexual para definir el consenso *Bm*♀ y, del mismo modo, se utilizaron las secuencias del parental apomítico para definir un consenso *Bm*♂. Las secuencias *Bm*♀ y *Bm*♂ resultaron equivalentes, lo cual corroboró que las reacciones de PCR amplificaron en ambos parentales el mismo fragmento de 521 pb que denominamos *Bm*. El consenso de la secuencia *Bi* resultó de un largo de 536 pb. Luego de esto se realizó un alineamiento entre las bandas *Bm* y *Bi*, y entre éstas y las secuencias *PPIs* expresadas en el transcriptoma. El alineamiento mostró que las secuencias amplificadas *Bm* y *Bi* se diferencian en tres regiones delimitadas por las posiciones 47-61 (*región 1*), 303-304 (*región 2*), y 356-365 (*región 3*) referenciadas a la secuencia *Bi* (**Figura 4.11A**). La *región 1* está posicionada dentro del 5' UTR del transcripto *PPI APO*, mientras que la 2 y la 3 corresponden a regiones localizadas dentro del primer intrón del gen.

El alineamiento de *Bm* y *Bi* con los transcriptos en estudio determinó que ambos fragmentos son homólogos a un segmento del extremo 5' de los transcriptos *PPI SEX* y *PPI APO*, respectivamente, e incluyen secuencias correspondientes al primer intrón del gen (**Figura 4.11B**). En particular, *Bm* se apila de forma exacta con los extremos 5' de los transcriptos *PPI SEX* y *PPI APO* (ver detalle del alineamiento en la **Figura 4.11C**). Este resultado era el esperado, ya que ambos transcriptos son similares en esa región. Sin embargo, el fragmento *Bi*, presentó una homología exacta con el extremo 5' del transcripto *PPI QUIM* a partir del nucleótido 29 (**Figura 4.11C**). *PPI QUIM* —y *Bi*— presentan idénticas mutaciones de bases en los nucleótidos 44, 73 y 110 (posiciones referenciadas a la secuencia *Bi*). Estos cambios de bases están señalados con asteriscos en la **Figura 4.11C**. Otra distinción de *PPI QUIM* y *Bi* es que presentan una inserción de 14 pb en el 5' UTR que los diferencia de los restantes transcriptos (señalada como *región 1* en las **Figuras 4.11A** y **C**). Todo esto indica que si bien se utilizaron cebadores específicos diseñados sobre la secuencia del transcripto *PPI APO*, se logró amplificar sobre ADN genómico un fragmento correspondiente a dicho gen (*Bm*) y una segunda banda correspondiente al extremo 5' del gen *PPI QUIM* (*Bi*). Estos resultados muestran que la secuencia ligada al

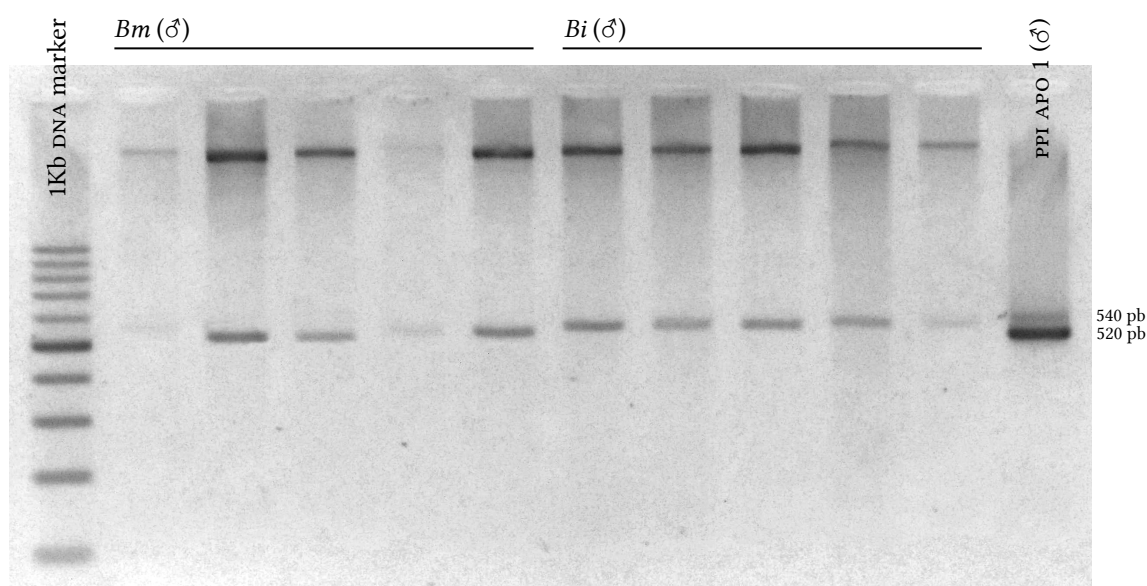


FIGURA 4.10: Resultado de las digestiones con *EcoRI* de diez vectores de clonación pGEM[®]-T Easy. Los insertos que se muestran corresponden a las bandas *Bm* y *Bi* amplificadas desde el parental apomítico (Q₄₁₁₇). La calle PPI APO 1 (♂) contiene ambas bandas *Bm* y *Bi* amplificadas desde ADNG del parental apomítico utilizando el par de cebadores PPI APO 1.

ACR correspondería al extremo 5' del gen codificante para PPI QUIM, una forma alterada del gen canónico presente tanto en la forma sexual (PPI SEX 1-5) como en la apomítica (PPI APO).

4.1.6. El transcripto PPI QUIM, su relación con el ACR y su expresión durante el desarrollo reproductivo en *P. notatum*

Como se mencionó anteriormente el transcripto PPI QUIM está compuesto por los cuatro primeros exones con homología al gen *PPI FKBP* y luego por la secuencia correspondiente a los últimos cuatro exones con homología a genes de chaperonas de tipo DNAJ (**Figura 4.8**). Sobre la secuencia del transcripto PPI QUIM, esquematizada en la **Figura 4.12**, se marcó el fragmento correspondiente al gen *PPI* y el del segmento correspondiente a gen *DNAJ*.

Es importante señalar que en arroz se puede observar el *locus* OS02G0760000, que codifica para una proteína de tipo DNAJ, ubicado a 13,6 Kpb corriente arriba del gen canónico *PPI* (OS02G0760300). La presencia de un transcripto quimérico de este tipo podría deberse a: 1) al resultado de un rearrreglo cromosómico que resultó en una fusión génica

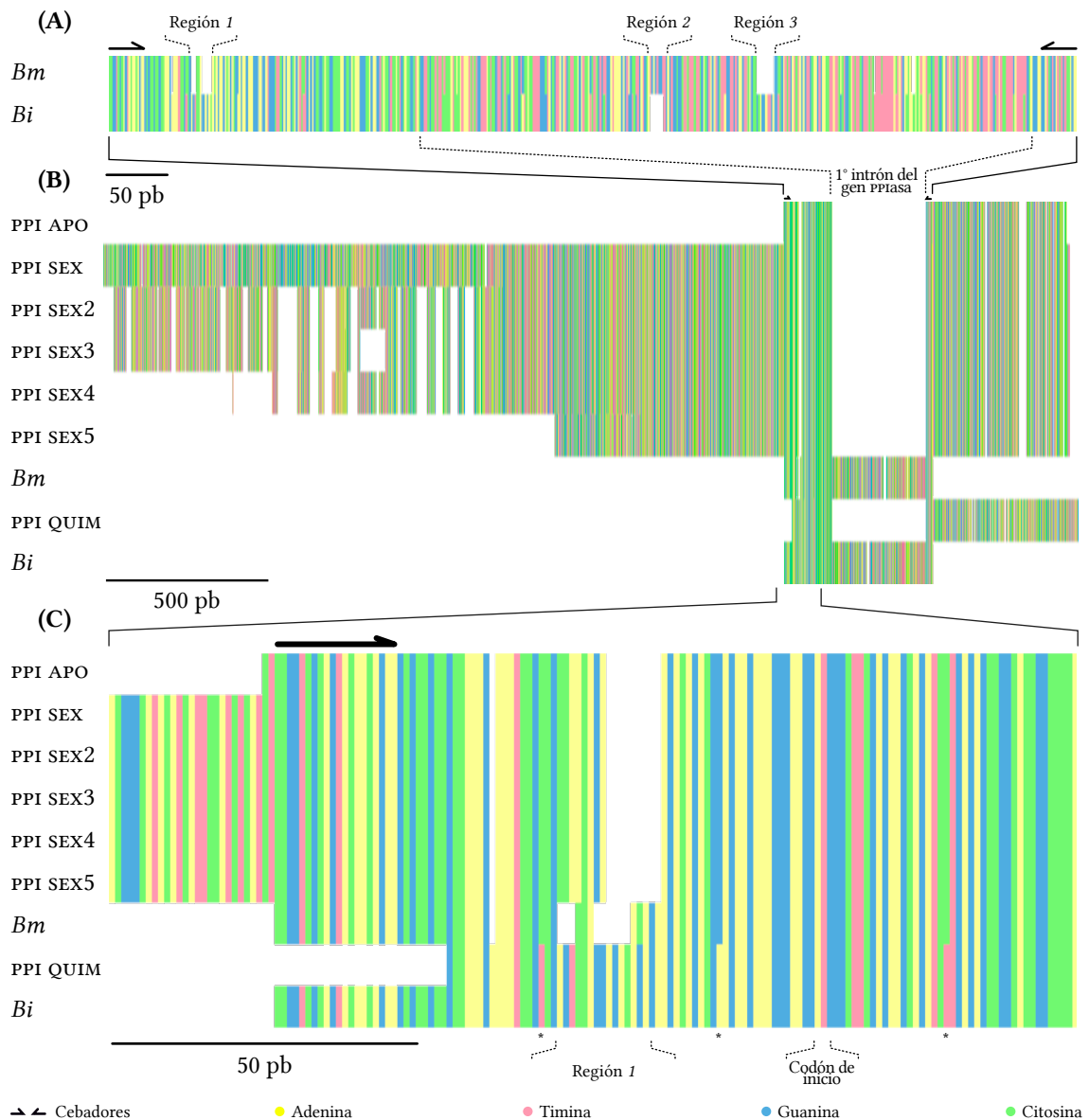


FIGURA 4.11: Alineamientos de transcritos *PPIs* de *Paspalum notatum* y amplicones secuenciados. **A)** Apilamiento de las secuencias consenso de los fragmentos *Bm* y *Bi* donde se aprecian las tres regiones que las diferencian. **B)** Apilamiento de los transcritos con los fragmentos de ADNG secuenciados revela que tanto *Bm* como *Bi* contienen secuencias correspondientes al primer intrón del gen *PPI* de *P. notatum*. **C)** Ampliación del apilamiento: se destacan con asteriscos las bases que son exclusivas de las secuencias *Bi* y *PPI QUIM* correspondientes al 5' UTR y que son diferentes de las secuencias restantes.

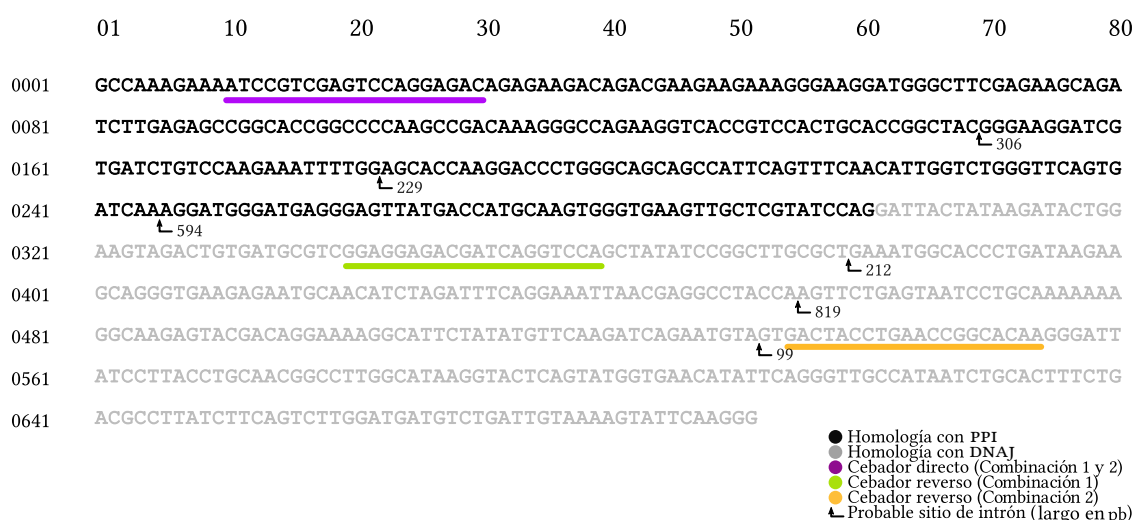


FIGURA 4.12: Secuencia del transcripto PPI QUIM y cebadores de las *Combinaciones 1 y 2* para amplificar segmentos específicos. Se indica en negro el segmento con homología al gen PPI de *Oryza sativa* (oso2G0760300) y en gris el segmento con homología al gen DNAJ (oso2G0760000).

TABLA 4.7: Cebadores diseñados para la amplificación específica del gen PPI QUIM desde ADN y ADNC

Par de cebadores	Secuencia	Producto estimado ADN (pb)	Producto estimado ADNC (pb)
Combinación 1	Directo: ATCCGTCGAGTCCAGGAGAC	1.474	345
	Reverso: TGGACCTGATCGTCTCCTCC		
Combinación 2	Directo: ATCCGTCGAGTCCAGGAGAC	2.796	537
	Reverso: TTGTGCCGGTTCAGGTAGTC		

(Roy *et al.*, 2016; Roytberg *et al.*, 2002) o bien, ii) a un mecanismo que altera la transcripción y genera un producto quimérico entre dos genes adyacentes (Li y Elfman, 2020). Dada esta situación, se diseñaron cebadores específicos sobre la *región 1* (presente en *Bi* y PPI QUIM) y sobre dos sectores diferentes del dominio DNAJ de PPI QUIM. En la **Figura 4.12** se esquematiza la secuencia en estudio y los cebadores diseñados. En la **Tabla 4.7** se observan las combinaciones de cebadores ensayadas y sus correspondientes productos de amplificación sobre ADN y ADNC. Se diseñó un único cebador directo específico que hibrida sobre la *región 1* y dos cebadores reversos uno sobre el segundo exón y otro sobre el quinto exón del dominio DNAJ. Se estimó la longitud de los amplicones sobre ADN considerando el largo de los intrones de los genes de arroz.

Los cebadores de la *combinación 1*, no generaron productos de amplificación en ninguna de las condiciones ensayadas usando como molde tanto ADN como ADNC. Por otro lado, la *combinación 2* no produjo bandas de amplificación cuando se empleó como mol-

de el ADN de los genotipos Q4188 y Q4117. En general, se obtuvieron patrones de bandas inespecíficos y no reproducibles, para todas las condiciones testeadas. Por lo tanto, no se pudo corroborar la presencia del gen quimérico con la estructura esperada en el ADN de *P. notatum*. Sin embargo, cuando se ensayó la amplificación con la *combinación 2* sobre el ADNC obtenido a partir del ARN extraído en tres estadios del desarrollo floral, se obtuvo una única banda del peso molecular esperado únicamente presente en las muestras de Q4117. A esta banda se la denominó *BiADNC* (**Figura 4.13**).

El resultado obtenido indica que el transcrito quimérico *PPI QUIM* se expresa en los estadios de meiosis y antesis durante el desarrollo apomítico y que correspondería a un ARN quimérico generado probablemente por un procesamiento postranscripcional de uno (*cis-splicing*) o dos transcritos (*trans-splicing*) primarios desconocidos.

Posteriormente, las bandas *BiADNC* fueron cortadas de los geles y clonadas. Se realizaron minipreparaciones plasmídicas de varias colonias recombinantes y se chequeó la presencia del inserto con los cebadores del M13 (**Figura 4.14**). Las muestras conteniendo el inserto del peso molecular esperado fueron enviadas a secuenciar y se corroboró en todos los casos la identidad de la secuencia. El fragmento *BiADNC* corresponde a 536 pb contenidos en el transcrito *PPI QUIM* como se observa en el alineamiento de la **Figura 4.15**.

Los resultados obtenidos indican que una secuencia correspondiente al extremo 5' del gen *PPI* ortólogo al gen de arroz OS02G0760300, se encuentra ligado al ACR de *P. notatum*, y expresa un transcrito quimérico formado por un segmento del propio gen y de uno adyacente (en referencia al genoma de arroz). Este ligamiento confirma la asociación entre el segmento del cromosoma 2 de arroz bajo estudio con la región responsable de la apomixis y la hipótesis de que, en *P. notatum*, esta región corresponde a un segmento cromosómico híbrido formado por bloques de los cromosomas Os2 y Os12 (Pupilli *et al.*, 2004). A su vez, la expresión de un transcrito quimérico específico del desarrollo apomítico derivado de este gen concuerda con estudios previos que muestran la expresión de transcritos no codificantes derivados del ACR (Polegri *et al.*, 2010; Mancini *et al.*, 2018; Ochogavía *et al.*, 2018). Asimismo, este transcrito quimérico podría ser codificante para una proteína putativa novel con funciones desconocidas que participaría durante el desarrollo apomítico.

Estas características justifican estudios detallados sobre la conservación de estas regiones genómicas durante la especiación de las gramíneas y si esta estructura genómica es la responsable del surgimiento de la apomixis en la especie.

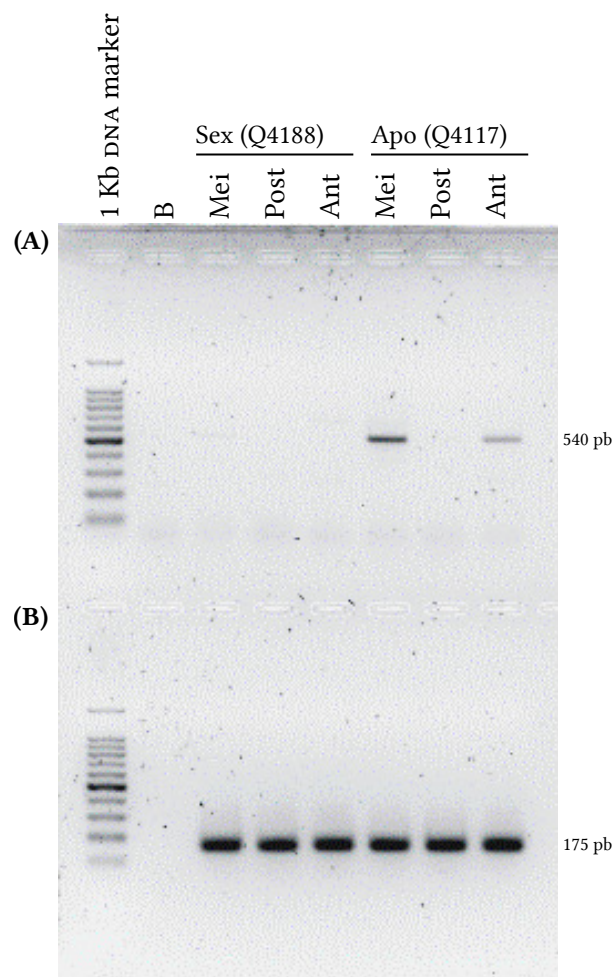


FIGURA 4.13: Patrón de amplificación sobre ADnc de tres estadios del desarrollo floral de los genotipos Q4188 (sexual) y Q4117 (apomíctico) de *Paspalum notatum*. **A)** Amplificación utilizando la combinación 2 de cebadores diseñados específicamente para el gen PPI QUIM. Se observa la amplificación de la banda *BiADnc* únicamente en el genotipo apomíctico para los estadios de meiosis y antesis. **B)** Amplificación del gen de referencia β -tubulina. B: blanco; Mei: estadio de meiosis; Post: estadio postmeiosis; Ant: estadio de antesis.

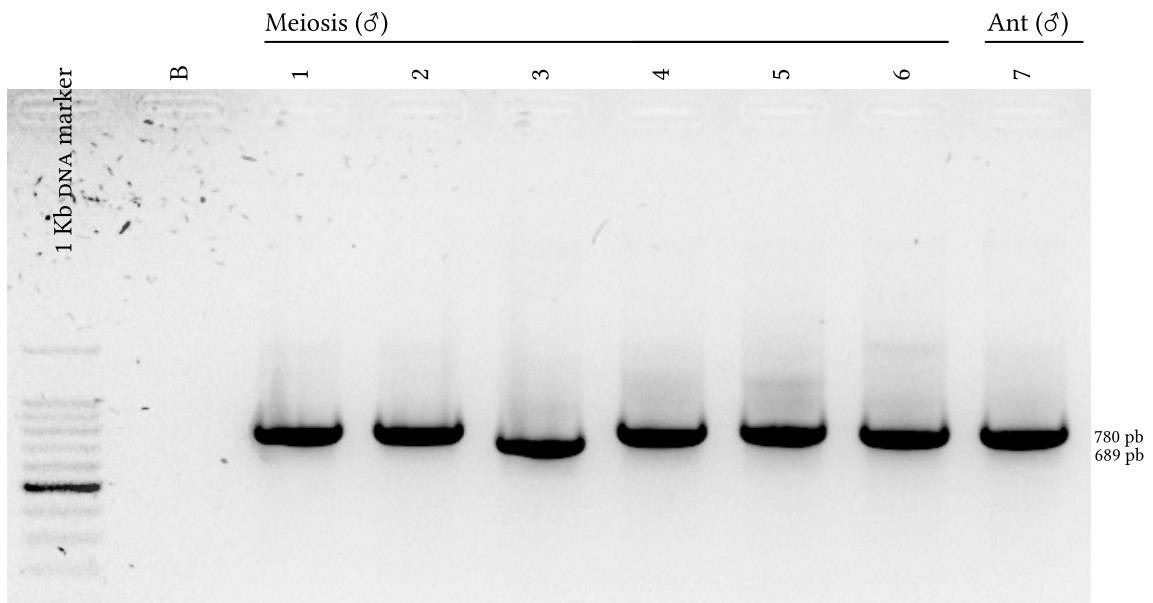


FIGURA 4.14: Amplificaciones con los cebadores directo e inverso del M13 sobre los siete plásmidos obtenidos por minipreparaciones de clones recombinantes para la banda *BiADNC*. Los insertos corresponden al fragmento *BiADNC* proveniente de reacciones de PCR sobre ADNC del parental apomítico (Q4117) extraídos de espiguillas de dos etapas reproductivas diferentes: meiosis, y anthesis. La muestra 3 fue descartada ya que su inserto no tuvo el peso esperado. Las seis muestras restantes fueron enviadas a secuenciar.

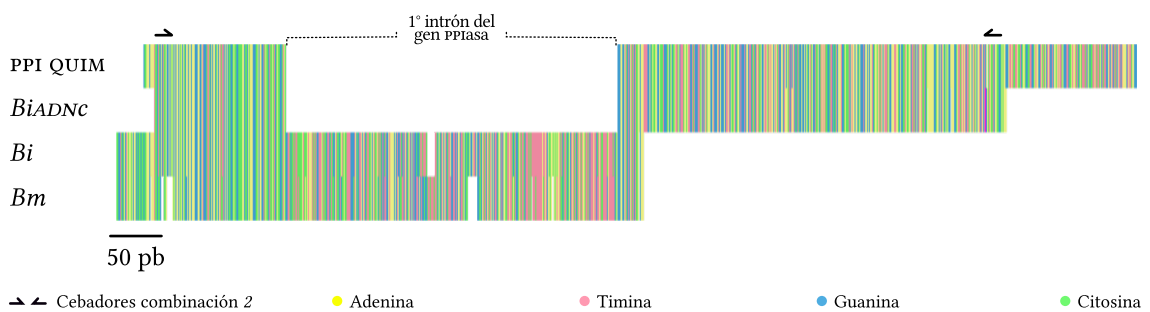


FIGURA 4.15: Alineamientos del fragmento *BiADNC*, obtenido por amplificación de ADNC de tejidos reproductivos de *Paspalum notatum*, y las secuencias correspondientes al transcrito PPI QUIM, y a los fragmentos *Bm* y *Bi*.

4.2. Análisis de macro y microsintenia de las regiones cromosómicas de arroz asociadas al ACR de *P. notatum*

4.2.1. Comparación con *B. distachyon*, *S. italica* y *S. bicolor*

Con el objetivo de estudiar la estructura y conservación de las regiones cromosómicas de arroz que fueron asociadas a la apomixis en *P. notatum* (Pupilli *et al.*, 2004; Podio *et al.*, 2012a y esta Tesis), se realizaron estudios de macrosintenia entre los segmentos de los cromosomas de arroz (2 y 12) y sus correspondientes homólogos de *B. distachyon* (Bd), *S. italica* (Si) y *S. bicolor* (Sb), a fin de validar la metodología y determinar específicamente las regiones de interés. Los genomas completos de estas especies de referencia se tomaron a partir de bases de datos públicas como Gramene¹, NCBI² y el *Rice Genome Annotation Project*³. Dado que *S. italica* y *S. bicolor* (Panicoides) se encuentran filogenéticamente más cercanos a *P. notatum*, se estima que los genomas de estas especies representan mejor a los sectores que están siendo analizados de *P. notatum*.

La congruencia entre las estructuras cromosómicas de las distintas especies se determinó calculando los porcentajes de homología de los cromosomas Os2 y Os12 y sus homólogos de las otras especies utilizando la **Ecuación 3.2**, según se describe en Materiales y métodos. En todos los casos se obtuvieron los resultados esperados de acuerdo a la literatura previa (Bolot *et al.*, 2009; Brutnell *et al.*, 2015). Brevemente, el cromosoma Os2 mostró alta homología con los cromosomas 4 (Sb4), 1 (Si1) y 3 (Bd3) de *S. bicolor*, *S. italica* y *B. distachyon*, respectivamente, con porcentajes de homología génica del 85,83; 86,26 y 87,59 %, respectivamente. Por otro lado, el Os12 presentó homología con el 8 de *S. bicolor* (Sb8) y 4 de *B. distachyon* (Bd4), con porcentajes de 61,14 y 81,85 %, respectivamente. Asimismo, con *S. italica* mostró homología con el cromosoma 3 (Si3) con un 49,09 % y en menor proporción con el cromosoma 7 (Si7) con un 28,69 % (**Tabla 4.8**). Estos primeros resultados mostraron que el segmento correspondiente al Os2 fue más conservado durante la especiación que el correspondiente al Os12. Además, debido a que en este estudio se analizaron las secuencias génicas codificantes (CDS), el ordenamiento de los genes nos permitió definir la conservación en el orden génico (microcolinearidad)

¹Disponible en <http://www.gramene.org/>

²Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

³Disponible en <http://rice.plantbiology.msu.edu/>

mientras que la orientación de los mismos contribuyó a inferir posibles regiones que presentan inversiones respecto al arroz. En los gráficos de la **Figura 4.16** se muestran las homologías detectadas entre los cromosomas Os2 (**A**) y Os12 (**B**) en pares de bases sobre el eje x , y sus correspondientes homólogos de sorgo sobre el eje y .

Es interesante destacar que Os2 conserva la microsintenia con el Sb4 en la mayor parte de su extensión (**Tabla 4.9**). Sin embargo, la sintenia se pierde en dos segmentos: una región de 16,7 Mpb en las zonas pericentroméricas del Sb4 (Sb4:20.672.482–37.410.299); y en una inversión de 6,5 Mpb en la porción subtelomérica del brazo largo del Sb4 (Sb4:57.822.066–64.350.995; **Figura 4.16A**). Por otro lado, el Sb8 mantiene la sintenia respecto al Os12 a excepción de dos regiones: un segmento de 2 Mpb del brazo corto donde la macrosintenia se pierde por estar invertido (Sb8:892.268–2.903.619); y un segmento de 24,6 Mpb localizado en las regiones pericentroméricas del cromosoma (Sb8:19.305.118–43.917.195; **Figura 4.16B**).

El análisis de sintenia con *S. italica* mostró una alta conservación de la microsintenia en toda la extensión del cromosoma Si1 respecto al cromosoma Os2. La macrosintenia también está conservada. Sin embargo, en la región distal del brazo corto del Si1, se observó una alteración de la misma de 9,8 Mpb producto de una inversión cromosómica (Si1:525.324–10.389.742; **Figura 4.17A**). Esta especie mostró dos cromosomas con porcentajes de homología altos con el Os12 (el Si7 y el Si3; **Tabla 4.8**). Los análisis de sintenia revelaron que el 19,7 % del Os12, ubicado en la región subtelomérica del brazo corto (Os12:1–5.455.305), es sinténico con el cromosoma Si7 en el extremo distal de su brazo largo (Si7:30.896.441–35.920.686). Este segmento del Si7 contiene dos inversiones con microsintenas conservadas respecto al arroz: Si7:32.517.666–34.063.740 y Si7:35.538.921–35.910.715 (**Tabla 4.9**). Sin embargo, la mayor parte de la longitud del Os12 (80,3 %; Os12:5.569.644–27.518.105) es sinténica con el Si3, donde la microsintenia está conservada y la macrosintenia se encuentra parcialmente alterada. La relación entre ambos cromosomas puede describirse como una delección de los primeros 5,4 Mpb del Os12 (Os12:0–5.475.227) y un gran segmento de 21,1 Mpb (Os12:5.475.227–27.513.968) donde la sintenia se encuentra alterada por: I) una inserción de 26,5 Mpb, localizada en Si3:6.425.432–32.926.911; II) una translocación entre dos segmentos de 2,0 Mpb (invertido) y 2,7 Mpb, localizados en Si3:33.34.160.630–35.360.943 y Si3:35.459.507–38.187.152, respectivamente; y III) tres inversiones de 1,0; 5,7 y 0,8 Mpb ubicadas en las posiciones Si3:5.442.516–6.425.432, Si3:40.880.840–46.583.732 y Si3:48.840.921–49.674.308, respectivamente (**Tabla 4.9; Figura 4.17B**).

TABLA 4.8: Cantidad de genes ortólogos detectados sobre los cromosomas de *Sorghum bicolor*, *Setaria italica* y *Brachypodium distachyon* y porcentaje de homología

Cromosoma	N° de genes con homología al Os2	Homología con el Os2 (%)	N° de genes con homología al Os12	Homología con el Os12 (%)
Sb1	67	2,78	40	3,73
Sb2	62	2,58	54	5,03
Sb3	51	2,12	46	4,29
Sb4	2.066	85,83 [†]	23	2,14
Sb5	29	1,20	184	17,15
Sb6	34	1,41	14	1,30
Sb7	22	0,91	19	1,77
Sb8	17	0,71	656	61,14 [‡]
Sb9	25	1,04	29	2,70
Sb10	34	1,41	8	0,75
Total	2.407	100,00	1.073	100,00
Si1	2.046	86,26 [†]	25	2,28
Si2	33	1,39	33	3,01
Si3	35	1,48	539	49,09 [‡]
Si4	58	2,45	32	2,91
Si5	53	2,23	40	3,64
Si6	38	1,60	40	3,64
Si7	45	1,90	315	28,69
Si8	22	0,93	56	5,10
Si9	42	1,77	18	1,64
Total	2.372	100,00	1.098	100,00
Bd1	137	5,82	72	6,88
Bd2	77	3,27	59	5,64
Bd3	2.061	87,59 [†]	48	4,58
Bd4	51	2,17	857	81,85 [‡]
Bd5	27	1,15	11	1,05
Total	2.353	100,00	1.047	100,00

[†]Mayor porcentaje de homólogos a genes del Os2

[‡]Mayor porcentaje de homólogos a genes del Os12

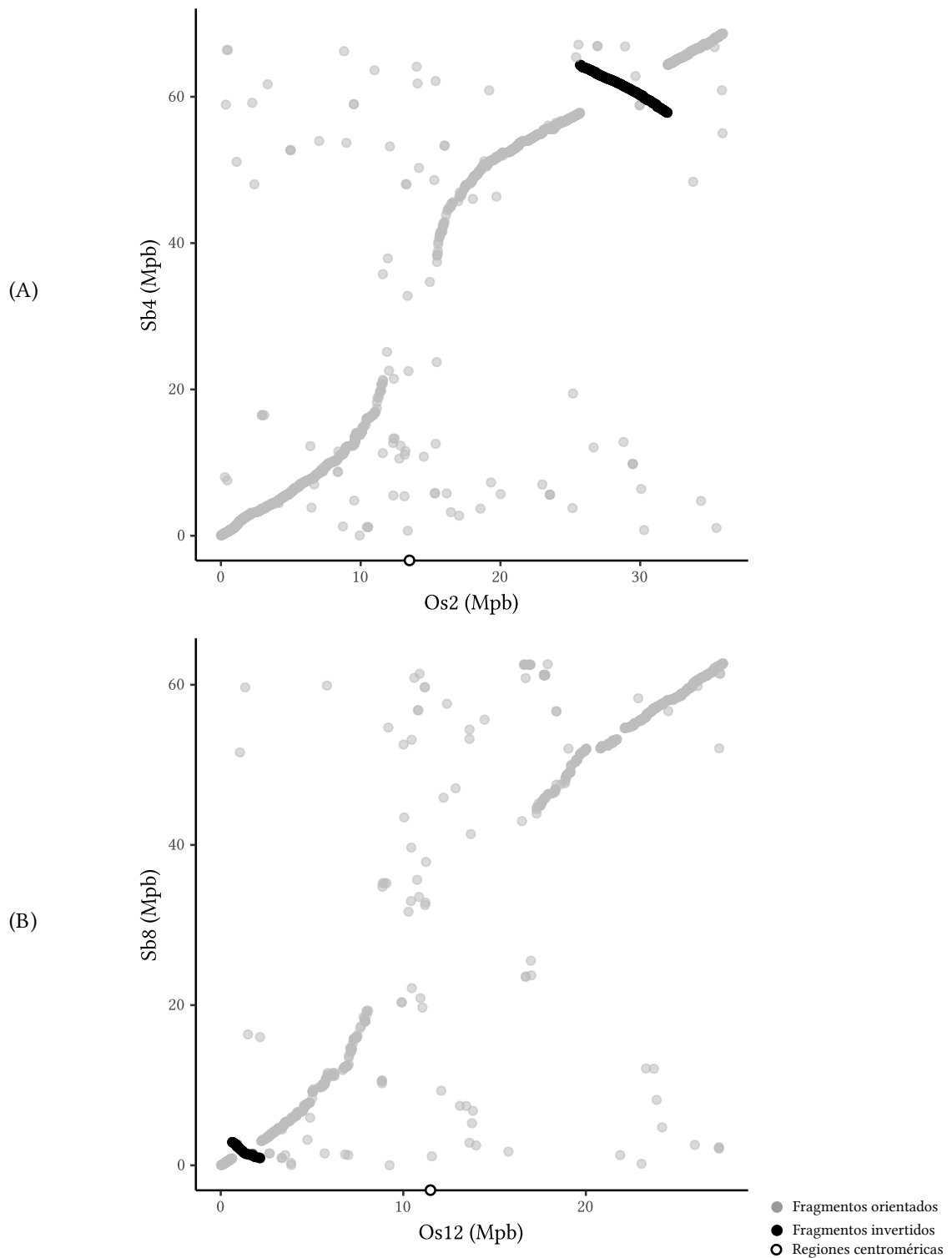


FIGURA 4.16: Análisis de sintenia entre los cromosomas de *Sorghum bicolor* ortólogos al Os2 y Os12 de *Oryza sativa*. Cada punto representa un par de genes ortólogos. El eje x corresponde a la localización cromosómica de cada gen de *O. sativa*, mientras que el eje y corresponde a la localización cromosómica en *S. bicolor*. **A)** Relaciones sinténicas entre el Os2 y Sb4. **B)** Relaciones sinténicas entre el Os12 y Sb8. Las inversiones se muestran como una secuencia de puntos con localizaciones crecientes en *O. sativa* y decrecientes en *S. bicolor* y están indicadas en negro.

TABLA 4.9: Análisis de sintenia entre los cromosomas de *Sorghum bicolor*, *Setaria italica* y *Brachypodium distachyon* ortólogos al Os2 y Os12 de *Oryza sativa*

Especie de comparación	Cromosoma Os2			Cromosoma Os12		
	Crom. ortólogo	Regiones en crom. ortólogo (Mpb)	Regiones en <i>O. sativa</i> (Mpb)	Crom. ortólogo	Regiones en crom. ortólogo (Mpb)	Regiones en <i>O. sativa</i> (Mpb)
<i>S. bicolor</i>	Sb4 (85,83 %)	0,0–20,8	0,0–11,0	Sb8 (61,14 %)	0,0–1,0	0,0–0,8
		38,0–57,8	15,5–25,6		2,9–1,0 [†]	0,8–2,2
		64,3–57,8 [†]	25,6–32,9		2,9–19,4	2,2–8,1
		64,3–68,8	32,9–36,1		44,0–53,1	17,1–20,0
<i>S. italica</i>	Si1 (86,26 %)	0,0–0,5	0,0–0,5	Si7 (28,69 %)	35,9–35,5 [†]	0,0–0,6
		10,3–0,5 [†]	0,5–10,0		34,0–35,4	0,6–2,6
		10,3–15,3	10,0–13,2		34,0–32,5 [†]	2,7–5,4
		19,8–42,0	15,0–36,1		6,4–5,4 [†]	5,5–8,9
	Si3 (49,09 %)				32,9–33,6	8,9–10,0
					35,4–38,1	10,5–11,5
					35,3–33,3 [†]	12,3–14,8
					38,3–40,7	15,1–17,9
					46,5–40,8 [†]	18,0–23,6
					46,5–48,8	23,6–25,8
<i>B. distachyon</i>	Bd3 (87,59 %)	0,0–11,1	0,0–15,3	Bd4 (81,85 %)	48,4–43,6 [†]	0,0–11,1
		44,1–54,0	15,6–29,8		31,8–28,5 [‡]	0,0–2,3
		58,8–55,9 [†]	30,3–35,3		7,1–0,0 [†]	11,3–27,4
		54,0–55,9	33,4–35,5			
		59,0–59,5	35,5–35,9			

[†] Fragmentos cromosómicos que se encuentran invertidos

[‡] Fragmentos cromosómicos duplicados

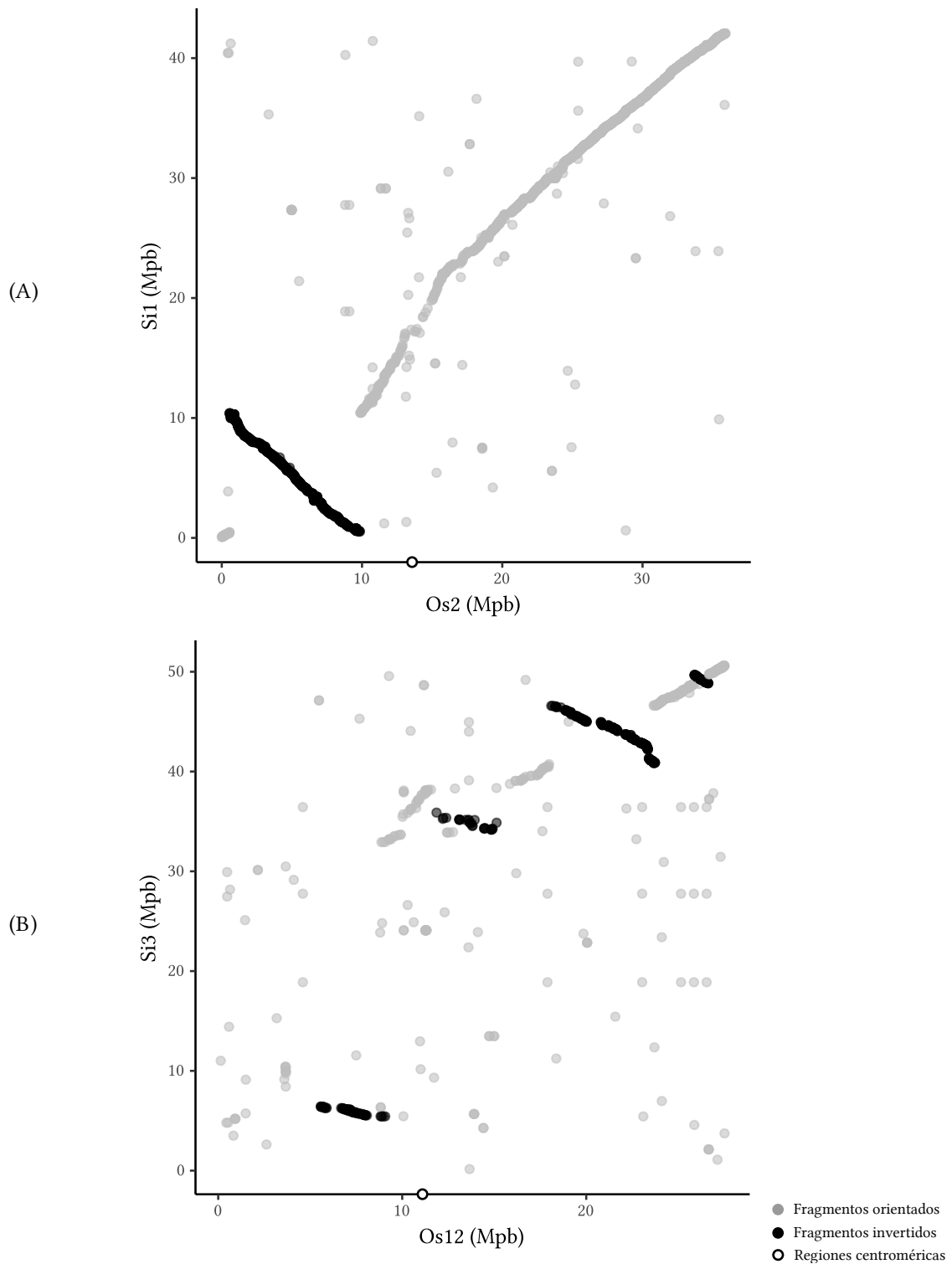


FIGURA 4.17: Análisis de sintenia entre los cromosomas de *Setaria italica* ortólogos al Os2 y Os12 de *Oryza sativa*. Cada punto representa un par de genes ortólogos. El eje x corresponde a la localización cromosómica de cada gen de *O. sativa*, mientras que el eje y corresponde a la localización cromosómica en *S. italica*. **A)** Relaciones sinténicas entre el Os2 y Si1. **B)** Relaciones sinténicas entre el Os12 y Si3. Las inversiones se muestran como una secuencia de puntos con localizaciones crecientes en *O. sativa* y decrecientes en *S. italica* y están indicadas en negro.

En el caso de *B. distachyon*, se observó una alta conservación de la microsintenia entre el cromosoma Bd3 y el Os2. Su macrosintenia se interrumpe por una gran inserción de 33,2 Mpb, localizada en Bd3:10.975.129–44.191.309, y por una inversión de 2,5 Mpb en la posición Bd3:55.925.457–58.833.517 (**Figura 4.18A**). El Bd4 también presenta conservación de la microintenia respecto al Os12, pero la colinearidad génica se encuentra completamente invertida (**Figura 4.18A**). Este cromosoma presenta una inserción de 36,5 Mpb (Bd4:7.130.280–43.652.750) que contiene un segmento de 4,5 Mpb del extremo distal del brazo largo (Bd4:43.901.256–48.432.346) transduplicado en la localización Bd4:28.258.389–31.801.639. Este segmento duplicado es sinténico con la región distal del brazo corto del cromosoma Os12 (Os12:2.682–2.395.992; **Figura 4.18B**; **Tabla 4.9**).

Los resultados obtenidos indican que si bien los cromosomas homólogos al Os2 y Os12 de *S. bicolor*, *S. italica* y *B. distachyon*, muestran una alta macrosintenia, se pudo observar la presencia de varios rearrreglos cromosómicos (inversiones y translocaciones) específicos de cada especie. Cabe destacar, que estos análisis confirman que el segmento del cromosoma Os12 analizado experimenta una mayor cantidad de rearrreglos cromosómicos y una distribución más dispersa de los genes en las tres especies empleadas en la comparación, que en el segmento del Os2.

4.2.2. Análisis de colinearidad génicas en las regiones asociadas al ACR

En base a los resultados descriptos anteriormente y con el objetivo de caracterizar específicamente las regiones de los cromosomas de arroz asociados a la apomixis en *P. notatum*, se realizaron consultas en las bases de datos del Gramene[®] utilizando las tablas de sintenia preexistentes en esta base de datos enfocadas en las regiones delimitadas por marcadores de RFLP ligados a la apomixis en *P. notatum* (Pupilli *et al.*, 2004; Ortiz *et al.*, 2013). En el cromosoma Os2, la región de estudio se delimitó entre el clon C560 y el clon C932 (un total de 9,6 Mpb, comprendidos entre las posiciones Os2:22.882.165–32.517.155), y en el cromosoma Os12 la región que contiene los clones C1069 y C0996 (en el intervalo Os12:20.005.405–27.529.682) que se extiende por 7,5 Mpb desde el extremo distal del brazo largo. En este estudio no solo se analizaron las especies previamente indicadas (*S. bicolor*, *S. italica* y *B. distachyon*), sino que también se incluyeron siete especies del género *Oryza* (*O. sativa* grupo Indica, *O. barthii*, *O. brachyantha*, *O. glaberrima*, *O. glumipatula*, *O. punctata* y *O. nivara*) dado que cuentan con información genómica en la base de datos. En estas especies los segmentos sinténicos a las regiones de estudio de arroz se

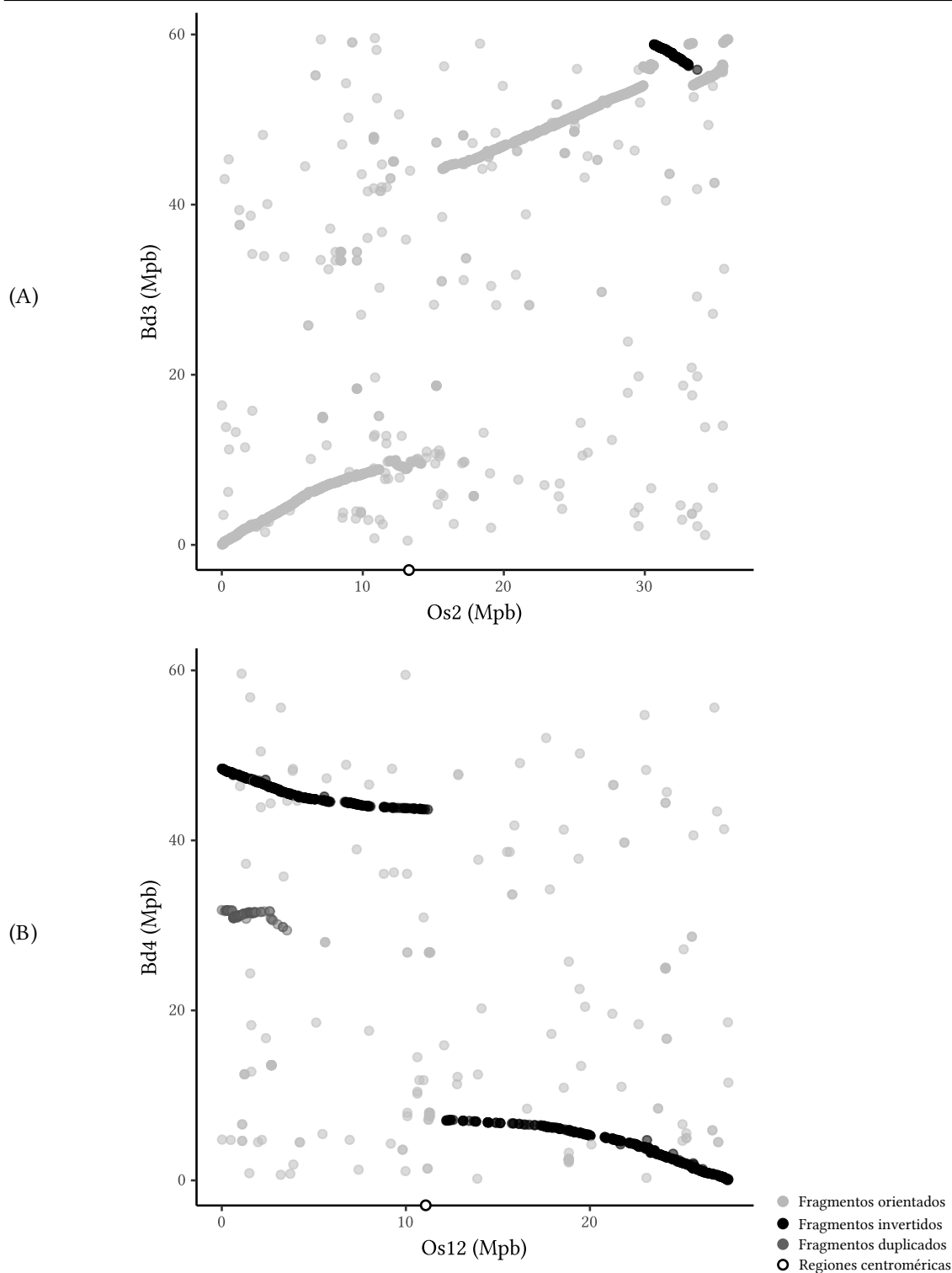


FIGURA 4.18: Análisis de sintenia entre los cromosomas de *Brachypodium distachyon* ortólogos al Os2 y Os12 de *Oryza sativa*. Cada punto representa un par de genes ortólogos. El eje x corresponde a la localización cromosómica de cada gen de *O. sativa*, mientras que el eje y corresponde a la localización cromosómica en *B. distachyon*. **A)** Relaciones sinténicas entre el Os2 y Bd3. **B)** Relaciones sinténicas entre el Os12 y Bd4. Las inversiones se muestran como una secuencia de puntos con localizaciones crecientes en *O. sativa* y decrecientes en *B. distachyon* y están indicados en negro. El segmento duplicado se representa en gris oscuro.

definieron tomando como límites a los genes ortólogos a OS02G0591700 y OS02G0770800, que delimitan la región del Os2, y los genes OS12G0515400 y OS12G0641500, que delimitan la región del Os12 (**Tabla A.1**). A fin de simplificar las comparaciones para este estudio, se utilizaron gráficos circulares (Gu *et al.*, 2014). En este tipo de representaciones, las regiones cromosómicas a comparar se trazan en una escala siguiendo una periferia circular y, posteriormente, aquellas posiciones génicas que presentan relaciones de ortología, se unen a través de líneas denominadas cuerdas. De esta forma, cada unión interna señala los genes ortólogos dispuestos en los cromosomas de las especies que se comparan. Las orientaciones de las regiones comparadas se dispusieron de forma espejada facilitando la lectura de las relaciones de sintenia. Como resultado se pueden encontrar diferentes tipos de regiones: I) regiones de microcolinearidad conservada, donde las cuerdas mantienen su orden; II) regiones invertidas, en las cuales las cuerdas se cruzan totalmente —en este caso, la microcolinearidad se mantiene pero la macrocolinearidad se altera—; III) regiones con pérdida de sintenia, donde las regiones no se vinculan entre sí; y IV) regiones con deleciones o inserciones, donde la colinearidad se ve interrumpida en algunos sectores.

En el caso de *S. bicolor*, la región ortóloga al ACR correspondiente al cromosoma Sb4, quedó definida entre las bases 54.951.290 y 64.943.098. El segmento presenta en esta especie una inversión de 6,5 Mpb comprendida entre las posiciones 57,8 y 64,3 Mpb (Sb4:57.822.066—64.350.995) en relación al Os2 (región comprendida en Os2:25.693.917—31.953.098; **Figura 4.19A**). El marcador C932, ligado a la aposporia y homólogo a la *PPI* de arroz (OS02G0760300), se encuentra por fuera de esta inversión, a 2 kpb por encima de la misma. De manera similar, el marcador flanqueante del otro extremo (C560) está localizado por fuera de la inversión. En cuanto a la región sinténica al segmento del Os12, resultó estar localizada en el brazo largo del Sb8 entre las bases Sb8:51.918.409—59.591.629. Dentro de este fragmento se destaca una inserción de 1,4 Mpb comprendida entre las posiciones 52,2 y 53,6 Mpb, y una deleción de al menos 1 Mpb localizada a partir de los 59 Mpb (**Figura 4.19A**). Esta deleción ocurrida en el Sb8 comprende al fragmento sinténico del Os12 donde se ubica el C0996 (**Figura 4.19A**).

En el caso de *S. italica*, se observó una alta conservación de la sintenia respecto a la región de estudio del Os2. En este caso, además, secuencias ortólogas a ambos marcadores moleculares ligados al ACR se encuentran en el fragmento analizado (**Figura 4.19B**). Por otro lado, si bien *S. italica* mostró dos cromosomas con porcentajes de homología altos con el cromosoma Os12 (el Si3 y el Si7, **Tabla 4.8**), el segmento sinténico a la región ACR se localizó en el cromosoma Si3 comprendido entre las posiciones 45.021.159

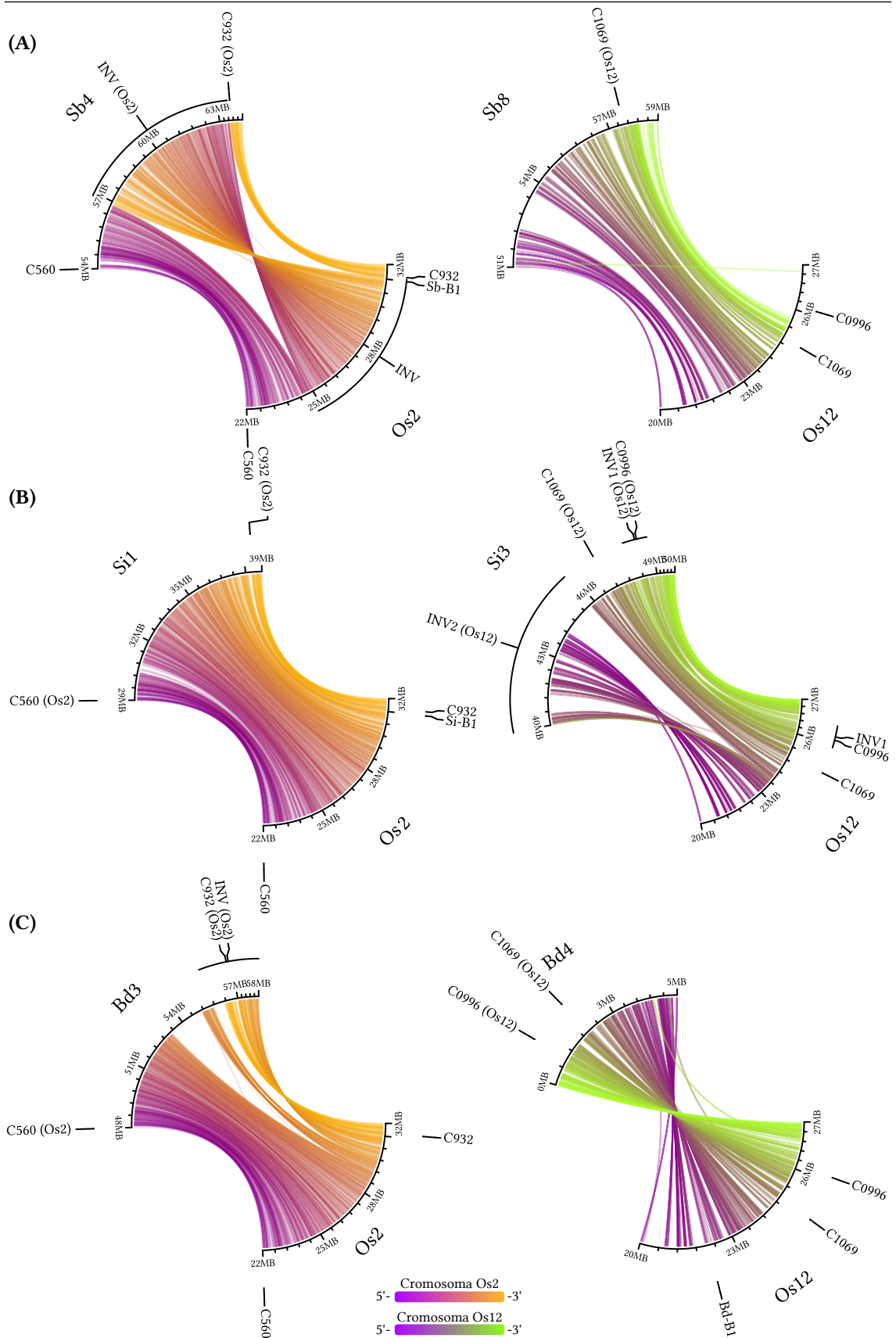


FIGURA 4.19: Análisis de conservación de la sintenia de las regiones del Os2 y Os12 sinténicas al ACR de *Paspalum notatum* respecto a tres especies de gramíneas. **A)** *Sorghum bicolor*; **B)** *Setaria italica*; **C)** *Brachypodium distachyon*. Se señalan los fragmentos invertidos (INV), los marcadores ligados al ACR y los bloques de sintenia translocados a otros cromosomas del genoma.

y 50.590.178. En este segmento se detectaron dos inversiones. La menor de ellas (denominada INV1 en la **Figura 4.19B**) se encuentra en la posición Si3:48.840.921–49.674.308, tiene una longitud de 0,8 Mpb y contiene al clon Co996. La inversión mayor (INV2) está parcialmente contenida en la región sinténica a la región de estudio del Os12, tiene un largo 5,7 Mpb y se localiza en Si3:40.880.840–46.583.732 (**Figura 4.19B**).

En *B. distachyon*, la región sinténica al ACR correspondiente al cromosoma 2 de arroz se encontró en el brazo largo del cromosoma Bd3 (Bd3:48.796.062–57.126.248). Esta región comprende una inserción de 2,5 Mpb (Bd3:56.329.501–58.833.517) y cuatro inversiones (tres menores y una mayor) denominadas como INV1, de 0,2 Mpb (Bd3:51.944.662–52.207.261); INV2 de 0,3 Mpb (Bd3:55.929.469–56.239.204); INV3 de 0,1 Mpb (Bd3:56.329.501–56.494.027); e INV4 de 2,5 Mpb (Bd3:55.925.457–58.833.517), que está parcialmente comprendida en la región ortóloga al ACR (**Figura 4.19C**). De las cuatro inversiones, solo INV4 había sido previamente detectada en el estudio de sintenia general (**Tabla 4.9**). Este resultado puede ser debido a que los restantes tres rearrreglos cromosómicos tienen un tamaño inferior a 0,5 Mpb. La secuencia ortóloga al gen *PPI* de arroz (Os02G0760300), está contenido en INV4. Asimismo, el estudio de la región sinténica al Os12 mostró que el fragmento ligado al ACR se encuentra completamente invertido en el cromosoma Bd4 de *B. distachyon*, aunque la microcolinearidad se mantiene en toda la extensión del fragmento (**Figura 4.19C**). Estos resultados de comparación con varias especies relacionadas demuestran que ambos fragmentos, sobre todo el correspondiente al Os12, son inestables y han sufrido numerosos cambios durante la especiación de estas gramíneas.

Un análisis similar, pero utilizando en la comparación siete especies del género *Oryza* para las cuales se dispone de información genómica —*O. sativa* grupo Indica, *O. barthii*, *O. brachyantha*, *O. glaberrima*, *O. glumipatula*, *O. punctata* y *O. nivara*— fue llevado a cabo a fin de analizar la estabilidad de estas regiones cromosómicas asociadas al ACR en estas especies más estrechamente emparentadas. Como resultado del análisis se observó que, en la mayoría de las especies, tanto las regiones sinténicas al Os2 como las sinténicas al Os12, presentan altos grados de conservación. La **Figura 4.20A** muestra la comparación con *O. sativa* del grupo Indica, a manera de ejemplo y en las **Figura A.2** y **Figura A.3** de los Anexos se encuentran los análisis de las restantes especies del género *Oryza*. Aunque no se detectaron grandes rearrreglos cromosomales como deleciones, inserciones o inversiones, sí se evidenció más inestabilidad en Os12 respecto al Os2. Ejemplo de esto último es la pérdida del marcador C1069 en el cromosoma 12 de *O. glaberrima* (**Figura A.2C**). El estudio con las especies mencionadas mostró que, en general, tanto la microcolinea-

ridad como la macrocolinearidad están altamente conservadas, probablemente debido a la cercanía filogenética dentro del género *Oryza*.

Sin embargo, en *O. nivara* se observaron rearrreglos cromosómicos en las regiones sinténicas a ambos cromosomas de arroz (**Figura 4.20B**). El estudio del cromosoma 2 de *O. nivara* (On2) reveló que la región sinténica al ACR comprendida entre las bases On2:22.740.698–31.359.979, contiene al menos dos inserciones de 0,3 y 0,4 Mpb, ubicadas en las posiciones On2:26.809.179–26.819.616 y On2:31.058.758–31.062.621 (respectivamente), y dos deleciones de 1,4 y 1,0 Mpb correspondientes a segmentos del Os2 ubicados en las posiciones Os2:24.152.119–25.565.865 y Os2:30.631.324–31.622.776, respectivamente. Las inserciones mencionadas se observan en la **Figura 4.20B** como espaciamientos en la continuidad de homologías génicas sobre el segmento del On2, mientras que las deleciones pueden observarse, en cambio, como espaciamientos sobre el Os2. Además, se evidenciaron dos segmentos de la región translocados. El segmento de On2 sinténico al Os2:28.153.289–28.362.827 se encontró translocado a 14,4 Mpb corriente arriba de su posición original en On2 (On2:13.341.917–13.541.725), quedando por fuera de la región del On2 ortóloga al ACR (no se muestra). Por otro lado, el segmento de On2 sinténico al Os2:32.197.044–32.384.720 fue translocado a 1,9 Mpb corriente arriba de su posición original en On2 (On2:29.361.323–29.546.021), permaneciendo en la región ortóloga al ACR.

Respecto a la región sinténica al segmento del Os12 se localizó en el cromosoma 12 (On12) sobre la posición On12:15.779.284–20.065.437. En esta región se encontró una inserción de 0,4 Mpb (On12:17.132.211–17.541.245), y dos translocaciones de 25,3 y 61,5 kpb que reposicionaron ambos bloques por fuera de la región sinténica al ACR (On12:14.326.118–14.351.504 y On12:8.310.377–8.371.900, respectivamente). Además, se encontraron deleciones de dos segmentos del On12 correspondientes a los segmentos de 1,9 y 0,3 Mpb del Os12 (Os12:20.888.278–22.854.591 y Os12:27.061.650–27.375.231, respectivamente). Estos resultados demuestran que ambas regiones cromosómicas asociadas al ACR de *P. notatum*, corresponden a segmentos estables y muy conservados en el género, que se han mantenido prácticamente invariables durante la especiación que solo se han modificado significativamente en el genoma de *O. nivara*.

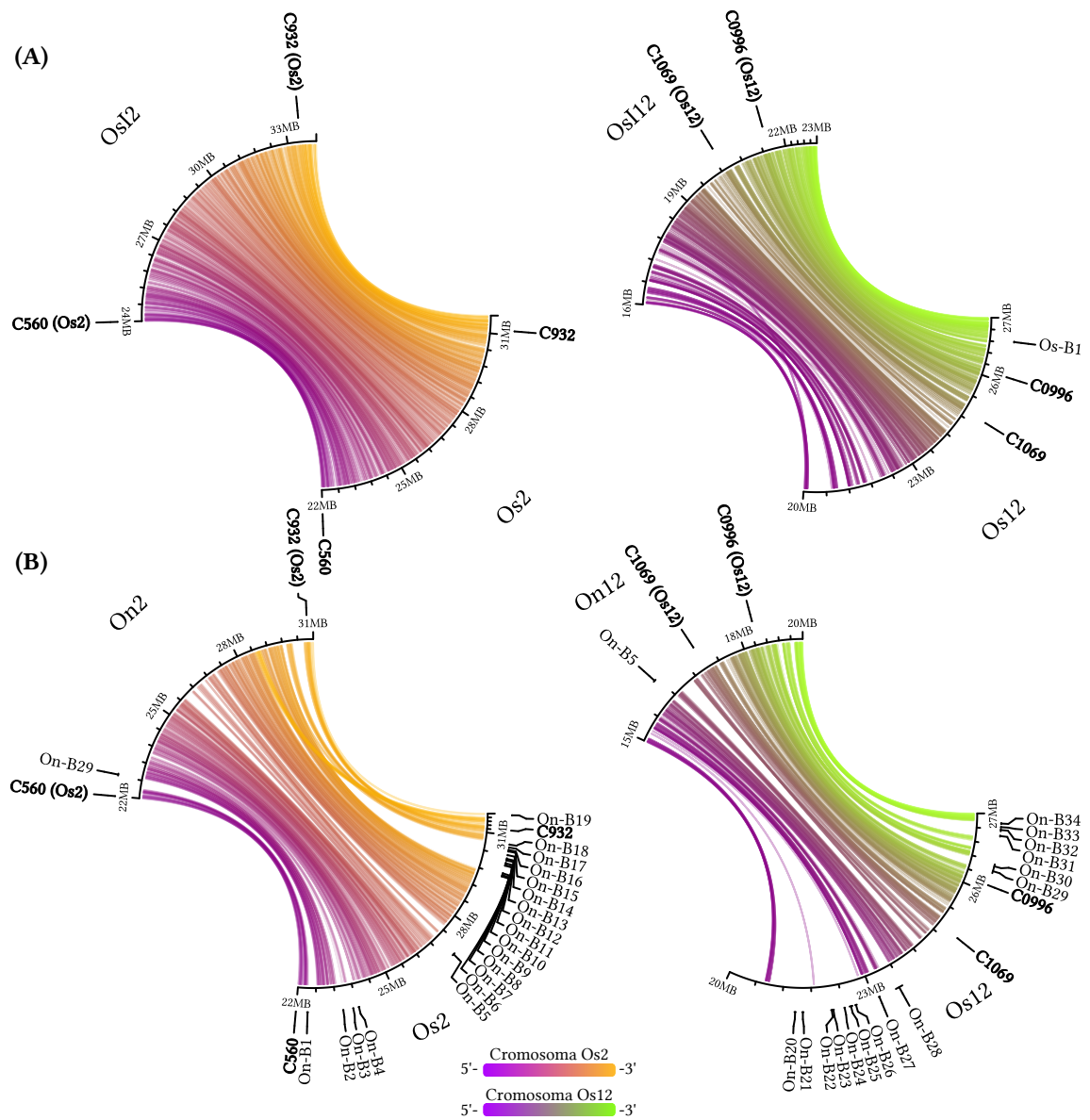


FIGURA 4.20: Análisis de conservación de la sintenia en las regiones del Os2 y Os12 sinténicas al ACR de *Paspalum notatum* respecto a especies del género *Oryza*. **A)** Análisis en *O. sativa* grupo Indica. **B)** Análisis en *O. nivara*. Se identifican en **negrita** los marcadores ligados al ACR y con el prefijo «On-B» los diferentes bloques de sintenia detectados entre *O. sativa* y *O. nivara*.

4.2.3. Análisis de bloques sinténicos

Las regiones de arroz previamente estudiadas, respecto a la conservación de la colinealidad de genes en referencia a las especies en comparación, fueron empleadas además en un análisis de bloques de sintenia. Este estudio permitió identificar fragmentos cromosómicos dentro de estas regiones que fueron translocados hacia cromosomas no ortólogos del genoma de las gramíneas evaluadas. En cada especie se reportaron bloques de sintenia compuestos por tres o más genes. Para este estudio se utilizaron las tablas de sintenia de la plataforma Gramene[®] y el programa OrthoClusterDB[®] v2010 (Vergara y Chen, 2010). Esta última herramienta permite detectar pares de genes sinténicos consecutivos entre especies diferentes partiendo de una base de datos donde se indique la homología génica de las especies y la localización genómica de los mismos. La salida del programa se compone de una tabla donde se detallan los genes de los bloques de sintenia detectados, y un gráfico de barras donde se representa la longitud de los cromosomas evaluados sobre los cuales y se marcan los bloques que el programa logró identificar (Vergara y Chen, 2010).

La identificación de bloques de sintenia correspondientes a las regiones ligadas al ACR mostró que en la mayoría de las especies en estudio existe una conservación alta de los genes ortólogos, aunque, en algunos casos, aparecen translocaciones a otras regiones del genoma. Brevemente, en *S. bicolor* y en *S. italica* se observó que la mayoría de los bloques de sintenia contenidos en las regiones sinténicas al ACR del Os2, se localizaron en los respectivos cromosomas homólogos (Sb4 y Si1). Por otro lado, la totalidad de los bloques del Os12 se encontraron en los cromosomas homólogos Sb8 y Si3. Sin embargo, en ambas especies se halló una translocación cromosómica de un bloque correspondiente a la región sinténica del ACR en el Os2 localizada en cromosomas no ortólogos. Estos bloques fueron identificados en el cromosoma Sb3 de *S. bicolor* y Si5 de *S. italica*, respectivamente. Al analizar su composición génica, descubrimos que en ambos casos se trataba del mismo bloque (**Figura 4.21A y B**), el cual, está compuesto por cuatro repeticiones de un gen transportador de oligopéptidos homólogo al locus OS02G0757400 (Os2:31.864.854–31.865.429) contenido en la región de estudio del Os2 y cercano al gen *PPI*. Para el caso de *B. distachyon* no se detectaron bloques translocados a otras partes del genoma de ninguna de las dos regiones de estudio (**Figura 4.21C**).

Es de destacar que en *O. sativa*, grupo Indica se encontró un bloque de sintenia translocado desde el Os12 al Os2, conformado por tres loci con homología a genes de la familia Thaumatin: OS12G0630100 (gen de tolerancia a la deficiencia de nitrógeno),



FIGURA 4.21: Bloques de sintenia de los cromosomas Os2 y Os12 de *Oryza sativa* identificados en el genoma de tres gramíneas relacionadas y *Oryza nivara*. **A)** *Sorghum bicolor*; **B)** *Setaria italica*; **C)** *Brachypodium distachyon*; **D)** *O. nivara*. Los cromosomas se representan con barras negras con su extremo 5' hacia la izquierda. Los bloques identificados con OrthoClusterDB se representan como marcas naranjas (bloques del Os2) y verdes (bloques del Os12).

OS12G0630200 (gen de tolerancia a patogénesis) y OS12G0630500 (gen *THAUMATIN-like*; no se muestra).

El análisis sobre *O. nivara* arrojó resultados contrastantes respecto a las otras especies mencionadas. En esta especie se presentó un gran número de bloques de sintenia translocados a diferentes regiones: 19 bloques translocados desde el Os2 (On-B1–B19) y 15 bloques translocados desde el Os12 (On-B20–B34). La mayor parte de los bloques de la región del Os2 (11 bloques), están localizados en un fragmento que sufrió una delección en *O. nivara* (**Figura 4.20B**). Estos 11 bloques fueron detectados en el cromosoma 6 de *O. nivara* (On6), mientras que el resto fue detectado en los cromosomas 1 (On1), 3 (On3) y On12. En los cromosomas On3 y On7 de *O. nivara* se identificaron en cada uno, cinco bloques de la región del Os12, mientras que en los cromosomas On1 y On2 se identificaron 2 y 3 bloques, respectivamente. Estas translocaciones mencionadas pueden verse en la **Figura 4.21D**. Interesantemente, en *O. nivara*, se halló que ambas regiones de arroz tienen bloques sinténicos translocados hacia cromosomas en común: bloques sinténicos al Os2 aparecen translocados al On12, y, a su vez, bloques sinténicos al Os12 están translocados hacia el On2.

Esta conjunción de regiones del Os2 y Os12 de arroz observada en *O. nivara* es semejante a la documentada en el ACR de *P. notatum* (Pupilli *et al.*, 2004; Podio *et al.*, 2012a). Particularmente, la relación de los cromosomas Os2 y Os12 con los cromosomas On2 y On12 está acotada a cuatro bloques de sintenia; un único bloque entre Os2 y On12 (On-B5; Os2:27.906.512–27.990.398), y tres bloques entre Os12 y On2; bloques On-B28 (Os12:23.404.675–23.600.217), On-B29 (Os12:26.381.679–26.460.984), y On-B30 (Os12:26.477.638–26.487.296; **Figura 4.22**). Dado que en *P. notatum* sondas del Os2 y Os12 mapean completamente ligados al carácter apomixis, la identificación de las secuencias codificantes en estos bloques de sintenia que presentan regiones de los cromosomas Os2 y Os12 en *O. nivara* puede aportar genes candidatos de interés. En la **Tabla 4.10** se indican las anotaciones de los genes contenidos en estos cuatro bloques de sintenia.

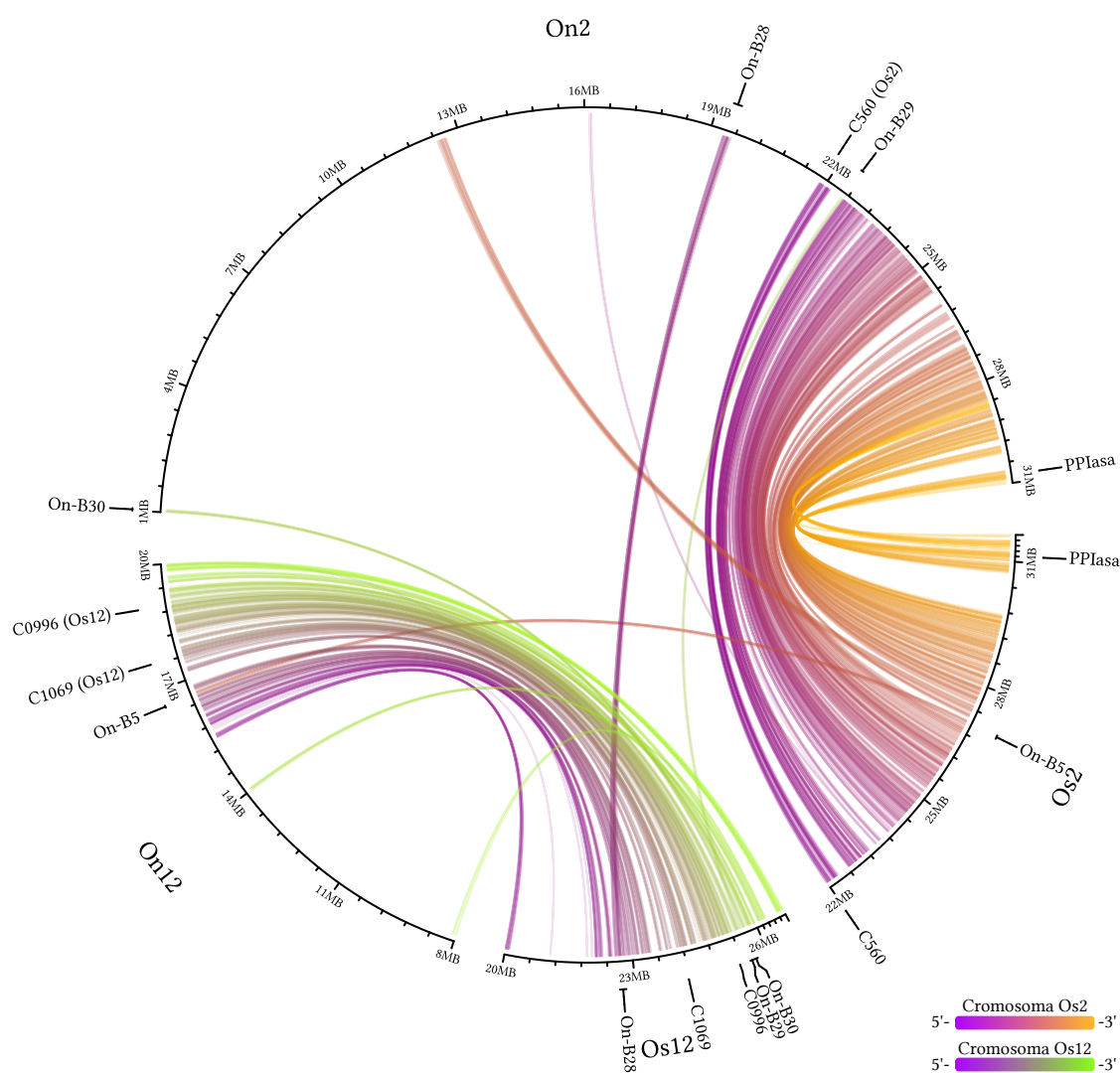


FIGURA 4.22: Relaciones sinténicas entre los cromosomas Os2 y Os12 de *Oryza sativa* respecto a los cromosomas On2 y On12 de *Oryza nivara*. Se identifican los marcadores ligados al ACR y los bloques de sintenia translocados.

TABLA 4.10: Bloques de sintenia entre los cromosomas Os2 y Os12 de *Oryza sativa* con los de *Oryza nivara*

Bloque	Gen en <i>O. sativa</i>	Gen en <i>O. nivara</i>	Anotación funcional en <i>O. sativa</i>
On-B5 [†]	OS02G0682500	ONIVA12G15300	Similar a la proteína Transparent Testa Glabra 1
	OS02G0682600	ONIVA12G15310	Dedo de Zinc de tipo TIM10/DDP
	OS02G0683500	ONIVA12G15340	Proteína con dominio B3 de unión a ADN
	OS02G0683900	ONIVA12G15360	Proteína DUF1084
	OS02G0684000	ONIVA12G15370	Proteína con dominio helicoide de tipo tetratricopéptido
	OS02G0684100	ONIVA12G15380	Proteína con dominio sulfotransferasa
	OS02G0684150	ONIVA12G15390	Proteína hipotética conservada

TABLA 4.10: Bloques de sintenia entre los cromosomas Os2 y Os12 de *O. sativa* con los de *O. nivara* (continuación)

Bloque	Gen en <i>O. sativa</i>	Gen en <i>O. nivara</i>	Anotación funcional en <i>O. sativa</i>
	OS02G0684300	ONIVA12G15400	Proteína nucleoporina con dominio Ndc1-Nup
	OS02G0684400	ONIVA12G15410	Similar a <i>OXS3</i> (<i>ESTRES OXIDATIVO</i>)
	OS12G0568800	ONIVA02G21940	
	OS12G0568900	ONIVA02G21950	Proteína thaumatin relacionada a la patogénesis
	OS12G0569200	ONIVA02G21960	Proteína hipotética conservada
	OS12G0569300	ONIVA02G21970	Proteína thaumatin relacionada a la patogénesis
	OS12G0569500	ONIVA02G21980	Proteína thaumatin relacionada a la patogénesis
	OS12G0569900	ONIVA02G22000	Similar a proteína con dedo de Zinc
On-B28 [‡]	OS12G0570000	ONIVA02G22010	Proteína con dominio helicoide de tipo Armadillo
	OS12G0570300	ONIVA02G22030	
	OS12G0570400	ONIVA02G22050	
	OS12G0570500	ONIVA02G22060	Hidrolasa glicosídica
	OS12G0570700	ONIVA02G22070	Similar a proteína Metallothioneina de tipo 1
	OS12G0571200	ONIVA02G22090	Similar a la subunidad Tim9 translocasa importadora de la membrana interna de la mitocondria
	OS12G0571300	ONIVA02G22100	Proteína hipotética conservada
	OS12G0571400	ONIVA02G22110	Proteína hipotética conservada
	OS12G0571500	ONIVA02G22120	Proteína hipotética conservada
	OS12G0571600	ONIVA02G22130	Proteína hipotética conservada
	OS12G0571700	ONIVA02G22140	Proteína hipotética conservada
	OS12G0571900	ONIVA02G22160	Proteína con dominio helicoide de tipo tetratricopéptido
	OS12G0572000	ONIVA02G22170	Factor de transcripción myb de tipo R2R3, tolerancia a la salinidad, crecimiento adaptativo
	OS12G0572400	ONIVA02G22190	Similar al factor de <i>splicing</i> SCL30 de tipo SC35, 30 KD
	OS12G0572500	ONIVA02G22200	Proteína con dominio XH/XS
	OS12G0619700	ONIVA02G25860	Proteína hipotética conservada
On-B29 [‡]	OS12G0620400	ONIVA02G25900	Proteína con dominio Methyl-CpG de unión a ADN
	OS12G0620600	ONIVA02G25920	Chaperona
	OS12G0621000	ONIVA02G25950	Similar a hidrolasa carboxil terminal Ubiquitina
	OS12G0621100	ONIVA02G03100	Similar a proteína Yabby de tipo flor filamentososa
On-B30 [†]			

TABLA 4.10: Bloques de sintenía entre los cromosomas Os2 y Os12 de *O. sativa* con los de *O. nivara* (continuación)

Bloque	Gen en <i>O. sativa</i>	Gen en <i>O. nivara</i>	Anotación funcional en <i>O. sativa</i>
	OS12G0621300	ONIVA02G03120	Proteína con dominio de dedo de Zinc de tipo PMZ
	OS12G0621400	ONIVA02G03130	Proteína hipotética conservada
	OS12G0621500	ONIVA02G03140	Similar a <i>IRE</i>
	OS12G0621600	ONIVA02G03150	Proteína hipotética conservada
	OS12G0621700	ONIVA02G03160	Proteína hipotética conservada
	OS12G0621900	ONIVA02G03170	Similar a proteína de la familia MOC34/MPN/PAD-1

† Bloques del Os2 translocados al On12

‡ Bloques del Os12 translocados al On2

Los resultados obtenidos en este análisis muestran que las regiones asociadas al ACR en la mayoría de las especies de gramíneas examinadas han experimentado escasas translocaciones hacia cromosomas no ortólogos y los bloques de sintenía identificados en éstas contienen pocos genes. Además, los análisis de colinearidades génicas evidenciaron que las regiones sinténicas al ACR entre cromosomas ortólogos son estables tanto en la micro como en la macrocolinearidad para la mayoría de las especies estudiadas. Estos resultados sugieren que es posible inferir la composición génica del ACR de *P. notatum* a partir del estudio de las especies modelos filogenéticamente cercanas. Esto no sería posible si la conservación de la sintenía para estos fragmentos hubiese sido baja o si se hubieran detectado múltiples translocaciones hacia cromosomas no ortólogos durante la especiación. Una característica importante es que la estructura de las regiones sinténicas de *O. nivara*, presentan una similitud estructural con el ACR.

4.3. Determinación de los patrones de expresión de los genes presentes en los bloques de sintenía asociados al ACR

En los últimos años, el grupo de trabajo del DREP generó transcriptomas del desarrollo reproductivo de *P. notatum* utilizando las tecnologías ROCHE 454[®] (Ortiz *et al.*, 2017) e ILLUMINA[®] HiSeq (Podio *et al.*, 2021). Estos recursos permiten analizar los transcritos que se expresan durante el desarrollo reproductivo apomítico y sexual e identificar las

vías metabólicas asociadas a estos y otros procesos. Con el objetivo de identificar genes diferencialmente expresados entre los modos reproductivos que se localizan en los sectores genómicos asociados a la apomixis, se utilizó el transcriptoma floral originado por la tecnología ILLUMINA[®] Hiseq desarrollado por Podio *et al.* (2021). En la **Figura 4.23** se describen las características generales de los transcriptomas utilizados en esta Tesis, de acuerdo al procedimiento seguido por Podio *et al.* (2021). Los transcriptomas florales del genotipo sexual y apomítico evaluados comprenden 100.100 y 103.567 transcritos, respectivamente. El 70 % del transcriptoma floral sexual está representado por secuencias codificantes para proteínas, mientras que en el transcriptoma apomítico el porcentaje es del 68 %. Dentro del conjunto de secuencias codificantes de los transcriptomas sexual y apomítico, el 54 y 52 % (respectivamente) presentaron homología con genes de arroz. Respecto a los transcritos no codificantes (tanto sexuales como apomíticos), únicamente el 4 % mostró similitud con secuencias de genes de la especie modelo (Podio *et al.*, 2021). Del total de los transcritos de la base TriAyS, 4.976 mostraron sobreexpresión en el genotipo sexual y 9.312 en el genotipo apomítico (**Figura 4.23, Tabla A.3**; Podio *et al.*, 2021). El análisis con el programa TransDecoder[®] (Haas y Papanicolaou, 2017) mostró que el 76,9 % de los transcritos sobreexpresados en el genotipo sexual (Up Sex) correspondía a secuencias codificantes. El mismo porcentaje de secuencias codificantes fue encontrado para los transcritos Up Apo. Por otro lado, del total de los transcritos Up Sex cod, el 75 % presentó similitudes de secuencias con genes de arroz. Dentro de los transcritos Up Apo cod, este valor fue del 92 % (**Tabla A.3**; Podio *et al.*, 2021).

En primer lugar, con el objetivo de determinar si existe una distribución particular de los transcritos diferencialmente expresados entre el desarrollo reproductivo sexual y apomítico, el conjunto de 9.880 transcritos diferenciales —Up Sex (cod y no-cod) y Up Apo (cod y no-cod)— se mapearon en los 12 cromosomas de arroz utilizando los paquetes Biostrings (Pagès *et al.*, 2017), y rBLAST vo.99.2 (Hahsler y Nagar, 2015). Como resultado de este análisis se observó que los transcritos diferenciales se distribuyeron en los doce cromosomas de arroz. Como era de esperar, en los cromosomas de mayor longitud, mapearon la mayor cantidad de transcritos de ambos genotipos (**Figura 4.24A; Tabla A.3**).

Al independizar las cantidades de transcritos codificantes sobreexpresados respecto al tamaño de los cromosomas, (mediante la relación número de transcritos mapeados en el cromosoma/total de genes en el cromosoma; **Ecuación 3.3**), se observó que los transcritos Up Sex cod mapean en todos los cromosomas de arroz en proporciones que van desde 0,048 a 0,082, con una media de 0,064, sin observarse diferencias signi-

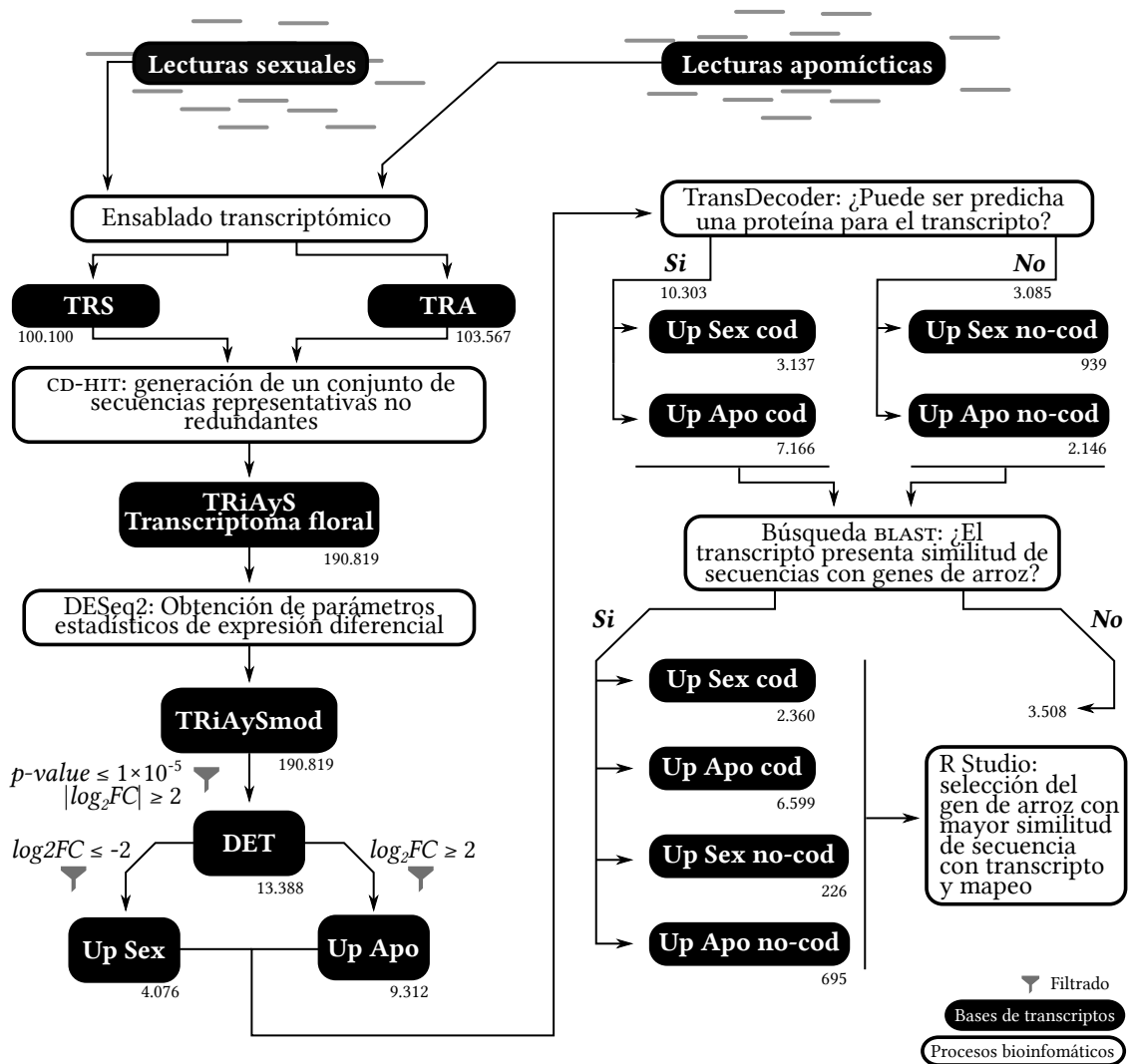


FIGURA 4.23: Esquema general del procedimiento de construcción de los transcriptomas de *Paspalum notatum* desarrollada por Podio *et al.* (2021) utilizados en esta Tesis. Los transcritos ensamblados en el Tr iAyS fueron empleados para el mapeo sobre el genoma de *O. sativa*. TRS: transcriptoma floral del genotipo sexual de *P. notatum*; TRA: transcriptoma floral del genotipo apomítico de *P. notatum*; DET: base de transcritos diferenciales; Up Sex: transcritos sobreexpresados en el genotipo sexual; Up Apo: transcritos sobreexpresados en el genotipo apomítico; cod: transcritos codificantes; no-cod: transcritos no codificantes.

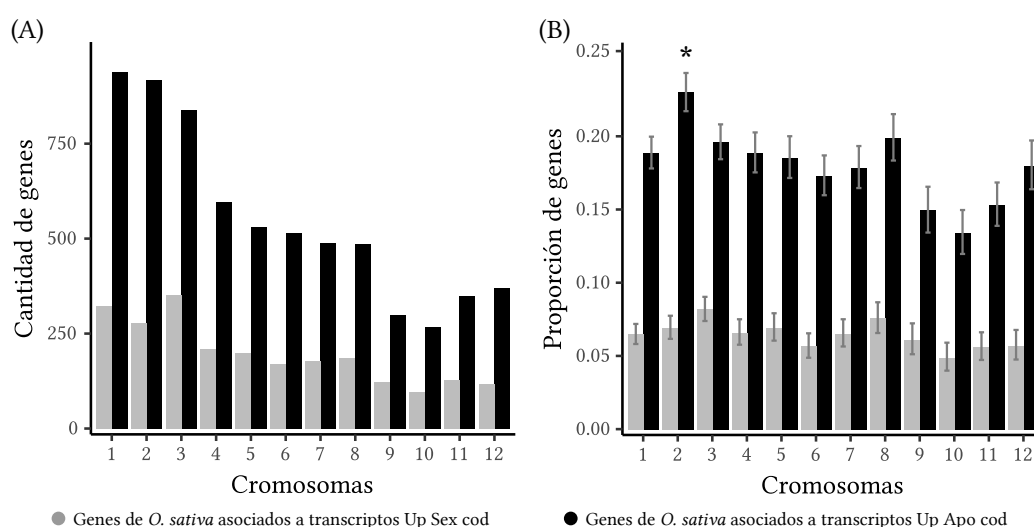


FIGURA 4.24: Distribución de genes de *Oryza sativa* asociados a transcritos codificantes de *Paspalum notatum* sobre el genoma de *O. sativa*. **A)** Distribución expresada en cantidades de genes por cromosoma de *O. sativa*. **B)** Distribución expresada en proporciones de genes por cromosoma de *O. sativa*. Asterisco: diferencia estadísticamente significativa entre cromosomas. IC calculados con el método de Newcombe (1998).

ficativas entre los diferentes cromosomas (**Tabla A.4; Figura 4.24B**). Las proporciones calculadas para los transcritos Up Apo cod resultaron superiores a los Up Sex cod, con valores promedio de 0,179 y curiosamente, el cromosoma Os2 registró una proporción significativamente mayor con un valor p de 0,23 (**Tabla A.4, Figura 4.24B**).

Con el objetivo de corroborar la existencia de posibles sectorizaciones en la distribución de los transcritos expresados diferencialmente a lo largo de los cromosomas de arroz, se realizó un mapeo *in silico* pero, en este caso, considerando las posiciones genómicas de los genes de arroz con homología de secuencias a cada uno de los transcritos. El gráfico de la **Figura 4.25**, construido con el paquete circlize (Gu *et al.*, 2014), muestra en su periferia del hemisferio derecho los 12 cromosomas de arroz en la misma escala, y un detalle de los cromosomas Os2 y Os12 en el hemisferio izquierdo. Las cuatro pistas del gráfico muestran desde afuera hacia dentro: I) la posición cromosómica de los genes de arroz con homología a transcritos codificantes Up Sex y Up Apo; II) los valores absolutos de Log_2FC de los transcritos asociados; y III) dos histogramas de frecuencias de 1,1 Mpb de rango que muestra los cambios de densidad de mapeo tanto de los transcritos Up Sex como Up Apo. En el gráfico se observa que los transcritos Up Sex cod y Up Apo cod se distribuyen homogéneamente entre los cromosomas de arroz, presentándose con mayor densidad en las regiones subteloméricas y en menor densidad en las centroméricas, lo cual coincide con zonas en las cuales se localizan generalmente un mayor número

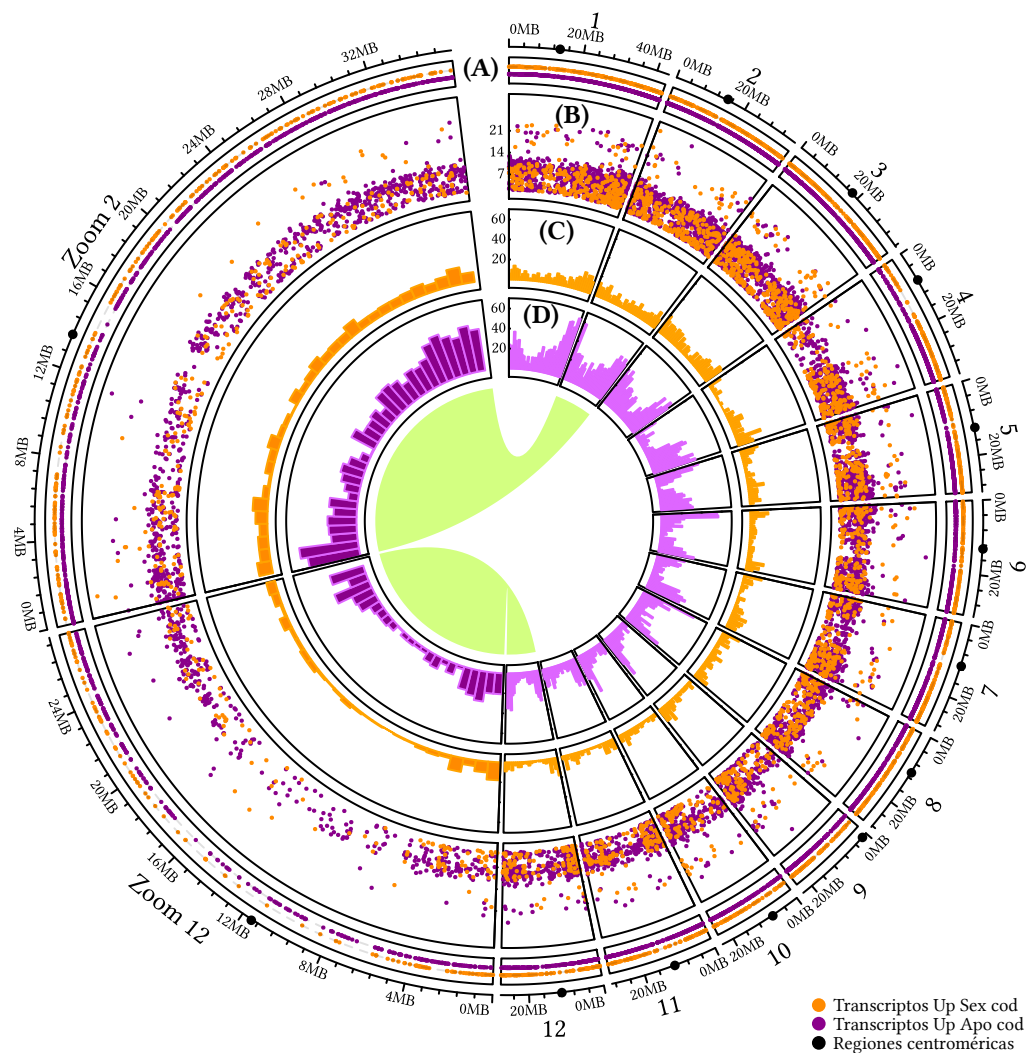


FIGURA 4.25: Mapeo de transcritos codificantes de *Paspalum notatum* sobre los cromosomas de *Oryza sativa*. Sobre el hemisferio derecho se observan los 12 cromosomas de arroz y sobre el hemisferio izquierdo se representan los cromosomas Os2 y Os12 a menor escala para observar en detalle como es la distribución interna del mapeo *in silico*. **A)** Localización de los genes de *O. sativa* asociados a transcritos Up Sex cod y Up Apo cod. **B)** Valores absolutos de Log_2FC de transcritos diferenciales. **C)** Histograma de frecuencias de transcritos Up Sex cod. **D)** Histograma de frecuencia de transcritos Up Apo cod.

de transcriptos (**Figura 4.25**). Dentro de las regiones de estudio sinténicas al ACR identificamos 395 genes asociados a transcriptos diferenciales codificantes; 268 genes de la región del Os₂ y 127 genes de la región del Os₁₂.

En la **Figura 4.26** se muestra en detalle el resultado obtenido con los cromosomas Os₂ y Os₁₂, indicándose las posiciones de 126 genes de arroz con las anotaciones funcionales más relevantes de los 1.156 genes similares a transcriptos codificantes diferenciales mapeados en estos cromosomas.

Entre los genes de los cromosomas Os₂ y Os₁₂ con homología a transcriptos diferenciales codificantes de *P. notatum* se encontraron genes que codifican para receptores de membrana (acuaporinas, proteínas del lumen endospermático), proteínas quinasas, factores de transcripción, genes vinculados al metabolismo de ARN y ADN (helicadas, polimerasa PolyA, transposasas, ARN polimerasas), y procesamiento de proteínas (*HUELLENLOS*, transportadores de aminoácidos, proteína ribosomal 40S, *PPIS* y *DNAJ*).

El mismo análisis se llevó a cabo para los transcriptos no codificantes, expresados tanto en las bibliotecas sexuales como apomícticas. Este análisis mostró que el 25 % y el 32 % de los mismos (respectivamente) presentaron homología con secuencia de genes de arroz. En todos estos casos, las cantidades absolutas de los transcriptos no codificantes sobrepresados en las bibliotecas apomícticas (Up Apo no-cod) superaron a los transcriptos no codificantes sobrepresados en las bibliotecas sexuales (Up Sex no-cod) en un orden de 3,17 veces (**Figura 4.27A**).

El análisis de proporciones determinó que los transcriptos Up Sex no-cod mapean en los cromosomas de arroz con valores similares, con una media de 0,006, y sin evidenciar diferencias significativas entre los mismos (**Figura 4.27B**). No ocurre lo mismo con el mapeo de los transcriptos de la base Up Apo no-cod. En este caso, los cromosomas que poseen los mayores niveles de transcriptos no codificantes sobrepresados en el genotipo apomíctico son el Os₂ y Os₁₂, con una proporción de 0,008, y el Os₁₂, con una proporción de 0,004. Si bien el bajo número de transcriptos no codificantes mapeados en arroz no nos permitió encontrar diferencias estadísticamente significativas en estos cromosomas, existe una tendencia que separa los cromosomas Os₂ y Os₁₂ de los diez cromosomas restantes (**Figura 4.27B; Tabla A.4**).

La distribución de estos transcriptos no codificantes diferencialmente expresados mostró que las regiones centroméricas tienen una reducida cantidad de transcriptos Up Sex no-cod, pero un número relativamente alto de transcriptos Up Apo no-cod (**Figura**

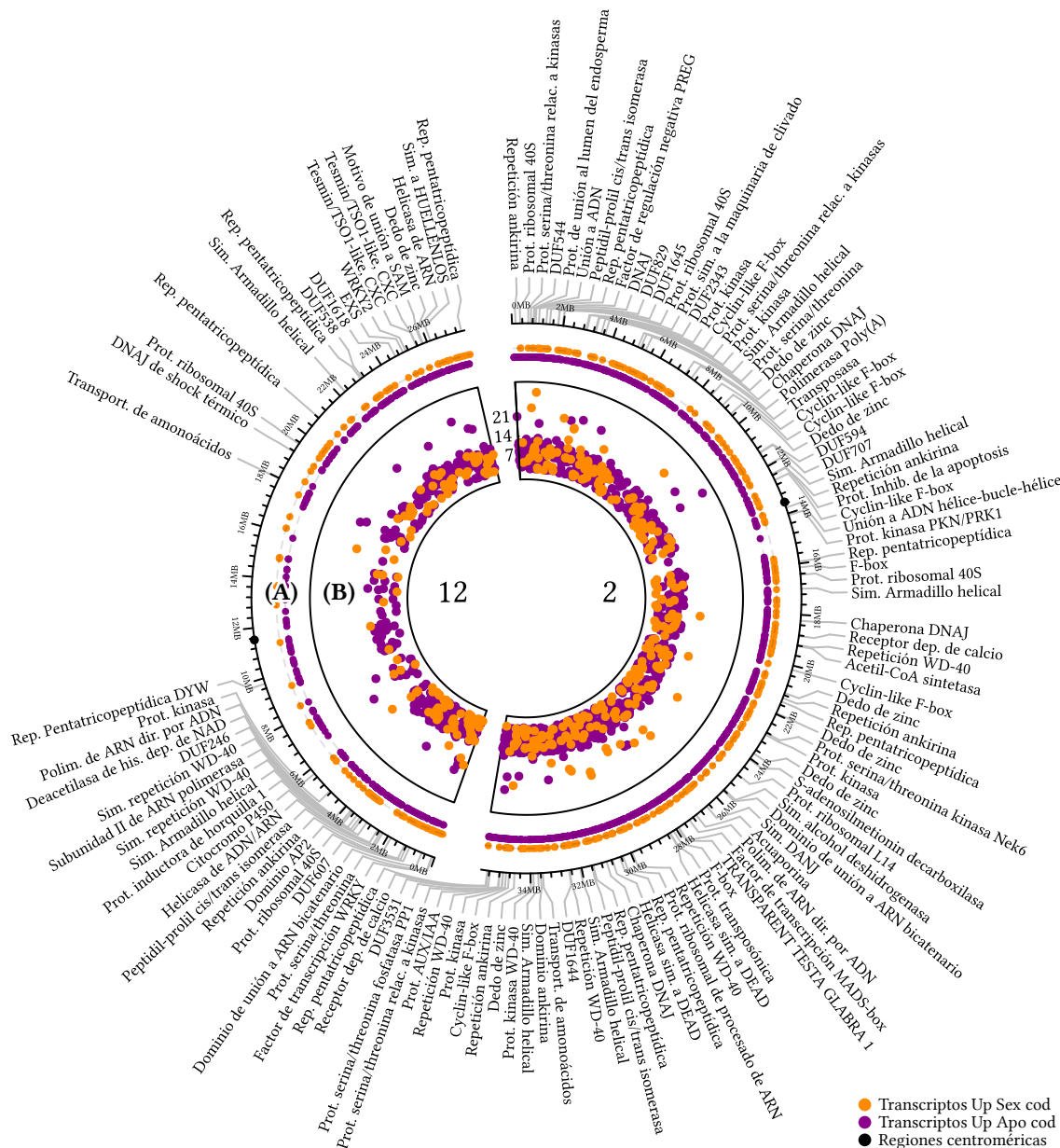


FIGURA 4.26: Transcripts codificantes diferencialmente expresados entre los genotipos sexuales y apomíticos de *Paspalum notatum* y sus anotaciones funcionales relevantes, mapeados sobre los cromosomas Os2 y Os12 de *Oryza sativa*. **A)** Localización de los genes en los cromosomas de *O. sativa*. **B)** Valores absolutos de Log_2FC de transcripts diferenciales.

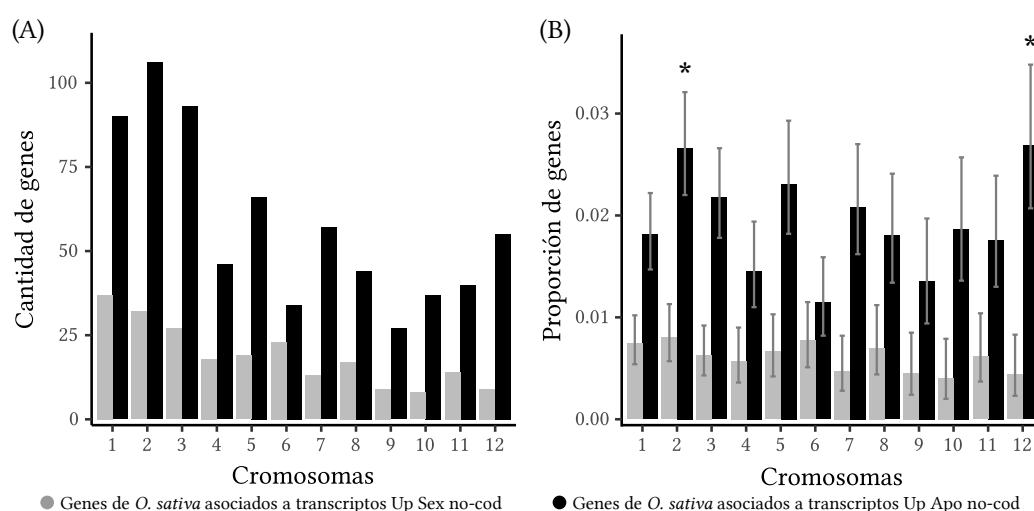


FIGURA 4.27: Distribución de genes de *Oryza sativa* asociados a transcritos no codificantes de *Paspalum notatum* en el genoma de *O. sativa*. **A)** Distribución expresada en cantidades de genes por cromosoma de *O. sativa*. **B)** Distribución expresada en proporciones de genes por cromosoma de *O. sativa*. Asteriscos: cromosomas que registran mayores proporciones de genes asociados a transcritos sobreexpresados en el genotipo apomítico (sin significancias estadísticas). 1C calculados con el método de Newcombe (1998).

4.28). Esto se observa con mayor claridad en los histogramas de frecuencia construidos con 1,1 Mpb de rango (Figura 4.28c y d). En cuanto a las regiones de estudio de arroz sintéticas al ACR logramos identificar un total de 46 genes asociados a transcritos diferenciales no codificantes; 28 pertenecientes a la región del Os2 y 18 pertenecientes a la región del Os12.

En la Figura 4.29 se muestra un detalle de este análisis, en donde se representan únicamente los cromosomas Os2 y Os12 y se indican las posiciones de 76 genes con las anotaciones funcionales más relevantes de los 162 genes con homología a transcritos no codificantes diferenciales mapeados en estos cromosomas.

Estos resultados indican que las regiones de arroz sintéticas al ACR de *P. notatum* son transcripcionalmente activas y que muestran genes asociados a diversas funciones (factores de transcripción, metabolismo de los ácidos nucleicos, vías de señalización por proteínas quinasas, metabolismo de hormonas, plegamiento de proteínas y otras funciones relacionados a la división celular y el desarrollo) con expresión diferencial entre los transcriptomas apomítico y sexual. Asimismo, la identificación de secuencias no codificantes, homólogas a varios de estos genes, indica que no solo factores génicos podrían jugar un papel importante en el cambio del modo reproductivo, sino también distintos mecanismos regulatorios mediados por ARN.

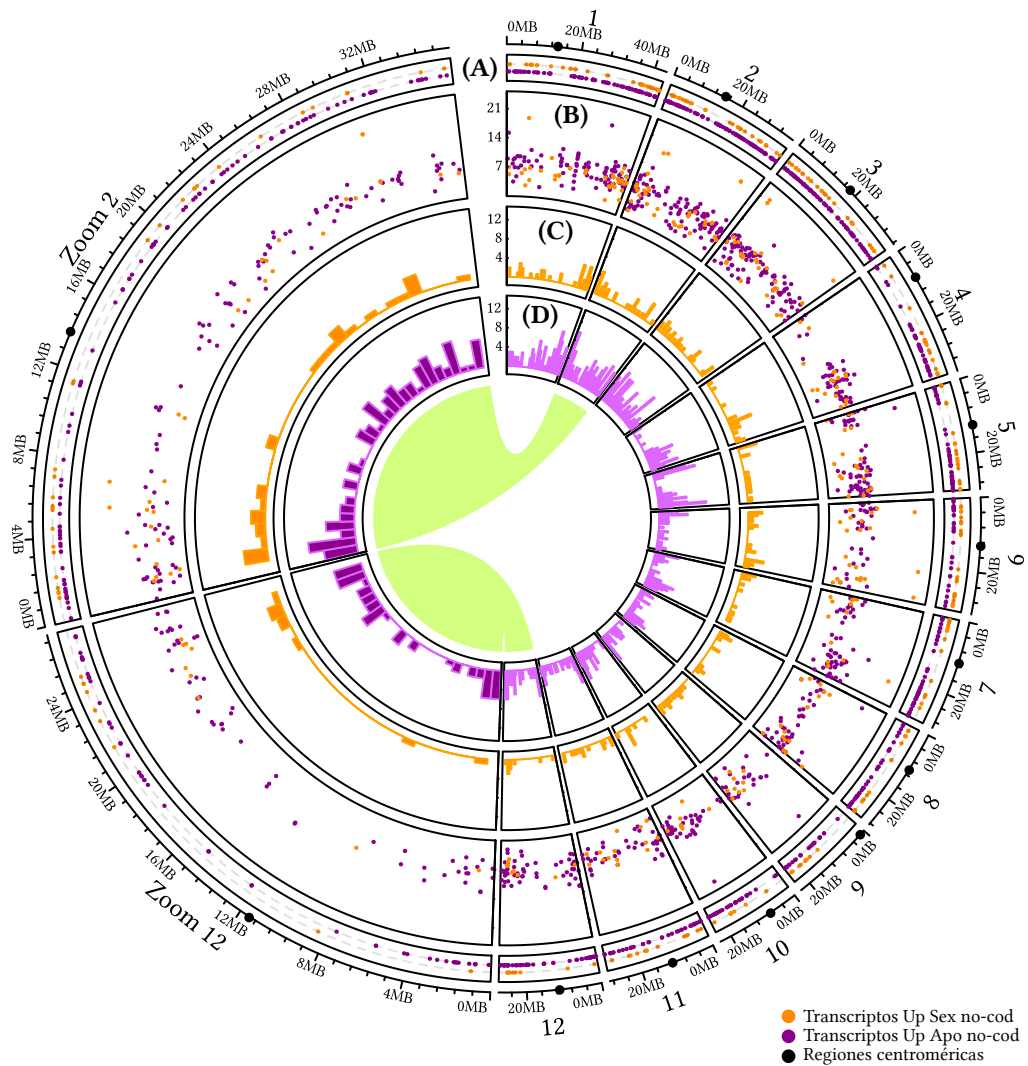


FIGURA 4.28: Mapeo de transcritos no codificantes de *Paspalum notatum* sobre los cromosomas de *Oryza sativa*. Sobre el hemisferio derecho se observan los 12 cromosomas de *O. sativa* y sobre el hemisferio izquierdo se representan los cromosomas Os2 y Os12 a menor escala para observar en detalle como es la distribución interna del mapeo *in silico*. **A)** Localización de los genes de *O. sativa* asociados a transcritos Up Sex no-cod y Up Apo no-cod. **B)** Valores absolutos de Log_2FC de transcritos diferenciales. **c)** Histograma de frecuencias de transcritos Up Sex no-cod. **D)** Histograma de frecuencia de transcritos Up Apo no-cod.

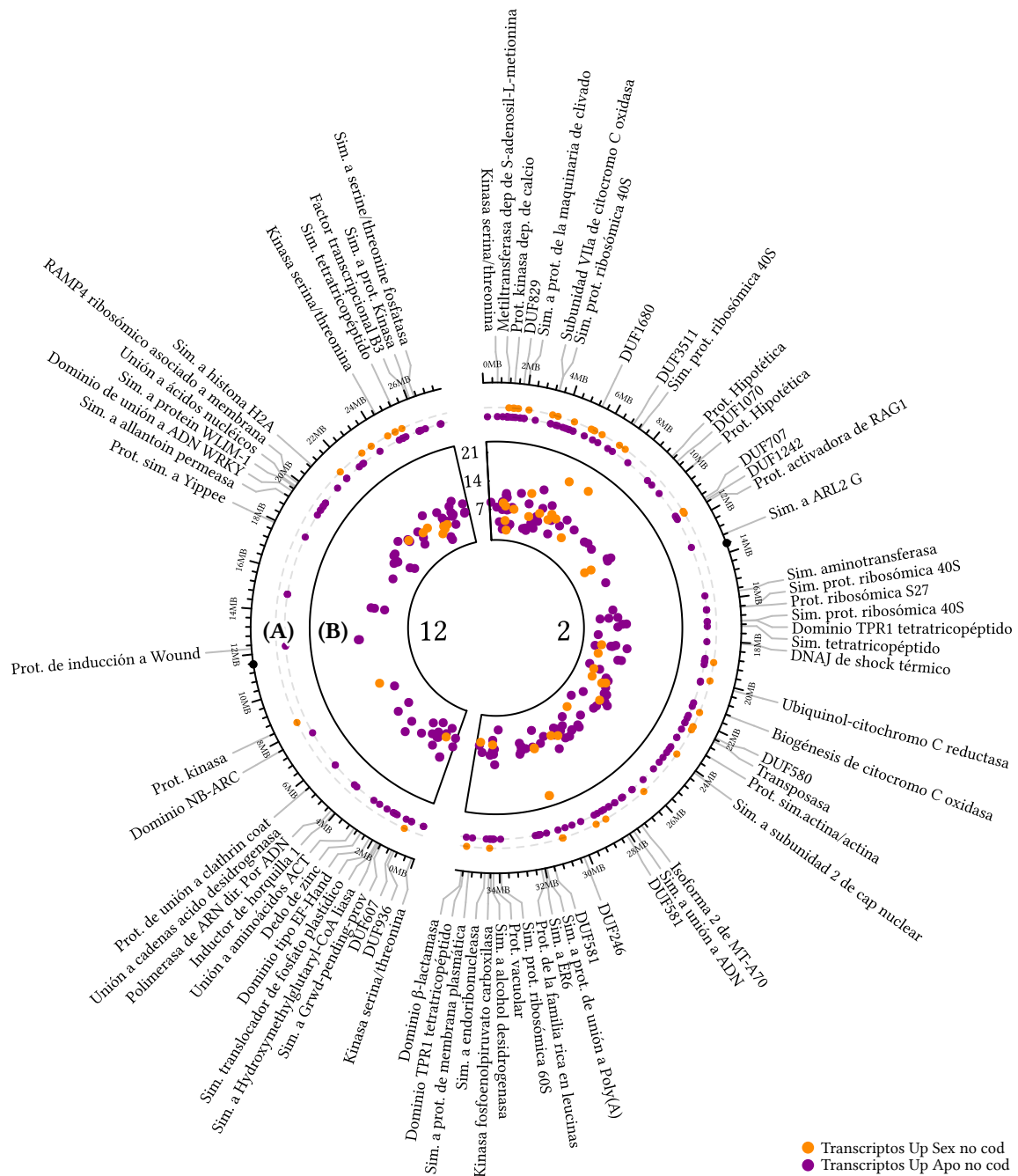


FIGURA 4.29: Transcritos no codificantes diferencialmente expresados entre los genotipos sexuales y apomicticos de *Paspalum notatum* y sus anotaciones funcionales mapeados sobre los cromosomas Os2 y Os12 de *Oryza sativa*. **A)** Localización de los genes en los cromosomas de *O. sativa*. **B)** Valores absolutos de Log_2FC de transcritos diferenciales.

4.4. Estudios genómicos del ACR en *Paspalum notatum*

4.4.1. Determinación de la conservación de la estructura del ACR a nivel diploide

Para la determinación de la conservación de la estructura del ACR a nivel diploide, se utilizó un ensamblado preliminar (borrador) del genoma de *P. notatum* derivado de un individuo diploide ($2n = 2x = 20$) denominado R1.

Para determinar si la estructura del ACR predicha en los citotipos tetraploides apomícticos se encuentra conservada en el citotipo diploide se realizó una búsqueda de los *scaffolds* que incluyeran secuencias físicamente asociadas al *locus* apomixis detectadas previamente. Los *scaffolds* se seleccionaron realizando un análisis de BLASTn con 17 secuencias utilizadas como consulta (**Tabla 3.3**) siguiendo los parámetros indicados en Materiales y métodos (pág. 52).

De las 17 secuencias utilizadas en la consulta (**Tabla 3.3**), 12 alinearon con secuencias en el genoma diploide bajo los parámetros definidos, y se distribuyeron en 68 *scaffolds* de longitudes comprendidas entre 65.289 y 2.255.383 pb (**Tabla A.5**). Es importante destacar que se identificaron *scaffolds* conteniendo fragmentos con homología a más de una secuencia ligada al ACR lo cual confirma el ligamiento entre las secuencias utilizadas como consulta. Esto fue observado en los *scaffolds* utg001311l y utg000513l, ambos con homología a los marcadores *PnMA243* y *PnMAJ5*, y en el *scaffold* utg001669l, que presentó homología con las secuencias del isotig11445 e isotig17513.

Por otro lado, se realizaron experimentos de mapeo a fin de seleccionar los *scaffolds* que presentaban homología con secuencias de las regiones de estudio previamente definidas sobre los cromosomas Os2 y Os12, y sus correspondientes regiones sinténicas de Si1 y Si3 de *S. italica*. Esta especie fue seleccionada en base a los resultados obtenidos en los análisis de sintenia descritos en la **Sección 4.2** de esta Tesis y por estar filogenéticamente más cercana al género *Paspalum*. Es de destacar que en el cromosoma Si1 se hallaron 540 *scaffolds* con homología de secuencias de los cuales 153 mapearon dentro de la región de estudio. En el cromosoma Si3 se hallaron 671 *scaffolds*, 110 de los cuales se localizaron en la región de estudio. En la región del cromosoma Si1 se hallaron tres

TABLA 4.11: *Scaffolds* genómicos del citotipo diploide de *Paspalum notatum* seleccionados para los análisis de caracterización génica y de sintenia

<i>Scaffold</i> de <i>P. notatum</i>	Nombre de la secuencia ligada al ACR	Homologías con las regiones de estudio de <i>S. Italica</i>	Longitud (pb)
utg002297l	<i>PnMT-A70</i>	Si1	202.830
utg000441l	<i>PnPPI_Bi</i>	Si1	358.722
utg000705l	<i>PnSPNA1</i>	Si1	393.352
utg002589l	<i>PnEXS</i>	Si3	159.355
utg001670l	<i>PnEXS</i>	Si3	101.703
utg002034l	<i>PSORC3a</i>	Si3	187.760
utg001669l	isotig11445	Si3	582.227
utg001125l	-	Si1; Si3	545.866
utg002456l	<i>PnMAJ7</i>	-	194.544
utg002007l	<i>PnPPI_Bi</i>	-	195.480

scaffolds (utg000441l, utg002297l y utg000705l) previamente identificados por contener homología con secuencias 100 % ligadas al ACR de *P. notatum*, mientras que para el Si3 se hallaron otros cuatro *scaffolds* (utg001669l, utg001670l, utg002034l, y utg002589l) con estas características.

En la **Figuras 4.30 y 4.31** se representan los alineamientos de los *scaffolds* de coberturas mayores a 5.000 pb que se encontraron en las regiones de estudio de los cromosomas Si1 y Si3, respectivamente. Para el Si1, los 49 *scaffolds* graficados representan el 49 % de la longitud total de la región de estudio, mientras que, para el Si3, los 19 *scaffolds* que se muestran corresponden al 17,2 % de la longitud total de dicha región. En color naranja se señalan los *scaffolds* que contienen secuencias ligadas al ACR.

De todos los *scaffolds* resultantes, se seleccionaron nueve de ellos por contener homología a secuencias del ACR y, adicionalmente, mapear en las regiones de estudio de *S. italica* (**Tabla 4.11**). Asimismo, se incorporó el *scaffold* utg001125l por haber mapeado simultáneamente en ambas regiones de estudio de los cromosomas Si1 y Si3 (señalado en violeta en las **Figuras 4.30 y 4.31**).

Como se puede observar, la estructura de los *scaffolds* a nivel diploide es coincidente con la estructura de los cromosomas de *S. italica*, especie altamente relacionada a *P. notatum*. Este análisis nos permitió identificar, además, posibles anclajes entre los *scaffolds* de *P. notatum* que todavía no han podido ser ensamblados en el borrador del genoma diploide.

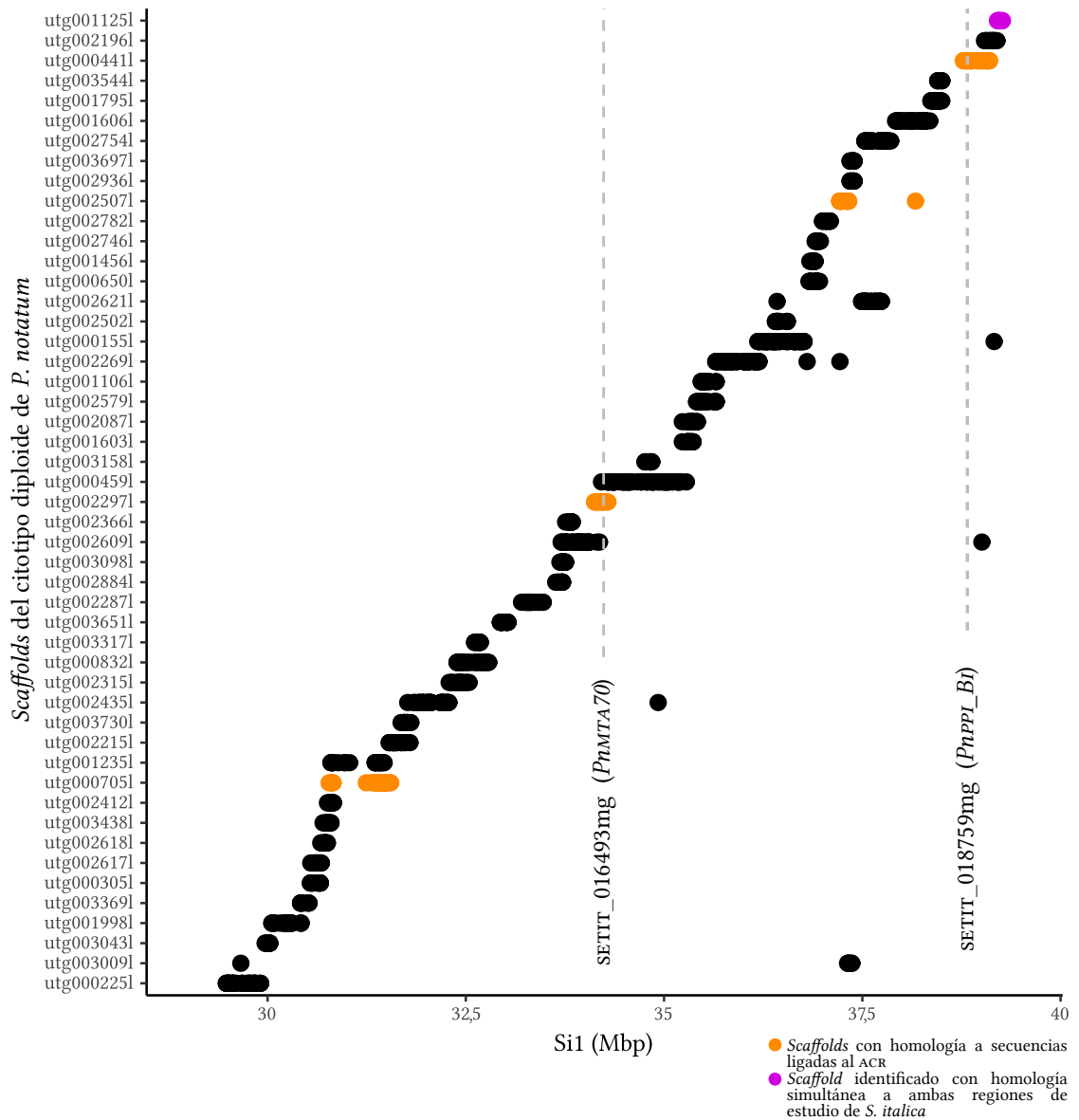


FIGURA 4.30: Mapeo de los *scaffolds* del citotipo diploide de *Paspalum notatum* sobre la región sinténica al ACR del cromosoma Si1 (*Setaria italica*) con coberturas mayores a 5.000 pb. Las líneas verticales señalan las posiciones de los genes en el cromosoma Si1 con homología a marcadores ligados al ACR. Se indica en naranja los *scaffolds* que presentan homología con secuencias del ACR de los citotipos tetraploides de *P. notatum* y en violeta el *scaffold* hallado simultáneamente en el mismo análisis realizado sobre la región del cromosoma Si3.

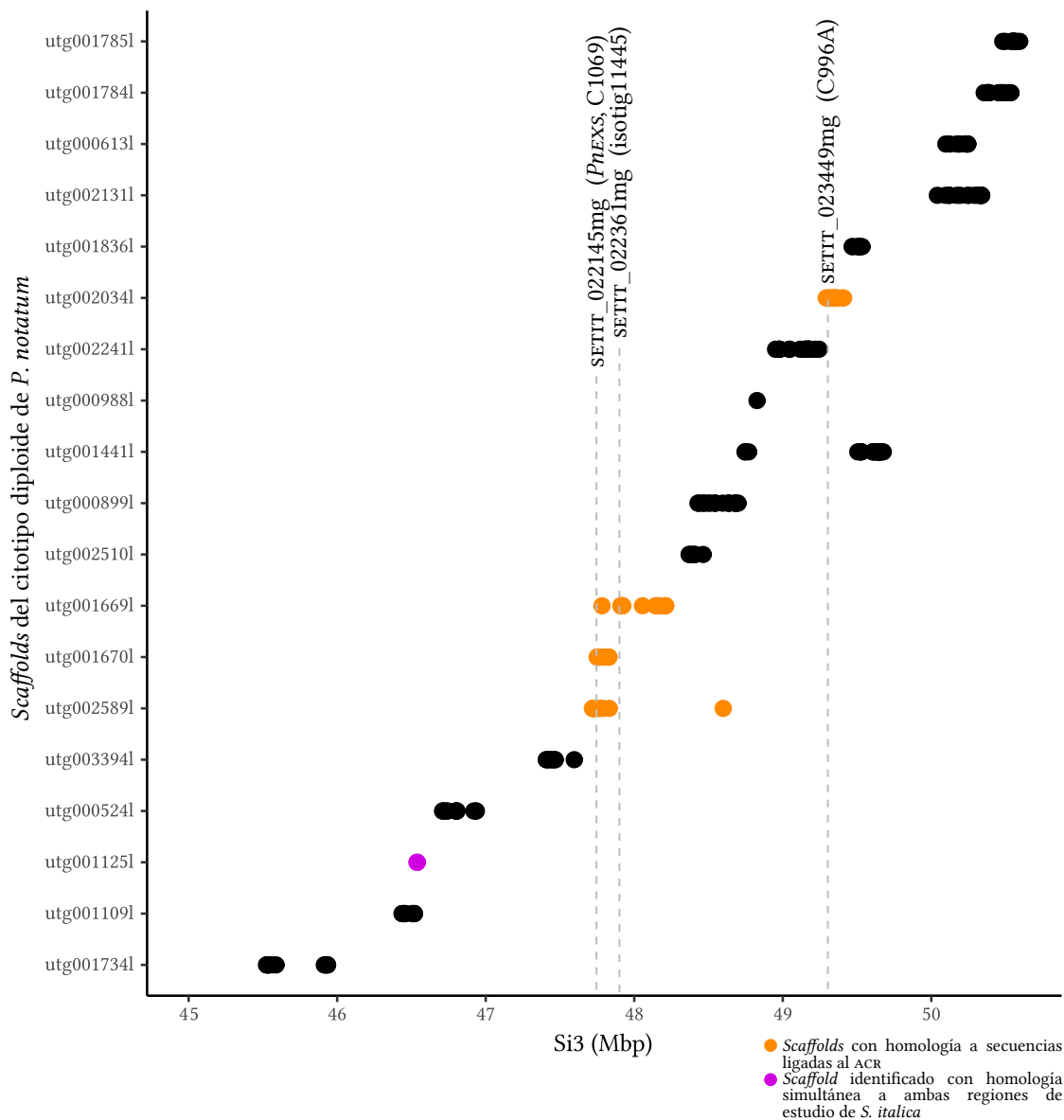


FIGURA 4.31: Mapeo de los *scaffolds* del citotipo diploide de *Paspalum notatum* sobre la región sinténica del cromosoma Si3 de *Setaria italica*. Las líneas verticales señalan las posiciones de los genes de *S. italica* con homología a marcadores del ACR. Se indica en naranja los *scaffolds* que presentan homología con secuencias del ACR de los citotipos tetraploides de *P. notatum* y en violeta el *scaffold* hallado simultáneamente en el mismo análisis realizado sobre la región del cromosoma Si1.

4.4.2. Caracterización del contenido génico y relación sinténica de los *scaffolds* de *P. notatum* con el genoma de arroz

Para caracterizar cada uno de los *scaffolds* de *P. notatum* seleccionados en el análisis descrito anteriormente, se identificó su contenido génico utilizando las bases de genes de plantas verdes del NCBI⁴. Posteriormente, se analizó la sintenia de los mismos en relación al genoma de arroz usando gráficos de cuerdas. Las búsquedas BLASTn en la base de plantas verdes del NCBI[®], utilizando las secuencias de los 10 *scaffolds* seleccionados (utg000441l, utg000705l, utg001125l, utg001669l, utg001670l, utg002007l, utg002034l, utg002297l, utg002456l y utg002589l) detectaron un total de 220 secuencias con homología a genes. La mayor parte de las homologías fueron halladas con genes de las especies de gramíneas filogenéticamente relacionadas con *P. notatum*: *S. italica*, *Panicum hallii*, *S. bicolor* y *Z. mays* con 64, 57, 57 y 26 genes, respectivamente. Las 16 secuencias restantes presentaron homología con secuencias de *O. sativa*, *B. distachyon*, *Saccharum hybrid*, *Cenchrus purpureus*, *Nicotiana tabacum*, *P. simplex* y *Phoenix dactylifera*. Los análisis con el programa Fgenesh[®] lograron predecir 164 genes (74,54 %) de las 220 secuencias, mientras que las restantes 56 secuencias no resultaron informativas sobre su capacidad codificante. Estas últimas podrían corresponder a pseudogenes, secuencias no codificantes, regiones intergénicas, o bien a genes nuevos que no poseen anotación. Una síntesis de la caracterización génica realizada con el Fgenesh[®] se detallan en la **Tabla 4.12**, junto a las densidades génicas de cada *scaffold*, las proporciones cubiertas por secuencias génicas e intergénicas, y las longitudes promedio de las secuencias intergénicas calculadas para cada *scaffold* según las **Ecuaciones 3.4 a 3.7** indicadas a continuación.

Los 164 genes predichos presentan ortología con 104 genes de arroz. En la **Tabla A.6** se detallan todos los genes predichos en los diferentes *scaffolds* con su correspondiente identificación del NCBI[®], la ortología con *O. sativa* y su anotación funcional (Gramene[®]). El 57,6 % de los mismos (60 genes) está comprendido en las regiones de estudio del Os2 (38 genes) y Os12 (22 genes). También se encontraron genes que mapearon por fuera de las mismas en los cromosomas Os2 (18 genes), Os3 (1 gen), Os4 (17 genes), Os5 (2 genes), Os6 (2 genes), Os7 (2 genes), Os10 (1 gen) y Os11 (1 gen) que podrían corresponder a genes duplicados o parálogos. A su vez, 43 de los 104 genes de arroz presentaron homología con secuencias de transcritos diferenciales de *P. notatum* del grupo analizado en la **Sección 4.3** de esta Tesis. El 67,4 % de los mismos mapearon sobre las regiones relacionadas al ACR del Os2 (19 genes) y Os12 (10 genes; **Figura 4.32**). Los restantes 14 genes mapearon

⁴Disponible en www.ncbi.nlm.nih.gov

TABLA 4.12: Caracterización génica de los *scaffolds* del citotipo diploide de *Paspalum notatum*

<i>Scaffold</i> del citotipo diploide de <i>P. notatum</i>	Cantidad de genes predichos	Densidad génica (genes/Mpb)	Longitud cubierta por genes (pb)	Prop. de secuencias génicas	Prop. de secuencia intergénicas	Long. promedio de secuencias intergénicas (pb)
utg002589l	12	75,30	37528	0,24	0,76	7479,00
utg001669l	20	36,07	42929	0,07	0,93	22558,08
utg002034l	11	58,59	19082	0,1	0,9	12802,40
utg000441l	34	94,78	99053	0,28	0,72	7582,39
utg002007l	8	46,04	25975	0,13	0,87	24130,29
utg001670l	10	98,33	15722	0,15	0,85	8461,00
utg000705l	13	35,59	33087	0,08	0,92	12655,58
utg001125l	33	62,29	89799	0,16	0,84	11808,69
utg002456l	11	56,54	26429	0,14	0,86	16135,40
utg002297l	12	59,16	22683	0,11	0,89	12323,36

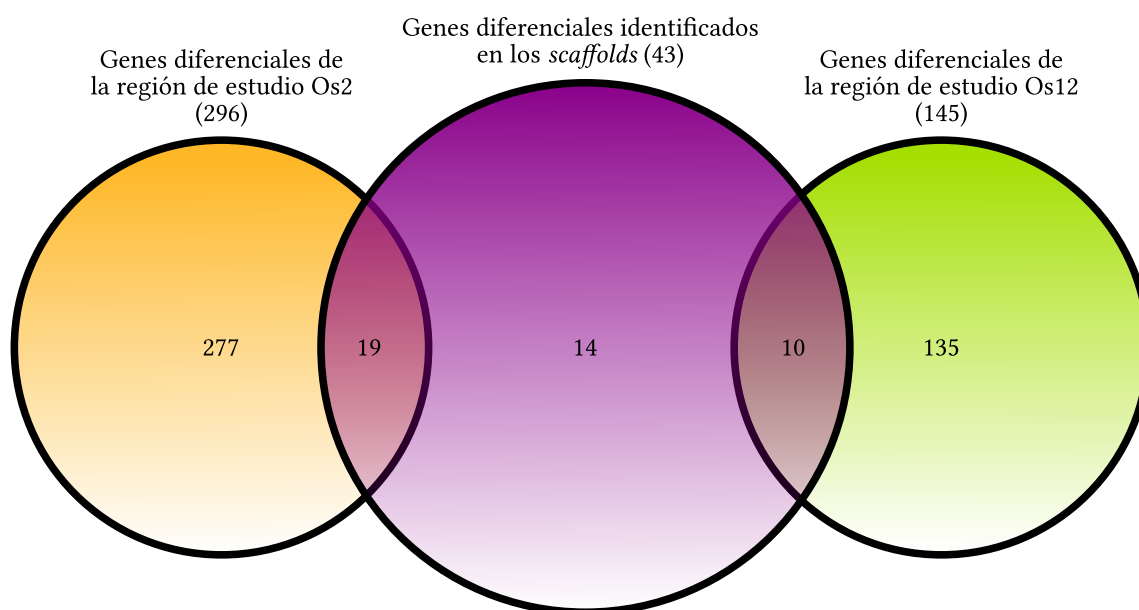


FIGURA 4.32: Diagrama de Venn mostrando los genes de las regiones sinténicas al ACR en *Oryza sativa* asociados a transcritos diferenciales de *Paspalum notatum*

por fuera de la región sinténica al ACR del Os2 (8 genes) y sobre los cromosomas Os1 (2 genes), Os3 (1 gen), Os6 (1 gen), Os8 (1 gen) y Os11 (1 gen).

La representación gráfica de las posiciones de los genes predichos en los *scaffolds* de *P. notatum* y sus ortólogos en arroz, permitió también comprender las relaciones sinténicas entre el citotipo diploide de *P. notatum* y arroz (**Figuras 4.33 y 4.34**).

Las predicciones génicas de los *scaffolds* asociados a los marcadores del ACR provenientes del Os2 *PnMT-A70* y C932 (utg002297l, utg002007l y utg000441l), resultaron en su mayoría (más del 75,0 %) ser ortólogos a genes del cromosoma Os2. Lo mismo se halló en el *scaffold* utg000705l, donde la totalidad de sus genes predichos resultaron ser ortólogos a genes del Os2 e incluyeron además al marcador completamente ligado a la apomixis *PnSPNA1* (Rebozzio *et al.*, 2012). El análisis del *scaffold* utg001125l mostró que el 37,5 % de los genes predichos (32 genes) resultaron ser ortólogos a genes de arroz localizados en el cromosoma Os2, mientras que otro 37,5 % (32 genes) resultó tener homologías con genes del cromosoma Os12. El 25,0 % restante no presentó homología con otros cromosomas de arroz.

El estudio de la relación sinténica entre estos cinco *scaffolds* de *P. notatum* y el cromosoma Os2 de arroz se muestra en la **Figura 4.33**. Este estudio evidenció una alta conservación de la microcolinearidad génica en todos los *scaffolds*, a su vez se observó que las regiones sinténicas en arroz son muy cercanas entre sí y que están localizadas en la región subtelomérica del brazo largo del cromosoma y contenidas en la región de estudio previamente definida (Os2:22.882.165–32.517.155).

Los cinco *scaffolds* asociados a secuencias del ACR correspondientes al cromosoma Os12 de arroz (utg001669l, utg001670l, utg002034l, utg002456l y utg002589l), presentaron porcentajes de genes predichos ortólogos al Os12 superiores al 45,0 %. El análisis de sintenia entre los mismos, más el utg001125l —que mapea en ambas regiones bajo estudio—, y el cromosoma Os12 reveló que las regiones sinténicas en arroz se encuentran cercanas y comprendidas dentro de la región de estudio definida para este cromosoma (Os12:20.005.405–27.529.682; **Figura 4.34**).

La microsintenia entre los *scaffolds* y el cromosoma de Os12 se muestra muy conservada, a excepción del *scaffold* utg002456l, cuyos genes predichos se encuentran relacionados con genes de arroz distantes entre sí que no mantienen el orden observado en el *scaffold*. Los *scaffolds* utg002589l y utg001670l están asociados al mismo marcador del ACR (la secuencia *PnEXS*) y sus regiones sinténicas en arroz se encuentran consecutivas

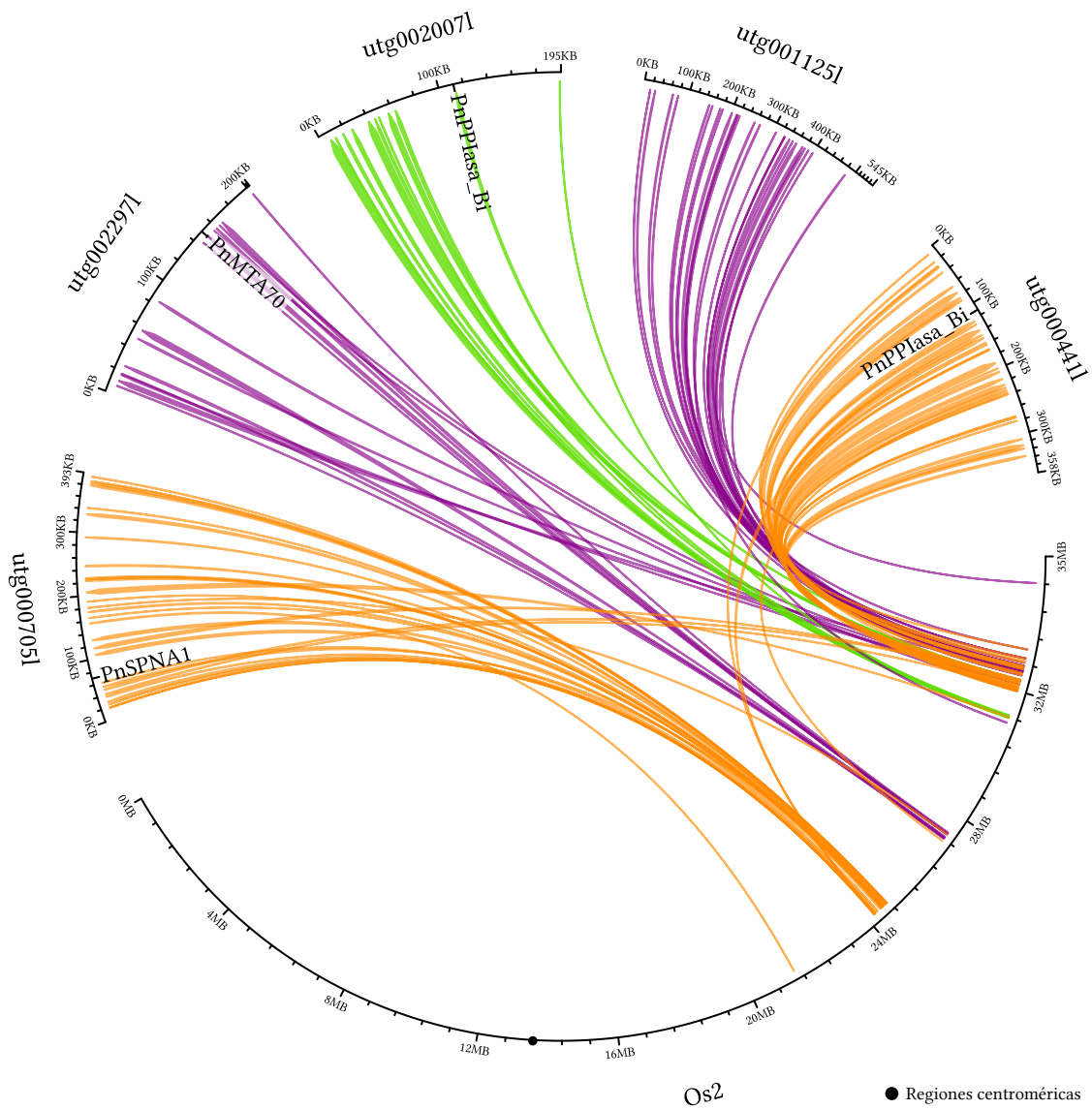


FIGURA 4.33: Relaciones sinténicas entre cinco *scaffolds* del citotipo diploide de *Paspalum notatum* y el cromosoma Os2 de *Oryza sativa*. Cada cuerda conecta un gen predicho en *P. notatum* y su ortólogo en *O. sativa*. Sobre cada *scaffold* se marcó la región de homología con las secuencias 100 % ligadas al ACR de los citotipos tetraploides de *P. notatum*

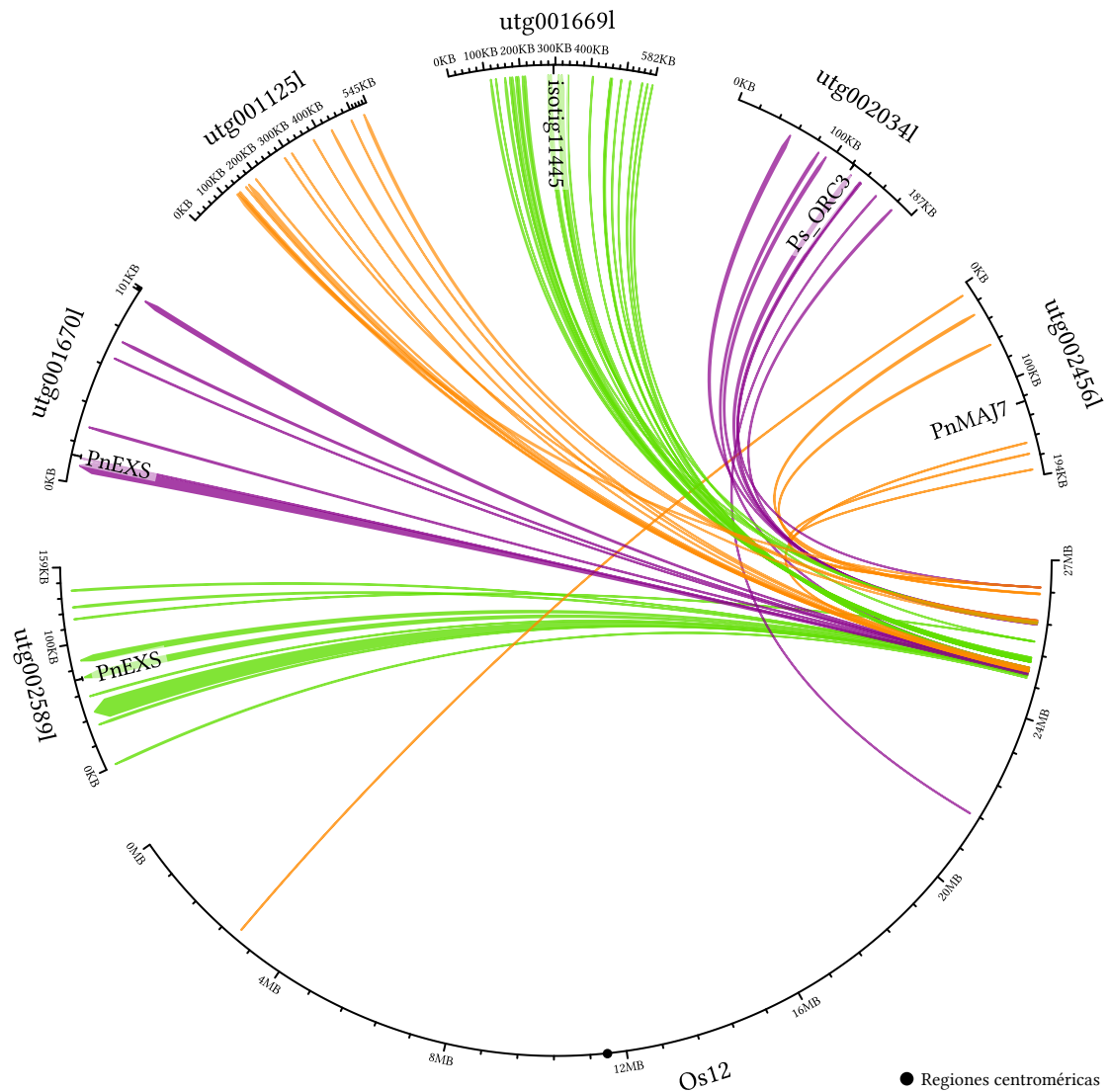


FIGURA 4.34: Relaciones sinténicas entre seis *scaffolds* del citotipo diploide de *Paspalum notatum* y el cromosoma Os12 de *Oryza sativa*. Cada cuerda conecta un gen predicho en *P. notatum* y su ortólogo en *O. sativa*. Sobre cada *scaffold* se marcó la región de homología con las secuencias 100 % ligadas al ACR de los citotipos tetraploides de *P. notatum*.

y parcialmente solapadas, lo que podría significar que ambos *scaffolds* corresponden al mismo fragmento genómico o cromosoma homólogo que el programa de ensamblado no pudo unificar.

El *scaffold* utg001125l presenta secuencias similares a fragmentos del cromosoma Os2 y Os12. Esto puede observarse en los análisis de sintenia presentados en las **Figuras 4.33 y 4.34** donde las regiones sinténicas del *scaffold* utg001125l mapean en las posiciones Os2:32.488.795–32.963.974 y Os12:25.015.035–26.179.003 de arroz. Es interesante notar que estas regiones de mapeo están localizadas en los extremos de las regiones sinténicas al ACR estudiadas en esta Tesis (Os2:22.882.165–32.517.155 y Os12:20.005.405–27.529.682), por lo cual este *scaffold* podría representar una parte de la región de «empalme» del segmento híbrido del cromosoma de *P. notatum* que cosegrega con la apomixis.

4.4.3. Mapeo de transcritos de *P. notatum* sobre los *scaffolds* del citotipo diploide

Con el objetivo de analizar qué transcritos expresados durante el desarrollo floral de *P. notatum* derivan de los *scaffolds* asociados al ACR, se realizaron búsquedas de BLASTN utilizando la información de secuencias disponibles en la base DET descrita en la **Sección 4.3**. Como resultado del análisis se encontraron 427 secuencias con homología a 404 transcritos diferentes. El 25 % de los mismos (101 transcritos) mostró homología con secuencias de los *scaffolds* previamente identificadas como secuencias codificantes, los restantes mapearon en regiones que no pudieron ser predichas en los análisis anteriores. Se hallaron 43 transcritos con expresión diferencial; 8 sobreexpresados en el genotipo sexual y 35 sobreexpresados en el genotipo apomítico. La mayor parte de los transcritos (60,14 %) correspondieron a secuencias codificantes para proteínas. De las restantes secuencias no codificantes, solo cuatro fueron identificadas como diferenciales: dos sobreexpresadas en el genotipo sexual y dos sobreexpresadas en el apomítico (**Tabla A.7**).

En las **Figuras 4.35 y 4.36** se representa el mapeo *in silico* de los transcritos mencionados sobre los *scaffolds*. En estos análisis se observa una sectorización de secuencias no codificantes, en particular, en los *scaffolds* utg002007l, utg000441l, utg002589l y utg001670l, donde se detectan regiones con transcritos no codificantes y ausencia de transcritos codificantes. Asimismo, la mayoría de los transcritos codificantes se encuentran sobreexpresados en el genotipo apomítico.

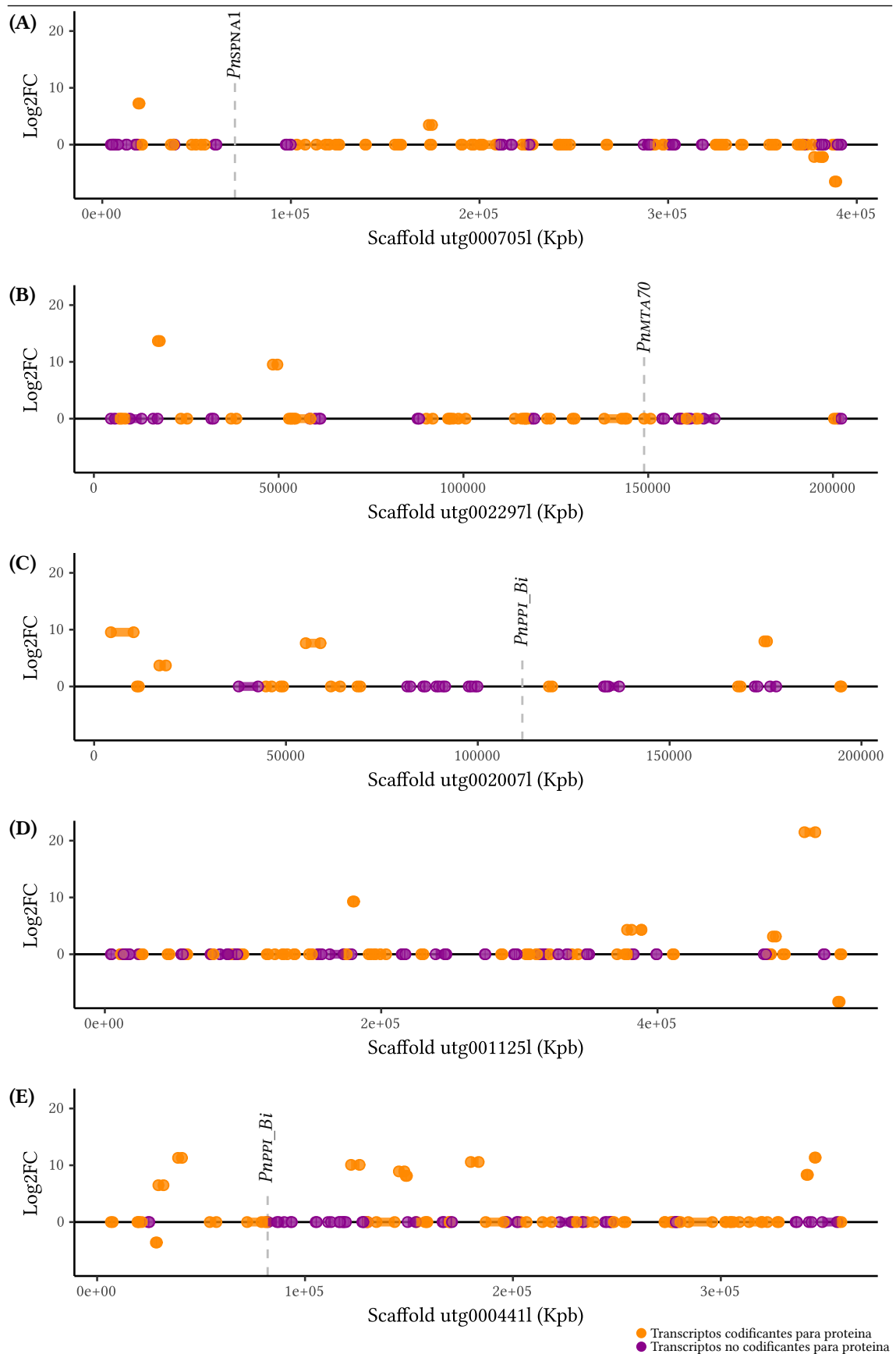


FIGURA 4.35: Mapeo de los transcritos de *Paspalum notatum* sobre los *scaffolds* del genotipo diploide de la misma especie y valores de expresión diferencial (Log_2FC) durante el desarrollo reproductivo (apomictico vs sexual). **A)** utg000705l. **B)** utg002297l. **C)** utg002007l. **D)** utg001125l. **E)** utg000441l.

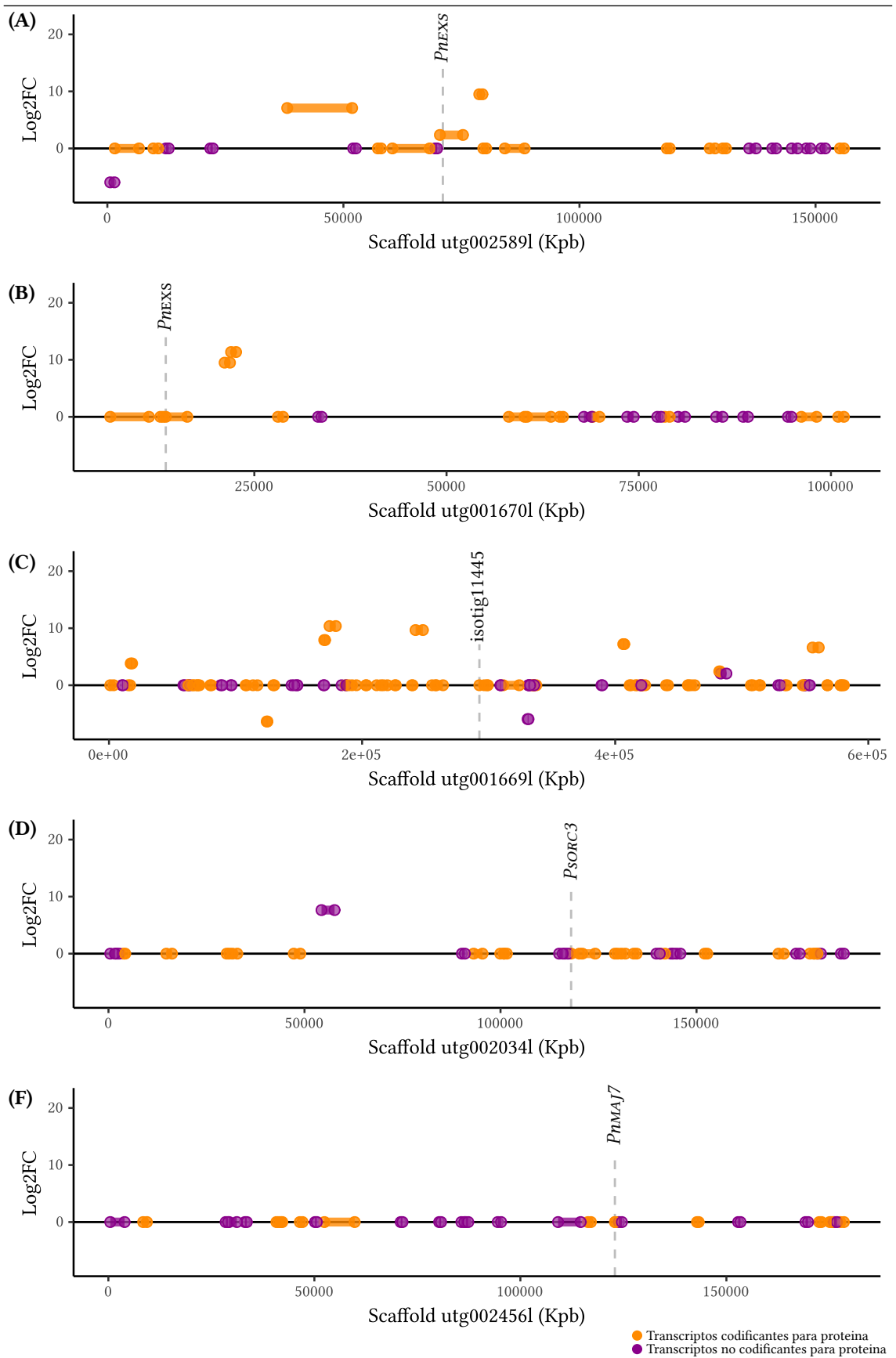


FIGURA 4.36: Mapeo de los transcritos de *Paspalum notatum* sobre los *scaffolds* del genotipo diploide de la misma especie y valores de expresión diferencial (Log₂FC) durante el desarrollo reproductivo (apomítico vs sexual). **A)** utg002589l. **B)** utg001670l. **C)** utg001669l. **D)** utg002034l. **E)** utg002456l.

4.4.4. Identificación, análisis y anotación funcional de genes candidatos

Los 104 genes de arroz identificados en los *scaffolds* asociados al ACR (**Sección 4.4.2**) en conjunto con los 441 genes de arroz de las regiones de interés de los cromosomas Os2 y Os12 asociados a transcritos diferenciales de *P. notatum* (395 codificantes y 46 no codificantes; **Sección 4.3**) fueron categorizados de acuerdo a las clases ontológicas (GO⁵; Ashburner *et al.*, 2000). El análisis fue realizado considerando las tres categorías principales: componentes celulares (CC), funciones moleculares (FM) y procesos biológicos (PB), utilizando los genes ortólogos de *A. thaliana*.

Los genes relacionados con CC fueron asociados a procesos que se desarrollan en compartimientos celulares (GO:0044464), membranas (GO:0016020) y complejos proteicos (GO:0032991). En la categoría FM, la mayoría de los genes se encontraron vinculados a funciones de regulación transcripcional (GO:0140110) y unión (GO:0005488); más específicamente unión a ácidos nucleicos (GO:0003676), ribonucleótidos (GO:0032553) y unión a ATP (GO:0005524). También se hallaron genes en las categorías de transporte (GO:0005215), actividad estructural (GO:0005198), regulación de funciones moleculares (GO:0098772) y actividad antioxidante (GO:0016209). Es de destacar que dentro de la categoría PB, se identificaron 302 genes involucrados a diez clases ontológicas relacionadas con el desarrollo reproductivo: procesos reproductivos (GO:0022414), polinización (GO:0009856), regulación de los procesos reproductivos (GO:2000241), reproducción sexual (GO:0019953) y meiosis (GO:1903046); asimismo mostraron relación con procesos metabólicos (GO:0008152); crecimiento (GO:0040007); proliferación celular (GO:0008283); procesos celulares (GO:0009987) donde se destaca el silenciamiento génico (GO:0016458) y el plegado de proteínas (GO:0006457); cascada de señales (GO:0023052); y procesos del desarrollo (GO:0032502), particularmente megagametogénesis (GO:0009561), desarrollo postembrionario (GO:0009791) y dormancia de semillas (GO:0010162; **Tabla 4.13**). Los principales GO de cada categoría: CC, FM y PB se muestran en la **Figura 4.37**, donde se representan al segundo nivel para simplificar la visualización de los datos. La lista completa de las clases al cuarto nivel con los genes identificados se muestra en la **Tabla A.8**.

⁵Disponible en <http://geneontology.org/>

TABLA 4.13: Categorías de Ontología Génica al cuarto nivel de los genes identificados en las **Secciones 4.4.2 y 4.3**

Categoría GO	Subcategoría GO	ID GO	Nº de genes
PB	Señalización	GO:0023052	32
PB	Señalización célula a célula	GO:0007267	3
PB	Crecimiento	GO:0040007	22
PB	Procesos del sistema inmune	GO:0002376	17
PB	Proliferación celular	GO:0008283	10
PB	Procesos rítmicos	GO:0048511	9
PB	Detoxificación	GO:0098754	5
PB	Adhesión biológica	GO:0022610	3
PB	Pigmentación	GO:0043473	2
PB	Fases biológicas	GO:0044848	1
PB	Plegado protéico	GO:0006457	6
PB	Segregación cromosómica	GO:0007059	4
PB	Biogénesis de componentes celulares	GO:0071840	95
PB	Crecimiento celular	GO:0016049	13
PB	Muerte celular	GO:0008219	11
PB	Localización	GO:0051179	75
PB	Procesos metabólicos	GO:0008152	216
PB	→ Metilación	GO:0032259	22
PB	Respuesta a estímulos	GO:0050896	141
PB	→ Respuesta celular a estímulos	GO:0051716	45
PB	→ Respuesta a estrés	GO:0006950	84
PB	→ Traducción de señales	GO:0007165	29
PB	Regulación biológica	GO:0065007	122
PB	→ Regulación de procesos biológicos	GO:0050789	109
PB	→ Regulación positiva de procesos biológicos	GO:0048518	30
PB	→ Regulación negativa de procesos biológicos	GO:0048519	41
PB	→ Silenciamiento génico	GO:0016458	17
PB	Procesos del desarrollo	GO:0032502	99
PB	→ Crecimiento del desarrollo	GO:0048589	14
PB	→ Megagametogénesis	GO:0009561	10
PB	→ Regulación de procesos del desarrollo	GO:0050793	26
PB	→ Procesos multicelular	GO:0032501	94
PB	→ Procesos de organismos multicelulares	GO:0051704	41
PB	→ Desarrollo postembrionario	GO:0009791	66
PB	→ Fotoperíodo y floración	GO:0048573	10
PB	Ciclo celular	GO:0007049	17
PB	→ Procesos del ciclo celular	GO:0022402	11
PB	→ Procesos basados en microtúbulos	GO:0007017	6
PB	Procesos reproductivos	GO:0022414	70
PB	→ Desarrollo de procesos involucrados en la reproducción	GO:0003006	67
PB	→ Ciclo meiótico celular	GO:0051321	6
PB	→ Germinación seminal	GO:0009845	5
PB	→ Polinización	GO:0009856	4
PB	→ Procesos de la dormancia seminal	GO:0010162	4

TABLA 4.13: Categorías de Ontología Génica al cuarto nivel de los genes identificados en las **Secciones 4.4.2** y **4.3** (continuación)

Categoría GO	Subcategoría GO	ID GO	Nº de genes
PB	→ Mantenimiento de la identidad de los órganos florales	GO:0048497	1
PB	→→ Procesos del ciclo meiótico celular	GO:1903046	6
FM	Actividad molecular estructural	GO:0005198	8
FM	Regulación de las funciones moleculares	GO:0098772	5
FM	Actividad de traducción molecular	GO:0060089	3
FM	Actividad antioxidante	GO:0016209	1
FM	Actividad catalítica	GO:0003824	142
FM	→ Actividad isomerasa	GO:0016853	6
FM	→ Actividad transferasa	GO:0016740	64
FM	Unión	GO:0005488	130
FM	→ Unión a compuestos orgánicos cíclicos	GO:0097159	67
FM	→ Unión a cromatina	GO:0003682	2
FM	→ Unión a ADN	GO:0003700	34
FM	→ Unión a proteína	GO:0005515	56
FM	Actividad transportadora	GO:0005215	22
FM	→ Actividad transportadora molecular	GO:0140104	1
CC	Confluencia celular	GO:0030054	21
CC	Simplasto	GO:0055044	21
CC	Región extracelular	GO:0005576	30
CC	Complejo protéico	GO:0032991	31
CC	Organela	GO:0043226	300
CC	→ Componente de organelas	GO:0044422	81
CC	Membrana	GO:0016020	110
CC	→ Componente de la membrana	GO:0044425	15
CC	→ Lumen de membrana	GO:0031974	22

PB: Procesos biológico; FM: Funciones moleculares; CC: Componentes celulares. Las flechas indican las subcategorías de la clase inmediatamente superior a cada una de ellas.

El 45,2 % de los genes identificados en los 10 *scaffolds* seleccionados (47 genes) se encontraron involucrados en las categorías de PB mencionadas. Los restantes 57 genes se asociaron únicamente a las categorías de CC o FM mencionadas.

Para poder identificar si existe alguna vía que relacione los genes identificados, se seleccionaron aquellos genes implicados en procesos reproductivos, del desarrollo o que fueron vinculados con la apomixis en trabajos anteriores y se generó una red de relaciones funcionales utilizando la plataforma String[®]. Como base de datos de referencia se

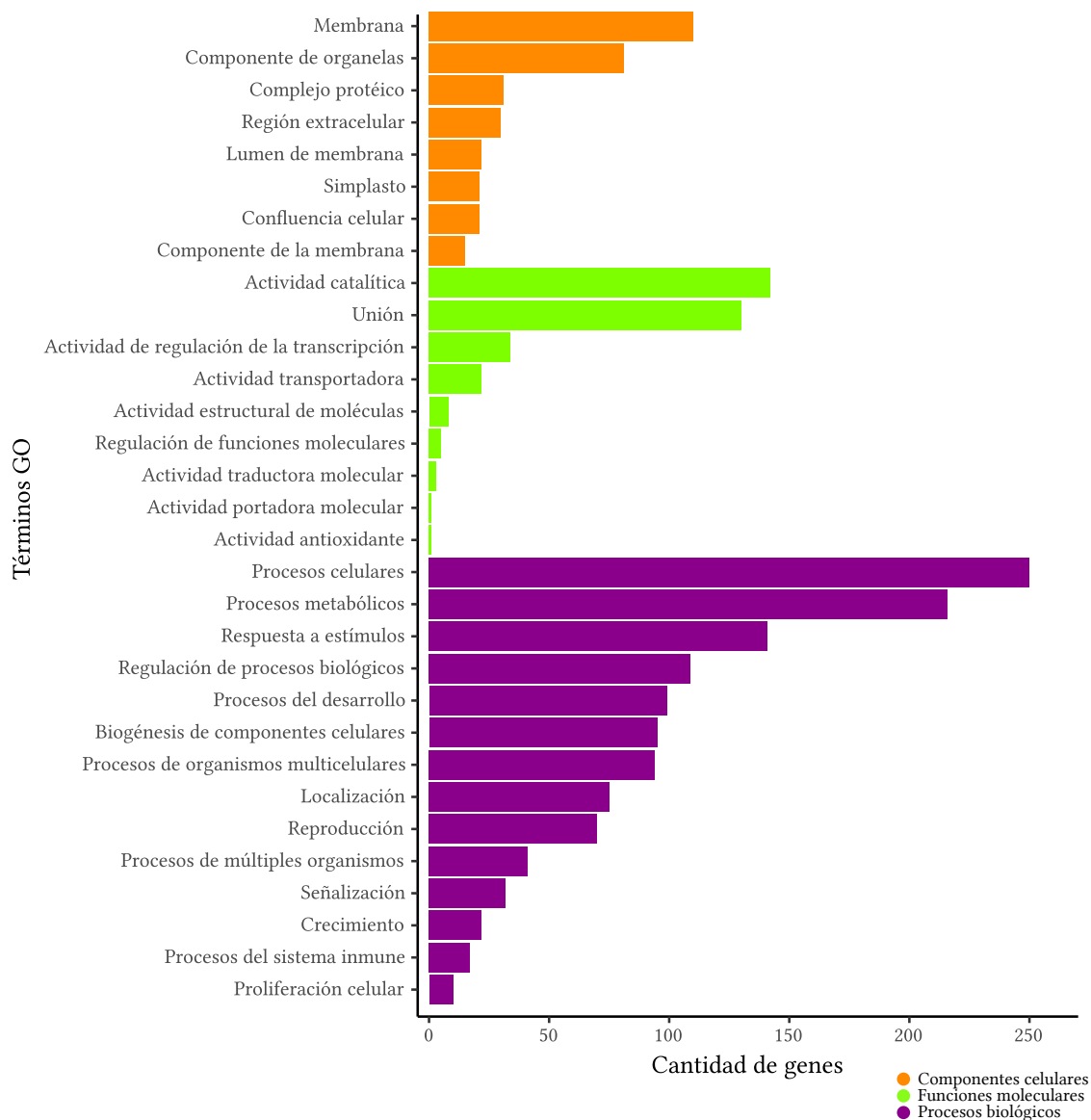


FIGURA 4.37: GO del segundo nivel asociados a genes de interés de las categorías Componentes celulares, Funciones moleculares y Procesos biológicos.

empleó *A. thaliana*. De los 135 genes seleccionados, se observaron conexiones del tipo experimental y predicha entre 50 de ellos.

Dentro de la red generada (**Figura 4.38**), el grafo que presentó la mayor cantidad de nodos (genes interconectados) está específicamente vinculado con la regulación pos-transcripcional. En este grupo se encuentran 14 genes que actúan en cascadas de señales (*BSL3*, Mora-García *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2016), en el clivado y empalme de ARN (*SKIP*, *CTF77*; Wang *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2010), la poliadenización del extremo 3' de los ARNm (*CSTF77*, Liu *et al.*, 2010), el procesado de precursores de ARNm (*RSZ21*, Palusa *et al.*, 2007), transcripción de ADN (*AT4G07950*, *RVE1*, *TOC1*; Spencer *et al.*, 2007; Rawat *et al.*, 2009; Pruneda-Paz *et al.*, 2009), organización estructural de la cromatina (*TOC1*; Pruneda-Paz *et al.*, 2009) y plegado protéico (*FKBP12*, *SQN*; Lu *et al.*, 2007).

Dentro de este grafo se identifica, además, un vértice de corte representado por el gen *SQUINT* (*SQN*), que articula dos subgrafos de ocho y cinco genes (**Figura 4.38**, marcado en violeta). Este gen codifica para una chaperona peptidil-prolil *cis/trans* isomerasa (*PPIasa*) de tipo ciclofilina 40 (*CyP-40*) involucrada en la vía del silenciamiento postranscripcional mediante la activación de *AGO1* (Earley *et al.*, 2010). El subgrafo mayor se encuentra unido al vértice de corte a través del gen *SKIP*, un factor de transcripción de tipo F-box que regula la actividad de genes implicados en la floración y el metabolismo de auxina (Wang *et al.*, 2012). Además, es parte del complejo Skp-Cullin-F-box (*SCF*), que cataliza la ubiquitinación de proteínas destinadas a la degradación (Jackson y Eldridge, 2002). Este complejo multiprotéico también está compuesto por *SKIP18*, otra proteína F-box *sw40* implicada en la desregulación de *AGO1* (Risseeuw *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2009), esto le confiere una actividad opuesta a la del gen *SQN* en la regulación postranscripcional. El subgrafo menor, se encuentra unido al vértice de corte a través de una *PPI* de tipo *FKBP* (*FKBP12*) con homología al gen *SQN* y que presenta actividad chaperona (Nath e Isakov, 2015).

Un hallazgo interesante fue que el ortólogo al gen *FKBP12* de *A. thaliana* es el gen de arroz OS02G0760300, que contiene el marcador RFLP C932 asociado al ACR de *P. notatum* (Podio *et al.*, 2012a; **Sección 4.1.2**) y ortólogo a la secuencia *PPI* *QUIM* detectada en esta Tesis (**Sección 4.1.4**). Un gen homólogo a esta *PPI* fue encontrado en uno de los *scaffolds* (utg0004411) asociados al ACR (*e-value*: $5e^{-31}$, % *ID*: 82.86 %). Asimismo, entre los transcritos diferenciales de *P. notatum* analizados (**Sección 4.3**), se identificó un transcrita codificante sobreexpresado en el genotipo apomítico (TRA_DN48155_CO_G1_i1; Log_2FC : 10,07; *FDR*: $6.69e^{-12}$) asociados a otro gen *PPI* con dominio *FKBP*: OS02G0761100.

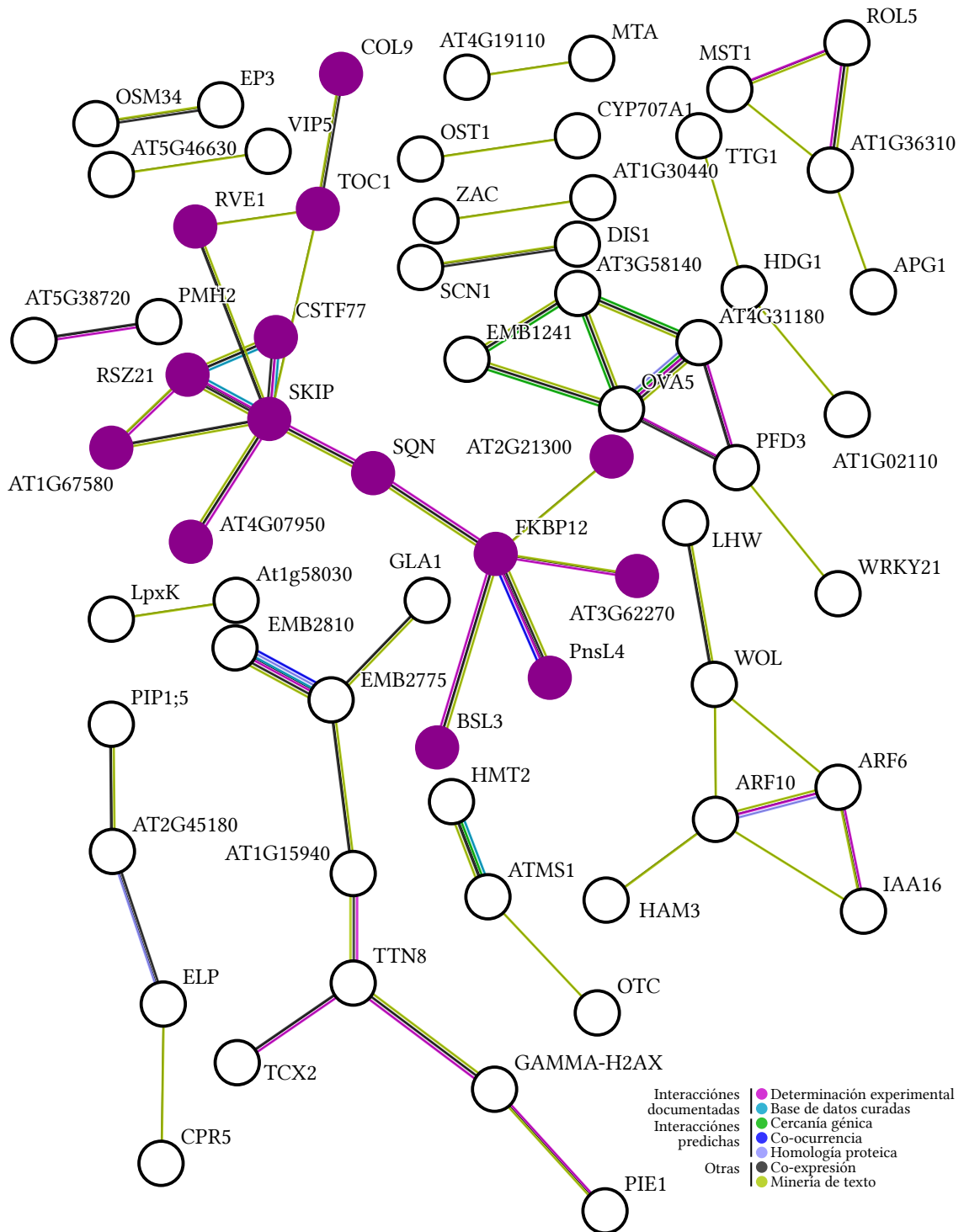


FIGURA 4.38: Análisis de relaciones funcionales entre los genes asociados a procesos reproductivos o del desarrollo vegetal. En el centro de la red (indicado en violeta) se ubica un grafo que agrupa 14 genes de *Arabidopsis thaliana* implicados en la regulación postranscripcional.

Este gen se encuentra en la región del cromosoma Os2 asociada al ACR, localizado en la posición Os2:32.047.766–32.052.300 (**Figura 4.26**), a solo 30 kpb del gen *oso2G0760300* (Os2:32.017.761–32.019.838). El gen ortólogo en *A. thaliana* es el denominado *sqn*, que constituye un nodo sensible del grafo central de la **Figura 4.38**. Estos resultados sugieren una fuerte asociación funcional (además de física) del gen de la *PPI* descrito en la **Sección 3.3.4** de esta Tesis (pág. 46) con el modo de reproducción apomítica.

5. Discusión

P. notatum es una de las especies modelo para el estudio de la apomixis, entre otras razones debido a que: I) existe una colección de germoplasma de la especie en el Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE), CONICET-UNNE que se encuentra completamente caracterizada en cuanto a sus niveles de ploidía y modos de reproducción (Ortiz *et al.*, 2013, 2020); II) se dispone de mapas de ligamiento genético a los niveles diploide (Pessino *et al.*, 1998) y tetraploide (Stein *et al.*, 2007); III) se han desarrollado transcriptomas tanto del desarrollo reproductivo, como de tejido foliar a los niveles $2x$ y $4x$ en donde es posible realizar «minería de genes» para caracteres de interés (Ortiz *et al.*, 2017; de Oliveira *et al.*, 2020); IV) se conoce el complemento completo de los ARN pequeños y sus potenciales secuencias blanco expresadas durante el desarrollo sexual y apomítico en las razas tetraploides (Ortiz *et al.*, 2019); V) se cuenta con sistemas de transformación genética para la realización de estudios funcionales (Mancini *et al.*, 2014); VI) se han identificado varias vías asociadas a la inducción y represión de la aposporía (Mancini *et al.*, 2018; Colono *et al.*, 2019) y VII) se cuenta con programas de mejoramiento avanzados que utilizan la tecnología de apomixis para la generación de nuevos cultivares (Zilli *et al.*, 2018). Además de esto, se ha caracterizado la herencia de la aposporía (Martínez *et al.*, 2001), así como la región genómica que controla a la apomixis (Ortiz *et al.*, 2013).

Este trabajo de Tesis estuvo enfocado a estudiar la conservación y microsintenia de la región genómica responsable de la apomixis (ACR) en la especie, identificar bloques de sintenia conservados y determinar posibles genes candidatos en base al mapeo comparativo y la combinación de datos genómicos y transcriptómicos.

En primer lugar, se realizó una evaluación del modo reproductivo del material vegetal (**Sección 4.1.1**) a fin de contar con una población segregante para estudios de ligamiento. Este análisis confirmó el modo reproductivo de todas las plantas utilizadas durante el trabajo de Tesis. La clasificación de la población híbrida y de las accesiones de *P. notatum*

coincidió con las realizadas por Quarín *et al.* (2001, 2003), Martínez *et al.* (2001), Stein *et al.* (2004) y Espinoza *et al.* (2006). Sin embargo, los valores obtenidos para la expresividad de la apomixis fueron menores a los documentados. En algunos casos la diferencia fue hasta de 23 puntos porcentuales, como se observa en el caso de la accesión Q4012 (ver **Tablas 3.1** y **4.1**). Esta diferencia podría estar dada por el mayor número de ovarios observados en esta Tesis en comparación con los utilizados en los trabajos previos. Sin embargo, está también documentado que la expresividad de la apomixis de un individuo puede variar en el tiempo e incluso entre condiciones distintas de un mismo año. Los estudios de Sailer *et al.* (2016) en híbridos de *Hieracium pilosella* sustentan la hipótesis de que el carácter apomítico podría estar fuertemente regulado por componentes epigenéticos ya que los individuos que mostraron inestabilidades en cuanto a la expresión del carácter evidenciaron, a su vez, inestabilidades en sus marcas epigenéticas. A pesar de que las expresiones del carácter apomítico obtenidas en *P. notatum* resultaron diferentes a las documentadas, las mismas siguen manteniendo un comportamiento bimodal con una variación discontinua, desde niveles bajos a niveles altos, lo cual concuerda con los resultados reportados por Zilli *et al.* (2015) en híbridos de la especie. En particular, el genotipo Q3664 es un individuo con baja expresión de la apomixis en donde el fragmento *Bi*, ligado al ACR, no pudo ser amplificado. Esta accesión fue la única en presentar sacos SEA que no amplificó el marcador SCAR SPNA2 (**Tabla 4.1**), ni el marcador PPI detectado en este trabajo (**Figura 4.9B**). El hecho de que no se detecten estos marcadores específicos del ACR en este genotipo altamente sexual, indicaría que la accesión podría ser un recombinante para los marcadores 100 % ligados al ACR. Esta recombinación hallada entre el marcador molecular y el carácter apomixis representaría una estructura genética diferente a las demás accesiones apomíticas de *P. notatum*. Que este genotipo se destaque respecto a los restantes genotipos apomíticos estudiados podría significar que la región que contiene a los marcadores SCAR SPNA2 y PPI contendría secuencias esenciales para alcanzar la máxima expresividad de la apomixis. El estudio de la estructura genómica al nivel de secuencias de este individuo puede aportar información crucial sobre cuales genes serían «imprescindibles» para lograr una alta expresividad del carácter, así como ayudar a determinar el tamaño preciso del ACR en la especie.

Por otro lado, fue posible observar que los porcentajes de ovarios mixtos (con sacos SEM y SEA) respecto a los netamente apospóricos (únicamente con sacos SEA) superó el 60 % en todos los individuos apomíticos, aún en los ejemplares que registraron alta expresividad del carácter. Engelbert (1941), fue el primero en proponer la existencia de una suerte de competencia intraovárica por el espacio y los recursos existente entre sacos SEM y SEA en plantas apomíticas de *Poa arctica*. Debido a que el resultado final en estos cito-

tipos era el desarrollo de un único embrión de origen apospórico, postuló que los sacos SEA sobrevivían a los SEM por encontrarse en una posición citológica ventajosa cercana a la zona chalazal del ovario. Sin embargo, este no sería el caso en especies del género *Paspalum* ya que la mayoría de los sacos apospóricos muestran localizaciones ectópicas dentro del ovario y normalmente no quedan directamente enfrentados a la micrópila (Soliman *et al.*, 2018). Posteriormente, Nygren (1948) encontró que la vía sexual inicia su desarrollo de forma tardía respecto a la apospórica en individuos apomícticos de *Calamagrostis spp.* Esta heterocronía fue hallada en individuos apomícticos de *Tripsacum dactyloides* (Leblanc y Savidan, 1994), *P. maximum* (Savidan, 2000) y *P. rufum* (Soliman *et al.*, 2018). En *P. malacophyllum*, Hojsgaard *et al.* (2013) concluyeron que la heterocronía presente en los citotipos apomícticos conlleva a la eventual degeneración del saco SEM de los ovarios mixtos por encontrarse en desventaja nutricional al diferenciarse de forma tardía. En el presente estudio, los altos porcentajes de sacos mixtos en ovarios al momento de la anthesis de plantas apomícticas con alta expresividad del carácter podría estar señalando un contexto de competencia, en donde los sacos SEM se encuentran en desventaja debido al desarrollo heterocrónico que presentan (Soliman *et al.*, 2018).

Estudios de mapeo comparativo en varias especies de *Paspalum* determinaron que el ACR se encuentra en una región genómica asociada a un segmento de aproximadamente 5.8 cM del brazo largo del cromosoma 12 de arroz (Pupilli *et al.*, 2004). Sin embargo, solamente en *P. notatum*, además de este segmento, se encontró asociación con un sector del cromosoma 2 de arroz (Pupilli *et al.*, 2004; Podio, 2013). A fin de validar la asociación del segmento del cromosoma Os2 con la región responsable de la apomixis en *P. notatum*, se desarrolló un marcador de PCR en base a una de las secuencias completamente ligadas reportadas por Pupilli *et al.* (2004). En este trabajo, a partir del clon C932, se validó la presencia de una secuencia quimérica de la especie dentro del ACR que presenta homología simultánea con un gen *PPI* y una chaperona *DNAJ*.

Es interesante destacar que varios estudios, concernientes al ACR en especies del género *Paspalum* han identificado la presencia de pseudogenes o secuencias no codificantes con homología a *loci* de copia única dentro del ACR. Por ejemplo, Mancini *et al.* (2018) identificaron en *P. notatum* la secuencia no codificante *PnLNC_QGJ* ligada al ACR que presenta un segmento idéntico al gen *MAP3K* que podría tener una función regulatoria. El gen funcional *MAP3K* segrega de forma independiente con la apomixis y su regulación negativa produce una disminución significativa de los sacos embrionarios de tipo apospóricos (Mancini *et al.*, 2018). Por otro lado, en *P. simplex*, el pseudogen *PsORC3a* también se halló ligado completamente al ACR (y ausente en los genotipos sexuales). Su

expresión se encontró asociada a la represión de su parálogo funcional (*PsORC3b*) presente tanto en plantas sexuales como apomícticas (Siena *et al.*, 2016). Se especula que este sistema posibilitaría el desarrollo del endosperma de las semillas apomícticas que se desvía de la relación genómica canónica de las gramíneas 2 materna:1 parterna (Siena *et al.*, 2016). Llamativamente, en el presente trabajo, la secuencia genómica *PPI*, ligada al ACR (**Secciones 4.1.3 a 4.1.5**), transcribe el isotig33823, codificante para un transcrito quimérico. Esta secuencia podría codificar para una proteína específica, de funciones novedosas o bien, podría ser una secuencia que no se traduzca a una proteína. A su vez, el isotig32671 encontrado únicamente en el transcriptoma del genotipo apomíctico también presenta homología a genes de *PPIS* y es de naturaleza pseudogénica. De forma análoga a lo descrito por Siena *et al.* (2016), para las secuencias *PsORC3a-like*, estos dos transcritos no codificantes podrían estar implicados en vías de silenciamiento que actúan sobre el gen *PPI* funcional. Para validar esta hipótesis deberían llevarse a cabo experimentos de correlación de expresión entre los transcritos *PPI* en los híbridos apomícticos mediante reacciones de PCR en tiempo real utilizando ARN de diferentes etapas del desarrollo floral, así como estudios funcionales para determinar si el gen *PPI* QUIM juega algún papel en el desarrollo reproductivo.

A fin de analizar la sintenia de los bloques cromosómicos de arroz asociados al ACR en especies de gramíneas se realizaron experimentos de comparación de macro y microsintenia. Las gramíneas son, hasta el momento, la familia más estudiada en el reino vegetal (Gaut, 2002) y los recientes avances en la secuenciación y tecnologías de genotipado han ayudado en el análisis comparativo de los genomas de especies relacionadas. La disponibilidad de herramientas bioinformáticas de reciente desarrollo ha aumentado la utilización de esta información aplicada a los programas de mejoramiento de cultivos (Xiao *et al.*, 2013). Sobre la base de la homología de secuencias, sumado a la disposición de marcadores moleculares, se pudo realizar una comparación entre los genomas de arroz, *S. bicolor*, *S. italica*, *B. distachyon* y *P. notatum*. En la **Sección 4.2**, referidas a los estudios de sintenia entre las regiones de arroz vinculadas con el ACR de *P. notatum* y sus correspondientes homologías en diferentes especies de gramíneas, se identificaron en primer lugar los cromosomas con mayor número de genes ortólogos a los cromosomas Os2 y Os12 de arroz. Los resultados obtenidos están en total concordancia con reportes de sintenia previos desarrollados mediante marcadores moleculares (Nagamura *et al.*, 1995; Gale y Devos, 1998; Ventelon *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2005; Galla *et al.*, 2019). Para el caso de *S. bicolor*, tanto Gale y Devos (1998) como Ventelon *et al.* (2001) hallaron bloques de marcadores de RFLP del cromosoma Os2 y Os12 en los grupos de ligamiento D e I, respectivamente. El primer grupo de ligamiento pertenece al cromosoma Sb4 de *S. bicolor*,

mientras que el segundo corresponde al cromosoma Sb8 (Kim *et al.*, 2005). Además, en un estudio reciente se identificaron regiones sinténicas al Os12 sobre el cromosoma Sb8 de *S. bicolor* (Galla *et al.*, 2019).

En cuanto a *S. italica*, Gale y Devos (1998) utilizaron marcadores de RFLP para reportar la asociación entre los cromosomas Os2 y Os12, y los cromosomas Si1 y Si3 (respectivamente), lo cual pudo ser claramente confirmado en nuestro análisis. Esto concuerda además con los resultados de Galla *et al.* (2019), donde se identificaron regiones sinténicas del Os12 en el cromosoma Si3. Por otro lado, Devos *et al.* (1998) encontraron marcadores adicionales del Os12 que mapeaban sobre el cromosoma Si7, y del mismo modo, asociaron al Os11 con el Si8. En la construcción del mapa genético de arroz mediante marcadores de RFLP, Nagamura *et al.* (1995) identificaron una duplicación intercromosómica de 12 cM en las regiones distales de los brazos cortos del Os11 y Os12 de arroz. Los estudios de Devos *et al.* (1998) complementaron esta evidencia y, debido a que las regiones sinténicas en *S. italica* también aparecen duplicadas entre los cromosomas Si7 y Si8, concluyeron que este rearrreglo cromosómico se desarrolló previamente a la especiación de arroz y *S. italica*. En nuestros resultados observamos una homología mixta de *S. italica* respecto al cromosoma Os12, ya que el mismo se encuentra asociado al Si3 y al Si7. Los 5,8 Mpb de la región distal del brazo corto del Os12 que muestra sintenia con regiones del brazo largo del Si7 corresponde claramente con las duplicaciones documentadas entre el Si7 y el Si8 (cromosoma ortólogo al Os11) y entre el Os11 y Os12.

El genoma de la especie modelo *B. distachyon* fue secuenciado por primera vez por *The International Brachypodium Initiative* en 2010, y los estudios derivados identificaron bloques de sintenia del Os2 translocados únicamente a regiones del Bd3. De forma análoga, los bloques de sintenia del cromosoma Os12 fueron identificados en el Bd4. Ambas relaciones sinténicas son coherentes con los resultados de Galla *et al.* (2019) y lo hallado en nuestro estudio.

La identificación de los bloques de sintenia pertenecientes a ambas regiones de arroz asociadas al ACR no evidenciaron translocaciones conjuntas entre ellas al compararlas con los genomas de *S. bicolor*, *S. italica* y *B. distachyon*. Sin embargo, sí se registraron rearrreglos cromosómicos como inversiones completas entre el Os2 y el Bd3 de *B. distachyon*, y entre el Os2 y el Sb4 de *S. bicolor*, especie donde se ha documentado apomixis (Elkonin *et al.*, 2012; Tsvetova *et al.*, 2019). El descubrimiento de líneas tetraploides de *S. bicolor* con reproducción apospórica realizada por Hanna *et al.* en 1970 fue seguida, desde entonces, por otros estudios citoembriológicos que determinaron valores de 3 y

14 % de aposporía tanto para líneas diploides como tetraploides, respectivamente (Carman *et al.*, 2011). El mejoramiento de líneas diploides ha alcanzado actualmente valores desde 28,00 a 96,10 % de semillas de origen apomíctico (Elkonin *et al.*, 2012; Tsvetova *et al.*, 2019). Los rearrreglos en *S. bicolor* encontrados en esta Tesis podrían estar asociados a la capacidad de apomixis en las líneas estudiadas. Aunque en *S. italica* y *B. distachyon* no se registraron deleciones en las regiones de estudio, la Hipótesis 1 de la Tesis (que postula que «los bloques cromosómicos de arroz que presentan sintenia con el ACR de *P. notatum* se encuentran conservados en los genomas de otras gramíneas»), resulta parcialmente correcta debido a que en *S. bicolor* hemos registrado la deleción de una secuencia que contiene al homólogo del marcador Co996 ligado a la apomixis.

Por otro lado, el estudio comparativo que realizamos entre los cromosomas Os2 y Os12 de arroz respecto a sus ortólogos en las tres gramíneas analizadas, evidenció fragmentos invertidos relativamente extensos (de 3 a 15 Mpb) con microcolinealidad génica conservada. La mayoría de las inversiones se encontró en las regiones subtelméricas de los brazos largos de ambos cromosomas de arroz. Estas regiones son de particular interés por contener secuencias ligadas al ACR de *P. notatum*. El análisis detallado de ambas regiones cromosómicas reveló que son fragmentos de relativa inestabilidad, que han sido afectadas por diversos rearrreglos cromosómicos durante los procesos evolutivos de las especies. Esto confirma que los bloques de sintenia asociados al ACR en especies de gramíneas presentan inserciones y deleciones que interrumpen la microcolinealidad. Estos resultados nos llevarían a rechazar una conservación estricta de los bloques asociados al ACR, sobre todo en lo relativo al segmento del cromosoma Os12.

En el estudio sobre las especies del género *Oryza*, la mayor cercanía evolutiva se reflejó en la alta conservación sinténica de estas regiones. Sin embargo, en *O. nivara* se halló una gran inestabilidad cromosómica caracterizada por deleciones de segmentos y translocaciones de bloques de sintenia hacia otros cromosomas. La relación entre estos dos genomas se analizó con mayor profundidad permitiéndonos identificar bloques particulares de los cromosomas Os2 y Os12 que sufrieron translocaciones hacia los cromosomas On12 y On2, respectivamente, durante su especiación. A pesar de que hasta el momento no se han encontrado indicios de sacos embrionarios de tipo apospórico o diplospórico en *O. nivara* (Virmani *et al.*, 1998), sería importante realizar nuevos estudios sobre la especie con mayor cantidad de observaciones, ya que la conjunción hallada en nuestro estudio es una evidencia de que segmentos del Os2 y Os12 podrían haberse translocado durante la especiación de *P. notatum* para integrar el ACR. Estos resultados indican que ambas regiones de arroz asociadas a la apomixis en *P. notatum* han sufrido

cambios durante la especiación y probablemente la conjunción de pérdidas de microcolinearidad por inversiones o por migración de genes esté asociada a la desregulación de la expresión génica en estas regiones. Es de destacar que varios genes que componen estos bloques tienen anotaciones funcionales asociadas al desarrollo reproductivo en plantas. Por ejemplo, el gen OS12G0570000 (ortólogo al ONIVA02G22010) codifica para una proteína de tipo ARMADILLO. Se ha descrito que proteínas de este tipo actúan como control materno del desarrollo inicial del embrión y endosperma en *A. thaliana* ya que mutantes defectivas en el gen *ARM* muestran un fenotipo caracterizado por la detención del crecimiento del endosperma y del embrión, el cual adopta la forma característica que le da nombre al gen (Ngo *et al.*, 2012). En *A. thaliana* el gen *TRANSPARENT TESTA GLABRA 1 (TTG1)* codifica para una proteína con repetición WD40 con funciones pleiotrópicas asociadas a la biosíntesis de flavonoides, la cubierta mucilaginoso de la semilla, la acumulación proteica y lipídica en el endosperma, y desarrollo de tricomas en hojas, tallos y raíces (Larkin *et al.*, 1994; Shirley *et al.*, 1995; Walker *et al.*, 1999; Western *et al.*, 2001). Recientemente este gen a sido vinculado con el control del desarrollo en *S. italica* (Liu *et al.*, 2017) y con el tiempo a floración en *A. thaliana* (Paffendorf *et al.*, 2019). La proteína THAUMATIN pertenece a una familia proteica relacionada con la resistencia a la patogénesis (proteínas PR) que se sintetiza en etapas donde la planta adquiere resistencia sistemática a factores tanto bióticos como abióticos. En particular, las proteínas THAUMATIN tienen efecto antifúngico y fueron detectadas en los estigmas de *N. tabacum* durante la polinización (Vigers *et al.*, 1992; Kuboyama, 1998). Estos genes se expresan en tejidos ováricos durante la diferenciación floral de *N. tabacum* (Richard *et al.*, 1992; Skadsen *et al.*, 2000) y se encuentran sobreexpresados en ovarios en desarrollo respecto a ovarios abortivos de árboles de *Corylus spp.* (Liu *et al.*, 2018b).

Una de las hipótesis vigentes sobre el origen de la apomixis sostiene que la misma está controlada por genes codificantes para proteínas nuevas con funciones novedosas no observadas en la reproducción sexual, desencadenadas por procesos de mutación génica —«teoría de la mutación», propuesta por Koltunow y Grossniklaus (2003)—. En línea con esta teoría, en este trabajo se demostró que la expresión de un gen quimérico (PPI QUIM) solamente en los tejidos reproductivos apomícticos, deriva de una secuencia específica del ACR. En este sentido, las técnicas focalizadas en la transcriptómica comparativa buscan identificar genes específicos de plantas apomícticas o que estén diferencialmente expresados entre éstas y su contraparte sexual (Ortiz *et al.*, 2017). Distintos estudios han encontrado genes con expresión diferencial entre individuos sexuales y apomícticos de *E. curvula* (Cervigni *et al.*, 2008; Selva *et al.*, 2012), *P. ciliare* (Vielle-Calzada *et al.*, 1996; Singh *et al.*, 2007), *H. pilosella* (Guerin *et al.*, 2000), *P. maximum* (Yamada-Akiyama *et al.*,

2009) y *P. notatum* (Pessino *et al.*, 2001; Laspina *et al.*, 2008; Podio *et al.*, 2014b; Mancini *et al.*, 2018). Mientras que la identificación en estos trabajos se realizó *in vivo*, en nuestro estudio hemos planteado una búsqueda de patrones diferenciales *in silico* realizando una minería de los transcriptomas florales de *P. notatum* (**Sección 4.3**).

En *P. pratensis* diferentes estudios de expresión génica utilizaron la técnica de ADNC-AFLP e identificaron dos genes candidatos: *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE* (*PpSERK*) y *APOSTART* (Albertini *et al.*, 2005). El primero es una serina/treonina y tirosina quinasa que actuaría permitiendo la formación del saco embrionario a partir de la célula inicial de la aposporía. En *P. notatum*, Podio *et al.* (2014b) estudiaron un ortólogo del gen, denominado *PnSERK2*, que presenta un patrón de expresión alterado en los tejidos reproductivos de individuos apomícticos respecto a los sexuales, y se encuentra únicamente en tejidos nucelares durante la meiosis del genotipo apomíctico mientras que en el sexual solo se evidencia en la célula madre de la megáspora. Nuestra búsqueda BLASTn usando la secuencia del gen (GenBank®: aj841698.1) contra la base de arroz del Gramene® encontró como potencial ortólogo al OS06G0274500 ($e\text{-value} = 4,2e^{-4}$), descrito como semejante al gen *SERK1* y que hemos hallado vinculado con un transcripto codificante sobrepresado en el genotipo apomíctico. El gen *APOSTART* contiene un dominio START de unión a lípidos y los dobles mutantes de *A. thaliana* para *apostart 1* y *apostart 2* sugieren que este gen tiene un rol de importancia en el desarrollo del embrión y la semilla (Albertini *et al.*, 2005; Barcaccia y Albertini, 2013). Ambas secuencias *APOSTART* (GenBank®: aj786392.1 y aj786393.1) presentan homología con el gen de arroz OS06G0116500 ($e\text{-value} = 1,2e^{-7}$), que codifica para una proteína con dominio pleckstrínico, y que detectamos, en este análisis, asociado a un transcripto no codificante sobrepresado en el genotipo apomíctico (aunque no hemos encontrado representantes de estos genes dentro de las regiones estudiadas del Os2 y Os12).

Los genes de arroz OS12G0616200 y OS12G0595000 contienen similitud de secuencias con el clon C996a —ligado al ACR— y con el gen *PnEXS* (respectivamente; Pupilli *et al.*, 2004; Podio, 2013). En esta Tesis, ambos genes de arroz fueron identificados por presentar homología con secuencias de transcriptos no codificantes sobrepresados en el genotipo apomíctico de *P. notatum*. Otro gen documentado como diferencialmente expresado es el *PnTGS1-like*, cuyos transcriptos fueron encontrados en cuantías significativamente mayores en espiguillas de genotipos sexuales respecto a las apomícticas (Laspina *et al.*, 2008; Siena *et al.*, 2014). Este gen es ortólogo al OS03G0396900 de arroz, que en nuestro trabajo encontramos asociado un transcripto codificante diferencial sobrepresado en el genotipo apomíctico, de forma contraria a lo documentado. Esta diferencia podría deberse a la

forma en la que hemos promediado las bases de expresión de los cuatro estadios florales (premeiosis, meiosis, posmeiosis y antesis), ya que la diferencia de expresión documentada por Siena *et al.* (2014) se presenta únicamente en el último de los estadios florales. Respecto al gen de *P. simplex* *PsORC3b*, con expresión diferencial en tejidos reproductivos del genotipo sexual, no hemos encontrado transcritos diferenciales asociados a su ortólogo en arroz (OS10G0402200).

En el análisis de la base del transcriptoma floral de *P. notatum*, identificamos transcritos diferenciales sobrepresados tanto en el genotipo sexual como en el apomíctico. El bajo porcentaje de transcritos diferenciales respecto al total (7,01 %) señala la baja proporción de genes que se encontrarían alterados en el citotipo apomíctico durante la reproducción. Sin embargo, este porcentaje representa una cantidad de genes imposible de estudiar individualmente mediante validación por mapeo experimental y posterior análisis funcional (~ 13.000 genes). Por esta razón, y de forma semejante al mapeo *in silico* realizado por Laspina *et al.* (2008), hemos acotado la búsqueda a genes directamente vinculados con regiones de arroz asociadas al ACR de *P. notatum*. En nuestro mapeo identificamos 638 genes de estas regiones de arroz vinculados con transcritos diferenciales (411 del cromosoma Os2 y 227 del cromosoma Os12). Además, la categorización previa de los transcritos agrupándolos en codificantes y no codificantes nos permitió conocer el paisaje de transcritos con potencial rol regulatorio.

Los transcritos no codificantes (ARNnc, por ARN no codificante) integran una familia de moléculas que regulan la expresión génica tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional (Zaratiegui *et al.*, 2007), y por lo tanto forman parte de la regulación fina de diferentes procesos biológicos incluidos los reproductivos (Li *et al.*, 2015). Los reportes en continuo crecimiento de diferentes ARNnc largos indican que existen de forma ubicua en el reino vegetal con funciones conservadas (Zhang y Chen, 2013). En especies modelos como *A. thaliana* y arroz se detectaron transcritos no codificantes relacionados con el tiempo a floración (Yamaguchi y Abe, 2012), y con el desarrollo de las estructuras florales y su fertilidad (Zhang *et al.*, 2014).

En *P. notatum* se reportaron dos casos de este tipo de transcritos vinculados con el carácter apomíctico: el gen *PnLNC_QGJ* (Mancini *et al.*, 2018) y el *PnLNC_N13* (Ochogavía *et al.*, 2018). En el primer caso, los autores identificaron dos transcritos de *P. notatum* con homología a un gen que codifica para una quinasa activada por mitógenos (MAP3K). Uno de ellos, denominado *QUI-GON JINN* (*QGJ*), codifica para la proteína funcional. El otro, denominado *PnLNC_QGJ*, se encuentra localizado en el ACR y corresponde a un trans-

cripto no codificante que podría estar regulando la expresión del primero. La proteína MAP3K está implicada en la cascada de señalización del ácido abscísico (ABA) y el armado del citoesqueleto, y que es esencial en diferentes procesos del desarrollo vegetal como, por ejemplo, la transición desde el desarrollo vegetativo al reproductivo (Matsuoka *et al.*, 2018). En individuos apomícticos de *P. notatum*, *QGJ* se expresa en la nucela de los ovarios apospóricos y cuando su expresión es inhibida, los fenotipos evidencian reducciones significativas en la proporción de sacos SEA. El trabajo de Mancini *et al.* (2018) identificó como potencial ortólogo del *QGJ* al gen de arroz OS11G0207200 (*e-value* = 0,0), que en nuestros análisis se encontró asociado a transcritos no diferenciales. No obstante, también señalaron como potencial ortólogo al gen de arroz OS02G0666300 (*e-value* = $3e^{-58}$), que se encuentra localizado en la región asociada al ACR del Os2, y que, en el presente trabajo, se halló vinculado con un transcripto codificante diferencial sobrepresado en el genotipo apomíctico, de forma concordante con lo detallado en la publicación mencionada (Mancini *et al.*, 2018).

El otro caso mencionado de genes no codificantes de *P. notatum* es el gen *PnLNC_N13*, que Laspina *et al.* (2008) encontraron expresado diferencialmente entre plantas sexuales y apomícticas. Posteriormente, Ochogavía *et al.* (2018) identificaron que un fragmento de este gen se transcribe en un ARNnc con homología parcial a un gen *RESPONSE REGULATOR 6* de *Z. mays* (GenBank®: bt068773). En arroz, la secuencia *PnLNC_N13* presenta homología con el gen OS12G0139400, localizado por fuera de la región de estudio que definimos para el cromosoma Os12, y que no encontramos diferencial entre los genotipos sexual y apomíctico. Ochogavía *et al.* (2018) también describieron otros miembros de la familia del *PnLNC_N13* que mostraron homología parcial con los genes *F-BOX* de *Z. mays* (GenBank®: xm_008674592), una *DEAD-BOX ATP-DEPENDENT RNA HELICASE 52C* de *O. sativa* (GenBank®: xm_015762339), y una *PPI* con dominio FKBP12 de *Z. mays* (GenBank®: eu959401), ortólogo al gen de arroz OS02G0760300. En nuestro mapeo transcriptómico de la **Sección 4.3**, tres genes *PPI* del Os2 fueron asociados a transcritos codificantes sobrepresados en el genotipo apomíctico: OS02G0117600, OS02G0491400 y OS02G0761100, estando este último localizado en la región de estudio sinténica al ACR.

Aunque la cantidad de transcritos codificantes de *P. notatum* sobrepresados en el genotipo apomíctico resultó mayor respecto a los transcritos codificantes sobrepresados en la base sexual (**Figura 4.23**), el mapeo de los mismos sobre los cromosomas de arroz no evidenció un patrón distintivo entre ellos (**Figura 4.25**). Respecto a los no codificantes sí se observó localizaciones contrastantes, particularmente en las regiones centroméricas y subcentroméricas de los cromosomas, donde la cantidad de transcritos

sobreexpresados en la base sexual fue nula o escasa. Esto se acentuó más en los cromosomas Os2 y Os12, donde se encuentran las regiones sinténicas al ACR (**Figura 4.28**). Lo anterior permite corroborar la Hipótesis 2, que postula que «genes localizados en el ACR de *P. notatum* presentan expresión diferencial entre individuos sexuales y apomíticos».

En la **Sección 4.4.1**, concerniente a la caracterización de la región asociada al ACR en el genoma diploide, se analizaron en detalle diez *scaffolds* conteniendo secuencias ligadas al ACR del citotipo tetraploide. En este estudio, se pudieron realizar estudios de sintenia usando como referencia a los cromosomas Os2 y Os12 de arroz y detectar varios genes asociados a transcritos con expresión diferencial entre el citotipo sexual y apomítico de *P. notatum*. Considerando aquellos genes predichos de *P. notatum* en los que encontramos homología con secuencias de genes de arroz, podemos aseverar que hay una alta conservación de la microcolinealidad génica. En un estudio sinténico comparando el ACR de *P. simplex* con el cromosoma Os12, Galla *et al.* (2019) encontraron que el gen OS12G0616400 (localizado entre el OS12G0616200 y el OS12G0616500), se encuentra reemplazado por siete genes en *P. simplex* cuyos ortólogos en arroz no forman parte del mismo bloque sinténico. En nuestro caso, el gen de arroz OS12G0616400 está reemplazado en *P. notatum* por una secuencia con homología al locus LOC112873752 de *P. hallii*. Curiosamente, este gen es ortólogo al OS02G0776900 de arroz, un activador transcripcional inducido por giberelinas, que está localizado en el brazo largo del cromosoma, a solo 0,32 Mpb de la región de estudio definida en este trabajo. Este rearrreglo génico puntual encontrado entre arroz, *P. simplex* y *P. notatum* resulta interesante porque evidencia una vez más la inestabilidad de las regiones que controlan la apomixis en ambas especies de *Paspalum*.

Basados en estudios de marcadores moleculares *in vivo* en *P. notatum*, Stein *et al.* (2007) estimaron que el ACR estaría conformado por una región cromosómica de al menos 36 Mpb. Por lo tanto, los *scaffolds* analizados en este estudio (2,92 Mpb en total) corresponden aproximadamente solo una porción (8,1 % de la longitud total) del ACR. Considerando el reducido tamaño de los ensamblados preliminares con los que contábamos (0,58 Mpb el de mayor longitud) y el bajo número que seleccionamos para el análisis, no fue posible corroborar o descartar la Hipótesis 3 de este trabajo, que plantea que «la estructura genética del ACR de *P. notatum* es específica de la especie y se encuentra presente también al nivel diploide».

A pesar de lo anterior, debido a que en los *scaffolds* estudiados hemos encontrado homología con secuencias de marcadores del ACR, y a su vez hemos identificado una

cantidad contundente de secuencias con homologías a genes de arroz localizadas en las regiones sinténicas al ACR tetraploide, podemos suponer que los mismos pertenecen a regiones cromosómicas conservadas en ambos citotipos. Además, uno de los *scaffolds* estudiados presentó homología tanto con el Os2 como con el Os12, y conformaría una evidencia en este estudio de que a nivel diploide la estructura híbrida del ACR estaría conservada. A pesar de que el arroz sea considerado como modelo de estudio y referencia para la mayoría de los estudios en especies gramíneas, existen otras especies filogenéticamente más relacionadas con el género *Paspalum* (Soreng *et al.*, 2015). Proponemos, por lo tanto, repetir este análisis cuando se disponga de los *scaffolds* completamente ensamblados e incluir como referencia al genoma de *S. italica*, que al estar más relacionada filogenéticamente con *P. notatum* podría esclarecer las relaciones sinténicas halladas con arroz.

Finalmente, en la **Figura 5.1** se esquematizan los genes mencionados en esta Tesis y su rol en los diferentes eventos durante el desarrollo reproductivo en plantas. A partir de los resultados obtenidos en este estudio se identificaron varios genes localizados en las regiones conservadas del ACR y/o diferencialmente expresados durante el desarrollo sexual y apomíctico que presentan homología a secuencias de interés. Algunos de los genes fueron identificados en más de un análisis, como se detalla en la **Tabla A.9**. De los mismos destacamos cinco genes de potencial importancia en futuros estudios de la apomixis:

1. El transcripto apomíctico *PPI QUIM* de *P. notatum* presenta homología con secuencias del gen *PPI* de tipo FKBP de arroz (Os02G0760300). Este gen ya había sido identificado por Podio *et al.* (2012a) por presentar homologías con marcador C932 ligado al ACR de *P. notatum*. Adicionalmente, en la caracterización de los *scaffolds* del genotipo diploide de *P. notatum* asociados al ACR (**Sección 4.4.2**), se detectó una secuencia genómica codificante homóloga al gen de arroz Os02G0760300. Estas evidencias indican que el gen *PPI* no solo se encontraría dentro del ACR sino que se expresa de forma diferencial entre los genotipos sexual y apomíctico debido a la presencia de un transcripto quimérico específico para la reproducción apomíctica. Este transcripto podría estar controlando la expresión del gen *PPI* funcional afectando la reproducción sexual o desencadenando el desarrollo apomíctico. Otro gen *PPI* identificado en esta Tesis por su relación con la apomixis fue el Os02G0761100. Esta *PPI* de tipo ciclofilina se localiza en el Os2 a 27,9 kb corriente abajo del gen Os02G0760300. Una secuencia homóloga al gen de arroz fue encontrada en los *scaffolds* estudiados del citotipo R1, y a su vez se detectaron transcriptos no codifican-

mitocondrial, involucrado en el control del crecimiento de los integumentos y en el desarrollo del saco embrionario (Schneitz *et al.*, 1998). Los mutantes para este gen se caracterizan por la degeneración de la ovocélula y por la detención en el desarrollo del óvulo durante la formación de los integumentos (Skadsen *et al.*, 2000). El gen presenta homología con la secuencia del marcador C996a del ACR de *P. notatum* y una secuencia homóloga al mismo pudo ser identificada en la caracterización de los *scaffolds* estudiados del citotipo diploide de *P. notatum*. Ambos hechos señalan que muy probablemente una copia de este gen está emplazada en el ACR de la especie. Interesantemente, transcritos no codificantes con expresión diferencial entre los genotipos sexual y apomíctico de *P. notatum* fueron identificados por presentar homología con secuencias del gen OS12G0616200. Esto indica que el transcripto del gen no codificaría para una proteína funcional (de forma semejante al gen PPI QUIM) sino que podría estar actuando en mecanismos de la regulación fina asociada al desarrollo apomíctico.

3. El gen *EXS* (OS12G0595000) es un receptor de quinasas que regula la cantidad de células iniciadoras de los microsporocitos y el tamaño celular del embrión en *A. thaliana* (Canales *et al.*, 2002). La familia *EXS* que incluye proteínas que llevan tres dominios: *ERD1*, *XPR1* y *SYG1*. *ERD1* participa en la localización en el retículo endoplásmico endógeno, *XPR1* está asociado con los receptores del virus de la leucemia murina₉, y *SYG1* está relacionado con la transducción de señales en *Saccharomyces cerevisiae*. Aunque la función de la proteína *EXS* en plantas aún se desconoce, una forma truncada del dominio *SYG1* se ha asociado con la proliferación en células de levadura que de otro modo se detienen, una función que se asemeja a la aposporia, uno de los componentes de la apomixis (Spain *et al.*, 1995). Además, el análisis de secuencia de un BAC ligado a apomixis en *P. simplex* identificó dos proteínas con homología a la familia *EXS* (*PSEXS*) y al dominio quinasa (*PSPKD*; Pupilli *et al.*, 2004). De forma similar a los casos anteriores, encontramos una secuencia génica homóloga al *EXS* de arroz en los *scaffolds* del genotipo diploide de *P. notatum*. Además, identificamos un transcripto no codificante con expresión diferencial entre el genotipo sexual y apomíctico de que presentó homologías con este gen.
4. El gen *TRANSPARENT TESTA GLABRA* (*TTG1*) conforma, con otros ocho genes, el bloque de sintenia B5 que, en los estudios de la **Sección 4.2.3**, encontramos translocado entre el cromosoma 2 de arroz y el 12 de *O. nivara*. Este mismo gen (OS02G0682500) presentó homología con la secuencia de un transcripto codificante sobreexpresado en el genotipo apomíctico en los estudios de la **Sección 4.3**. La proteína que codifica *TTG1* tiene una repetición WD40 (Walker *et al.*, 1999), las cuales tienen un rol

central en los procesos biológicos, ya que actúan como andamiaje en la interacción entre proteínas, péptidos y ácidos nucleicos (Stirnimann *et al.*, 2010). La cubierta seminal externa (testa) de los mutantes para *ttg1* no acumula proantocianinas durante su desarrollo, por lo que se generan semillas amarillas (Koorrneef, 1981). Por otro lado, en estas mutantes se altera la activación de los tricomas presentando hojas y tallos glabros (Galway *et al.*, 1994; Zhao *et al.*, 2008; Brueggemann *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2020), y se acelera el cambio del estadio vegetativo al reproductivo (Paffendorf *et al.*, 2019). Recientemente, se ha determinado el rol de *TTG1* en la regulación de la biosíntesis de cutina mediante el control de la expresión de diferentes genes (Li *et al.*, 2020a), entre ellos el citocromo P450, el cual ha sido asociado varias veces a la apomixis (Laspina *et al.*, 2008; Ochogavía *et al.*, 2011; Okada *et al.*, 2013; Rabiger *et al.*, 2016; Zühl *et al.*, 2019).

5. El gen *MT-A70* codifica para una N⁶-adenosina-metiltransferasa, que en arroz está localizado en la región del Os2 sinténica al ACR (Os02G0672600). La metilación de adenosinas (m⁶A) es una modificación epigenética común en los ARNm que no alteran su capacidad de codificación a proteína (Li *et al.*, 2019). La modificación es catalizada por metiltransferasas con dominio MT-A70 que en conjunto con enzimas desmetilasas, controlan de forma dinámica el estado de las marcas m⁶A (Balacco y Soller, 2019). La expresión de este gen está asociada a tejidos en división activa de órganos reproductivos y meristemas de tallos y raíces (Zhong *et al.*, 2008), y su alteración generan fallas en el desarrollo del embrión luego de su estadio globular, generando semillas deficientes en marcas m⁶A de su ARNm, pérdida de dominancia apical y defectos en el número y tamaño de los órganos florales en *A. thaliana* (Zhong *et al.*, 2008; Bodi *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2018). Una secuencia codificante con homología a este gen fue identificada en los *scaffolds* del citotipo R1. Además, un transcripto codificante con homología al *MT-A70* fue detectado como diferencial entre los genotipos sexual y apomítico.

Nuestros resultados refinan las hipótesis previas relacionadas con la maquinaria de regulación génica que se asocia al desarrollo reproductivo, ya que varios genes presentes en el ACR están, a su vez, diferencialmente expresados entre ambos modos reproductivos, y además se asocian a transcriptos no codificantes para proteínas. La importancia de estos últimos viene dada por su implicancia en el control fino de la expresión de otros genes.

6. Conclusiones

Los estudios realizados en este trabajo de Tesis se enfocaron en profundizar el conocimiento de las relaciones de sintenia de las regiones de arroz asociadas al ACR de *P. notatum* en diferentes especies de gramíneas. Los resultados experimentales sobre la caracterización del material vegetal y la validación de genes ligados al ACR (**Sección 4.1**) nos permiten llegar a las siguientes conclusiones:

1. Se confirmó el modo reproductivo de todas las plantas que se utilizaron durante el trabajo de Tesis. El genotipo Q3664, con muy baja expresividad de la aposporía, fue el único que no presentó el marcador SCAR SPNA2 y tampoco amplificó la banda *Bi*. Este genotipo sería un recombinante de la región ACR.
2. Se identificaron ocho transcritos similares a la *PPI* de arroz que se expresan en el transcriptoma floral de *P. notatum*.
3. Se validó la asociación del segmento del cromosoma 2 de arroz con el ACR a partir del mapeo de secuencias homólogas a *PPIS*.
4. Se determinó que la secuencia de la *PPI* presente en el ACR (*PPI QUIM*) se transcribe como un gen quimérico en el cual se encuentran los dominios FKBP_C y DNAJ.
5. El transcritto *PPI QUIM* tiene una expresión exclusiva en el genotipo apomítico durante el desarrollo reproductivo.
6. El marcador *Bi* detectado puede implementarse como herramienta para la clasificación de las plantas según su modo reproductivo. Su detección es más sencilla que la del marcador SCAR SPNA2 ya que puede visualizarse en geles de agarosa.

A partir de los resultados obtenidos en los estudios de sintenia entre las regiones de arroz vinculadas con el ACR de *P. notatum* y sus correspondientes homologías en diferentes especies de gramíneas (**Sección 4.2**), es posible arribar a las siguientes conclusiones:

1. Las regiones de los cromosomas Os₂ y Os₁₂ de arroz asociadas al ACR de *P. notatum* presentan rearrreglos cromosómicos en varias de las especies de gramíneas analizadas, por lo cual, es probable que hayan sufrido cambios durante la especiación.
2. La presencia de rearrreglos cromosómicos (inversiones y translocaciones) entre los cromosomas Os₂ y Os₁₂ de arroz y sus homólogos en *S. bicolor*, *S. italica* y *B. distachyon*, y, particularmente, los bloques de sintenia encontrados en *O. nivara* que involucran translocaciones semejantes a las hallados en el ACR de *P. notatum*, respalda las evidencias previas que indican que el ACR de *P. notatum* está asociado a regiones cromosómicas inestables.
3. En *S. bicolor*, especie donde se ha documentado a la apomixis, se registra una inversión de 6 Mpb confinada dentro de la región ligada al ACR, lo cual indica una posible asociación entre la estructura y función de la región.

Los resultados provenientes de los análisis de las bases de transcriptos florales de *P. notatum* y su mapeo en los cromosomas de arroz (**Sección 4.3**), nos permite concluir lo siguiente:

1. La mayoría de los transcriptos diferenciales son secuencias codificantes sobrepresadas en el genotipo apomítico.
2. Los cromosomas de arroz que presentan las mayores proporciones de transcriptos diferenciales codificantes sobrepresados en el genotipo apomítico son el Os₂ y Os₁₂, mientras que el cromosoma que presenta la mayor proporción de transcriptos diferenciales no codificantes sobrepresados en el genotipo apomítico es el Os₁₂.
3. En particular, este estudio revela que muchos de los transcriptos que mapean en la región del cromosoma Os₁₂ de arroz sinténica al ACR de *P. notatum*, se encuentran sobrepresados en el genotipo apomítico y corresponden a secuencias no codificantes.

Los estudios realizados sobre los ensamblados crudos de la secuenciación del citotipo diploide R1-Cayastá mediante el mapeo de marcadores y secuencias génicas ligadas a la apomixis, así como de transcriptos florales de los citotipos tetraploides C₄₋₄[×] (sexual) y Q₄₁₁₇ (apomítico) —**Sección 4.4**—, nos permiten afirmar lo siguiente:

1. Se identificaron *scaffolds* conteniendo marcadores específicos del ACR de la especie. Varios de ellos contienen más de un marcador ligado, lo cual refuerza su asociación física con el carácter.
2. Los *scaffolds* que presentan homología a secuencias del ACR contienen genes predichos con homología a genes de arroz localizados en las regiones sinténicas al ACR (cromosomas Os2 y Os12).
3. Los genes identificados en los *scaffolds* del genotipo diploide de *P. notatum* presentan una alta conservación del ordenamiento lineal respecto a sus homólogos en arroz.
4. Uno de los *scaffolds* estudiados (utg001125l) contiene genes predichos homólogos a genes de arroz de las regiones sinténicas al ACR de los cromosomas Os2 y Os12 de forma simultánea.
5. El genoma del citotipo diploide de *P. notatum* contiene, al menos parcialmente, el ACR encontrado en los citotipos tetraploides.
6. La mayor parte de los genes con expresión diferencial identificados en los *scaffolds* diploides de *P. notatum* sinténicos al ACR se encuentran sobreexpresados en el genotipo apomíctico.
7. Los genes asociados a transcritos no codificantes identificados en los *scaffolds* diploides sinténicos al ACR se localizan de forma colinear formando islas de secuencias sin potencial para traducirse a proteínas.

7. Bibliografía

- ACUÑA CA, BLOUNT AR, QUESENBERRY KH, KENWORTHY KE Y HANNA WW (2009).** Bahiagrass tetraploid germplasm: Reproductive and agronomic characterization of segregating progeny. *Crop Science*, 49(2):581–588.
- ACUÑA CA, BLOUNT AR, QUESENBERRY KH, KENWORTHY KE Y HANNA WW (2011).** Tetraploid bahiagrass hybrids: Breeding technique, genetic variability and proportion of heterotic hybrids. *Euphytica*, 179(2):227–235.
- AGUILERA PM, GALDEANO F, QUARÍN CL, ORTIZ JPA Y ESPINOZA F (2015).** Inheritance of aposporous apomixis in inter-specific hybrids derived from sexual and apomictic. *Crop Science*, 55(5):1947.
- AHN S Y TANKSLEY SD (1993).** Comparative linkage maps of the rice and maize genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(17):7980–7984.
- AKIYAMA Y, GOEL S, CONNER JA, HANNA WW, YAMADA-AKIYAMA H Y OZIAS-AKINS P (2011).** Evolution of the apomixis transmitting chromosome in *Pennisetum*. *BMC Evolutionary Biology*, 11(1):289.
- ALBERTINI E, BARCACCIA G, CARMAN JG Y PUPILLI F (2019).** Did apomixis evolve from sex or was it the other way around? *Journal of experimental botany*, 70(11):2951–2964.
- ALBERTINI E, MARCONI G, REALE L, BARCACCIA G, PORCEDDU A, FERRANTI F Y FALCINELLI M (2005).** SERK and APOSTART. Candidate genes for apomixis in *Poa pratensis*. *Plant Physiology*, 138(4):2185–2199.
- ALBERTINI E Y VERONESI F (2017).** Harnessing apomixis to improve crops. En *More Food: Road to Survival*, pp. 362–372. Bentham Science Publishers. Google-Books-ID: CeEuDwAAQBAJ.

-
- ALIYU OM, SCHRANZ ME Y SHARBEL TF (2010).** Quantitative variation for apomictic reproduction in the genus *Boechera* (*Brassicaceae*). *American Journal of Botany*, 97(10):1719–1731.
- ALTSCHUL SF, GISH W, MILLER W, MYERS EW Y LIPMAN DJ (1990).** Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3):403–410.
- AMITEYE S, CORRAL JM, VOGEL H Y SHARBEL TF (2011).** Analysis of conserved microRNAs in floral tissues of sexual and apomictic *Boechera* species. *BMC genomics*, 12:500.
- ARTIMO P, JONNALAGEDDA M, ARNOLD K, BARATIN D, CSARDI G, DE CASTRO E, DUVAUD S, FLEGEL V, FORTIER A, GASTEIGER E, GROSDIDIER A, HERNANDEZ C, IOANNIDIS V, KUZNETSOV D, LIECHTI R, MORETTI S, MOSTAGUIR K, REDASCHI N, ROSSIER G, XENARIOS I Y STOCKINGER H (2012).** ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic Acids Research*, 40(W1):W597–W603.
- ASHBURNER M, BALL CA, BLAKE JA, BOTSTEIN D, BUTLER H, CHERRY JM, DAVIS AP, DOLINSKI K, DWIGHT SS, EPPIG JT Y OTHERS (2000).** Gene ontology: tool for the unification of biology. *Nature genetics*, 25(1):25–29. Publisher: Nature Publishing Group.
- ASKER S Y JERLING L (1992).** Apomixis in plants. CRC press.
- BALACCO DL Y SOLLER M (2019).** The m⁶A Writer: Rise of a Machine for Growing Tasks. *Biochemistry*, 58(5):363–378. American Chemical Society.
- BARAKAT A, CARELS N Y BERNARDI G (1997).** The distribution of genes in the genomes of *Gramineae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(13):6857–6861.
- BARCACCIA G Y ALBERTINI E (2013).** Apomixis in plant reproduction: A novel perspective on an old dilemma. *Plant Reproduction*, 26(3):159–179.
- BAYER RJ (1990).** Patterns of clonal diversity in the *Antennaria rosea* (*Asteraceae*) polyploid agamic complex. *American Journal of Botany*, 77(10):1313–1319.
- BENNETT MD (1998).** Plant genome values: How much do we know? *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(5):2011–2016.
- BENNETZEN JL (2000).** Transposable element contributions to plant gene and genome evolution. *Plant molecular biology*, 42(1):251–269.
-

-
- BENNETZEN JL (2007)**. Patterns in grass genome evolution. *Current Opinion in Plant Biology*, 10(2):176–181.
- BENNETZEN JL Y CHEN M (2008)**. Grass genomic synteny illuminates plant genome function and evolution. *Rice*, 1(2):109–118.
- BERGERO R Y CHARLESWORTH D (2009)**. The evolution of restricted recombination in sex chromosomes. *Trends in Ecology & Evolution*, 24(2):94–102.
- BERKMAN PJ, VISENDI P, LEE HC, STILLER J, MANOLI S, LORENC MT, LAI K, BATLEY J, FLEURY D, ŠIMKOVÁ H, KUBALÁKOVÁ M, WEINING S, DOLEŽEL J Y EDWARDS D (2013)**. Dispersion and domestication shaped the genome of bread wheat. *Plant Biotechnology Journal*, 11(5):564–571.
- BHATT AM, LISTER C, PAGE T, FRANZ P, FINDLAY K, JONES GH, DICKINSON HG Y DEAN C (1999)**. The DIF1 gene of *Arabidopsis* is required for meiotic chromosome segregation and belongs to the REC8/RAD21 cohesin gene family. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 19(4):463–472.
- BISOGNIN C, SEEMÜLLER E, CITTERIO S, VELASCO R, GRANDO MS Y JARAUSCH W (2009)**. Use of SSR markers to assess sexual vs. apomictic origin and ploidy level of breeding progeny derived from crosses of apple proliferation-resistant *Malus sieboldii* and its hybrids with *Malus × domestica* cultivars. *Plant Breeding*, 128(5):507–513.
- BOCCHINI M, GALLA G, PUPILLI F, BELLUCCI M, BARCACCIA G, ORTIZ JPA, PESINO SC Y ALBERTINI E (2018)**. The vesicle trafficking regulator PN-SCD1 is demethylated and overexpressed in florets of apomictic *Paspalum notatum* genotypes. *Scientific Reports*, 8(1):1–11.
- BODI Z, ZHONG S, MEHRA S, SONG J, LI H, GRAHAM N, MAY S Y FRAY RG (2012)**. Adenosine methylation in *Arabidopsis* mRNA is associated with the 3' end and reduced levels cause developmental defects. *Frontiers in plant science*, 3:48. Frontiers.
- BOLOT S, ABROUK M, MASOOD-QURAISHI U, STEIN N, MESSING J, FEUILLET C Y SALSE J (2009)**. The ‘inner circle’ of the cereal genomes. *Current Opinion in Plant Biology*, 12(2):119–125.
- BOSSOLINI E, WICKER T, KNOBEL PA Y KELLER B (2007)**. Comparison of orthologous loci from small grass genomes *Brachypodium* and rice: implications for wheat genomics and grass genome annotation. *The Plant Journal*, 49(4):704–717.
-

- BRENCHLEY R, SPANNAGL M, PFEIFER M, BARKER GLA, D'AMORE R, ALLEN AM, MCKENZIE N, KRAMER M, KERHORNOU A, BOLSER D, KAY S, WAITE D, TRICK M, BANCROFT I, GU Y, HUO N, LUO MC, SEHGAL S, GILL B, KIANIAN S, ANDERSON O, KERSEY P, DVORAK J, MCCOMBIE WR, HALL A, MAYER KFX, EDWARDS KJ, BEVAN MW Y HALL N (2012).** Analysis of the bread wheat genome using whole-genome shotgun sequencing. *Nature*, 491(7426):705–710.
- BRUEGGEMANN J, WEISSHAAR B Y SAGASSER M (2010).** A WD40-repeat gene from *Malus × domestica* is a functional homologue of *Arabidopsis thaliana* TRANSPARENT TESTA GLABRA1. *Plant Cell Reports*, 29(3):285–294.
- BRUTNELL TP, BENNETZEN JL Y VOGEL JP (2015).** *Brachypodium distachyon* and *Setaria viridis*: model genetic systems for the grasses. *Annual review of plant biology*, 66:465–485.
- BUKOWSKI R, GUO X, LU Y, ZOU C, HE B, RONG Z, WANG B, XU D, YANG B, XIE C, FAN L, GAO S, XU X, ZHANG G, LI Y, JIAO Y, DOEBLEY JF, ROSS-IBARRA J, LORANT A, BUFFALO V, ROMAY MC, BUCKLER ES, WARE D, LAI J, SUN Q Y XU Y (2018).** Construction of the third-generation *Zea mays* haplotype map. *GigaScience*, 7(4).
- BURGESS MB, CUSHMAN KR, DOUCETTE ET, TALENT N, FRYE CT Y CAMPBELL CS (2014).** Effects of apomixis and polyploidy on diversification and geographic distribution in *Amelanchier* (Rosaceae). *American Journal of Botany*, 101(8):1375–1387.
- BURSON B Y BENNETT H (1970).** Cytogenetics and reproduction of three *Paspalum* species. *Can J Genet Cytol*, 20:365–372.
- BURTON GW (1948).** The method of reproduction in common bahia grass, *Paspalum notatum* 1. *Agronomy Journal*, 40(5):443–452.
- BURTON GW (1955).** Breeding Pensacola Bahiagrass, *Paspalum notatum*: I. Method of Reproduction 1. *Agronomy Journal*, 47(7):311–314.
- BURTON GW (1967).** A search for the origin of Pensacola Bahia grass. *Economic Botany*, 21(4):379–382.
- BURTON GW (1974).** Recurrent restricted phenotypic selection increases forage yields of Pensacola Bahiagrass 1. *Crop Science*, 14(6):831–835.

- CACERES ME, PUPILLI F, QUARÍN CL Y ARCIONI S (1999).** Feulgen-DNA densitometry of embryo sacs permits discrimination between sexual and apomictic plants in *Paspalum simplex*. *Euphytica*, 110(3):161–167.
- CALDERINI O, CHANG SB, DE JONG H, BUSTI A, PAOLOCCI F, ARCIONI S, DE VRIES SC, ABMA-HENKENS MH, LANKHORST RM, DONNISON IS Y 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. *Theoretical and Applied Genetics*, 112(6):1179–1191.
- CALDERINI O, DONNISON I, POLEGRI L, PANARA F, THOMAS A, ARCIONI S Y PUPILLI F (2011).** Partial isolation of the genomic region linked with apomixis in *Paspalum simplex*. *Molecular Breeding*, 28(2):265–276.
- CANALES C, BHATT AM, SCOTT R Y DICKINSON H (2002).** EXS, a putative LRR receptor kinase, regulates male germline cell number and tapetal identity and promotes seed development in *Arabidopsis*. *Current Biology*, 12(20):1718–1727.
- CAPRON A, GOURGUES M, NEIVA LS, FAURE JE, BERGER F, PAGNUSSAT G, KRISHNAN A, ALVAREZ-MEJIA C, VIELLE-CALZADA JP, LEE YR, LIU B Y SUNDARESAN V (2008).** Maternal control of male-gamete delivery in *Arabidopsis* involves a putative GPI-anchored protein encoded by the LORELEI gene. *The Plant Cell*, 20(11):3038–3049.
- CARLSON M (2010).** org. At. tair. db: Genome wide annotation for *Arabidopsis*.
- CARMAN JG (1997).** Asynchronous expression of duplicate genes in angiosperms may cause apomixis, bispory, tetraspory, and polyembryony. *Biological Journal of the Linnean Society*, 61(1):51–94.
- CARMAN JG, JAMISON M, ELLIOTT E, DWIVEDI KK Y NAUMOVA TN (2011).** Apospory appears to accelerate onset of meiosis and sexual embryo sac formation in sorghum ovules. *BMC Plant Biology*, 11(1):9.
- CERVIGNI GDL, PANIEGO N, PESSINO S, SELVA JP, DÍAZ M, SPANGENBERG G Y ECHENIQUE V (2008).** Gene expression in diplosporous and sexual *Eragrostis curvula* genotypes with differing ploidy levels. *Plant Molecular Biology*, 67(1):11–23.
- CHASE A (1929).** The North American Species of *Paspalum*. *Contributions from the United States National Herbarium*, 28(1):1–310.

-
- CHASTAIN S Y PFAFFMAN J (2006).** The GIMP: GNU Image Manipulation Program. *Learning and leading with technology*, 33(5):54. The International Society for Technology.
- CHOI JY, LYE ZN, GROEN SC, DAI X, RUGHANI P, ZAAIJER S, HARRINGTON ED, JUUL S Y PURUGGANAN MD (2020).** Nanopore sequencing-based genome assembly and evolutionary genomics of circum-basmati rice. *Genome Biology*, 21(1):21.
- CHOMCZYNSKI P (1989).** Product and process for isolating RNA. Google Patents.
- COLLINGE MA, SPILLANE C, KÖHLER C, GHEYSELINCK J Y GROSSNIKLAUS U (2004).** Genetic interaction of an origin recognition complex subunit and the polycomb group gene MEDEA during seed development. *The Plant Cell*, 16(4):1035–1046.
- COLLINS A (2018).** The challenge of genome sequence assembly. *The Open Bioinformatics Journal*, 11(1).
- COLONO C, ORTIZ JPA, PERMINGEAT HR, SOUZA CANADA ED, SIENA LA, SPOTO N, GALDEANO F, ESPINOZA F, LEBLANC O Y PESSINO SC (2019).** A plant-specific TGS1 homolog influences gametophyte development in sexual tetraploid *Paspalum notatum* ovules. *Frontiers in Plant Science*, 10.
- DAURELIO LD, ESPINOZA F, QUARÍN CL Y PESSINO SC (2004).** Genetic diversity in sexual diploid and apomictic tetraploid populations of *Paspalum notatum* situated in sympatry or allopatry. *Plant Systematics and Evolution*, 244(3-4):189–199.
- DE OLIVEIRA FA, VIGNA BB, DA SILVA CC, FÁVERO AP, DE MATTA FP, AZEVEDO AL Y DE SOUZA AP (2020).** Coexpression and transcriptome analyses identify active apomixis-related genes in *Paspalum notatum* leaves. *BMC genomics*, 21(1):78. r.
- DELGADO L, GALDEANO F, SARTOR ME, QUARÍN CL, ESPINOZA F Y ORTIZ JPA (2014).** Analysis of variation for apomictic reproduction in diploid *Paspalum rufum*. *Annals of Botany*, 113(7):1211–1218.
- D'ERFURTH I, JOLIVET S, FROGER N, CATRICE O, NOVATCHKOVA M Y MERCIER R (2009).** Turning meiosis into mitosis. *PLoS biology*, 7(6).
- DEVOS KM (2005).** Updating the ‘Crop Circle’. *Current Opinion in Plant Biology*, 8(2):155–162.
- DEVOS KM, MOORE G Y GALE MD (1995).** Conservation of marker synteny during evolution. *Euphytica*, 85(1-3):367–372.
-

- DEVOS KM, WANG ZM, BEALES J, SASAKI T Y GALE MD (1998).** Comparative genetic maps of foxtail millet (*Setaria italica*) and rice (*Oryza sativa*). *Theoretical and Applied Genetics*, 96(1):63–68.
- DILWORTH D, GUDAVICIUS G, LEUNG A Y NELSON C (2012).** The roles of peptidyl-proline isomerases in gene regulation. *Biochemistry and Cell Biology*, 90(1):70–77.
- DOOLITTLE WF (2000).** The nature of the universal ancestor and the evolution of the proteome. *Current Opinion in Structural Biology*, 10(3):355–358.
- EARLEY K, SMITH M, WEBER R, GREGORY B Y POETHIG R (2010).** An endogenous F-box protein regulates ARGONAUTE1 in *Arabidopsis thaliana*. *Silence*, 1(1):15.
- ECKARDT NA (2001).** Everything in its place: Conservation of gene order among distantly related plant species. *The Plant Cell*, 13(4):723–725.
- EDGAR RC (2004).** MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5):1792–1797.
- EL-GEHALI S, MISTRY J, BATEMAN A, EDDY SR, LUCIANI A, POTTER SC, QURESHI M, RICHARDSON LJ, SALAZAR GA, SMART A, SONNHAMMER ELL, HIRSH L, PALADIN L, PIOVESAN D, TOSATTO SCE Y FINN RD (2019).** The Pfam protein families database in 2019. *Nucleic Acids Research*, 47(D1):D427–D432.
- ELKONIN LA, BELYAEVA EV Y FADEEVA IY (2012).** Expression of the apomictic potential and selection for apomixis in sorghum line AS-1a. *Russian Journal of Genetics*, 48(1):32–40.
- ENGELBERT V (1941).** The development of twin embryo sacs, embryos, and endosperm in *Poa arctica* r. Br. *Canadian Journal of Research*, 19(5):135–144.
- ESPINOZA F, DAURELIO LD, PESSINO SC, VALLE EM Y QUARÍN CL (2006).** Genetic characterization of *Paspalum notatum* accessions by AFLP markers. *Plant Systematics and Evolution*, 258(3-4):147–159.
- EVERS G, BURSON B, MOSER L Y SOLLENBERGER L (2004).** Warm-Season (C₄) Grasses.
- FANG X, GU S, XU Z, CHEN F, GUO D, ZHANG HB Y WU N (2004).** Construction of a binary BAC library for an apomictic monosomic addition line of β corolliflora in sugar beet and identification of the clones derived from the alien chromosome. *Theoretical and Applied Genetics*, 108(7):1420–1425.

- FELITTI SA, SEIJO GG, GONZÁLEZ AM, PODIO M, LASPINA NV, SIENA L, ORTIZ JPA Y PESSINO SC (2011).** Expression of LORELEI-like genes in aposporous and sexual *Paspalum notatum* plants. *Plant Molecular Biology*, 77(4-5):337–354.
- FAIZ S, WANG X, YOUNAS A, ALHARTHI B, RIAZ A Y ALI H (2021).** Apomixis and strategies to induce apomixis to preserve hybrid vigor for multiple generations. *GM Crops & Food*, 12(1):57–70.
- GALDEANO F, URBANI MH, SARTOR ME, HONFI AI, ESPINOZA F Y 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(4):697–710.
- GALE MD Y DEVOS KM (1998).** Comparative genetics in the grasses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(5):1971–1974.
- GALLA G, SIENA LA, ORTIZ JPA, BAUMLEIN H, BARCACCIA G, PESSINO SC, BELLUCCI M Y PUPILLI F (2019).** A portion of the apomixis locus of *Paspalum simplex* is microsyntenic with an unstable chromosome segment highly conserved among *Poaceae*. *Scientific Reports*, 9(1):3271.
- GALWAY ME, MASUCCI JD, LLOYD AM, WALBOT V, DAVIS RW Y SCHIEFELBEIN JW (1994).** The TTG gene is required to specify epidermal cell fate and cell patterning in the *Arabidopsis* root. *Developmental biology*, 166(2):740–754. Elsevier.
- GARCIA-AGUILAR M, MICHAUD C, LEBLANC O Y GRIMANELLI D (2010).** Inactivation of a DNA methylation pathway in maize reproductive organs results in apomixis-like phenotypes. *The Plant cell*, 22(10):3249–3267.
- GATES RN, MOSER LE, BURSON BL, SOLLENBERGER LE, QUARÍN CL Y PEDREIRA CG (2004).** Bahiagrass. En *Agronomy Monograph*. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America.
- GATES RN, QUARÍN CL Y PEDREIRA CGS (2016).** Bahiagrass. En *Warm-Season (C4) Grasses*, pp. 651–680. John Wiley & Sons, Ltd.
- GAUT BS (2002).** Evolutionary dynamics of grass genomes. *New phytologist*, 154(1):15–28. Wiley Online Library.
- GEISLER M Y BAILLY A (2007).** Tete-a-tete: the function of FKBP in plant development. *Trends in plant science*, 12(10):465–473.

-
- GHIURCUTA CG Y MORET BME (2014).** Evaluating synteny for improved comparative studies. *Bioinformatics*, 30(12):i9–i18.
- GIUSSANI LM, ZULOAGA FO, QUARÍN CL, COTA-SÁNCHEZ JH, UBAYASENA K Y MORRONE O (2009).** Phylogenetic relationships in the genus *Paspalum* (*Poaceae: Panicoideae: Paniceae*): an assessment of the Quadrifaria and Virgata informal groups. *Systematic Botany*, 34(1):32–43.
- GOEL S, CHEN Z, AKIYAMA Y, CONNER JA, BASU M, GUALTIERI G, HANNA WW Y OZIAS-AKINS P (2006).** Comparative physical mapping of the apospory-specific genomic region in two apomictic grasses: *Pennisetum squamulatum* and *Cenchrus ciliaris*. *Genetics*, 173(1):389–400.
- GOLLAN PJ, BHAVE M Y ARO EM (2012).** The FKBP families of higher plants: Exploring the structures and functions of protein interaction specialists, volumen 586. Federation of European Biochemical Societies.
- GRIMANELLI D, GARCÍA M, KASZAS E, PEROTTI E Y LEBLANC O (2003).** Heterochronic expression of sexual reproductive programs during apomictic development in *Tripsacum*. *Genetics*, 165(3):1521–1531.
- GRIMANELLI D, LEBLANC O, PEROTTI E Y GROSSNIKLAUS U (2001).** Developmental genetics of gametophytic apomixis. *Trends in Genetics*, 17(10):597–604.
- GROSSNIKLAUS U, MOORE J Y GAGLIANO (1998).** Chapter 16: Molecular and genetic approaches to understanding apomixis: *Arabidopsis* as a powerful tool. En *Advances in Hybrid Rice Technology: Proceedings of the 3rd International Symposium on Hybrid Rice, 14-16 November 1996, Hyderabad, India*. Int. Rice Res. Inst. Google-Books-ID: xA1jRdqJJzcC.
- GROSSNIKLAUS U, NOGLER GA Y VAN DIJK PJ (2001).** How to avoid sex: the genetic control of gametophytic apomixis. *The plant cell*, 13(7):1491–1498.
- GU Z, GU L, EILS R, SCHLESNER M Y BRORS B (2014).** Circlize implements and enhances circular visualization in R. *Bioinformatics*, 30(19):2811–2812.
- GUALTIERI G, CONNER JA, MORISHIGE DT, MOORE LD, MULLET JE Y OZIAS-AKINS P (2006).** A segment of the apospory-specific genomic region is highly microsyntenic not only between the apomicts *Pennisetum squamulatum* and buffelgrass, but also with a rice chromosome 11 centromeric-proximal genomic region. *Plant Physiology*, 140(3):963–971.
-

-
- GUERIN J, ROSSEL JB, ROBERT S, TSUCHIYA T Y KOLTUNOW A (2000).** A DEFICIENS homologue is down-regulated during apomictic initiation in ovules of *Hieracium*. *Planta*, 210(6):914–920.
- GUITTON AE Y BERGER F (2005).** Loss of function of MULTICOPY SUPPRESSOR OF IRA 1 produces nonviable parthenogenetic embryos in *Arabidopsis*. *Current Biology*, 15(8):750–754.
- HAAS B Y PAPANICOLAOU A (2017).** TransDecoder: find coding regions within transcripts.
- HAHSLER M Y NAGAR P (2015).** rBLAST: Interface to the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).
- HAND ML Y KOLTUNOW AMG (2014).** The genetic control of apomixis: Asexual seed formation. *Genetics*, 197(2):441–450.
- HANNA W, SCHERTZ K Y BASHAW E (1970).** Apospory in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Science*, 170(3955):338–339.
- HANNA WW (1991).** Apomixis in crop plants—cytogenetic basis and role in plant breeding. *Chromosome engineering in plants: genetics, breeding, evolution, part A*. Elsevier, Amsterdam, pp. 229–242.
- HANNA WW Y BASHAW EC (1987).** Apomixis: Its identification and use in plant breeding 1. *Crop Science*, 27(6):1136–1139.
- HARRINGTON B (2004).** Inkscape, a professional quality vector graphics open-source software.
- HEBERLE H, MEIRELLES GV, DA SILVA FR, TELLES GP Y MINGHIM R (2015).** InteractiVenn: a web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. *BMC bioinformatics*, 16(1):1–7. BioMed Central.
- HECHT V, VIELLE-CALZADA JP, HARTOG MV, SCHMIDT EDL, BOUTILIER K, GROSSNIKLAUS U Y VRIES SCD (2001).** The *Arabidopsis* SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1 gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. *Plant Physiology*, 127(3):803–816.
- HODKINSON TR (2018).** Evolution and Taxonomy of the Grasses (*Poaceae*): A Model Family for the Study of Species-Rich Groups. En *Annual Plant Reviews online*, pp. 255–294. American Cancer Society.
-

-
- HOFMANN NR (2010).** Apomixis and gene expression in *Boechea*. *The Plant Cell*, 22(3):539–539.
- HOJSGAARD D (2020).** Apomixis technology: Separating the wheat from the chaff. *Genes*, 11(4):411.
- HOJSGAARD D, HONFI AI, RUA G Y DAVIÑA J (2009).** Chromosome numbers and ploidy levels of *Paspalum* species from subtropical South America (*Poaceae*). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 56(4):533–545.
- HOJSGAARD D Y HÖRANDL E (2019).** The rise of apomixis in natural plant populations. *Frontiers in Plant Science*, 10.
- HOJSGAARD DH, MARTÍNEZ EJ, ACUÑA CA, QUARÍN CL Y PUPILLI F (2011).** A molecular map of the apomixis-control locus in *Paspalum procurrens* and its comparative analysis with other species of *Paspalum*. *Theoretical and Applied Genetics*, 123(6):959–971.
- HOJSGAARD DH, MARTÍNEZ EJ Y QUARÍN CL (2013).** Competition between meiotic and apomictic pathways during ovule and seed development results in clonality. *New Phytologist*, 197(1):336–347.
- HUANG DW, SHERMAN BT Y LEMPICKI RA (2009).** Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature Protocols*, 4(1):44–57.
- HUO N, VOGEL JP, LAZO GR, YOU FM, MA Y, McMAHON S, DVORAK J, ANDERSON OD, LUO MC Y GU YQ (2009).** Structural characterization of *Brachypodium* genome and its syntenic relationship with rice and wheat. *Plant Molecular Biology*, 70(1-2):47–61.
- HÖRANDL E (2006).** The complex causality of geographical parthenogenesis. *New Phytologist*, 171(3):525–538.
- HÖRANDL E Y HOJSGAARD D (2012).** The evolution of apomixis in angiosperms: A reappraisal. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 146(3):681–693.
- INTERNATIONAL RICE GENOME SEQUENCING PROJECT (2005).** The map-based sequence of the rice genome. *Nature*, 436(7052):793–800.
-

-
- ISTACE B, FRIEDRICH A, D'AGATA L, FAYE S, PAYEN E, BELUCHE O, CARADEC C, DAVIDAS S, CRUAUD C, LITI G, LEMAINQUE A, ENGELEN S, WINCKER P, SCHA-CHERER J Y AURY JM (2017).** *De novo* assembly and population genomic survey of natural yeast isolates with the Oxford Nanopore MinION sequencer. *GigaScience*, 6(2).
- JACCARD P (1908).** Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat.*, 44:223–270.
- JACKSON PK Y ELDRIDGE AG (2002).** The SCF ubiquitin ligase: An extended look. *Molecular Cell*, 9(5):923–925.
- JANK L, VALLE CB Y RESENDE RMS (2011).** Breeding tropical forages. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 11(SPE):27–34.
- JARRET RL, OZIAS-AKINS P, PHATAK S, NADIMPALLI R, DUNCAN R Y HILIARD S (1995).** DNA contents in *Paspalum spp.* determined by flow cytometry. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 42(3):237–242.
- JESSUP RW, BURSON BL, BUROW GB, WANG YW, CHANG C, LI Z, PATERSON AH Y HUSSEY MA (2002).** Disomic inheritance, suppressed recombination, and allelic interactions govern apospory in Buffelgrass as revealed by genome mapping. *Crop Science*, 42(5):1688–1694.
- JIA J, ZHAO S, KONG X, LI Y, ZHAO G, HE W, APPELS R, PFEIFER M, TAO Y, ZHANG X, JING R, ZHANG C, MA Y, GAO L, GAO C, SPANNAGL M, MAYER KFX, LI D, PAN S, ZHENG F, HU Q, XIA X, LI J, LIANG Q, CHEN J, WICKER T, GOU C, KUANG H, HE G, LUO Y, KELLER B, XIA Q, LU P, WANG J, ZOU H, ZHANG R, XU J, GAO J, MIDDLETON C, QUAN Z, LIU G, WANG J, INTERNATIONAL WHEAT GENOME SEQUENCING CONSORTIUM, YANG H, LIU X, HE Z, MAO L Y WANG J (2013).** *Aegilops tauschii* draft genome sequence reveals a gene repertoire for wheat adaptation. *Nature*, 496(7443):91–95.
- JOHRI B Y RAO P (1984).** Experimental embryology. En *Embryology of angiosperms*, pp. 735–802. Springer.
- JOHRI BM (1982).** Embriologi of Angiosperm.
- KASPRZYK A (2011).** BioMart: driving a paradigm change in biological data management. *Database*, 2011.
- KEARNEY M (2005).** Hybridization, glaciation and geographical parthenogenesis. *Trends in Ecology & Evolution*, 20(9):495–502.
-

-
- KELLER B Y FEUILLET C (2000)**. Colinearity and gene density in grass genomes. *Trends in Plant Science*, 5(6):246–251.
- KHANDAY I, SKINNER D, YANG B, MERCIER R Y SUNDARESAN V (2019)**. A male-expressed rice embryogenic trigger redirected for asexual propagation through seeds. *Nature*, 565(7737):91.
- KILIAN A, KUDRNA DA, KLEINHOF S A, YANO M, KURATA N, STEFFENSON B Y SASAKI T (1995)**. Rice-barley synteny and its application to saturation mapping of the barley Rpg1 region. *Nucleic Acids Research*, 23(14):2729–2733.
- KIM EJ, YOUNG JH, PARK CH, KIM TW, GUAN S, XU S, BURLINGAME AL, KIM YP, KIM SK, WANG ZY Y OTHERS (2016)**. Oligomerization between BSU1 family members potentiates brassinosteroid signaling in *Arabidopsis*. *Molecular plant*, 9(1):178–181.
- KIM JS, KLEIN PE, KLEIN RR, PRICE HJ, MULLEN JE Y STELLY DM (2005)**. Chromosome identification and nomenclature of *Sorghum bicolor*. *Genetics*, 169(2):1169–1173.
- KOLTUNOW AM (1993)**. Apomixis: embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. *The plant cell*, 5(10):1425.
- KOLTUNOW AM Y GROSSNIKLAUS U (2003)**. Apomixis: a developmental perspective. *Annual review of plant biology*, 54:547–574.
- KOORNNEEF M (1981)**. The complex syndrome of *ttg* mutants. *Arab. Inf. Serv.*, 18:45–51.
- KOREN S, WALENZ BP, BERLIN K, MILLER JR, BERGMAN NH Y PHILLIPPY AM (2017)**. Canu: scalable and accurate long-read assembly via adaptive k-mer weighting and repeat separation. *Genome Research*, 27(5):722–736.
- KUBOYAMA T (1998)**. A novel Thaumatin-like protein gene of tobacco is specifically expressed in the transmitting tissue of stigma and style. *Sexual plant reproduction*, 11(5):251–256.
- KUMAR S, STECHER G, LI M, KNYAZ C Y TAMURA K (2018)**. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular biology and evolution*, 35(6):1547–1549.
- LARKIN JC, OPPENHEIMER DG, LLOYD AM, PAPAROZZI ET Y MARKS MD (1994)**. Roles of the GLABROUS1 and TRANSPARENT TESTA GLABRA genes in *Arabidopsis* trichome development. *The Plant Cell*, 6(8):1065–1076.
-

- LASPINA NV, VEGA T, SEIJO JG, GONZÁLEZ AM, MARTELOTTO LG, STEIN J, PODIO M, ORTIZ JPA, ECHENIQUE VC, QUARÍN CL Y PESSINO SC (2008)**. Gene expression analysis at the onset of aposporous apomixis in *Paspalum notatum*. *Plant Molecular Biology*, 67(6):615–628.
- LAZAR I Y LAZAR I (2012)**. Gel Analyzer 2010a: Freeware 1D gel electrophoresis image analysis software.
- LEBLANC O Y SAVIDAN Y (1994)**. Timing of megasporogenesis in *Tripsacum* species (*Poaceae*) as related to the control of apomixis and sexuality. *Polish Botanical Studies*, 8:75–81.
- LESZCZUK A, DOMACIUK M Y SZCZUKA E (2018)**. Unique features of the female gametophyte development of strawberry *Fragaria x ananassa* Duch. *Scientia Horticulturae*, 234:201–209.
- LI H (2016)**. Minimap and miniasm: fast mapping and *de novo* assembly for noisy long sequences. *Bioinformatics*, 32(14):2103–2110.
- LI H Y ELFMAN J (2020)**. Chimeric RNA: Methods and Protocols. Springer.
- LI J, ZHANG Y, LI D, LIU Y, CHU D, JIANG X, HOU D, ZEN K Y ZHANG CY (2015)**. Small non-coding RNAs transfer through mammalian placenta and directly regulate fetal gene expression. *Protein & Cell*, 6(6):391–396.
- LI SF, ALLEN PJ, NAPOLI RS, BROWNE RG, PHAM H Y PARISH RW (2020a)**. MYB–bHLH–TTG1 regulates *Arabidopsis* seed coat biosynthesis pathways directly and indirectly via multiple tiers of transcription factors. *Plant and Cell Physiology*, 61(5):1005–1018.
- LI W Y GODZIK A (2006)**. CD-HIT: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics*, 22(13):1658–1659.
- LI W, LI K, ZHANG QJ, ZHU T, ZHANG Y, SHI C, LIU YL, XIA EH, JIANG JJ, SHI C, ZHANG LP, HUANG H, TONG Y, LIU Y, ZHANG D, ZHAO Y, JIANG WK, ZHAO YJ, MAO SY, JIAO JY, XU PZ, YANG LL, YIN GY Y GAO LZ (2020b)**. Improved hybrid *de novo* genome assembly and annotation of African wild rice, *Oryza longistaminata*, from Illumina® and PacBio® sequencing reads. *The Plant Genome*, 13(1):e20001.
- LI Z, ZHAO P Y XIA Q (2019)**. Epigenetic methylations on N⁶-adenine and N⁶-adenosine with the same input but different output. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(12):2931. Multidisciplinary Digital Publishing Institute.

- LING HQ, ZHAO S, LIU D, WANG J, SUN H, ZHANG C, FAN H, LI D, DONG L, TAO Y, GAO C, WU H, LI Y, CUI Y, GUO X, ZHENG S, WANG B, YU K, LIANG Q, YANG W, LOU X, CHEN J, FENG M, JIAN J, ZHANG X, LUO G, JIANG Y, LIU J, WANG Z, SHA Y, ZHANG B, WU H, TANG D, SHEN Q, XUE P, ZOU S, WANG X, LIU X, WANG F, YANG Y, AN X, DONG Z, ZHANG K, ZHANG X, LUO MC, DVORAK J, TONG Y, WANG J, YANG H, LI Z, WANG D, ZHANG A Y WANG J (2013). Draft genome of the wheat A-genome progenitor *Triticum urartu*. *Nature*, 496(7443):87–90.
- LIU D, HUNT M Y TSAI IJ (2018a). Inferring synteny between genome assemblies: A systematic evaluation. *BMC Bioinformatics*, 19(1):1–13.
- LIU F, MARQUARDT S, LISTER C, SWIEZEWSKI S Y DEAN C (2010). Targeted 3' processing of antisense transcripts triggers *Arabidopsis* FLC chromatin silencing. *Science*, 327(5961):94–97.
- LIU J, XING J, FANG J, AI P Y CHENG Y (2018b). New insight into ovary abortion during ovary development of hazelnut through a combined proteomic and transcriptomic analysis. *Scientia Horticulturae*, 234:36–48.
- LIU K, QI S, LI D, JIN C, GAO C, DUAN S, FENG B Y CHEN M (2017). TRANSPARENT TESTA GLABRA 1 ubiquitously regulates plant growth and development from *Arabidopsis* to foxtail millet (*Setaria italica*). *Plant science*, 254:60–69.
- LU BR Y SNOW AA (2005). Gene flow from genetically modified rice and its environmental consequences. *BioScience*, 55(8):669–678.
- LU KP, FINN G, LEE TH Y NICHOLSON LK (2007). Prolyl cis-trans isomerization as a molecular timer. *Nature Chemical Biology*, 3(10):619–630.
- LUO M, BILODEAU P, DENNIS ES, PEACOCK WJ Y CHAUDHURY A (2000). Expression and parent-of-origin effects for FIS2, MEA, and FIE in the endosperm and embryo of developing *Arabidopsis* seeds. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(19):10637–10642.
- MANCINI M, PERMINGEAT H, COLONO C, SIENA L, PUPILLI F, AZZARO C, DE ALEN-CAR DUSI DM, DE CAMPOS CARNEIRO VT, PODIO M, SEIJO JG, GONZÁLEZ AM, FELITTI SA, ORTIZ JPA, LEBLANC O Y 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 JPA, PESSINO SC Y 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(4):412–424.
- MARIMUTHU MP, JOLIVET S, RAVI M, PEREIRA L, DAVDA JN, CROMER L, WANG L, NOGUÉ F, CHAN SW, SIDDIQI I Y OTHERS (2011).** Synthetic clonal reproduction through seeds. *Science*, 331(6019):876–876. American Association for the Advancement of Science.
- MARTÍNEZ E, URBANI M, QUARÍN C Y ORTIZ JP (2001).** Inheritance of apospory in bahiagrass, *Paspalum notatum*. *Hereditas*, 135:16–25.
- MARTÍNEZ EJ, ACUÑA CA, HOJSGAARD DH, TCACH MA Y QUARÍN CL (2007).** Segregation for sexual seed production in *Paspalum* as directed by male gametes of apomictic triploid plants. *Annals of Botany*, 100(6):1239–1247.
- MARTÍNEZ EJ, HOPP HE, STEIN J, ORTIZ JP Y QUARÍN CL (2003).** Genetic characterization of apospory in tetraploid *Paspalum notatum* based on the identification of linked molecular markers. *Molecular Breeding*, 12(4):319–327.
- MARÇAIS G, DELCHER AL, PHILLIPPY AM, COSTON R, SALZBERG SL Y ZIMIN A (2018).** MUMmer4: A fast and versatile genome alignment system. *PLOS Computational Biology*, 14(1):e1005944.
- MATSUOKA D, SOGA K, YASUFUKU T Y NANMORI T (2018).** Control of plant growth and development by overexpressing MAP3K17, an ABA-inducible MAP3K, in *Arabidopsis*. *Plant Biotechnology*, pp. 18–0412.
- MATZK F, PRODANOVIC S, BÄUMLEIN H Y SCHUBERT I (2005).** The inheritance of apomixis in *Poa pratensis* confirms a five locus model with differences in gene expressivity and penetrance. *The Plant Cell*, 17(1):13–24.
- MCCORMICK RF, TRUONG SK, SREEDASYAM A, JENKINS J, SHU S, SIMS D, KENNEDY M, AMIREBRAHIMI M, WEERS BD, MCKINLEY B, MATTISON A, MORISHIGE DT, GRIMWOOD J, SCHMUTZ J Y MULLET JE (2018).** The *Sorghum bicolor* reference genome: improved assembly, gene annotations, a transcriptome atlas, and signatures of genome organization. *The Plant Journal*, 93(2):338–354.
- MENDES-RODRIGUES C Y OLIVEIRA P (2012).** Polyembryony in *Melastomataceae* from Brazilian Cerrado: multiple embryos in a small world. *Plant Biology*, 14(5):845–853.

-
- MESSING J Y LLACA V (1998)**. Importance of anchor genomes for any plant genome project. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(5):2017–2020.
- MICHELMORE RW, PARAN I Y KESSELI RV (1991)**. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis - a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(21):9828–9832.
- MIEULET D, JOLIVET S, RIVARD M, CROMER L, VERNET A, MAYONOVE P, PEREIRA L, DROC G, COURTOIS B, GUIDERDONI E Y MERCIER R (2016)**. Turning rice meiosis into mitosis. *Cell Research*, 26(11):1242–1254.
- MILES JW (2007)**. Apomixis for Cultivar Development in Tropical Forage Grasses. *Crop Science*, 47(S3):S–238.
- MOORE G (1995)**. Cereal genome evolution: pastoral pursuits with ‘Lego®’ genomes. *Current Opinion in Genetics & Development*, 5(6):717–724.
- MOORE G, ARAGÓN-ALCAIDE L, ROBERTS M, READER S, MILLER T Y FOOTE T (1997)**. Are rice chromosomes components of a holocentric chromosome ancestor? *Plant molecular biology*, 35(1-2):17–23.
- MOORE G, FOOTE T, HELENTJARIS T, DEVOS K, KURATA N Y GALE M (1995)**. Was there a single ancestral cereal chromosome? *Trends in Genetics*, 11(3):81–82.
- MOORE G, GALE MD, KURATA N Y FLAVELL RB (1993)**. Molecular analysis of small grain cereal genomes: Current status and prospects. *Bio/Technology*, 11(5):584.
- MORA-GARCÍA S, VERT G, YIN Y, CAÑO-DELGADO A, CHEONG H Y CHORY J (2004)**. Nuclear protein phosphatases with Kelch-repeat domains modulate the response to brassinosteroids in *Arabidopsis*. *Genes & Development*, 18(4):448–460.
- MUDUNURI U, CHE A, YI M Y STEPHENS RM (2009)**. bioDBnet: the biological database network. *Bioinformatics*, 25(4):555–556.
- NAGAMURA Y, INOUE T, ANTONIO BA, SHIMANO T, KAJIYA H, SHOMURA A, LIN SY, KUBOKI Y, HARUSHIMA Y, KURATA N Y OTHERS (1995)**. Conservation of duplicated segments between rice chromosome 11 and 12. *Japanese Journal of Breeding*, 45(3):373–376.
- NATH PR E ISAKOV N (2015)**. Insights into peptidyl-prolyl cis–trans isomerase structure and function in immunocytes. *Immunology Letters*, 163(1):120–131.
-

- NAUMOVA T (1993)**. Apomixis in angiosperms: nucellar and integumentary embryony. *CRC Press: Boca Raton, FL, USA*.
- NAVASHIN S (1898)**. Resultate einer Revision der Befruchtungsvorgänge bei *Lilium martagon* und *Fritillaria tenella*. *Proceedings of the Russian Academy of Sciences. Mathematical series*, 9(4):377–382.
- NEWCOMBE RG (1998)**. Two-sided confidence intervals for the single proportion: comparison of seven methods. *Statistics in medicine*, 17(8):857–872.
- NGO QA, BAROUX C, GUTHÖRL D, MOZEROV P, COLLINGE MA, SUNDARESAN V Y GROSSNIKLAS U (2012)**. The Armadillo repeat gene ZAK IXIK promotes *Arabidopsis* early embryo and endosperm development through a distinctive gametophytic maternal effect. *The Plant Cell*, 24(10):4026–4043.
- NOGLER GA (1984)**. Gametophytic apomixis. En *Embryology of angiosperms*, pp. 475–518. Springer.
- NONOMURA KI, NAKANO M, FUKUDA T, EIGUCHI M, MIYAO A, HIROCHIKA H Y KURATA N (2004)**. The novel gene HOMOLOGOUS PAIRING ABERRATION IN RICE MEIOSIS1 of rice encodes a putative coiled-coil protein required for homologous chromosome pairing in meiosis. *The Plant Cell*, 16(4):1008–1020.
- NORMANN G, QUARÍN C Y BURSON B (1989)**. Cytogenetics and reproductive behaviour of different chromosomes races in six *Paspalum* species. 80:24–28.
- NYGREN A (1948)**. Further studies in spontaneous and synthetic *Calamagrostis purpurea*. *Hereditas*, 34(1-2):113–134.
- OCHOGAVÍA A, GALLA G, SEIJO JG, GONZÁLEZ AM, BELLUCCI M, PUPILLI F, BARCACCIA G, ALBERTINI E Y PESSINO S (2018)**. Structure, target-specificity and expression of Pn<LNC_n13, a long non-coding RNA differentially expressed in apomictic and sexual *Paspalum notatum*. *Plant Molecular Biology*, 96(1-2):53–67.
- OCHOGAVÍA AC, SEIJO JG, GONZÁLEZ AM, PODIO M, SILVEIRA ED, LACERDA ALM, DE CAMPOS CARNEIRO VT, ORTIZ JPA Y PESSINO SC (2011)**. Characterization of retrotransposon sequences expressed in inflorescences of apomictic and sexual *Paspalum notatum* plants. *Sexual Plant Reproduction*, 24(3):231–246.
- OGAS J, KAUFMANN S, HENDERSON J Y SOMERVILLE C (1999)**. PICKLE is a CHD3 chromatin-remodeling factor that regulates the transition from embryonic to vege-

tative development in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(24):13839–13844.

OHMIDO N, KIJIMA K, AKIYAMA Y, DE JONG JH Y FUKUI K (2000). Quantification of total genomic DNA and selected repetitive sequences reveals concurrent changes in different DNA families in indica and japonica rice. *Molecular and General Genetics MGG*, 263(3):388–394.

OKADA T, HU Y, TUCKER MR, TAYLOR JM, JOHNSON SD, SPRIGGS A, TSUCHIYA T, OELKERS K, RODRIGUES JCM Y KOLTUNOW AMG (2013). Enlarging cells initiating apomixis in *Hieracium praealtum* transition to an embryo sac program prior to entering mitosis. *Plant Physiology*, 163(1):216–231. American Society of Plant Biologists.

OKONECHNIKOV K, GOLOSOVA O, FURSOV M, VARLAMOV A, VASKIN Y, EFREMOV I, GERMAN GREHOV OG, KANDROV D, RASPUTIN K, SYABRO M Y TLEUKENOV T (2012). Unipro UGENE: A unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*, 28(8):1166–1167.

OLMEDO-MONFIL V, DURÁN-FIGUEROA N, ARTEAGA-VÁZQUEZ M, DEMESA-ARÉVALO E, AUTRAN D, GRIMANELLI D, SLOTKIN RK, MARTIENSSEN RA Y VIELLE-CALZADA JP (2010). Control of female gamete formation by a small RNA pathway in *Arabidopsis*. *Nature*, 464(7288):628–632.

ORTIZ JP, SIENA LA, GRISOLIA M, ROHR C, VAZQUEZ M, PODIO M, MARIAC C, PESSINO S Y LEBLANC O (2019). Progress towards the generation of a reference genome of *Paspalum notatum*. *ALAG/2019 - VII Congreso Latinoamericano de Genética, XLVII Congreso Argentino de Genética, LII Reunión Anual de la Sociedad de Genética de Chile, VI Congreso de la Sociedad Uruguaya de Genética, V Congreso Latinoamericano de Genética Humana y V Simposio Latinoamericano de Citogenética y Evolución*. Mendoza, Argentina.

ORTIZ JPA, PESSINO SC, LEBLANC O, HAYWARD MD Y QUARÍN CL (1997). Genetic fingerprinting for determining the mode of reproduction in *Paspalum notatum*, a subtropical apomictic forage grass. *Theoretical and Applied Genetics*, 95(5):850–856.

ORTIZ JPA, PUPILLI F, ACUÑA CA, LEBLANC O Y PESSINO SC (2020). How to become an apomixis model: The multifaceted case of *Paspalum*. *Genes*, 11(9):974.

ORTIZ JPA, QUARÍN CL, PESSINO SC, ACUÑA C, MARTÍNEZ EJ, ESPINOZA F, HOJSGAARD DH, SARTOR ME, CÁCERES ME Y PUPILLI F (2013). Harnessing apomictic

reproduction in grasses: What we have learned from *Paspalum*. *Annals of Botany*, 112(5):767–787.

ORTIZ JPA, REVALE S, SIENA LA, PODIO M, DELGADO L, STEIN J, LEBLANC O Y PESSINO SC (2017). A reference floral transcriptome of sexual and apomictic *Paspalum notatum*. *BMC Genomics*, 18(1):318.

OUYANG S, ZHU W, HAMILTON J, LIN H, CAMPBELL M, CHILDS K, THIBAUD-NISSEN F, MALEK RL, LEE Y, ZHENG L, ORVIS J, HAAS B, WORTMAN J Y BUELL CR (2007). The TIGR Rice Genome Annotation Resource: improvements and new features. *Nucleic Acids Research*, 35(suppl_1):D883–D887.

OZIAS-AKINS P Y VAN DIJK PJ (2007). Mendelian genetics of apomixis in plants. *Annual review of genetics*, 41(FEBRUARY):509–537.

PAFFENDORF BAM, QASSRAWI R, MEYS AM, TRIMBORN L Y SCHRADER A (2019). Initial embedding of TRANSPARENT TESTA GLABRA 1 in the *Arabidopsis thaliana* flowering time regulatory pathway. Technical Report e27974v1, PeerJ Inc.

PAGÈS H, ABOYOUN P, GENTLEMAN R Y DEBROY S (2017). Biostrings: Efficient manipulation of biological strings. *R package version*, 2(0).

PALUSA SG, ALI GS Y REDDY AS (2007). Alternative splicing of pre-mRNAs of *Arabidopsis* serine/arginine-rich proteins: regulation by hormones and stresses. *The Plant Journal*, 49(6):1091–1107.

PANAUD O, VITTE C, HIVERT J, MUZLAK S, TALAG J, BRAR D Y SARR A (2002). Characterization of transposable elements in the genome of rice (*Oryza sativa* L.) using Representational Difference Analysis (RDA). *Molecular Genetics and Genomics*, 268(1):113–121.

PASSARGE E, HORSTHEMKE B Y FARBER RA (1999). Incorrect use of the term synteny. *Nat Genet*, 23(4):387.

PATERSON A, LAN TH, REISCHMANN K, CHANG C, LIN YR, LIU SC, BUROW M, KOWALSKI S, KATSAR C, DELMONTE T, FELDMANN K, SCHERTZ K Y WENDEL J (1996). Toward a unified genetic map of higher plants, transcending the Monocot-Dicot divergence. *Nature Genetics*, 14:380–382.

PATERSON AH, BOWERS JE, BRUGGMANN R, DUBCHAK I, GRIMWOOD J, GUNDLACH H, HABERER G, HELLSTEN U, MITROS T, POLIAKOV A, SCHMUTZ J, SPANNAGL M, TANG H, WANG X, WICKER T, BHARTI AK, CHAPMAN J, FELTUS FA, GOWIK

- U, GRIGORIEV IV, LYONS E, MAHER CA, MARTIS M, NARECHANIA A, OTILLAR RP, PENNING BW, SALAMOV AA, WANG Y, ZHANG L, CARPITA NC, FREELING M, GINGLE AR, HASH CT, KELLER B, KLEIN P, KRESOVICH S, McCANN MC, MING R, PETERSON DG, UR RAHMAN M, WARE D, WESTHOFF P, MAYER KFX, MESSING J Y ROKHSAR DS (2009). The *Sorghum bicolor* genome and the diversification of grasses. *Nature*, 457(7229):551–556.
- PATERSON AH, WANG X, TANG H Y LEE TH (2012). Synteny and genomic rearrangements. En Wendel JF, Greilhuber J, Dolezel J y Leitch IJ, editores, *Plant Genome Diversity Volume 1: Plant Genomes, their Residents, and their Evolutionary Dynamics*, pp. 195–207. Springer, Vienna.
- PELLICER J, HIDALGO O, DODSWORTH S Y LEITCH IJ (2018). Genome size diversity and its impact on the evolution of land plants. *Genes*, 9(2):88.
- PESSINO SC, ESPINOZA F, MARTÍNEZ EJ, ORTIZ JPA, VALLE EM Y QUARÍN CL (2001). Isolation of cDNA clones differentially expressed in flowers of apomictic and sexual *Paspalum notatum*. *Hereditas*, 134(1):35–42.
- PESSINO SC, EVANS C, ORTIZ JPA, ARMSTEAD I, VALLE CBD Y HAYWARD MD (1998). A genetic map of the apospory-region in *Brachiaria* hybrids: Identification of two markers closely associated with the trait. *Hereditas*, 128(2):153–158.
- PESSINO SC, ORTIZ JPA, LEBLANC O, DO VALLE CB, EVANS C Y HAYWARD MD (1997). Identification of a maize linkage group related to apomixis in *Brachiaria*. *Theoretical and Applied Genetics*, 94(3):439–444.
- PODIO M (2013). Estudios citogenéticos y moleculares del fragmento cromosómico responsable de la aposporía en *Paspalum notatum* y caracterización molecular de secuencias asociadas a la aposporía. Tesis doctoral, Facultad de Ciencias Agrarias, UNR, Rosario, Argentina.
- PODIO M, CACERES ME, SAMOLUK SS, SEIJO JG, PESSINO SC, ORTIZ JPA Y 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(22):6411–6424.
- PODIO M, COLONO C, SIENA L, ORTIZ JPA Y PESSINO SC (2021). A study of the heterochronic sense/antisense RNA representation in florets of sexual and apomictic *Paspalum notatum*. *BMC Genomics*, 22(1):185.

- PODIO M, FELITTI S, STEIN J, SIENA LA, QUARÍN CL, PESSINO SC Y ORTIZ JPA (2012a).** Sequence characterization, *in silico* mapping and cytosine methylation analysis of markers linked to apospory in *Paspalum notatum*. *Genetics and Molecular Biology*, 837:827–837.
- PODIO M, FELITTI SA, SIENA LA, DELGADO L, MANCINI M, SEIJO JG, GONZÁLEZ AM, PESSINO SC Y ORTIZ JPA (2014b).** Characterization and expression analysis of SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE (SERK) genes in sexual and apomictic *Paspalum notatum*. *Plant Molecular Biology*, 84(4-5):479–495.
- PODIO M, SIENA LA, HOJSGAARD D, STEIN J, QUARÍN CL Y ORTIZ JPA (2012b).** Evaluation of meiotic abnormalities and pollen viability in aposporous and sexual tetraploid *Paspalum notatum* (Poaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 298(9):1625–1633.
- POLEGRI L, CALDERINI O, ARCIONI S Y 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(6):1869–1883.
- PRUNEDA-PAZ JL, BRETON G, PARA A Y KAY SA (2009).** A functional genomics approach reveals CHE as a component of the *Arabidopsis* circadian clock. *Science*, 323(5920):1481–1485.
- PUPILLI F, LABOMBARDA P, CACERES ME, QUARÍN CL Y 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(1):53–61.
- PUPILLI F, MARTINEZ EJ, BUSTI A, CALDERINI O, QUARÍN CL Y ARCIONI S (2004).** Comparative mapping reveals partial conservation of synteny at the apomixis locus in *Paspalum* spp. *Molecular Genetics and Genomics*, 270(6):539–548.
- QIU (2011).** Comparative transcript profiling of gene expression between seedless Ponkan mandarin and its seedy wild type during floral organ development by suppression subtractive hybridization and cDNA microarray. *BMC genomics*, pp. 1–20.
- QUARÍN C (1992).** The nature of apomixis and its origin in *Panicoid* grasses. *Apomixis Newslt.*, 5:8–15.
- QUARÍN C, POZZOBON M Y VALLS J (1996).** Cytology and reproductive behavior of diploid, tetraploid and hexaploid germplasm accessions of a wild forage grass: *Paspalum compressifolium*. *Euphytica*, 90(3):345–349.

- QUARÍN C, URBANI M, BLOUNT AR, MARTINEZ E, HACK C, BURTON G Y QUESENBERRY K (2003)**. Registration of Q4188 and Q4205, sexual tetraploid germplasm lines of Bahiagrass. *Crop Science*, 43(2):745.
- QUARÍN CL (1999)**. Effect of pollen source and pollen ploidy on endosperm formation and seed set in pseudogamous apomictic *Paspalum notatum*. *Sexual Plant Reproduction*, 11(6):331–335.
- QUARÍN CL Y BURSON BL (1991)**. Cytology of sexual and apomictic *Paspalum* species. *Cytologia*, 56(2):223–228.
- QUARÍN CL, BURSON BL Y BURTON GW (1984)**. Cytology of intra- and interspecific hybrids between two cytotypes of *Paspalum notatum* and *P. cromyorrhizon*. *Botanical Gazette*, 145(3):420–426.
- QUARÍN CL, ESPINOZA F, MARTINEZ EJ, PESSINO SC Y BOVO OA (2001)**. A rise of ploidy level induces the expression of apomixis in *Paspalum notatum*. *Sexual Plant Reproduction*, 13(5):243–249.
- QUESENBERRY KH, DAMPIER JM, LEE YY, SMITH RL Y ACUÑA CA (2010)**. Doubling the chromosome number of bahiagrass via tissue culture. *Euphytica*, 175(1):43–50.
- R CORE TEAM (2013)**. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- RABIGER DS, TAYLOR JM, SPRIGGS A, HAND ML, HENDERSON ST, JOHNSON SD, OELKERS K, HRMOVA M, SAITO K, SUZUKI G, MUKAI Y, CARROLL BJ Y KOLTUNOW AMG (2016)**. Generation of an integrated *Hieracium* genomic and transcriptomic resource enables exploration of small RNA pathways during apomixis initiation. *BMC Biology*, 14(1):86.
- RAVI M, MARIMUTHU MPA Y SIDDIQI I (2008)**. Gamete formation without meiosis in *Arabidopsis*. *Nature*, 451(7182):1121–1124.
- RAWAT R, SCHWARTZ J, JONES MA, SAIRANEN I, CHENG Y, ANDERSSON CR, ZHAO Y, LJUNG K Y HARMER SL (2009)**. REVEILLE1, a Myb-like transcription factor, integrates the circadian clock and auxin pathways. *Proceedings of the national academy of sciences*, 106(39):16883–16888.
- REBOZZIO RN, RODRÍGUEZ MP, STEIN J, ORTIZ JPA, QUARÍN CL Y ESPINOZA F (2012)**. Validation of molecular markers linked to apospory in tetraploid races of bahiagrass, *Paspalum notatum* Flügge. *Molecular Breeding*, 29(1):189–198.

-
- REMUS D Y DIFFLEY JF (2009).** Eukaryotic DNA replication control: Lock and load, then fire. *Current Opinion in Cell Biology*, 21(6):771–777.
- REUSCHER S, FURUTA T, BESSHO-UEHARA K, COSI M, JENA KK, TOYODA A, FUJIYAMA A, KURATA N Y ASHIKARI M (2018).** Assembling the genome of the African wild rice *Oryza longistaminata* by exploiting synteny in closely related *Oryza* species. *Communications Biology* |, 1(2018):162.
- RICHARD L, ARRÓ M, HOEBEKE J, MEEKS-WAGNER DR Y VAN KTT (1992).** Immunological evidence of Thaumatin-like proteins during tobacco floral differentiation. *Plant Physiology*, 98(1):337–342.
- RISSEEUW EP, DASKALCHUK TE, BANKS TW, LIU E, COTELESAGE J, HELLMANN H, ESTELLE M, SOMERS DE Y CROSBY WL (2003).** Protein interaction analysis of SCF ubiquitin E3 ligase subunits from *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 34(6):753–767.
- ROBLES M Y DOERS J (1994).** pGEM®-T Vector Systems troubleshooting guide. *Pro-mega Notes*.
- ROCHE D, CONNER J, BUDIMAN M, FRISCH D, WING R, HANNA W Y OZIAS-AKINS P (2002).** Construction of BAC libraries from two apomictic grasses to study the microcolinearity of their apospory-specific genomic regions. *Theoretical and Applied Genetics*, 104(5):804–812.
- ROSSBERG M, THERES K, ACARKAN A, HERRERO R, SCHMITT T, SCHUMACHER K, SCHMITZ G Y SCHMIDT R (2001).** Comparative sequence analysis reveals extensive microcolinearity in the lateral suppressor regions of the tomato, *Arabidopsis*, and *Capsella* Genomes. *The Plant Cell*, 13(4):979–988.
- ROUQUETTE M, CORRIHER-OLSON V Y SMITH GR (2020).** Chapter 7 - Management strategies for pastures and beef cattle in the Middle-South: The I-20 Corridor. En Rouquette M y Aiken GE, editores, *Management Strategies for Sustainable Cattle Production in Southern Pastures*, pp. 123–187. Academic Press.
- ROY NK, PADMAVATHI G, BORDOLOI D Y KUNNUMAKKARA AB (2016).** Techniques to identify novel fusion genes and to detect known fusion genes. En *Fusion Genes and Cancer*, pp. 59–79. WORLD SCIENTIFIC.
- ROYTBERG MA, OGURTSOV AY, SHABALINA SA Y KONDRASHOV AS (2002).** A hierarchical approach to aligning collinear regions of genomes. *Bioinformatics*, 18(12):1673–1680.
-

- ROZEN S Y SKALETSKY H (1999)**. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. En *Bioinformatics Methods and Protocols*, pp. 365–386.
- RUA GH, SPERANZA PR, VAIO M Y ARAKAKI M (2010)**. A phylogenetic analysis of the genus *Paspalum* (*Poaceae*) based on cpDNA and morphology. *Plant Systematics and Evolution*, 288(3):227–243.
- SACHAR R Y CHOPRA R (1957)**. A study of the endosperm and embryo in *Mangifera* L. *Indian J. Agric. Sci*, 27(2):219–228.
- SAGHAI-MAROOF MA, SOLIMAN KM, JORGENSEN RA Y ALLARD RW (1984)**. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81(24):8014–8018.
- SAILER C, SCHMID B Y GROSSNIKLAUS U (2016)**. Apomixis allows the transgenerational fixation of phenotypes in hybrid plants. *Current Biology*, 26(3):331–337.
- SALSE J, PIÉGU B, COOKE R Y DELSENY M (2004)**. New *in silico* insight into the synteny between rice (*Oryza sativa* L.) and maize (*Zea mays* L.) highlights reshuffling and identifies new duplications in the rice genome. *The Plant Journal*, 38(3):396–409.
- SAMBROOK J Y MANIATIS T (1989)**. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold spring harbor laboratory press, 2° edición.
- SAPKOTA S, CONNER JA, HANNA WW, SIMON B, FENGLER K, DESCHAMPS S, CIGAN M Y OZIAS-AKINS P (2016)**. *In silico* and fluorescence *in situ* hybridization mapping reveals collinearity between the *Pennisetum squamulatum* apomixis carrier-chromosome and chromosome 2 of sorghum and foxtail millet. *PLOS ONE*, 11(3):e0152411.
- SAVIDAN Y (2000)**. Apomixis: genetics and breeding. *Plant Breeding Reviews*, 18:13–86.
- SCATAGLINI MA, ZULOAGA FO, GIUSSANI LM, DENHAM SS Y MORRONE O (2014)**. Phylogeny of New World *Paspalum* (*Poaceae*, *Panicoideae*, *Paspaleae*) based on plastid and nuclear markers. *Plant Systematics and Evolution*, 300(5):1051–1070.
- SCHMIDT A (2020)**. Controlling apomixis: Shared features and distinct characteristics of gene regulation. *Genes*, 11(3):329.
- SCHMIDT ED, GUZZO F, TOONEN MA Y VRIES SCD (1997)**. A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. *Development*, 124(10):2049–2062.

- SCHNABLE PS, WARE D, FULTON RS, STEIN JC, WEI F, PASTERNAK S, LIANG C, ZHANG J, FULTON L, GRAVES TA Y OTHERS (2009).** The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics. *science*, 326(5956):1112–1115.
- SCHNEITZ K, BAKER SC, GASSER CS Y REDWEIK A (1998).** Pattern formation and growth during floral organogenesis: HUELLENLOS and AINTEGUMENTA are required for the formation of the proximal region of the ovule primordium in *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 125(14):2555–2563. The Company of Biologists Ltd.
- SCOTT RJ, SPIELMAN M Y DICKINSON HG (2004).** Stamen structure and function. *The Plant Cell*, 16(suppl 1):S46–S60.
- SELVA JP, PESSINO SC, MEIER MS Y ECHENIQUE VC (2012).** Identification of candidate genes related to polyploidy and/or apomixis in *Eragrostis curvula*. *American Journal of Plant Sciences*, 2012.
- SHAFIN K, PESOUT T, LORIG-ROACH R, HAUKNES M, OLSEN HE, BOSWORTH C, ARMSTRONG J, TIGYI K, MAURER N, KOREN S Y OTHERS (2020).** Nanopore sequencing and the Shasta toolkit enable efficient *de novo* assembly of eleven human genomes. *Nature Biotechnology*, pp. 1–10.
- SHAW PE (2007).** Peptidyl-prolyl cis/trans isomerases and transcription: is there a twist in the tail? *EMBO reports*, 8(1):40–45.
- SHIMAMOTO K Y KYOZUKA J (2002).** Rice as a model for comparative genomics of plants. *Annual Review of Plant Biology*, 53(1):399–419.
- SHIRLEY BW, KUBASEK WL, STORZ G, BRUGGEMANN E, KOORNNEEF M, AUSUBEL FM Y GOODMAN HM (1995).** Analysis of *Arabidopsis* mutants deficient in flavonoid biosynthesis. *The Plant Journal*, 8(5):659–671.
- SIENA L, SARTOR ME, ESPINOZA F, QUARÍN CL Y ORTIZ JPA (2008).** Genetic and embryological evidences of apomixis at the diploid level in *Paspalum rufum* support recurrent auto-polyploidization in the species. *Sexual Plant Reproduction*, 21(3):205–215.
- SIENA LA, ORTIZ JPA, CALDERINI O, PAOLOCCI F, CÁCERES ME, KAUSHAL P, GRISAN S, PESSINO SC Y 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*, p. erw018.

-
- SIENA LA, ORTIZ JPA, LEBLANC O Y PESSINO S (2014).** PnTgs1-like expression during reproductive development supports a role for RNA methyltransferases in the aposporous pathway. *BMC Plant Biology*, 14(1):297.
- SILVERTOWN J (2008).** The evolutionary maintenance of sexual reproduction: Evidence from the ecological distribution of asexual reproduction in clonal plants. *International Journal of Plant Sciences*, 169(1):157–168.
- SIMÃO FA, WATERHOUSE RM, IOANNIDIS P, KRIVENTSEVA EV Y ZDOBNOV EM (2015).** BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. *Bioinformatics*, 31(19):3210–3212.
- SINGH M, BURSON BL Y FINLAYSON SA (2007).** Isolation of candidate genes for apomictic development in buffelgrass (*Pennisetum ciliare*). *Plant Molecular Biology*, 64(6):673–682.
- SINGH M, GOEL S, MEELEY RB, DANTEC C, PARRINELLO H, MICHAUD C, LEBLANC O Y GRIMANELLI D (2011).** Production of viable gametes without meiosis in maize deficient for an ARGONAUTE protein. *The Plant cell*, 23(2):443–458.
- SINHA AU Y MELLER J (2007).** Cinteny: flexible analysis and visualization of synteny and genome rearrangements in multiple organisms. *BMC Bioinformatics*, 8(1):82.
- SKADSEN RW, SATHISH P Y KAEPLER HF (2000).** Expression of THAUMATIN-like PERMATIN PR-5 genes switches from the ovary wall to the aleurone in developing barley and oat seeds. *Plant Science*, 156(1):11–22.
- SKINNER DJ, BAKER SC, MEISTER RJ, BROADHVEST J, SCHNEITZ K Y GASSER CS (2001).** The Arabidopsis HUELLENLOS gene, which is essential for normal ovule development, encodes a mitochondrial ribosomal protein. *The Plant Cell*, 13(12):2719–2730. Publisher: American Society of Plant Biologists.
- SMITH MR, WILLMANN MR, WU G, BERARDINI TZ, MÖLLER B, WEIJERS D Y POETHIG RS (2009).** Cyclophilin 40 is required for microRNA activity in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(13):5424–5429.
- SOLIMAN M, ESPINOZA F, ORTIZ JPA Y DELGADO L (2018).** Heterochronic reproductive developmental processes between diploid and tetraploid cytotypes of *Paspalum rufum*. *Annals of botany*, 123(5):901–915.
- SOLOVYEV V, KOSAREV P, SELEDOV I Y VOROBYEV D (2006).** Automatic annotation of eukaryotic genes, pseudogenes and promoters. *Genome Biology*, 7(1):S10.
-

- SORENG RJ, PETERSON PM, ROMASCHENKO K, DAVIDSE G, ZULOAGA FO, JUDZIEWICZ EJ, FILGUEIRAS TS, DAVIS JI Y MORRONE O (2015).** A worldwide phylogenetic classification of the *Poaceae* (*Gramineae*). *Journal of Systematics and Evolution*, 53(2):117–137.
- SPAIN BH, KOO D, RAMAKRISHNAN M, DZUDZOR B Y COLICELLI J (1995).** Truncated forms of a novel yeast protein suppress the lethality of a G protein α subunit deficiency by interacting with the β subunit. *Journal of Biological Chemistry*, 270(43):25435–25444. ASBMB.
- SPENCER MW, CASSON SA Y LINDSEY K (2007).** Transcriptional profiling of the *Arabidopsis* embryo. *Plant physiology*, 143(2):924–940.
- SPILLANE C, CURTIS MD Y GROSSNIKLAUS U (2004).** Apomixis technology development—virgin births in farmers’ fields? *Nature biotechnology*, 22(6):687–691.
- STEIN J, PESSINO SC, MARTÍNEZ EJ, RODRIGUEZ MP, SIENA LA, QUARÍN CL Y ORTIZ JPA (2007).** A genetic map of tetraploid *Paspalum notatum* Flüggé (bahiagrass) based on single-dose molecular markers. *Molecular Breeding*, 20(2):153–166.
- STEIN J, QUARÍN CL, MARTÍNEZ EJ, PESSINO SC Y ORTIZ JPA (2004).** Tetraploid races of *Paspalum notatum* show polysomic inheritance and preferential chromosome pairing around the apospory-controlling locus. *Theoretical and Applied Genetics*, 109(1):186–191.
- STEIN JC, YU Y, COPETTI D, ZWICKL DJ, ZHANG L, ZHANG C, CHOUGULE K, GAO D, IWATA A, GOICOECHEA JL, WEI S, WANG J, LIAO Y, WANG M, JACQUEMIN J, BECKER C, KUDRNA D, ZHANG J, LONDONO CEM, SONG X, LEE S, SANCHEZ P, ZUCCOLO A, AMMIRAJU JSS, TALAG J, DANOWITZ A, RIVERA LF, GSCHWEND AR, NOUTSOS C, WU Cc, KAO Sm, ZENG Jw, WEI Fj, ZHAO Q, FENG Q, EL BAIDOURI M, CARPENTIER MC, LASSERRE E, COOKE R, ROSA FARIAS DD, DA MAIA LC, DOS SANTOS RS, NYBERG KG, McNALLY KL, MAULEON R, ALEXANDROV N, SCHMUTZ J, FLOWERS D, FAN C, WEIGEL D, JENA KK, WICKER T, CHEN M, HAN B, HENRY R, HSING YiC, KURATA N, DE OLIVEIRA AC, PANAUD O, JACKSON SA, MACHADO CA, SANDERSON MJ, LONG M, WARE D Y WING RA (2018).** Genomes of 13 domesticated and wild rice relatives highlight genetic conservation, turnover and innovation across the genus *Oryza*. *Nature Genetics*, 50(2):285–296.
- STIRNIMANN CU, PETSALAKI E, RUSSELL RB Y MÜLLER CW (2010).** WD40 proteins propel cellular networks. *Trends in Biochemical Sciences*, 35(10):565–574.

- STRASBURGER E (1908)**. Lehrbuch der Botanik für Hochschulen. Fischer.
- SUN B, ZHU Z, LIU R, WANG L, DAI F, CAO F Y LIU S (2020)**. TRANSPARENT TESTA GLABRA1 (TTG1) regulates leaf trichome density in tea *Camellia sinensis*. *Nordic Journal of Botany*, 38(1).
- SUNNOTEL O, HIRIPI L, LAGAN K, MCDAID JR, DE LEÓN JM, MIYAGAWA Y, CROWE H, KALUSKAR S, WARD M, SCULLION C, CAMPBELL A, DOWNES CS, HIRST D, BARTON D, MOCANU E, TSUJIMURA A, COX MB, ROBSON T Y WALSH CP (2010)**. Alterations in the steroid hormone receptor co-chaperone FKBPL are associated with male infertility: A case-control study. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 8:1–8.
- SZKLARCZYK D, MORRIS JH, COOK H, KUHN M, WYDER S, SIMONOVIC M, SANTOS A, DONCHEVA NT, ROTH A, BORK P, JENSEN LJ Y VON MERING C (2017)**. The STRING database in 2017: quality-controlled protein–protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Research*, 45(D1):D362–D368.
- TALMADGE PA (2018)**. Intergeneric hybrid plants and methods of production. Google Patents. US Patent 10,694,691.
- TANG H, BOWERS JE, WANG X, MING R, ALAM M Y PATERSON AH (2008)**. Synteny and collinearity in plant genomes. *Science*, 320(5875):486–488.
- TARCHINI R, BIDDLE P, WINELAND R, TINGEY S Y RAFALSKI A (2000)**. The complete sequence of 340 kb of DNA around the rice ADH1–ADH2 region reveals interrupted colinearity with maize chromosome 4. *The Plant Cell*, 12(3):381–391.
- TEPPNER H (1996)**. Adventitious embryony in *Nigritella* (*Orchidaceae*). *Folia Geobotanica*, 31(3):323–331.
- THE INTERNATIONAL BRACHYPODIUM INITIATIVE (2010)**. Genome sequencing and analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Nature*, 463(7282):763–768.
- THE INTERNATIONAL WHEAT GENOME SEQUENCING CONSORTIUM (2014)**. A chromosome-based draft sequence of the hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum*) genome. *Science*, 345(6194):1251788.
- THE UNIPROT CONSORTIUM (2015)**. UniProt: a hub for protein information. *Nucleic acids research*.
- THOMAS JR CA (1971)**. The genetic organization of chromosomes. *Annual review of genetics*, 5(1):237–256.

- TIWARI JK, LUTHRA SK, KUMAR V, BHARDWAJ V, SINGH RK, SRIDHAR J, ZINTA R Y KUMAR S (2017).** Genomics in True Potato Seed (TPS) technology: Engineering cloning through seeds. En Kumar Chakrabarti S, Xie C y Kumar Tiwari J, editores, *The Potato Genome*, Compendium of Plant Genomes, pp. 297–305. Springer International Publishing, Cham.
- TSVETOVA M, ELKONIN L E ITALIANSKAYA Y (2019).** Pseudogamous apomixis in maize and sorghum in diploid-tetraploid crosses. *Phyton*, 88(4).
- TUCKER MR, ARAUJO ACG, PAECH NA, HECHT V, SCHMIDT EDL, ROSSELL JB, VRIES SCD Y KOLTUNOW AMG (2003).** Sexual and Apomictic Reproduction in *Hieracium* subgenus *Pilosella* are closely interrelated developmental pathways. *The Plant Cell*, 15(7):1524–1537.
- URBANI MH, DOVAL DW, SARTOR ME, GALDEANO F, BLOUNT AR, QUESENBERRY KH, MACKOWIAK CL Y QUARÍN CL (2017).** Registration of ‘Boyero UNNE’ Bahiagrass. pp. 26–32.
- VENTELON M, DEU M, GARSMEUR O, DOLIGEZ A, GHESQUIÈRE A, LORIEUX M, RAMI JF, GLAZSMANN JC Y GRIVET L (2001).** A direct comparison between the genetic maps of sorghum and rice. *Theoretical and Applied Genetics*, 102(2):379–386.
- VERGARA IA Y CHEN N (2010).** Large synteny blocks revealed between *Caenorhabditis elegans* and *Caenorhabditis briggsae* genomes using OrthoCluster. *BMC Genomics*, 11(1):516.
- VESPA L, VACHON G, BERGER F, PERAZZA D, FAURE JD Y HERZOG M (2004).** The immunophilin-interacting protein AtFIP37 from Arabidopsis is essential for plant development and is involved in trichome endoreduplication. *Plant physiology*, 134(4):1283–1292. Publisher: Am Soc Plant Biol.
- VIELLE-CALZADA JP, CRANE CF Y STELLY DM (1996).** Apomixis–The Asexual Revolution. *Science*, 274(5291):1322–1323.
- VIGERS AJ, WIEDEMANN S, ROBERTS WK, LEGRAND M, SELITRENNIKOFF CP Y FRITIG B (1992).** Thaumatin-like pathogenesis-related proteins are antifungal. *Plant Science*, 83(2):155–161.
- VIRMANI SS, SIDDIQ EA Y MURALIDHARAN K (1998).** Advances in hybrid rice technology: Proceedings of the 3rd international symposium on hybrid rice. Int. Rice Res. Inst.

- WALKER AR, DAVISON PA, BOLOGNESI-WINFIELD AC, JAMES CM, SRINIVASAN N, BLUNDELL TL, ESCH JJ, MARKS MD Y GRAY JC (1999). The TRANSPARENT TESTA GLABRA₁ locus, which regulates trichome differentiation and anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis*, encodes a WD40 repeat protein. *The Plant Cell*, 11(7):1337–1349.
- WANG C, LIU Q, SHEN Y, HUA Y, WANG J, LIN J, WU M, SUN T, CHENG Z, MERCIER R Y WANG K (2019). Clonal seeds from hybrid rice by simultaneous genome engineering of meiosis and fertilization genes. *Nature Biotechnology*, 37(3):283–286.
- WANG X, WANG J, JIN D, GUO H, LEE TH, LIU T Y PATERSON A (2015). Genome alignment spanning major *Poaceae* lineages reveals heterogeneous evolutionary rates and alters inferred dates for key evolutionary events. *Molecular Plant*, 8(6):885–898.
- WANG X, WU F, XIE Q, WANG H, WANG Y, YUE Y, GAHURA O, MA S, LIU L, CAO Y, JIAO Y, PUTA F, McCLUNG CR, XU X Y MA L (2012). SKIP Is a component of the spliceosome linking alternative splicing and the circadian clock in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 24(8):3278–3295.
- WARE D, JAISWAL P, NI J, PAN X, CHANG K, CLARK K, TEYTELMAN L, SCHMIDT S, ZHAO W, CARTINHO S, MCCOUCH S Y STEIN L (2002). Gramene: a resource for comparative grass genomics. *Nucleic Acids Research*, 30(1):103–105.
- WEBB MC Y GUNNING BE (1990). Embryo sac development in *Arabidopsis thaliana*. *Sexual Plant Reproduction*, 3(4):244–256.
- WESTERN TL, BURN J, TAN WL, SKINNER DJ, MARTIN-McCAFFREY L, MOFFATT BA Y HAUGHN GW (2001). Isolation and characterization of mutants defective in seed coat mucilage secretory cell development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 127(3):998–1011.
- WICKHAM H (2011). ggplot2. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics*, 3(2):180–185.
- WICKHAM H, AVERICK M, BRYAN J, CHANG W, MCGOWAN LD, FRANÇOIS R, GROLEMUND G, HAYES A, HENRY L, HESTER J Y OTHERS (2019). Welcome to the Tidyverse. *Journal of Open Source Software*, 4(43):1686.
- WICKHAM H, FRANÇOIS R, HENRY L Y MÜLLER K (2015). dplyr: A Grammar of Data Manipulation, volumen 3. R package version 0.4.
- WORTHINGTON M, EBINA M, YAMANAKA N, HEFFELFINGER C, QUINTERO C, ZAPATA YP, PEREZ JG, SELVARAJ M, ISHITANI M, DUITAMA J, DE LA HOZ JF, RAO I,

- DELLAPORTA S, TOHME J Y ARANGO J (2019).** Translocation of a parthenogenesis gene candidate to an alternate carrier chromosome in apomictic *Brachiaria humidicola*. *BMC Genomics*, 20(1):41.
- WORTHINGTON M, HEFFELFINGER C, BERNAL D, QUINTERO C, ZAPATA YP, PEREZ JG, DE VEGA J, MILES J, DELLAPORTA S Y TOHME J (2016).** A parthenogenesis gene candidate and evidence for segmental allopolyploidy in apomictic *Brachiaria decumbens*. *Genetics*, 203:1117–1132.
- WU Y, ZHOU C Y YUAN Q (2018).** Role of DNA and RNA N⁶-adenine methylation in regulating stem cell fate. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 13(1):31–38. Bentham Science Publishers.
- XIAO M, ZHANG Y, CHEN X, LEE EJ, BARBER CJS, CHAKRABARTY R, DESGAGNÉ-PENIX I, HASLAM TM, KIM YB, LIU E, MACNEVIN G, MASADA-ATSUMI S, REED DW, STOUT JM, ZERBE P, ZHANG Y, BOHLMANN J, COVELLO PS, DE LUCA V, PAGE JE, RO DK, MARTIN VJJ, FACCHINI PJ Y SENSEN CW (2013).** Transcriptome analysis based on next-generation sequencing of non-model plants producing specialized metabolites of biotechnological interest. *Journal of Biotechnology*, 166(3):122–134.
- XIE E, LI Y, TANG D, LV Y, SHEN Y Y CHENG Z (2019).** A strategy for generating rice apomixis by gene editing. *Journal of Integrative Plant Biology*, 61(8):911–916.
- YAMADA-AKIYAMA H, AKIYAMA Y, EBINA M, XU Q, TSURUTA SI, YAZAKI J, KISHIMOTO N, KIKUCHI S, TAKAHARA M, TAKAMIZO T, SUGITA SI Y NAKAGAWA H (2009).** Analysis of expressed sequence tags in apomictic guineagrass (*Panicum maximum*). *Journal of Plant Physiology*, 166(7):750–761.
- YAMAGUCHI A Y ABE M (2012).** Regulation of reproductive development by non-coding RNA in *Arabidopsis*: to flower or not to flower. *Journal of Plant Research*, 125(6):693–704.
- YOUNG BA, SHERWOOD RT Y BASHAW EC (1979).** Cleared-pistil and thick-sectioning techniques for detecting aposporous apomixis in grasses. *Canadian Journal of Botany*, 57(15):1668–1672.
- YU G, WANG LG, HAN Y Y HE QY (2012).** clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters. *Omics: a journal of integrative biology*, 16(5):284–287.

- YU Y, LI Y, HUANG G, MENG Z, ZHANG D, WEI J, YAN K, ZHENG C Y ZHANG L (2011).** PwHAP5, a CCAAT-binding transcription factor, interacts with PwFKBP12 and plays a role in pollen tube growth orientation in *Picea wilsonii*. *Journal of experimental botany*, 62(14):4805–4817. Publisher: Oxford University Press.
- ZAPPACOSTA D, GALLARDO J, CARBALLO J, MEIER M, RODRIGO JM, GALLO CA, SELVA JP, STEIN J, ORTIZ JPA, ALBERTINI E Y 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.
- ZARATIEGUI M, IRVINE DV Y MARTIENSSEN RA (2007).** Noncoding RNAs and Gene Silencing. *Cell*, 128(4):763–776.
- ZENG X, NESBITT MJ, PEI J, WANG K, VERGARA IA Y CHEN N (2008).** OrthoCluster: a new tool for mining syntenic blocks and applications in comparative genomics. En *Proceedings of the 11th international conference on Extending database technology: Advances in database technology*, pp. 656–667.
- ZHANG G, LIU X, QUAN Z, CHENG S, XU X, PAN S, XIE M, ZENG P, YUE Z, WANG W, TAO Y, BIAN C, HAN C, XIA Q, PENG X, CAO R, YANG X, ZHAN D, HU J, ZHANG Y, LI H, LI H, LI N, WANG J, WANG C, WANG R, GUO T, CAI Y, LIU C, XIANG H, SHI Q, HUANG P, CHEN Q, LI Y, WANG J, ZHAO Z Y WANG J (2012).** Genome sequence of foxtail millet (*Setaria italica*) provides insights into grass evolution and biofuel potential. *Nature Biotechnology*, 30(6):549–554.
- ZHANG YC Y CHEN YQ (2013).** Long noncoding RNAs: New regulators in plant development. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 436(2):111–114.
- ZHANG YC, LIAO JY, LI ZY, YU Y, ZHANG JP, LI QF, QU LH, SHU WS Y CHEN YQ (2014).** Genome-wide screening and functional analysis identify a large number of long noncoding RNAs involved in the sexual reproduction of rice. *Genome Biology*, 15(12):512.
- ZHAO M, MOROHASHI K, HATLESTAD G, GROTEWOLD E Y LLOYD A (2008).** The TTG1-bHLH-MYB complex controls trichome cell fate and patterning through direct targeting of regulatory loci. *Development*, 135(11):1991–1999. Publisher: The Company of Biologists Ltd Section: Research Article.
- ZHONG S, LI H, BODI Z, BUTTON J, VESPA L, HERZOG M Y FRAY RG (2008).** MTA is an *Arabidopsis* messenger RNA adenosine methylase and interacts with a homolog of a sex-specific splicing factor. *The Plant Cell*, 20(5):1278–1288. Am. Soc. Plant Biol.

- ZILLI AL, ACUÑA CA, SCHULZ RR, BRUGNOLI EA, GUIDALEVICH V, QUARÍN CL Y MARTÍNEZ EJ (2018)**. Widening the gene pool of sexual tetraploid bahiagrass: Generation and reproductive characterization of a sexual synthetic tetraploid population. *Crop Science*, 58(2):762–772.
- ZILLI AL, ACUÑA CA, SCHULZ RR, MARCÓN F, BRUGNOLI EA, NOVO SF, QUARÍN CL Y MARTÍNEZ EJ (2019)**. Transference of natural diversity from the apomictic germplasm of *Paspalum notatum* to a sexual synthetic population. *Annals of Applied Biology*, 175(1):18–28.
- ZILLI AL, BRUGNOLI EA, MARCÓN F, BILLA MB, RIOS EF, MARTÍNEZ EJ Y ACUÑA CA (2015)**. Heterosis and expressivity of apospory in tetraploid bahiagrass hybrids. *Crop Science*, 55(3):1189–1201.
- ZILLI AL, HOJSGAARD DH, BRUGNOLI EA, ACUÑA CA, HONFI AI, URBANI MH, QUARÍN CL Y MARTÍNEZ EJ (2014)**. Genetic relationship among *Paspalum* species of the subgenus *Anachyris*: Taxonomic and evolutionary implications. *Flora: Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 209(10):604–612.
- ZIMIN AV, MARÇAIS G, PUIU D, ROBERTS M, SALZBERG SL Y YORKE JA (2013)**. The MaSuRCA genome assembler. *Bioinformatics*, 29(21):2669–2677.
- ZÜHL L, VOLKERT C, IBBERSON D Y SCHMIDT A (2019)**. Differential activity of F-box genes and E3 ligases distinguishes sexual versus apomictic germline specification in *Boechera*. *Journal of Experimental Botany*, 70(20):5643–5657.

8. Anexos

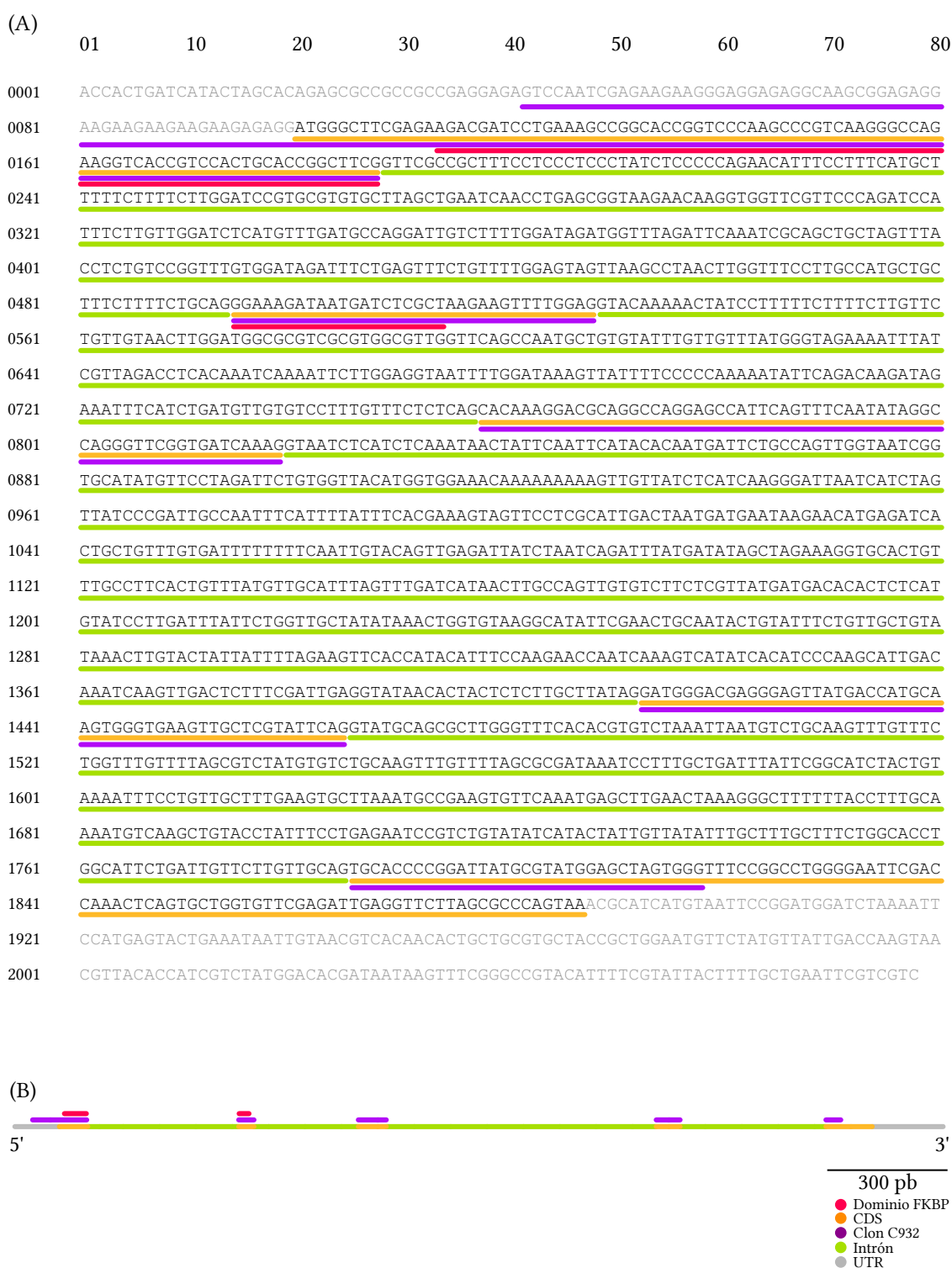


FIGURA A.1: Transcripto del gen de *Oryza sativa* oso2g0760300. **A)** Secuencia transcrita del gen *PPI* de arroz. Se indica en rojo la localización del dominio FKBP y en violeta la región de hibridación con el clon C932. **B)** Estructura del transcripto. Se observan los cuatro intrones del gen. El clon C932 hibrida parcialmente en la región 5' UTR y prácticamente en la totalidad de la región codificante. El dominio de la proteína se encuentra codificado únicamente en los primeros dos exones del gen.

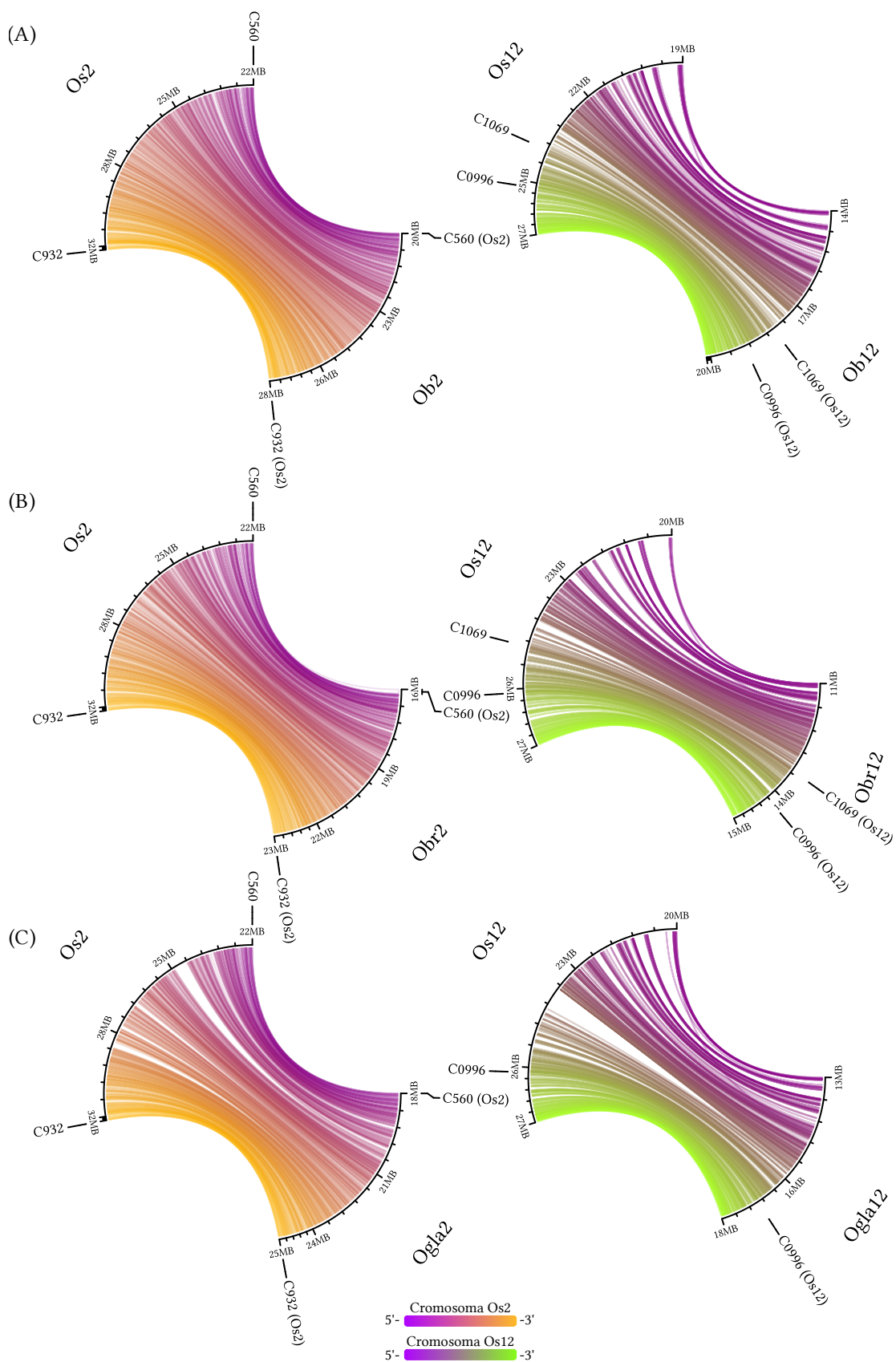


FIGURA A.2: Análisis de conservación de la sintenia en las regiones del Os2 y Os12 de *Oryza sativa* ligadas al ACR de *Paspalum notatum* respecto a diferentes especies del género *Oryza*. **A)** Análisis en *O. barthii*. **B)** Análisis en *O. brachyantha*. **C)** Análisis en *O. glaberrima*. En negrita, se identifican los marcadores ligados al ACR.

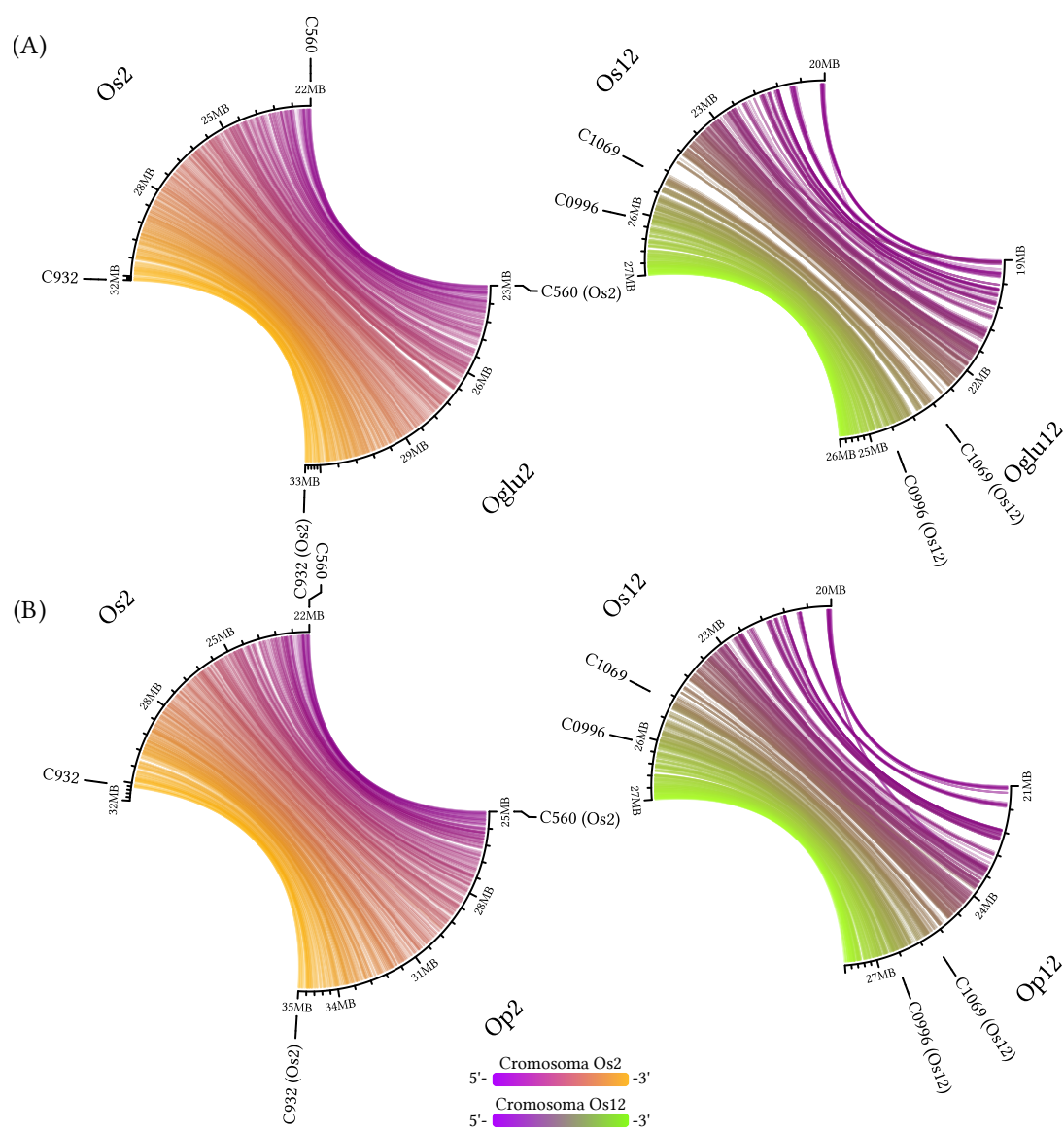


FIGURA A.3: Análisis de conservación de la sintenía en las regiones del Os2 y Os12 de *Oryza sativa* ligadas al ACR de *Paspalum notatum* respecto a diferentes especies del género *Oryza*. **A)** Análisis en *O. glumipatula*. **B)** Análisis en *O. punctata*. En negrita, se identifican los marcadores ligados al ACR.

TABLA A.1: Localizaciones de las regiones de estudio de los cromosomas Os2 y Os12 de *Oryza sativa* grupo Japonica y de sus segmentos sinténicos en las gramíneas analizadas

Especie	Límite 5'	Límite 3'	Localización cromosómica	Longitud (Mpb)
Os2				
<i>O. sativa</i> grupo Japonica	OS02G0591700	OS02G0770800	2:22.882.165-32.517.155	9,63
<i>S. bicolor</i>	SORBI_3004G198400	SORBI_3004G312500	4:54.951.290-64.943.098	9,99
<i>S. italica</i>	SETIT_018309mg	SETIT_016274mg	1:29.477.369-39.265.383	9,79
<i>B. distachyon</i>	BRADI_3G08900V3	BRADI_3G57680V3	3:7.025.147-57.126.248	50,10
<i>O. sativa</i> grupo Indica	BGOSGA006144	BGOSGA005531	2:24.589.270-34.620.156	10,03
<i>O. barhii</i>	OBART02G22390	OBART02G34070	2:20.242.775-28.629.626	8,39
<i>O. brachyantha</i>	OBO2G29860	OBO2G40940	2:16.272.446-24.284.340	8,01
<i>O. blaberrima</i>	ORGLA02G0191400	ORGLA02G0294900	2:18.574.817-26.255.076	7,68
<i>O. glumipatula</i>	OGLUM02G22760	OGLUM02G35230	2:23.898.637-34.493.582	10,59
<i>O. punctata</i>	OPUNC02G20340	OPUNC02G31470	2:25.197.760-36.291.476	11,09
<i>O. nivara</i>	ONIVA02G25060	ONIVA02G36130	2:22.740.698-31.359.979	8,62
Os12				
<i>O. sativa</i> grupo Japonica	OS12G0515400	OS12G0641500	12:20.005.405-27.529.682	7,52
<i>S. bicolor</i>	SORBI_3008G112300	SORBI_3008G193300	8:51.918.409-62.671.469	10,75
<i>S. italica</i>	SETIT_024403mg	SETIT_021670mg	3:45.021.159-50.597.016	5,58
<i>B. distachyon</i>	BRADI_4G06300V3	BRADI_4G00206V3	4:5.256.132-27.611	5,23
<i>O. sativa</i> grupo Indica	BGOSGA037477	BGOSGA035747	12:16.245.657-23.037.434	6,79
<i>O. barhii</i>	OBART12G13740	OBART12G20310	12:14.452.959-18.975.830	4,52
<i>O. brachyantha</i>	OB12G21400	OB12G27110	12:11.039.068-15.316.620	4,28
<i>O. blaberrima</i>	ORGLA12G0121000	ORGLA12G0176700	12:13.938.292-20.546.173	6,61
<i>O. glumipatula</i>	OGLUM12G15410	OGLUM12G22110	12:19.982.480-26.738.595	6,76
<i>O. punctata</i>	OPUNC12G12390	OPUNC12G18640	12:21.105.071-27.929.869	6,82
<i>O. nivara</i>	ONIVA12G14180	ONIVA12G18990	12:15.779.284-20.065.437	4,29

TABLA A.2: Regiones centroméricas de los cromosomas de *Oryza sativa*

Cromosoma	Inicio (pb)	Fin (pb)
Os1	16.742.196	16.847.194
Os2	13.579.189	13.580.640
Os3	19.404.121	19.544.627
Os4	9.706.596	9.888.181
Os5	12.427.585	12.479.755
Os6	15.282.690	15.423.582
Os7	12.119.072	12.185.863
Os8	12.870.263	13.061.068
Os9	2.750.629	2.761.610
Os10	8.170.469	8.309.866
Os11	11.994.674	12.039.486
Os12	11.873.007	12.010.077

Datos obtenidos del *Rice Genome Annotation Project*[®] (Ouyang *et al.*, 2007)

TABLA A.3: Composición de las bases de transcritos de *Paspalum notatum*

Base de transcritos	Cantidad de transcritos	Transcritos con homología a genes de <i>O. sativa</i>	Transcritos sin homología a genes de <i>O. sativa</i>
DET	13.388	9.880	3.508
Up Sex	4.076	2.586	1.490
Up Sex cod	3.137	2.360	777
Up Sex no-cod	939	226	713
Up Apo	9.312	7.294	2.018
Up Apo cod	7.166	6.599	567
Up Apo no-cod	2.146	695	1.451

DET: Transcritos diferenciales entre los genotipos sexual y apomítico; Up Sex: Transcritos sobrexpresados en el genotipo sexual; Up Sex cod: Transcritos codificantes sobrexpresados en el genotipo sexual; Up Sex no-cod: Transcritos no codificantes sobrexpresados en el genotipo sexual; Up Apo: Transcritos sobrexpresados en el genotipo apomítico; Up Apo cod: Transcritos codificantes sobrexpresados en el genotipo apomítico; Up Apo no-cod: Transcritos no codificantes sobrexpresados en el genotipo apomítico.

TABLA A.4: Intervalos de confianza de las proporciones de transcritos diferenciales mapeados por cromosoma de *Oryza sativa*

Crom.	Genes por crom.	Transcritos Up Sex cod			Transcritos Up Apo cod			Transcritos Up Sex no-cod			Transcritos Up Apo no-cod		
		Genes aso-ciados	Límites Newcombe	Prop.	Genes aso-ciados	Límites Newcombe	Prop.	Genes aso-ciados	Límites Newcombe	Prop.	Genes aso-ciados	Límites Newcombe	Prop.
Os1	4967	323	0,058-0,072	0,065 ^{abcd}	939	0,178-0,200	0,189 ^b	37	0,010-0,002	0,007 ^a	90	0,014-0,022	0,018 ^{abc}
Os2	3986	277	0,062-0,077	0,049 ^{bcd}	918	0,217-0,243	0,23 ^a	32	0,011-0,002	0,008 ^a	106	0,022-0,032	0,026 ^a
Os3	4273	351	0,074-0,090	0,057 ^d	839	0,184-0,208	0,196 ^b	27	0,009-0,002	0,006 ^a	93	0,017-0,026	0,021 ^{ab}
Os4	3158	209	0,058-0,075	0,076 ^{abcd}	597	0,175-0,203	0,189 ^b	18	0,009-0,002	0,005 ^a	46	0,011-0,019	0,014 ^{bc}
Os5	2860	199	0,060-0,079	0,061 ^{bcd}	531	0,171-0,200	0,186 ^b	19	0,010-0,002	0,006 ^a	66	0,018-0,029	0,023 ^{ab}
Os6	2972	169	0,049-0,065	0,066 ^{abc}	515	0,160-0,187	0,173 ^c	23	0,011-0,002	0,007 ^a	34	0,008-0,015	0,011 ^c
Os7	2733	179	0,056-0,075	0,057 ^{abcd}	489	0,165-0,193	0,179 ^b	13	0,008-0,001	0,004 ^a	57	0,016-0,027	0,020 ^{ab}
Os8	2440	185	0,066-0,087	0,056 ^{cd}	486	0,183-0,215	0,199 ^b	17	0,011-0,002	0,006 ^a	44	0,013-0,024	0,018 ^{abc}
Os9	1992	122	0,051-0,072	0,07 ^{abc}	298	0,134-0,165	0,15 ^{cd}	9	0,008-0,002	0,004 ^a	27	0,009-0,019	0,013 ^{bc}
Os10	1981	97	0,040-0,059	0,065 ^a	266	0,120-0,150	0,134 ^d	8	0,007-0,002	0,004 ^a	37	0,013-0,025	0,018 ^{abc}
Os11	2275	128	0,047-0,066	0,069 ^{ab}	349	0,139-0,168	0,153 ^{cd}	14	0,010-0,002	0,006 ^a	40	0,013-0,023	0,017 ^{abc}
Os12	2047	117	0,047-0,068	0,082 ^{abc}	369	0,164-0,197	0,18 ^c	9	0,008-0,002	0,004 ^a	55	0,020-0,034	0,026 ^a

Up Sex cod: Transcritos codificantes sobrepresados en el genotipo sexual; Up Apo cod: Transcritos codificantes sobrepresados en el genotipo apomítico; Up Sex no-cod: Transcritos no codificantes sobrepresados en el genotipo sexual; Up Apo no-cod: Transcritos no codificantes sobrepresados en el genotipo apomítico; Genes por cromosoma: Cantidad de genes de *O. sativa* por cromosoma; Genes asociados: Cantidad de genes de *O. sativa* asociados a transcritos diferenciales por cromosoma; Prop.: Proporción de genes de *O. sativa* asociados a transcritos diferenciales respecto al total de genes por cromosoma. Letras diferentes indican proporciones estadísticamente diferentes (ic no solapados).

TABLA A.5: Resultado de la búsqueda BLASTn de secuencias ligadas al ACR en los *scaffolds* del citotipo diploide R1 de *Paspalum notatum*

Secuencia problema	UTG	% identidad	Long. alin.	Inicio (problema)	Fin (problema)	Inicio (UTG)	Fin (UTG)	e-value	bit score
isotig11445	utg001669l [†]	90	129	596	722	287.827	287.704	4e ⁻³⁷	159
		92	465	1.227	1.686	293.129	292.681	0	645
		99	84	1.145	1.227	293.367	293.284	8e ⁻³⁴	148
		91	179	973	1.146	293.631	293.461	1e ⁻⁵⁶	224
		98	94	884	976	293.897	293.805	1e ⁻³⁷	161
		93	165	722	880	294.235	294.075	3e ⁻⁵⁸	230
		94	134	596	727	295.283	295.151	2e ⁻⁴⁹	200
		94	143	373	513	295.828	295.689	4e ⁻⁵²	209
		89	138	237	370	296.084	295.955	1e ⁻³⁷	161
		98	136	95	229	296.299	296.166	8e ⁻⁵⁹	231
		93	94	1	94	296.599	296.507	2e ⁻²⁹	134
		85	124	725	846	323.153	323.030	5e ⁻²⁶	122
		isotig17513	utg001669l [†]	81	2.408	417	2.677	462.745	460.479
79	362			62	412	463.198	462.874	6e ⁻⁵²	209
<i>PnMAC5</i>	utg000994l	91	97	1	94	286.680	286.776	5e ⁻²⁹	128
	utg002367l	96	98	1	96	77.913	78.010	2e ⁻³⁸	159
<i>PnMAJ7</i>	utg002456l [†]	95	116	1	115	122.941	123.054	6e ⁻⁴⁴	178
	utg003260l	92	118	1	115	100.877	100.988	1e ⁻³⁶	154
<i>PnMA243</i>	utg000056l	80	152	3	151	580.123	580.269	3e ⁻²²	108
	utg000057l	79	288	22	303	303.193	303.467	7e ⁻⁴³	176
	utg000090l	79	317	2	306	910.556	910.249	9e ⁻⁴⁷	189
	utg000147l	79	278	2	267	502.333	502.069	6e ⁻³⁹	163
	utg000170l	85	239	86	321	970.985	970.751	3e ⁻⁶²	241
		77	313	2	306	1.063.2031.062.9172e ⁻³⁴			148
	utg000190l	81	287	52	323	73.624	73.903	9e ⁻⁵²	206
		89	80	106	185	617.819	617.743	2e ⁻¹⁸	95
	utg000367l	82	310	2	306	89.116	89.406	6e ⁻⁶⁴	246
	utg000428l	79	291	2	282	38.830	39.111	3e ⁻⁴⁶	187
	utg000513l	76	311	2	300	125.776	125.478	7e ⁻³³	143
	utg000520l	81	207	97	299	5	200	6e ⁻³⁴	147
		77	317	2	314	4.987	5.284	3e ⁻³⁶	154
		80	337	2	325	375.429	375.753	4e ⁻⁵⁵	217
	utg000558l	82	330	2	324	105.441	105.757	7e ⁻⁶⁸	259
	utg000644l	83	292	2	287	15.010	14.731	3e ⁻⁶²	241
	utg000706l	80	279	52	324	532.900	533.163	3e ⁻⁴⁷	191
	utg000716l	84	282	48	324	667.858	667.582	3e ⁻⁶⁷	257
		84	113	59	165	761.797	761.907	1e ⁻²⁰	102

TABLA A.5: Resultado de la búsqueda BLASTn de secuencias ligadas al ACR en los *scaffolds* del citotipo diploide R1 de *Paspalum notatum* (continuación)

Secuencia problema	<i>Scaffold</i>	% identidad	Long. alin.	Inicio (problema)	Fin (problema)	Inicio (UTG)	Fin (UTG)	<i>e-value</i>	<i>bit score</i>
	utg000756l	75	339	2	324	495.405	495.723	2e ⁻²⁸	128
	utg000762l	80	289	2	283	117.156	117.439	6e ⁻⁴⁹	196
	utg000891l	80	285	2	283	204.874	204.600	3e ⁻⁵¹	204
	utg001055l	81	296	2	295	351.281	351.566	3e ⁻⁵⁶	220
	utg001223l	79	292	30	313	306.192	306.472	4e ⁻⁴⁵	183
	utg001264l	78	319	2	310	38.947	39.243	4e ⁻⁴⁰	167
	utg001311l	80	327	2	324	109.372	109.064	6e ⁻⁵⁹	230
	utg001465l	80	320	2	311	115.117	115.422	2e ⁻⁵⁴	215
	utg001468l	80	256	35	283	44.730	44.481	4e ⁻⁴⁵	183
	utg001507l	82	120	52	163	206.604	206.486	3e ⁻¹⁷	92
	utg001712l	83	215	75	283	8.589	8.382	6e ⁻⁴⁴	180
	utg001808l	83	321	2	315	497.193	497.506	3e ⁻⁷¹	270
	utg001893l	81	239	75	309	68.853	68.621	2e ⁻⁴³	178
	utg001908l	80	234	86	310	217.049	217.269	3e ⁻³⁷	158
	utg001994l	81	218	52	267	109.176	109.384	2e ⁻³⁹	165
	utg002124l	80	316	2	314	136.501	136.800	9e ⁻⁵⁷	222
		85	178	81	252	141.657	141.833	2e ⁻⁴³	178
	utg002507l	80	253	59	306	38.071	37.831	3e ⁻⁴²	174
	utg002624l	83	123	57	173	115.779	115.898	1e ⁻²⁰	102
	utg002769l	81	266	59	310	59.132	58.875	9e ⁻⁴⁷	189
	utg003199l	83	162	98	255	39.100	38.949	2e ⁻²⁹	132
<i>PnMAJ5</i>	utg000137l	80	112	66	172	152.836	152.729	4e ⁻¹³	77
	utg000199l	95	38	125	161	312.480	312.443	2w4e ⁻⁷	58
	utg000379l	83	87	77	161	346.528	346.442	4e ⁻¹³	77
	utg000513l	85	93	118	207	184.099	184.190	2e ⁻¹⁷	92
	utg000541l	80	142	71	207	492.754	492.619	2e ⁻¹⁷	92
	utg000594l	83	182	10	187	376.585	376.413	7e ⁻³⁶	152
	utg001311l	96	67	131	197	29.996	30.061	5e ⁻²²	106
	utg002476l	80	146	47	189	247.336	247.470	3e ⁻¹⁹	97
<i>PnMT-A70</i>	utg002297l [†]	93	485	2	478	148.894	149.365	0	699
		96	97	474	567	149.641	149.737	8e ⁻³⁶	154
		94	110	662	767	150.511	150.619	2e ⁻³⁷	159
<i>PnEXS</i>	utg000647l	80	1.329	3	1.248	324.800	323.523	0	857
	utg001670l [†]	95	370	1.928	2.290	13.845	13.482	1e ⁻¹⁵⁷	560
		91	1.771	200	1.940	16.099	14.401	0	2.318
		93	179	1	175	16.269	16.097	6e ⁻⁶⁶	255
	utg002589l [†]	89	387	1.927	2.293	71.437	71.063	5e ⁻¹²²	442
		93	1.763	200	1.940	73.701	71.987	0	2.460

TABLA A.5: Resultado de la búsqueda BLASTn de secuencias ligadas al ACR en los *scaffolds* del citotipo diploide R1 de *Paspalum notatum* (continuación)

Secuencia problema	<i>Scaffold</i>	% identidad	Long. alin.	Inicio (problema)	Fin (problema)	Inicio (UTG)	Fin (UTG)	<i>e-value</i>	<i>bit score</i>
		92	179	1	175	73.874	73.699	4e ⁻⁶³	246
<i>PnPP1_Bi</i>	utg000441l [†]	85	549	1	536	84.773	84.262	5e ⁻¹⁴¹	503
	utg002007l [†]	93	58	1	536	84.773	84.262	5e ⁻¹⁴¹	503
<i>PnSORC3</i>	utg002034l [†]	83	2.224	2	2.164	120.112	118.011	0	1.888
<i>PnSPNA1</i>	utg000222l	85	143	39	179	63.337	63.200	2e ⁻³¹	137
	utg000700l	90	146	37	181	522.273	522.132	2e ⁻⁴⁵	183
	utg000705l [†]	89	84	37	120	70.326	70.407	2e ⁻²¹	104
	utg000725l	87	142	42	181	218.359	218.222	2e ⁻³⁶	154
	utg000894l	84	148	37	181	192.247	192.389	4e ⁻³³	143
	utg001842l	83	150	37	182	47.835	47.695	5e ⁻²⁷	122
	utg002163l	88	82	45	125	393.887	393.807	1e ⁻¹⁸	95
	utg003131l	82	147	37	181	174.253	174.114	8e ⁻²⁵	115
utg003392l	88	145	37	181	50.029	50.168	8e ⁻⁴⁰	165	
<i>PnMAU16</i>	utg000479l	92	116	62	176	875.174	875.287	1e ⁻³⁸	161
	utg000774l	90	104	72	175	291.989	292.090	6e ⁻³¹	135
	utg001130l	87	127	50	175	214.864	214.983	4e ⁻³²	139
	utg001131l	86	128	51	176	178.113	178.234	3e ⁻²⁹	130
	utg001356l	89	117	62	176	267.096	266.984	4e ⁻³²	139
	utg001568l	86	115	64	176	338.728	338.838	6e ⁻²⁶	119
	utg001788l	89	125	48	170	480.836	480.955	3e ⁻³⁴	147
<i>PnLNC_QGJ</i>		-	-	-	-	-	-	-	-
<i>PnMA764</i>		-	-	-	-	-	-	-	-
<i>PnMAI3</i>		-	-	-	-	-	-	-	-
<i>PnMAM3</i>		-	-	-	-	-	-	-	-
<i>PnMAN1</i>		-	-	-	-	-	-	-	-

[†]UTGs seleccionados para realizar la caracterización y el análisis de sintenia con los cromosomas Os2 y Os12 de *Oryza sativa*

TABLA A.6: Genes predichos en los diez *scaffolds* del citotipo diploide de *Paspalum notatum* vinculados con el ACR y su homología más cercana en las bases génicas públicas

<i>Scaffold</i>	Posición en el <i>scaffold</i>	Homología con genes de especies vegetales	Ortología en <i>O. sativa</i>	Anotación funcional en <i>O. sativa</i>
utg000441l	6.620–7.469	LOC112898565 ^{Ph}	OS02G0767700	Dedo de zinc RING/FYVE/PHD
	20.220–21.441	LOC112890627 ^{Ph}	OS02G0759500	Dominio de repetición pentatricopetídico
	29.466–31.906	LOC101762209 ^{Si}	OS02G0614400	Proteína con repetición rico en leucina
	38.928–40.787	LOC112890441 ^{Ph}	OS02G0770100	Similar a proteína de unión a GAMYB
	63.494–66.501	LOC110434674 ^{Sb}	OS02G0773200	Proteína con dominio UspA
	72.145–79.100	LOC112889980 ^{Ph}	OS02G0770600	Proteína de función desconocida DUF1644
	82.212–86.534	LOC112889990 ^{Ph}	OS02G0760300	Peptidil-prolil <i>cis/trans</i> isomerasa FKBP
	87.313–89.951	LOC8078905 ^{Sb}	OS02G0773500	Proteína de función desconocida DUF3464
	122.134–126.220	LOC8078906 ^{Sb}	OS02G0761100	Similar a ciclofilina 40
	128.434–130.036	LOC8075188 ^{Sb}	OS02G0774500	Similar a ADN-3-metiladenina glicosilasa
	134.347–143.081	LOC101767636 ^{Si}	OS02G0614400	Similar a ATPREP2
	145.141–147.770	LOC112889154 ^{Ph}	OS02G0771100	Proteína hipotética conservada
	153.640–157.750	LOC101769932 ^{Si}	OS10G0400800	Similar a sintetasa de cadena α fenilalanina de ARNT
	161.599–162.144	LOC100193637 ^{Zm}	OS02G0762300	Proteína de biosíntesis de ARNT 2-tiocitidina
	169.110–169.523	LOC112892456 ^{Ph}	OS02G0775200	Inhibidor CDK del desarrollo seminal
	179.746–183.500	LOC101771532 ^{Si}	OS12G0597000	Proteína relacionada con SG1
	186.901–195.499	LOC112899624 ^{Ph}	OS02G0775300	Unión a ATO, ADN y helicasa
	199.356–200.047	LOC8078916 ^{Sb}	OS02G0763000	Proteína de función desconocida rica en cisteína
	203.615–206.536	LOC101773702 ^{Si}	OS02G0760500	Similar a galactosidasa 2- α -L-fucosyltransferasa
	214.258–218.532	LOC112890914 ^{Ph}	OS02G0776900	Activaros d ella transcripción inducido por Giberelinas
	222.412–228.055	LOC112875080 ^{Ph}	OS02G0777400	Similar a xiloglucan fucosiltransferasa
	229.047–230.591	LOC112885421 ^{Ph}	OS02G0764400	Similar a galactosidasa 2- α -L-fucosyltransferasa
	239.272–240.359	LOC100283908 ^{Zm}	OS02G0765400	Similar a alfa-amilasa
	253.296–254.245	LOC113463576 ^{Pd}	OS04G0540600	Ferredoxina-nitrato reductasa
	272.905–273.231	LOC8078922 ^{Sb}	OS02G0778600	Proteína de función desconocida DUF1685

TABLA A.6: Genes predichos en los diez *scaffolds* del citotipo diploide de *Paspalum notatum* vinculados con el ACR y su homología más cercana en las bases génicas públicas (continuación)

<i>Scaffold</i>	Posición en el <i>scaffold</i>	Homología con genes de especies vegetales	Ortología en <i>O. sativa</i>	Anotación funcional en <i>O. sativa</i>
	274.444–275.517	LOC112879445 ^{Ph}	OS02G0783100	Prot. relacionada con el factor de terminación de la transcripción mitocondrial
	299.297–299.886	LOC8078923 ^{Sb}	OS03G0851300	Proteína con dominio de unión a ADN represora de la hélice
	305.998–308.889	LOC8078924 ^{Sb}	OS02G0767000	Proteína con dominio C-terminal Remorin
	313.532–319.424	LOC112882351 ^{Ph}	OS02G0767100	Similar a proteína inducida por frío
	319.899–322.398	LOC8075202 ^{Sb}	OS02G0767200	Lipasa clase 3
	327.214–327.845	LOC8078926 ^{Sb}	OS04G0527900	Similar a flavonol sintasa/flavonona 3-hidrolasa
	331.053–333.588	LOC101780983 ^{Si}	OS02G0767500	Transportadora mitocondrial de fosfato
	347.099–347.740	LOC101781794 ^{Si}	OS12G0596600	Proteína hipotética conservada
	348.787–355.892	LOC112878919 ^{Ph}	OS12G0595800	YbaK/aminoacil ARNT sintetasa
utg000705l	24.104–24.379	LOC103627409 ^{Zm}	OS02G0614100	Transportador de nucleótido-azúcar del aparato de Golgi
	26.563–30.224	LOC8059683 ^{Sb}	OS02G0614300	Similar a proteína ANT
	36.327–37.722	LOC101756528 ^{Si}	OS02G0614400	Proteína con dominio aspártico peptidasa
	40.443–41.826	LOC110432997 ^{Sb}	OS02G0761100	Similar a ciclofilina 40
	47.490–49.680	LOC8072462 ^{Sb}	OS02G0767000	Proteína de función desconocida DUF869
	52.433–54.336	LOC101758003 ^{Si}	OS02G0618200	Proteína con dominio B30.2/SPRY
	103.149–107.593	LOC100278954 ^{Zm}	OS02G0617100	Similar a proteína OSIGBA0157A06.2
	113.485–118.499	LOC8059685 ^{Sb}	OS02G0767200	Proteína hipotética conservada
	126.898–131.185	LOC101762743 ^{Si}	OS02G0616100	Similar a proteína de unión a proteínas
	139.433–139.753	LOC8064172 ^{Sb}	—	—
	164.283–164.792	LOC8059688 ^{Sb}	OS02G0617700	Proteína de unión a ácidos nucleicos
	180.449–180.787	LOC101766271 ^{Si}	OS02G0672600	Similar a N6-adenosina-metiltransferasa MT-A70
	201.690–208.594	LOC101756541 ^{Si}	OS02G0743700	Proteína de unión a ácidos nucleicos

TABLA A.6: Genes predichos en los diez *scaffolds* del citotipo diploide de *Paspalum notatum* vinculados con el ACR y su homología más cercana en las bases génicas públicas (continuación)

<i>Scaffold</i>	Posición en el <i>scaffold</i>	Homología con genes de especies vegetales	Ortología en <i>O. sativa</i>	Anotación funcional en <i>O. sativa</i>
utg001125l	64.980–67.139	LOC8082678 ^{Sb}	OS02G0778600	Similar a <i>CELLULASE 5</i>
	117.181–118.126	LOC112878784 ^{Ph}	OS06G0661700	Proteína de función desconocida DUF1644
	123.060–132.080	LOC8064003 ^{Sb}	OS12G0629300	Proteína C50 peptidasa
	130.281–133.777	LOC112901794 ^{Ph}	OS12G0595800	Similar al clon de ADNC J023098M23
	136.979–137.527	LOC112878605 ^{Ph}	OS12G0595800	Similar a nitrato reductasa
	147.861–149.999	LOC101777359 ^{Si}	OS02G0770500	Reguladora del cambio de fases vegetativa-reproductiva y tiempo a floración
	157.841–158.243	LOC112882974 ^{Ph}	OS12G0595800	Similar al clon de ADNC J023098M23
	162.757–172.788	LOC112882964 ^{Ph}	OS12G0596600	Proteína hipotética conservada
	176.596–178.531	LOC112892413 ^{Ph}	—	—
	190.964–192.512	LOC112899338 ^{Ph}	OS12G0596600	Similar a proteína predicha
	211.874–214.140	LOC8078948 ^{Sb}	OS02G0771600	Similar a oxidasa 1-carboxilasa-1amonociclopropano
	219.037–220.588	LOC101757219 ^{Si}	OS02G0771700	Glicosido hidrolasa
	229.055–230.567	LOC112874908 ^{Ph}	OS07G0102000	Similar a proteína ROC8
	239.402–246.022	LOC101759103 ^{Si}	OS04G0527700	Proteína con dominio CHCH
	254.231–256.594	LOC8075215 ^{Sb}	OS02G0772300	Proteína con dominio Acyl-CoA N-acyltransferasa
	267.201–269.456	HDZIV14_OCL14 ^{Zm}	—	—
	286.858–287.742	LOC101761143 ^{Si}	OS12G0615400	Gen hipotético conservado
	304.719–306.448	LOC8075220 ^{Sb}	OS04G0530500	Dedo de zinc RING/FYVE/PHD
	309.661–310.056	LOC101763021 ^{Si}	OS12G0595800	Similar al clon de ADNC J023098M23
	328.445–328.666	LOC8081920 ^{Sb}	OS02G0773500	Proteína de función desconocida DUF3464
	337.926–342.390	LOC8081922 ^{Sb}	OS02G0773732	Gen hipotético conservado
	354.726–360.630	LOC8081924 ^{Sb}	OS02G0774500	Similar a ADN-3-metiladenina glicosilasa
	360.843–361.746	LOC8055345 ^{Sb}	OS03G0851300	Proteína con dominio de unión a ADN represora de la hélice
	370.779–376.432	LOC112878925 ^{Ph}	OS02G0775200	Transportadora de manganeso

TABLA A.6: Genes predichos en los diez *scaffolds* del citotipo diploide de *Paspalum notatum* vinculados con el ACR y su homología más cercana en las bases génicas públicas (continuación)

<i>Scaffold</i>	Posición en el <i>scaffold</i>	Homología con genes de especies vegetales	Ortología en <i>O. sativa</i>	Anotación funcional en <i>O. sativa</i>
	377.767–378.270	LOC112900759 ^{Ph}	OS12G0597500	Proteína hipotética conservada
	388.353–388.353	LOC101767502 ^{Si}	OS02G0775400	Similar a proteína kinesín de cadena larga
	399.164–399.391	LOC101767903 ^{Si}	OS02G0775600	Dedo de zinc C ₂ H ₂
	431.124–434.364	LOC101768309 ^{Si}	OS12G0597700	Similar a <i>WRKY2</i>
	472.517–473.593	LOC8081932 ^{Sb}	OS04G0534500	Similar a proteína OSIGBa0159I10.11
	483.548–485.623	LOC112880833 ^{Ph}	OS02G0776800	Proteína de reparación del ADN meiótica y somática
	490.883–492.116	LOC112873752 ^{Ph}	OS12G0616400	Activaros de ella transcripción inducido por Giberelinas
	506.367–514.180	LOC8081936 ^{Sb}	OS04G0538000	Proteína con dominio DENN
	525.967–530.657	LOC112899328 ^{Ph}	OS12G0616500	Similar a intercambiadora de cationes/protones
utg001669l	144.274–146.388	LOC8070109 ^{Sb}	—	—
	154.380–158.560	LOC103640570 ^{Zm}	OS12G0601000	Similar a proteína con repeticiones ricas en leucina
	170.092–170.721	LOC8076644 ^{Sb}	OS12G0600701	Proteína hipotética conservada
	205.092–208.197	LOC101760124 ^{Si}	OS12G0616200	Similar a HUELLENLOS
	279.173–280.181	LOC101760950 ^{Si}	—	—
	284.515–289.043	LOC101760124 ^{Si}	OS12G0616200	Similar a HUELLENLOS
	293.112–301.130	LOC101760533 ^{Si}	OS07G0622100	Similar a proteína ribosomal s6 RPS-2
	307.105–308.835	LOC8070103 ^{Sb}	—	—
	406.366–407.155	LOC101761071 ^{Si}	OS12G0597700	Factor de transcripción WRKY de tolerancia al frío
	411.448–412.516	LOC101760669 ^{Si}	OS04G0544100	Similar a proteína con dominio KH
	432.303–435.589	LOC112886869 ^{Ph}	OS04G0533300	Similar a Remorín
	464.919–465.641	PCO113091 ^{Zm}	—	—
	473.628–476.903	LOC112886502 ^{Ph}	OS04G0533000	Similar a ARN helicasa
	510.755–511.183	LOC8067150 ^{Sb}	—	—
	516.735–517.424	LOC4352700 ^{Os}	OS02G0762400	Inhibidor CDK del desarrollo seminal

TABLA A.6: Genes predichos en los diez *scaffolds* del citotipo diploide de *Paspalum notatum* vinculados con el ACR y su homología más cercana en las bases génicas públicas (continuación)

<i>Scaffold</i>	Posición en el <i>scaffold</i>	Homología con genes de especies vegetales	Ortología en <i>O. sativa</i>	Anotación funcional en <i>O. sativa</i>
	549.679–550.095	LOC101752682 ^{Si}	OS11G0609600	Similar a proteína 14-3-3
	555.984–560.796	LOC112898654 ^{Ph}	OS04G0538166	Similar a nucleolina
	563.268–564.149	LOC100277629 ^{Zm}	OS12G0596300	Proteína con dominio DC1
	567.677–567.677	LOC101786031 ^{Si}	OS02G0672500	Similar a la subunidad tim23 de la translocasa importadora de la membrana mitocondrial interna
	573.778–574.209	LOC112885767 ^{Ph}	OS04G0527800	Carrier de sustrato mitocondrial
utg001670l	6.261–11.290	LOC8069730 ^{Sb}	OS12G0594300	Gen hipotético conservado
	12.370–12.690	LOC8076626 ^{Sb}	OS12G0595000	Similar a EXS C-terminal
	28.079–28.730	LOC101784693 ^{Si}	OS12G0595800	Proteína con dominio relacionado con serina/threonina
	60.459–63.575	LOC112885767 ^{Ph}	OS04G0527800	Similar al clon de ADNC J023098M23
	69.010–69.886	LOC101786031 ^{Si}	OS02G0672500	Similar a la subunidad tim23 de la translocasa importadora de la membrana mitocondrial interna
	73.502–74.341	LOC8076629 ^{Sb}	OS12G0596300	Proteína con dominio DC1
	87.132–87.789	LOC100824560 ^{Bd}	OS02G0672800	Similar a proteína quinasa
	89.501–90.475	LOC112885910 ^{Ph}	OS04G0529700	Dominio DXD glicosiltransferasa
	91.927–93.208	LOC112885911 ^{Ph}	OS04G0532100	Dominio SDR deshidrogenasa/reductasa de cadena corta
	96.153–98.132	PCO156068(373) ^{Zm}	—	—
utg002007l	4.369–10.278	LOC8068590 ^{Sb}	OS02G0743500	Similar a EDR1
	24.548–27.041	LOC103627719 ^{Zm}	OS02G0743900	Similar a proteína de membrana integral TIGR01569
	37.679–42.724	LOC8066441 ^{Sb}	OS02G0767500	Metiltransferasa tipo 11
	44.777–46.254	LOC112893211 ^{Ph}	OS02G0767200	A-expansina <i>OSEXPA5</i>
	55.156–58.997	LOC101785561 ^{Si}	OS02G0767600	Similar a la isoforma ZSTSI-2 Starch sintasa
	111.610–113.532	LOC8075186 ^{Sb}	OS02G0773400	Dominio de unión a nucleótidos cíclicos

TABLA A.6: Genes predichos en los diez *scaffolds* del citotipo diploide de *Paspalum notatum* vinculados con el ACR y su homología más cercana en las bases génicas públicas (continuación)

<i>Scaffold</i>	Posición en el <i>scaffold</i>	Homología con genes de especies vegetales	Ortología en <i>O. sativa</i>	Anotación funcional en <i>O. sativa</i>
	141.367–141.872	LOC112884095 ^{Ph}	OS04G0535400	Dominio tríada histidina
	194.473–194.745	LOC101784083 ^{Si}	OS02G0743700	ATPasa
utg002034l	14.767–16.191	LOC101757284 ^{Si}	OS04G0550600	Similar a proteína predicha
	28.435–30.155	BIF2-47330 ^{Zm}	—	—
	47.267–48.907	LOC101781590 ^{Si}	OS05G0271900	Dominio de repetición pentatricopetídico
	54.340–57.664	LOC101777419 ^{Si}	OS12G0615000	Similar a proteína quinasa
	85.341–87.273	LOC101777009 ^{Si}	OS12G0597700	Similar a WRKY2
	93.147–95.396	LOC111256608 ^{Si}	OS12G0615600	Gen hipotético conservado
	97.638–98.669	LOC4352793 ^{Os}	OS02G0762800	Similar a <i>AtrAD54/CHR25</i>
	116.494–117.237	ORC3b ^{Ps}	—	—
	120.868–124.148	LOC8071473 ^{Sb}	OS12G0616000	Similar a proteína kinesín KIFC3
	132.524–133.600	LOC101774295 ^{Si}	OS12G0629300	Similar a Thaumatin
	161.210–161.873	LOC112884845 ^{Ph}	OS04G0538166	Similar al factor de elongación G
utg002297l	9.729–12.910	LOC101759654 ^{Si}	OS02G0771700	Glicosido hidrolasa
	16.058–17.214	LOC112886623 ^{Ph}	OS02G0764200	Similar a xiloglucan fucosiltransferasa
	23.557–25.241	LOC101778437 ^{Si}	OS02G0670900	Similar a transportadora de aminoácidos
	48.422–49.648	LOC112877547 ^{Ph}	OS02G0764400	Proteína de función desconocida DUF295
	82.891–84.434	LOC112886302 ^{Ph}	OS02G0766700	Factor de transcripción bZIP
	98.635–100.589	LOC112899730 ^{Ph}	OS04G0545100	Proteína con dominio relacionado con serina/threonina
	138.120–142.846	LOC101780722 ^{Si}	—	—
	143.691–144.155	LOC8073913 ^{Sb}	OS02G0672500	Similar a la subunidad tim23 de la translocasa importadora de la membrana mitocondrial interna
	148.898–151.843	LOC101781789 ^{Si}	OS02G0672600	Similar a N ⁶ -adenosina-metiltransferasa MT-A70

TABLA A.6: Genes predichos en los diez *scaffolds* del citotipo diploide de *Paspalum notatum* vinculados con el ACR y su homología más cercana en las bases génicas públicas (continuación)

<i>Scaffold</i>	Posición en el <i>scaffold</i>	Homología con genes de especies vegetales	Ortología en <i>O. sativa</i>	Anotación funcional en <i>O. sativa</i>
	156.990–157.319	LOC107276940 ^{Os}	OS02G0760200	Proteína hipotética conservada
	162.925–163.455	LOC112899320 ^{Ph}	OS02G0767100	Similar a proteína quinasa
	165.024–167.969	LOC103627532 ^{Zm}	OS02G0673100	Transportadora de malato activada por aluminio
utg002456l	463–3.938	ZM_BFC0169A07 ^{Zm}	—	—
	29.284–31.170	LOC101759707 ^{Si}	OS12G0626400	Similar a FITOENE SINTASA 1
	52.433–59.780	LOC112884994 ^{Ph}	OS04G0540300	Similar al clon de ARNM RAFL24-07-B09
	61.774–63.244	LOC8086110 ^{Sb}	OS12G0626200	Proteína de respuesta a Auxinas SAUR
	88.521–88.856	LOC107764493 ^{Nt}	OS02G0759400	Dedo de zinc RING/FYVE/PHD
	109.147–114.624	LOC101754326 ^{Si}	OS04G0545100	Proteína no caracterizada de la familia UPF0120
	116.405–117.108	LOC110430498 ^{Sb}	OS06G0212900	Proteína de shock térmico HSP70
	138.174–142.696	LOC112902381 ^{Ph}	OS04G0532100	Dominio SDR deshidrogenasa/reductasa de cadena corta
	161.893–162.272	LOC101764711 ^{Si}	OS12G0597000	Similar a proteína CALCEURINA B
	172.537–173.055	LOC8081620 ^{Sb}	OS12G0629300	Similar a precursora de Thaumatin relacionada con la patogénesis
	187.929–188.246	LOC8081619 ^{Sb}	OS12G0629300	Similar a Thaumatin
utg002589l	33.886–34.929	LOC112886087 ^{Ph}	OS12G0594000	Proteína con repetición WD40
	38.096–51.845	LOC101782669 ^{Si}	OS12G0594200	Gen hipotético conservado
	60.376–68.267	LOC8069730 ^{Sb}	OS05G0489900	Gen hipotético conservado
	70.440–75.313	LOC8076626 ^{Sb}	OS12G0595000	Similar a EXS C-terminal
	84.186–88.369	LOC101784693 ^{Si}	OS12G0595800	Proteína de función desconocida DUF26
	122.239–122.661	LOC112885767 ^{Ph}	OS04G0527800	Carrier de sustrato mitocondrial
	127.596–128.701	LOC101784693 ^{Si}	OS12G0595800	Proteína con dominio relacionado con serina/threonina
	130.361–131.022	LOC112885767 ^{Ph}	OS04G0527800	Similar al clon de ADNC J023098M23
	135.958–137.371	LOC101786031 ^{Si}	OS02G0672500	Dedo de zinc RING/FYVE/PHD

TABLA A.6: Genes predichos en los diez *scaffolds* del citotipo diploide de *Paspalum notatum* vinculados con el ACR y su homología más cercana en las bases génicas públicas (continuación)

<i>Scaffold</i>	Posición en el <i>scaffold</i>	Homología con genes de especies vegetales	Ortología en <i>O. sativa</i>	Anotación funcional en <i>O. sativa</i>
	140.825–141.646	LOC100277629 ^{Zm}	OS12G0596300	Proteína con dominio DC1
	144.965–146.174	PCO140565 ^{Zm}	—	—
	153.525–153.683	LOC100824560 ^{Bd}	OS02G0672800	Similar a proteína quinasa

Los ID de la columna «Homología con genes de especies vegetales» llevan superíndices que se corresponden con las siguientes especies: Bd: *Brachypodium distachyon*; Nt: *Nicotiana tabacum*; Os: *Oryza sativa*; Pd: *Phoenix dactylifera*; Ph: *Panicum hallii*; Ps: *Paspalum simplex*; Sb: *Sorghum bicolor*; Si: *Setaria italica*; Zm: *Zea mays*.

TABLA A.7: Mapeo de transcritos diferenciales codificantes y no codificantes de *Paspalum notatum* sobre los *scaffolds* del citotipo diploide R1

<i>scaffold</i>	Transcripto	Posición en el <i>scaffold</i>	Anotación funcional del ortólogo en <i>O. sativa</i>	Log ₂ FC	Sobreexpresión	Codificación
utg000441l	TRA_DN19628_co_g1_i1	19.171-19.710	Proteína conservada	7,25	Up Apo	Cod
	TRA_DN24940_co_g1_i1	170.092-170.721	Proteína conservada	7,92	Up Apo	Cod
	TRA_DN29792_co_g1_i3	617-1.488	Proteína conservada	-5,94	Up Sex	No-cod
	TRA_DN36951_co_g1_i1	38.096-51.845	Gen hipotético conservado	7,09	Up Apo	Cod
	TRA_DN36951_co_g1_i2	174.705-175.375	Gen hipotético conservado	7,95	Up Apo	Cod
	TRA_DN37630_co_g1_i1	29.466-31.906	Repetición rica en leucina 2	6,49	Up Apo	Cod
	TRA_DN46306_co_g1_i2	4.369-10.278	Similar a EDR1	9,55	Up Apo	Cod
	TRA_DN48155_co_g1_i1	555.984-560.796	Similar a nucleolina	6,61	Up Apo	Cod
	TRS_DN3946_co_g1_i1	55.156-58.997	Similar a la isoforma zSTSII-2 Starch sintasa	7,62	Up Apo	Cod
utg000705l	TRA_DN32160_co_g1_i1	242.237-248.015	DUF1618	9,68	Up Apo	Cod
	TRA_DN39978_c1_g2_i2	148.449-148.990	Peptidasa de la familia M24	8,13	Up Apo	Cod
	TRS_DN35544_co_g1_i1	17.006-18.691	Similar a proteína ATL1Q	3,69	Up Apo	Cod
	TRS_DN38496_c1_g1_i2	21.976-22.619	Similar a proteína asociada a la senescencia	11,36	Up Apo	Cod
	TRS_DN38496_c1_g1_i2	21.136-21.828	Similar a proteína asociada a la senescencia	9,50	Up Apo	Cod
utg001125l	TRA_DN25535_co_g1_i1	145.141-147.770	Proteína conservada	8,92	Up Apo	Cod
	TRA_DN32729_co_g1_i1	377.411-380.363	Proteína homóloga a CER1	-2,17	Up Sex	Cod
	TRA_DN37159_co_g1_i5	124.634-125.179	Gen hipotético conservado	-6,36	Up Sex	Cod
	TRA_DN46165_co_g1_i1	482.242-482.739	Similar a proteína Calceurina B	2,42	Up Apo	Cod
	TRA_DN46165_co_g1_i1	483.400-487.853	Similar a proteína Calceurina B	2,05	Up Apo	No-cod
	TRS_DN34695_co_g1_i3	174.295-179.186	Similar a quinasa piridoxal	10,37	Up Apo	Cod

TABLA A.7: Tabla A.7: Mapeo de transcritos diferenciales codificantes y no codificantes de *Paspalum notatum* sobre los *scaffolds* del citotipo diploide R1 (continuación)

<i>scaffold</i>	Transcripto	Posición en el <i>scaffold</i>	Anotación funcional del ortólogo en <i>O. sativa</i>	Log ₂ FC	Sobreexpresión	Codificación
utg001669l	TRA_DN31535_co_g2_i1	506.367-514.180	Proteína con dominio DENN	21,49	Up Apo	Cod
	TRA_DN39345_c1_g1_i1	341.256-341.839	Transportador mitocondrial de fosfato	8,32	Up Apo	Cod
	TRA_DN46505_co_g1_i3	70.440-75.313	Similar a EXS C-terminal	2,36	Up Apo	Cod
	TRA_DN46588_co_g1_i3	38.928-40.787	Similar a proteína de unión a GAMYB	11,30	Up Apo	Cod
	TRA_DN47406_c1_g1_i2	388.353-388.353	Similar a proteína kinesín de cadena larga	4,30	Up Apo	Cod
	TRA_DN47457_co_g1_i3	377.970-381.206	Similar a proteína kinesín de cadena larga	4,30	Up Apo	Cod
	TRA_DN47498_co_g1_i4	17.183-18.237	Similar a proteína con dominio NB-ARC	3,82	Up Apo	Cod
	TRS_DN22780_co_g1_i1	406.366-407.155	Factor de transcripción WRKY de tolerancia al frío	7,21	Up Apo	Cod
	TRS_DN34383_co_g1_i1	54.340-57.664	Similar a proteína quinasa	7,64	Up Apo	No-cod
TRS_DN38997_c2_g1_i2	78.777-79.439	Similar a proteína asociada a la senescencia	9,50	Up Apo	Cod	
utg001670l	TRA_DN38331_co_g1_i1	28.260-28.730	Repetición rica en leucina 2	-3,60	Up Sex	Cod
	TRA_DN38331_c1_g2_i1	173.138-174.784	Dominio GDSL lipasa	3,46	Up Apo	Cod
utg002007l	TRA_DN32660_co_g1_i3	381.659-382.018	Proteína homóloga a CER1	-2,17	Up Sex	Cod
	TRA_DN44702_co_g1_i1	530.767-531.776	quinasa receptora	-8,37	Up Sex	Cod
	TRA_DN46246_c3_g1_i1	122.134-126.220	Similar a ciclofilina 40	10,07	Up Apo	Cod
	TRA_DN46690_c4_g2_i1	17.325-17.813	Similar a HMGC1	13,67	Up Apo	Cod

TABLA A.7: Tabla A.7: Mapeo de transcritos diferenciales codificantes y no codificantes de *Paspalum notatum* sobre los *scaffolds* del citotipo diploide R1 (continuación)

<i>scaffold</i>	Transcripto	Posición en el <i>scaffold</i>	Anotación funcional del ortólogo en <i>O. sativa</i>	Log ₂ FC	Sobreexpresión	Codificación
utg002034l	TRA_DN9721_co_g2_i1	330.805-331.472	Similar a proteína inhibidora de pectinesterasa	-5,94	Up Sex	No-cod
utg002297l	TRA_DN32633_co_g1_i1	179.573-180.398	Glicosil hidrolasa	9,29	Up Apo	Cod
	TRA_DN4552_co_g1_i1	179.746-183.500	Proteína relacionada con SG1	10,58	Up Apo	Cod
utg002589l	TRA_DN38331_c1_g2_i1	345.165-345.586	Transportador mitocondrial de fosfato	11,35	Up Apo	Cod
	TRA_DN44695_c1_g1_i5	48.422-49.648	DUF295	9,52	Up Apo	Cod
	TRA_DN45364_co_g1_i1	483.548-485.623	Proteína de replicación A 70 kDa	3,12	Up Apo	Cod
	TRS_DN33884_co_g2_i3	388.387-389.106	Zinc finger, RING/FYVE/PHD-type	-6,50	Up Sex	Cod

Cod: transcripto codificante; No-cod: transcripto no codificante

TABLA A.8: Clasificación GO de genes de *Arabidopsis thaliana* ortólogos a los genes de *Oryza sativa* que se identificaron en los *scaffolds* de *Paspalum notatum* asociados al ACR. Estos genes de *O. sativa* se localizan en las regiones del Os2 y Os12 sinténicas al ACR, y a su vez presentan homología con las secuencias de transcritos de *P. notatum* diferencialmente expresados durante el desarrollo floral.

Categoría GO	Subcategoría GO	ID GO	Genes de <i>A. thaliana</i>
CC	Complejo protéico	GO:0032991	AT2G20450, AT3G12810, AT3G13300, AT3G13340, AT3G20230, AT3G22300, AT3G23890, AT3G24440, AT3G24800, AT3G27740, AT3G54670, AT4G15950, AT4G17560, AT5G44200, AT5G46160, AT5G46630, AT5G49510, AT5G53480, AT5G54200, AT5G63880, AT1G09430, AT1G13180, AT1G03090, AT1G18730, AT1G30120, AT1G65030
CC	→ Componente de la membrana	GO:0044425	AT3G13340, AT3G47700, AT4G12650, AT4G25960, AT5G19200, AT5G35730, AT5G46630, AT5G54200, AT5G63880, AT5G65290, AT1G10030, AT1G18730, AT1G65030
CC	→ Componente de organelas	GO:0044422	AT2G20450, AT2G43090, AT2G45180, AT3G04380, AT3G11950, AT3G12810, AT3G15360, AT3G22300, AT3G22330, AT3G23890, AT3G24440, AT3G27740, AT3G27820, AT3G46560, AT3G47700, AT3G52640, AT3G54670, AT3G58140, AT3G63410, AT4G09650, AT4G10760, AT4G11440, AT4G12650, AT4G15950, AT4G17560, AT4G02060, AT4G26570, AT4G28025, AT4G29060, AT4G32720, AT4G38100, AT4G39710, AT5G10350, AT5G13490, AT5G14040, AT5G17230, AT5G17710, AT5G17920, AT5G19200, AT5G26820, AT5G41480, AT5G45130, AT5G45170, AT5G46630, AT5G46860, AT5G53480, AT5G56550, AT5G57120, AT5G63310, AT5G63880, AT1G02130, AT1G05940, AT1G10290, AT1G13180, AT1G17070, AT1G18730, AT1G20696, AT1G23860, AT1G27450, AT1G30120, AT1G54690, AT1G58030, AT1G65030, AT1G67700, AT1G68070, AT1G75330, AT1G77180, AT1G79280
CC	Confluencia celular	GO:0030054	AT2G20450, AT2G26510, AT2G37170, AT2G42910, AT3G04380, AT3G03140, AT4G12650, AT4G23400, AT5G17920, AT5G22060, AT5G35980, AT5G62890, AT1G10290, AT1G15420, AT1G15940, AT1G63000, AT1G78060, AT1G79280
CC	→ Lumen de membrana	GO:0031974	AT3G04380, AT3G12810, AT3G22300, AT3G22330, AT3G23890, AT3G24440, AT3G46560, AT4G10760, AT4G02060, AT4G32720, AT5G41480, AT5G56550, AT5G57120, AT1G17070, AT1G23860, AT1G54690, AT1G65030, AT1G77180, AT1G79280
CC	Membrana	GO:0016020	AT2G01680, AT2G01830, AT2G02100, AT2G17290, AT2G18280, AT2G18330, AT2G21300, AT2G21620, AT2G26510, AT2G27210, AT2G33470, AT2G37170, AT2G42910, AT2G45180, AT2G46710, AT2G47710, AT3G09470, AT3G13340, AT3G15360, AT3G03060, AT3G01100, AT3G19553, AT3G27820, AT3G27960, AT3G28850, AT3G29180, AT3G46560, AT3G47090, AT3G47700, AT3G52640, AT3G58140, AT3G62270, AT3G63410, AT4G09650, AT4G11440, AT4G11600, AT4G12650, AT4G16070, AT4G17560, AT4G19185, AT4G21160, AT4G23400, AT4G25960, AT4G26570, AT4G28025, AT4G33565, AT4G38100, AT4G39710, AT5G10350, AT5G13490, AT5G14040, AT5G17920, AT5G03300, AT5G19200, AT5G22060, AT5G22300, AT5G26820, AT5G35525, AT5G35730, AT5G39990, AT5G45130, AT5G46630, AT5G46860, AT5G51740, AT5G54200, AT5G54440, AT5G62670, AT5G62880, AT5G62890, AT5G63880, AT5G64930, AT5G65290, AT1G02130, AT1G05940, AT1G09580, AT1G10030, AT1G10290, AT1G15740, AT1G18730, AT1G21270, AT1G22050, AT1G02110, AT1G01050, AT1G27450, AT1G30440, AT1G31830, AT1G45207, AT1G55620, AT1G55850, AT1G58030, AT1G62740, AT1G63000, AT1G65030, AT1G68070, AT1G70300, AT1G80050

TABLA A.8: Clasificación GO de genes de *Arabidopsis thaliana* ortólogos a los genes de *Oryza sativa* que se identificaron en los *scaffolds* de *Paspalum notatum* asociados al ACR (continuación)

Categoría GO	Subcategoría GO	ID GO	Genes de <i>A. thaliana</i>
CC	Organela	GO:0043226	AT2G01440, AT2G01830, AT2G02870, AT2G16400, AT2G17290, AT2G18280, AT2G18330, AT2G18900, AT2G20450, AT2G22780, AT2G23740, AT2G26510, AT2G26580, AT2G27210, AT2G27230, AT2G28350, AT2G30590, AT2G31380, AT2G31400, AT2G31810, AT2G32850, AT2G35585, AT2G37170, AT2G39580, AT2G40116, AT2G43090, AT2G45180, AT2G45650, AT2G47710, AT3G04130, AT3G04380, AT3G04650, AT3G04730, AT3G07650, AT3G08020, AT3G01180, AT3G11950, AT3G12120, AT3G12810, AT3G13300, AT3G13490, AT3G15360, AT3G15390, AT3G16890, AT3G17450, AT3G17590, AT3G03140, AT3G01100, AT3G03490, AT3G03380, AT3G01040, AT3G20230, AT3G21400, AT3G22300, AT3G22330, AT3G23890, AT3G24440, AT3G24506, AT3G27260, AT3G27740, AT3G27820, AT3G28850, AT3G46560, AT3G46710, AT3G47090, AT3G47700, AT3G49590, AT3G50780, AT3G50910, AT3G51000, AT3G52640, AT3G54670, AT3G54750, AT3G58140, AT3G59640, AT3G60530, AT3G60580, AT3G61150, AT3G62580, AT3G63410, AT4G07950, AT4G08280, AT4G08950, AT4G09650, AT4G10760, AT4G11440, AT4G11600, AT4G12650, AT4G14340, AT4G14770, AT4G15950, AT4G16800, AT4G16820, AT4G17510, AT4G17560, AT4G17670, AT4G19110, AT4G19185, AT4G19670, AT4G21160, AT4G20260, AT4G20280, AT4G00150, AT4G01320, AT4G21670, AT4G24690, AT4G25800, AT4G25960, AT4G26570, AT4G26610, AT4G26620, AT4G28025, AT4G29060, AT4G31050, AT4G32720, AT4G33380, AT4G33565, AT4G33890, AT4G33945, AT4G33950, AT4G34340, AT4G35320, AT4G37040, AT4G38100, AT4G39620, AT4G39710, AT4G39795, AT5G08040, AT5G10350, AT5G13490, AT5G14040, AT5G14580, AT5G15740, AT5G17230, AT5G17300, AT5G17440, AT5G17710, AT5G17920, AT5G18590, AT5G18650, AT5G19200, AT5G24520, AT5G25760, AT5G26820, AT5G27740, AT5G27830, AT5G27920, AT5G35730, AT5G39990, AT5G41480, AT5G41970, AT5G42400, AT5G42920, AT5G43080, AT5G43130, AT5G45130, AT5G45170, AT5G46160, AT5G46630, AT5G46850, AT5G46860, AT5G46910, AT5G49470, AT5G49555, AT5G49980, AT5G51460, AT5G51740, AT5G51990, AT5G52020, AT5G52510, AT5G52660, AT5G53480, AT5G56550, AT5G57120, AT5G57580, AT5G57870, AT5G60850, AT5G61670, AT5G62880, AT5G62890, AT5G62940, AT5G63310, AT5G63880, AT5G64160, AT5G64930, AT5G65120, AT5G65290, AT5G66450, AT5G66800, AT1G02130, AT1G05940, AT1G08580, AT1G09310, AT1G10030, AT1G10290, AT1G10820, AT1G11290, AT1G13180, AT1G14530, AT1G15340, AT1G15420, AT1G15940, AT1G16810, AT1G17070, AT1G17450, AT1G17760, AT1G03090, AT1G18560, AT1G18730, AT1G18900, AT1G19310, AT1G20370, AT1G20696, AT1G22170, AT1G22360, AT1G23800, AT1G23860, AT1G24120, AT1G02110, AT1G01030, AT1G03030, AT1G01050, AT1G27450, AT1G29400, AT1G30120, AT1G30300, AT1G30330, AT1G31650, AT1G31920, AT1G32700, AT1G33390, AT1G36310, AT1G45207, AT1G49950, AT1G52520, AT1G54580, AT1G54690, AT1G55620, AT1G55690, AT1G55850, AT1G58030, AT1G60010, AT1G60860, AT1G61040, AT1G62740, AT1G65030, AT1G65540, AT1G67580, AT1G67700, AT1G68070, AT1G68140, AT1G69640, AT1G70090, AT1G70680, AT1G72570, AT1G73240, AT1G73660, AT1G74520, AT1G75330, AT1G75670, AT1G77180, AT1G78060, AT1G78080, AT1G79230, AT1G79280, AT1G80050, AT3G26782, AT1G65032, AT4G17905, AT3G23440
CC	Región extracelular	GO:0005576	AT2G02100, AT2G44850, AT2G45180, AT3G16570, AT3G52640, AT3G54420, AT4G08950, AT4G11600, AT4G19230, AT4G19420, AT4G39710, AT5G07830, AT5G09640, AT5G10770, AT5G117920, AT5G27830, AT5G33370, AT5G62880, AT1G09310, AT1G10090, AT1G12570, AT1G32540, AT1G60060, AT1G63000, AT1G78060
CC	Simplasto	GO:0055044	AT2G20450, AT2G26510, AT2G37170, AT2G42910, AT3G04380, AT3G03140, AT4G12650, AT4G23400, AT5G17920, AT5G22060, AT5G35980, AT5G62890, AT1G10290, AT1G15420, AT1G15940, AT1G63000, AT1G78060, AT1G79280
FM	Actividad antioxidante	GO:0016209	AT4G11600

TABLA A.8: Clasificación GO de genes de *Arabidopsis thaliana* ortólogos a los genes de *Oryza sativa* que se identificaron en los *scaffolds* de *Paspalum notatum* asociados al ACR (continuación)

Categoría GO	Subcategoría GO	ID GO	Genes de <i>A. thaliana</i>
FM	Actividad catalítica	GO:0003824	AT2G01440, AT2G01830, AT2G15790, AT2G17290, AT2G18280, AT2G18330, AT2G21300, AT2G22780, AT2G27210, AT2G32850, AT2G34770, AT2G37040, AT2G40116, AT2G41880, AT2G42910, AT2G43090, AT2G44660, AT3G04380, AT3G04600, AT3G04810, AT3G01180, AT3G11950, AT3G12120, AT3G12810, AT3G13490, AT3G03060, AT3G03380, AT3G01040, AT3G19050, AT3G22330, AT3G23890, AT3G24800, AT3G25570, AT3G27740, AT3G27820, AT3G47090, AT3G51000, AT3G54420, AT3G58140, AT3G63250, AT3G63410, AT4G07950, AT4G10760, AT4G11600, AT4G14340, AT4G16070, AT4G16800, AT4G16820, AT4G19110, AT4G19230, AT4G00660, AT4G02120, AT4G02060, AT4G01320, AT4G21670, AT4G25960, AT4G26610, AT4G31050, AT4G31180, AT4G33950, AT4G36610, AT4G37040, AT4G39710, AT5G07830, AT5G07920, AT5G09640, AT5G14580, AT5G15740, AT5G17230, AT5G17920, AT5G02890, AT5G03300, AT5G18650, AT5G19200, AT5G22300, AT5G25760, AT5G27000, AT5G27920, AT5G35980, AT5G37850, AT5G39990, AT5G40760, AT5G41480, AT5G49470, AT5G49980, AT5G50180, AT5G51460, AT5G51740, AT5G62670, AT5G63310, AT5G66450, AT1G09430, AT1G10290, AT1G02205, AT1G11290, AT1G12570, AT1G03090, AT1G20370, AT1G21270, AT1G22170, AT1G22360, AT1G22400, AT1G23800, AT1G03030, AT1G01050, AT1G27450, AT1G27520, AT1G30120, AT1G33390, AT1G36310, AT1G55850, AT1G63000, AT1G63700, AT1G67580, AT1G69640, AT1G70090, AT1G73660, AT1G73980, AT1G75330, AT1G78060, AT1G79230, AT1G80050
FM	Actividad de traducción molecular	GO:0060089	AT2G01830
FM	→ Actividad isomerasa	GO:0016853	AT2G15790, AT3G23890, AT4G39710, AT1G20370, AT1G63000
FM	Actividad molecular estructural	GO:0005198	AT2G20450, AT3G20230, AT3G22300, AT4G17560, AT5G46160, AT1G13180, AT1G20696
FM	→ Actividad transferasa	GO:0016740	AT2G01830, AT2G17290, AT2G32850, AT2G41880, AT2G42910, AT2G44660, AT3G04380, AT3G04810, AT3G01180, AT3G11950, AT3G01040, AT3G24800, AT3G47090, AT3G63250, AT3G63410, AT4G07950, AT4G10760, AT4G14340, AT4G19110, AT4G26610, AT4G31050, AT4G33950, AT5G07920, AT5G09640, AT5G14580, AT5G15740, AT5G17230, AT5G17920, AT5G02890, AT5G03300, AT5G18650, AT5G25760, AT5G27920, AT5G35980, AT5G37850, AT5G39990, AT5G49470, AT5G49980, AT5G50180, AT5G63310, AT1G09430, AT1G21270, AT1G22360, AT1G22400, AT1G03030, AT1G27450, AT1G36310, AT1G55850, AT1G63700, AT1G67580, AT1G70090, AT1G73660, AT1G73980, AT1G75330, AT1G79230, AT1G80050
FM	Actividad transportadora	GO:0005215	AT2G26510, AT2G37170, AT3G19553, AT3G46560, AT3G54670, AT3G62270, AT4G23400, AT4G25960, AT5G13490, AT5G26820, AT5G53480, AT5G62890, AT1G09580, AT1G31830, AT1G55620, AT1G55690, AT1G70300, AT1G80050
FM	→ Actividad transportadora molecular	GO:0140104	AT1G54580

TABLA A.8: Clasificación GO de genes de *Arabidopsis thaliana* ortólogos a los genes de *Oryza sativa* que se identificaron en los *scaffolds* de *Paspalum notatum* asociados al ACR (continuación)

Categoría GO	Subcategoría GO	ID GO	Genes de <i>A. thaliana</i>
FM	Regulación de las funciones moleculares	GO:0098772	AT2G02100, AT3G07880, AT3G15360, AT5G43080, AT1G31650
FM	Unión	GO:0005488	AT2G01830, AT2G16400, AT2G17290, AT2G18900, AT2G23740, AT2G27230, AT2G28350, AT2G30590, AT2G31380, AT2G31400, AT2G32850, AT2G37040, AT2G45180, AT2G45650, AT3G04600, AT3G04730, AT3G07650, AT3G07880, AT3G12810, AT3G13300, AT3G13490, AT3G17590, AT3G03060, AT3G03490, AT3G20930, AT3G23890, AT3G24440, AT3G26100, AT3G27260, AT3G46710, AT3G47090, AT3G54670, AT3G58140, AT3G60580, AT3G61150, AT4G07950, AT4G10760, AT4G19230, AT4G21160, AT4G20060, AT4G00150, AT4G21670, AT4G24690, AT4G25800, AT4G26570, AT4G26610, AT4G29060, AT4G31180, AT4G32720, AT4G33565, AT4G33945, AT4G33950, AT4G39710, AT5G07920, AT5G10230, AT5G10350, AT5G10770, AT5G13490, AT5G14580, AT5G17300, AT5G17710, AT5G17920, AT5G03300, AT5G18650, AT5G24520, AT5G25760, AT5G27000, AT5G37680, AT5G43080, AT5G44200, AT5G45130, AT5G46860, AT5G49555, AT5G51990, AT5G52020, AT5G52660, AT5G53480, AT5G57580, AT5G57870, AT5G60850, AT5G62880, AT5G62940, AT5G63310, AT5G63880, AT1G02130, AT1G08410, AT1G12090, AT1G14530, AT1G15340, AT1G17070, AT1G17760, AT1G03090, AT1G18560, AT1G19310, AT1G20696, AT1G23860, AT1G04170, AT1G03030, AT1G29400, AT1G30330, AT1G31650, AT1G32540, AT1G33390, AT1G49950, AT1G54580, AT1G54690, AT1G63840, AT1G65030, AT1G65540, AT1G67580, AT1G68070, AT1G70680, AT1G72570, AT1G73980, AT1G74410, AT1G75330, AT1G77180, AT1G78080, AT1G79280
FM	→ Unión a ADN	GO:0003700	AT2G16400, AT2G18280, AT2G23740, AT2G26580, AT2G27230, AT2G28350, AT2G30590, AT2G31380, AT2G45650, AT3G04730, AT3G07650, AT3G60530, AT3G60580, AT3G61150, AT4G07950, AT4G14770, AT4G00150, AT5G17300, AT5G46910, AT5G51990, AT5G52020, AT5G52510, AT5G52660, AT5G60850, AT5G62940, AT1G20696, AT1G01030, AT1G30330, AT1G49950, AT1G72570, AT1G78080
FM	→ Unión a compuestos orgánicos cíclicos	GO:0097159	AT2G16400, AT2G18900, AT2G23740, AT2G28350, AT2G31400, AT2G32850, AT2G45650, AT3G04600, AT3G12810, AT3G13300, AT3G13490, AT3G20930, AT3G23890, AT3G27260, AT3G47090, AT3G54670, AT3G58140, AT3G60580, AT3G61150, AT4G07950, AT4G02060, AT4G21670, AT4G29060, AT4G31180, AT4G32720, AT4G39710, AT5G10350, AT5G10770, AT5G14580, AT5G17300, AT5G24520, AT5G37680, AT5G44200, AT5G45130, AT5G51990, AT5G52020, AT5G52660, AT5G57870, AT5G60850, AT5G62880, AT5G62940, AT5G63310, AT1G02130, AT1G08410, AT1G15340, AT1G17070, AT1G17760, AT1G18560, AT1G20696, AT1G04170, AT1G03030, AT1G29400, AT1G30330, AT1G32540, AT1G33390, AT1G49950, AT1G54690, AT1G63840, AT1G65030, AT1G72570, AT1G73980, AT1G78080
FM	→ Unión a cromatina	GO:0003682	AT3G17590, AT1G20696

TABLA A.8: Clasificación GO de genes de *Arabidopsis thaliana* ortólogos a los genes de *Oryza sativa* que se identificaron en los *scaffolds* de *Paspalum notatum* asociados al ACR (continuación)

Categoría GO	Subcategoría GO	ID GO	Genes de <i>A. thaliana</i>
FM	→ Unión a proteína	GO:0005515	AT2G01830, AT2G17290, AT2G27230, AT2G30590, AT2G31380, AT2G37040, AT2G45650, AT3G04730, AT3G07880, AT3G12810, AT3G13300, AT3G17590, AT3G03490, AT3G24440, AT3G26100, AT3G46710, AT4G10760, AT4G02060, AT4G00150, AT4G24690, AT4G25800, AT4G26570, AT4G26610, AT4G33945, AT4G33950, AT4G39710, AT5G10350, AT5G13490, AT5G18650, AT5G24520, AT5G25760, AT5G27000, AT5G43080, AT5G44200, AT5G45130, AT5G46860, AT5G53480, AT5G57580, AT5G62880, AT5G63310, AT5G63880, AT1G17760, AT1G23860, AT1G30330, AT1G31650, AT1G49950, AT1G65030, AT1G67580, AT1G77180, AT1G78080, AT1G79280
PB	Adhesión biológica	GO:0022610	AT3G12810, AT1G63700
PB	Biogénesis de componentes celulares	GO:0071840	AT2G18330, AT2G20450, AT2G22780, AT2G23740, AT2G26580, AT2G27230, AT2G31810, AT2G33470, AT2G43090, AT2G44270, AT2G44660, AT2G46710, AT3G07880, AT3G12810, AT3G13490, AT3G15360, AT3G03490, AT3G01040, AT3G20930, AT3G23890, AT3G24440, AT3G27960, AT3G46560, AT3G54670, AT3G54750, AT3G58140, AT3G62270, AT3G63250, AT4G08280, AT4G09650, AT4G11600, AT4G17560, AT4G21160, AT4G03100, AT4G02060, AT4G00150, AT4G23400, AT4G24690, AT4G29060, AT4G31180, AT4G32720, AT4G35320, AT5G06590, AT5G07830, AT5G13490, AT5G25760, AT5G37680, AT5G38720, AT5G41970, AT5G42400, AT5G46860, AT5G50180, AT5G53480, AT5G54440, AT5G61670, AT5G62880, AT5G64930, AT1G05940, AT1G12090, AT1G13180, AT1G15420, AT1G15940, AT1G18730, AT1G20370, AT1G20696, AT1G21270, AT1G02110, AT1G29400, AT1G31650, AT1G49950, AT1G55850, AT1G58030, AT1G60860, AT1G61040, AT1G63700, AT1G67580, AT1G67700, AT1G75670, AT1G79280
PB	Ciclo celular	GO:0007049	AT2G44270, AT3G12810, AT3G23890, AT3G54670, AT4G03100, AT5G37680, AT5G43080, AT5G46860, AT5G54440, AT1G17760, AT1G23860, AT1G27520, AT1G29400, AT1G49950
PB	→ Ciclo meiótico celular	GO:0051321	AT3G23890, AT5G37680, AT5G46860, AT1G29400
PB	Crecimiento	GO:0040007	AT2G28350, AT3G07880, AT3G16570, AT3G01040, AT3G27960, AT4G14770, AT4G21160, AT4G00150, AT4G33950, AT5G07830, AT5G39990, AT5G46860, AT1G12090, AT1G13180, AT1G21270, AT1G29400, AT1G31650, AT1G31920, AT1G78060
PB	Crecimiento celular	GO:0016049	AT3G07880, AT3G01040, AT3G27960, AT4G21160, AT4G00150, AT5G07830, AT5G39990, AT5G46860, AT1G12090, AT1G13180, AT1G21270, AT1G31650
PB	→ Crecimiento del desarrollo	GO:0048589	AT2G28350, AT3G07880, AT3G01040, AT3G27960, AT4G14770, AT4G00150, AT5G07830, AT1G12090, AT1G21270, AT1G31650, AT1G31920, AT1G78060

TABLA A.8: Clasificación GO de genes de *Arabidopsis thaliana* ortólogos a los genes de *Oryza sativa* que se identificaron en los *scaffolds* de *Paspalum notatum* asociados al ACR (continuación)

Categoría GO	Subcategoría GO	ID GO	Genes de <i>A. thaliana</i>
PB	→ Desarrollo de procesos involucrados en la reproducción	GO:0003006	AT2G15790, AT2G18330, AT2G27230, AT2G28350, AT2G44270, AT2G45650, AT3G07650, AT3G12810, AT3G13300, AT3G13490, AT3G01040, AT3G23890, AT3G24440, AT3G24715, AT3G27960, AT3G28850, AT3G46560, AT3G54420, AT3G58140, AT3G61150, AT4G10760, AT4G19230, AT4G02820, AT4G25960, AT4G29060, AT4G31180, AT4G32720, AT4G39620, AT5G06590, AT5G17300, AT5G17710, AT5G27740, AT5G38720, AT5G41480, AT5G42400, AT5G46860, AT5G49980, AT5G62940, AT5G64930, AT1G21270, AT1G23800, AT1G23860, AT1G01030, AT1G30330, AT1G31650, AT1G55690, AT1G58030, AT1G60860, AT1G61040, AT1G63700, AT1G73660, AT1G75330, AT1G77180, AT1G79230, AT1G79280, AT3G23440
PB	→ Desarrollo post-embrionario	GO:0009791	AT2G01830, AT2G15790, AT2G18330, AT2G27230, AT2G28350, AT2G44270, AT2G45650, AT3G07650, AT3G12810, AT3G13300, AT3G13490, AT3G23890, AT3G24440, AT3G28850, AT3G46560, AT3G54420, AT3G58140, AT3G61150, AT3G63250, AT4G10760, AT4G14770, AT4G19230, AT4G25960, AT4G29060, AT4G32720, AT4G39620, AT5G06590, AT5G17300, AT5G17710, AT5G27740, AT5G41480, AT5G42400, AT5G49980, AT5G62940, AT5G64930, AT1G15940, AT1G21270, AT1G23800, AT1G23860, AT1G02110, AT1G01030, AT1G30330, AT1G55690, AT1G58030, AT1G60860, AT1G61040, AT1G63700, AT1G69640, AT1G73660, AT1G75330, AT1G77180, AT1G79230, AT1G79280, AT3G23440
PB	Detoxificación	GO:0098754	AT3G50910, AT4G11600, AT5G22300, AT5G27920, AT1G32540
PB	Fases biológicas	GO:0044848	AT4G15950
PB	→ Fotoperíodo y floración	GO:0048573	AT3G07650, AT3G24440, AT5G17300, AT5G64930, AT1G23860, AT1G58030, AT1G61040, AT1G73660
PB	→ Germinación seminal	GO:0009845	AT2G01830, AT3G24440
PB	Localización	GO:0051179	AT2G01830, AT2G17290, AT2G18900, AT2G33470, AT2G34770, AT2G37170, AT2G43090, AT2G45180, AT2G46710, AT3G16570, AT3G19553, AT3G24315, AT3G24440, AT3G46560, AT3G47700, AT3G54420, AT3G62270, AT4G09650, AT4G11440, AT4G21160, AT4G02820, AT4G01320, AT4G23400, AT4G25960, AT4G29060, AT4G32720, AT4G36610, AT5G13490, AT5G14040, AT5G18590, AT5G24520, AT5G25760, AT5G38720, AT5G39990, AT5G41970, AT5G45130, AT5G46630, AT5G46860, AT5G53480, AT5G63880, AT1G02130, AT1G05940, AT1G09430, AT1G09580, AT1G09740, AT1G10290, AT1G12090, AT1G15420, AT1G18730, AT1G22400, AT1G01050, AT1G29400, AT1G31830, AT1G55620, AT1G55690, AT1G58030, AT1G60010, AT1G61040, AT1G67700, AT1G70300, AT1G75670, AT1G79280
PB	→ Mantenimiento de la identidad de los órganos florales	GO:0048497	AT3G61150
PB	→ Megagametogénesis	GO:0009561	AT2G18330, AT2G44270, AT4G02820, AT4G31180, AT4G32720, AT5G38720, AT3G23440

TABLA A.8: Clasificación GO de genes de *Arabidopsis thaliana* ortólogos a los genes de *Oryza sativa* que se identificaron en los *scaffolds* de *Paspalum notatum* asociados al ACR (continuación)

Categoría GO	Subcategoría GO	ID GO	Genes de <i>A. thaliana</i>
PB	→ Metilación	GO:0032259	AT2G18330, AT2G20450, AT2G23740, AT2G44270, AT3G23890, AT3G24440, AT3G27740, AT3G46560, AT3G54750, AT3G63250, AT4G10760, AT4G15950, AT4G02060, AT5G06590, AT5G42400, AT1G15940, AT1G02110, AT1G54690, AT1G60860
PB	Muerte celular	GO:0008219	AT2G17290, AT2G34770, AT3G54420, AT4G09650, AT5G13490, AT5G24520, AT5G64930, AT1G22400, AT1G32540
PB	Pigmentación	GO:0043473	AT4G25960, AT1G12090
PB	Plegado protéico	GO:0006457	AT2G44660, AT5G17710, AT5G22060, AT5G49510, AT1G24120
PB	→ Polinización	GO:0009856	AT3G01040, AT3G24715, AT3G27960, AT1G31650
PB	→ Procesos basados en microtúbulos	GO:0007017	AT2G44660, AT3G23890, AT4G03100, AT5G50180, AT1G79280
PB	→ Procesos de la dormancia seminal	GO:0010162	AT3G24440, AT4G19230
PB	→ Procesos del ciclo celular	GO:0022402	AT3G23890, AT3G54670, AT4G03100, AT5G37680, AT5G46860, AT5G54440, AT1G29400, AT1G49950
PB	→ Procesos del ciclo meiótico celular	GO:1903046	AT3G23890, AT5G37680, AT5G46860, AT1G29400
PB	Procesos del desarrollo	GO:0032502	AT2G01830, AT2G15790, AT2G18330, AT2G26580, AT2G27230, AT2G28350, AT2G37040, AT2G44270, AT2G45180, AT2G46560, AT2G46710, AT3G07650, AT3G07880, AT3G12810, AT3G13300, AT3G13490, AT3G01040, AT3G23890, AT3G24440, AT3G24715, AT3G27960, AT3G28850, AT3G46560, AT3G54420, AT3G54670, AT3G58140, AT3G61150, AT3G62270, AT3G63250, AT4G10760, AT4G14770, AT4G19230, AT4G21160, AT4G02820, AT4G00150, AT4G25960, AT4G29060, AT4G31180, AT4G32720, AT4G33950, AT4G39620, AT5G06590, AT5G07830, AT5G17300, AT5G17710, AT5G24520, AT5G27740, AT5G37850, AT5G38720, AT5G41480, AT5G42400, AT5G46860, AT5G49980, AT5G62940, AT5G64930, AT1G02205, AT1G12090, AT1G13180, AT1G15940, AT1G17760, AT1G21270, AT1G23800, AT1G23860, AT1G02110, AT1G01030, AT1G30330, AT1G31650, AT1G31920, AT1G55690, AT1G58030, AT1G60860, AT1G61040, AT1G63700, AT1G67580, AT1G69640, AT1G72570, AT1G73660, AT1G75330, AT1G77180, AT1G78060, AT1G78080, AT1G79230, AT1G79280, AT3G23440
PB	Procesos del sistema inmune	GO:0002376	AT2G17290, AT3G54420, AT3G63250, AT4G09650, AT4G17560, AT5G13490, AT5G24520, AT5G37680, AT5G64930, AT1G15940, AT1G19020, AT1G22400, AT1G32540, AT1G60860

TABLA A.8: Clasificación GO de genes de *Arabidopsis thaliana* ortólogos a los genes de *Oryza sativa* que se identificaron en los *scaffolds* de *Paspalum notatum* asociados al ACR (continuación)

Categoría GO	Subcategoría GO	ID GO	Genes de <i>A. thaliana</i>
PB	→ Procesos de organismos multicelulares	GO:0051704	AT2G01830, AT2G02870, AT2G17290, AT2G18280, AT2G18330, AT2G21620, AT2G44270, AT2G47710, AT3G12810, AT3G01040, AT3G24715, AT3G27960, AT3G63250, AT4G09650, AT4G17560, AT4G19230, AT4G00660, AT4G02820, AT4G31180, AT4G33950, AT5G18650, AT5G37680, AT5G38720, AT5G46860, AT5G49980, AT5G52020, AT5G64930, AT1G09740, AT1G02205, AT1G15940, AT1G19020, AT1G31650, AT1G32540, AT1G60860, AT1G74520
PB	Procesos metabólicos	GO:0008152	AT2G01830, AT2G02870, AT2G17290, AT2G18280, AT2G18330, AT2G20450, AT2G21620, AT2G22780, AT2G23740, AT2G26580, AT2G27230, AT2G28350, AT2G30590, AT2G31380, AT2G31810, AT2G32850, AT2G34770, AT2G37040, AT2G40116, AT2G41880, AT2G42910, AT2G43090, AT2G44270, AT2G45180, AT3G04600, AT3G07650, AT3G01180, AT3G11950, AT3G13300, AT3G13340, AT3G13490, AT3G15360, AT3G15390, AT3G16890, AT3G17590, AT3G03380, AT3G01040, AT3G19553, AT3G20230, AT3G20930, AT3G22300, AT3G22330, AT3G23890, AT3G24315, AT3G24440, AT3G24800, AT3G27740, AT3G27820, AT3G46560, AT3G47090, AT3G50910, AT3G54420, AT3G54670, AT3G54750, AT3G58140, AT3G59990, AT3G60580, AT3G61150, AT3G62270, AT3G63250, AT3G63410, AT4G07950, AT4G08280, AT4G08950, AT4G09650, AT4G10760, AT4G11600, AT4G14340, AT4G14770, AT4G15950, AT4G16070, AT4G16800, AT4G16820, AT4G17510, AT4G17560, AT4G17790, AT4G19110, AT4G19230, AT4G02060, AT4G00150, AT4G01320, AT4G21670, AT4G23400, AT4G29060, AT4G31050, AT4G31180, AT4G32720, AT4G33950, AT4G37040, AT4G39710, AT5G06590, AT5G09640, AT5G13490, AT5G14040, AT5G14580, AT5G17230, AT5G17300, AT5G17920, AT5G03300, AT5G18650, AT5G19200, AT5G22060, AT5G22300, AT5G24520, AT5G24760, AT5G25760, AT5G27740, AT5G27920, AT5G37680, AT5G37850, AT5G39990, AT5G40760, AT5G41480, AT5G42400, AT5G43080, AT5G44200, AT5G45170, AT5G46160, AT5G46910, AT5G49555, AT5G51460, AT5G51740, AT5G51990, AT5G52020, AT5G52510, AT5G52660, AT5G53480, AT5G57580, AT5G57870, AT5G60850, AT5G61670, AT5G62940, AT5G63310, AT5G66450, AT1G05940, AT1G09310, AT1G09430, AT1G10030, AT1G02205, AT1G11290, AT1G12090, AT1G15940, AT1G17070, AT1G17760, AT1G03090, AT1G18730, AT1G20696, AT1G21270, AT1G22170, AT1G23800, AT1G23860, AT1G02110, AT1G04170, AT1G01030, AT1G03030, AT1G01050, AT1G27450, AT1G27520, AT1G29400, AT1G30120, AT1G30330, AT1G31650, AT1G31830, AT1G31920, AT1G32540, AT1G36310, AT1G49950, AT1G54580, AT1G54690, AT1G55690, AT1G55850, AT1G58030, AT1G60860, AT1G61040, AT1G62740, AT1G63000, AT1G67580, AT1G67700, AT1G68070, AT1G69640, AT1G70090, AT1G72570, AT1G73980, AT1G75330, AT1G77180, AT1G78080, AT1G79230, AT1G79280, AT1G80050
PB	→ Procesos multicelular	GO:0032501	AT2G01830, AT2G15790, AT2G18330, AT2G26580, AT2G27230, AT2G28350, AT2G37040, AT2G44270, AT2G45180, AT2G45650, AT2G46710, AT3G07650, AT3G07880, AT3G12810, AT3G13300, AT3G13490, AT3G01040, AT3G23890, AT3G24440, AT3G24715, AT3G27960, AT3G28850, AT3G46560, AT3G54420, AT3G54670, AT3G58140, AT3G61150, AT3G62270, AT3G63250, AT4G10760, AT4G14770, AT4G19230, AT4G02820, AT4G00150, AT4G25960, AT4G29060, AT4G31180, AT4G32720, AT4G33950, AT4G39620, AT5G06590, AT5G17300, AT5G17710, AT5G27740, AT5G37850, AT5G38720, AT5G41480, AT5G42400, AT5G46860, AT5G49980, AT5G62940, AT5G64930, AT1G02205, AT1G12090, AT1G15940, AT1G17760, AT1G21270, AT1G23800, AT1G23860, AT1G02110, AT1G01030, AT1G30330, AT1G31650, AT1G31920, AT1G55690, AT1G58030, AT1G60860, AT1G61040, AT1G63700, AT1G67580, AT1G69640, AT1G72570, AT1G73660, AT1G75330, AT1G77180, AT1G78060, AT1G79230, AT1G79280, AT3G23440

TABLA A.8: Clasificación GO de genes de *Arabidopsis thaliana* ortólogos a los genes de *Oryza sativa* que se identificaron en los *scaffolds* de *Paspalum notatum* asociados al ACR (continuación)

Categoría GO	Subcategoría GO	ID GO	Genes de <i>A. thaliana</i>
PB	Procesos reproductivos	GO:0022414	AT2G15790, AT2G18330, AT2G27230, AT2G28350, AT2G44270, AT2G45650, AT3G07650, AT3G12810, AT3G13300, AT3G13490, AT3G01040, AT3G23890, AT3G24440, AT3G24715, AT3G27960, AT3G28850, AT3G46560, AT3G54420, AT3G58140, AT3G61150, AT4G10760, AT4G19230, AT4G02820, AT4G25960, AT4G29060, AT4G31180, AT4G32720, AT4G39620, AT5G06590, AT5G17300, AT5G17710, AT5G27740, AT5G37680, AT5G38720, AT5G41480, AT5G42400, AT5G46860, AT5G49980, AT5G62940, AT5G64930, AT1G21270, AT1G23800, AT1G23860, AT1G01030, AT1G29400, AT1G30330, AT1G31650, AT1G55690, AT1G58030, AT1G60860, AT1G61040, AT1G63700, AT1G73660, AT1G75330, AT1G77180, AT1G79230, AT1G79280, AT3G23440
PB	Procesos rítmicos	GO:0048511	AT3G07650, AT4G11600, AT4G00150, AT5G17300, AT1G17070, AT1G27450, AT1G77180
PB	Proliferación celular	GO:0008283	AT3G23890, AT3G54750, AT3G63250, AT4G14770, AT4G03100, AT4G02060, AT5G06590, AT5G65290, AT1G54690, AT1G61040
PB	Regulación biológica	GO:0065007	AT2G01830, AT2G17290, AT2G18280, AT2G18330, AT2G22780, AT2G23740, AT2G26580, AT2G27230, AT2G28350, AT2G30590, AT2G31380, AT2G31400, AT2G34770, AT2G37040, AT2G40116, AT2G44270, AT2G45650, AT2G46710, AT3G07650, AT3G12810, AT3G13300, AT3G13340, AT3G15360, AT3G15390, AT3G16570, AT3G17590, AT3G03380, AT3G23890, AT3G24440, AT3G27960, AT3G47090, AT3G54670, AT3G60580, AT3G61150, AT3G62270, AT3G63250, AT4G07950, AT4G09650, AT4G14770, AT4G15950, AT4G16820, AT4G17560, AT4G19110, AT4G02060, AT4G00150, AT4G21670, AT4G25960, AT4G26570, AT4G33950, AT5G06590, AT5G07920, AT5G13490, AT5G17300, AT5G18650, AT5G24520, AT5G26820, AT5G37680, AT5G42400, AT5G43080, AT5G44200, AT5G46910, AT5G49980, AT5G51990, AT5G52020, AT5G52510, AT5G52660, AT5G54200, AT5G60850, AT5G62880, AT5G62940, AT5G63310, AT5G64930, AT5G65290, AT1G09740, AT1G12090, AT1G13180, AT1G15940, AT1G17070, AT1G17760, AT1G18730, AT1G19020, AT1G21270, AT1G22400, AT1G23860, AT1G02110, AT1G01030, AT1G01050, AT1G27450, AT1G27520, AT1G29400, AT1G30120, AT1G30330, AT1G31650, AT1G31920, AT1G32540, AT1G60860, AT1G61040, AT1G63700, AT1G63840, AT1G66750, AT1G72570, AT1G77180, AT1G78060, AT1G78080, AT1G79280
PB	→ Regulación de procesos del desarrollo	GO:0050793	AT2G01830, AT2G18330, AT2G45650, AT3G07650, AT3G12810, AT3G23890, AT3G24440, AT3G61150, AT4G14770, AT5G06590, AT5G42400, AT1G30330, AT1G31650, AT1G31920, AT1G61040, AT1G78060, AT1G78080, AT1G79280

TABLA A.8: Clasificación GO de genes de *Arabidopsis thaliana* ortólogos a los genes de *Oryza sativa* que se identificaron en los *scaffolds* de *Paspalum notatum* asociados al ACR (continuación)

Categoría GO	Subcategoría GO	ID GO	Genes de <i>A. thaliana</i>
PB	→ Regulación de procesos biológicos	GO:0050789	AT2G01830, AT2G17290, AT2G18280, AT2G18330, AT2G22780, AT2G23740, AT2G26580, AT2G27230, AT2G28350, AT2G30590, AT2G31380, AT2G31400, AT2G34770, AT2G37040, AT2G40116, AT2G44270, AT2G45650, AT3G07650, AT3G12810, AT3G13300, AT3G13340, AT3G15360, AT3G15390, AT3G16570, AT3G17590, AT3G03380, AT3G23890, AT3G24440, AT3G27960, AT3G47090, AT3G54670, AT3G60580, AT3G61150, AT3G63250, AT4G07950, AT4G09650, AT4G14770, AT4G15950, AT4G17560, AT4G19110, AT4G20260, AT4G21670, AT4G25960, AT4G26570, AT4G33950, AT5G06590, AT5G07920, AT5G13490, AT5G17300, AT5G18650, AT5G24520, AT5G42400, AT5G43080, AT5G44200, AT5G46910, AT5G49980, AT5G51990, AT5G52020, AT5G52510, AT5G52660, AT5G54200, AT5G60850, AT5G62880, AT5G62940, AT5G63310, AT5G64930, AT5G65290, AT1G13180, AT1G15940, AT1G17070, AT1G17760, AT1G19020, AT1G22400, AT1G23860, AT1G02110, AT1G01030, AT1G27520, AT1G29400, AT1G30330, AT1G31650, AT1G31920, AT1G32540, AT1G60860, AT1G61040, AT1G63700, AT1G63840, AT1G67580, AT1G72570, AT1G77180, AT1G78060, AT1G78080, AT1G79280
PB	→ Regulación negativa de procesos biológicos	GO:0048519	AT2G17290, AT2G23740, AT2G27230, AT2G34770, AT3G07650, AT3G12810, AT3G13300, AT3G13340, AT3G15390, AT3G16570, AT3G03380, AT3G23890, AT3G24440, AT3G54670, AT3G61150, AT4G09650, AT4G15950, AT4G17560, AT4G20260, AT4G21670, AT5G13490, AT5G18650, AT5G44200, AT5G62880, AT1G15940, AT1G17760, AT1G19020, AT1G23860, AT1G30330, AT1G60860, AT1G61040, AT1G67580, AT1G77180, AT1G79280
PB	→ Regulación positiva de procesos biológicos	GO:0048518	AT2G26580, AT2G27230, AT2G37040, AT2G44270, AT2G45650, AT3G12810, AT3G24440, AT3G54670, AT3G63250, AT4G19110, AT5G18650, AT5G24520, AT5G44200, AT5G52020, AT5G62940, AT5G65290, AT1G13180, AT1G23860, AT1G02110, AT1G29400, AT1G32540, AT1G61040, AT1G63700, AT1G67580, AT1G77180
PB	Respuesta a estímulos	GO:0050896	AT2G01830, AT2G02100, AT2G02870, AT2G17290, AT2G18280, AT2G21620, AT2G28350, AT2G31380, AT2G31400, AT2G33470, AT2G37030, AT2G37040, AT2G37170, AT2G40116, AT2G43090, AT2G44270, AT2G44660, AT2G46710, AT2G47710, AT3G04730, AT3G05550, AT3G07650, AT3G01180, AT3G12810, AT3G13300, AT3G15360, AT3G16570, AT3G16890, AT3G03380, AT3G22330, AT3G23890, AT3G24440, AT3G27740, AT3G27820, AT3G27960, AT3G46710, AT3G47090, AT3G50910, AT3G54420, AT3G54670, AT3G59990, AT3G60530, AT3G62270, AT3G63250, AT4G08950, AT4G09650, AT4G11600, AT4G17560, AT4G19230, AT4G20260, AT4G21670, AT4G23400, AT4G25960, AT4G26570, AT4G26620, AT4G29060, AT4G31180, AT4G32720, AT4G33950, AT4G37040, AT5G07920, AT5G10230, AT5G13490, AT5G14040, AT5G17300, AT5G17920, AT5G18650, AT5G22060, AT5G22300, AT5G24520, AT5G24760, AT5G27830, AT5G27920, AT5G35980, AT5G37680, AT5G37850, AT5G43080, AT5G43130, AT5G45130, AT5G46860, AT5G46910, AT5G49980, AT5G52020, AT5G52660, AT5G54200, AT5G56550, AT5G62880, AT5G63310, AT5G63880, AT5G64930, AT1G02130, AT1G09740, AT1G02205, AT1G12090, AT1G15940, AT1G17760, AT1G03090, AT1G19020, AT1G21270, AT1G22400, AT1G23860, AT1G24120, AT1G02110, AT1G27450, AT1G30120, AT1G30330, AT1G30440, AT1G32540, AT1G49950, AT1G52520, AT1G58030, AT1G60010, AT1G60860, AT1G61040, AT1G62740, AT1G63840, AT1G69640, AT1G73660, AT1G73980, AT1G74410, AT1G74520, AT1G77180, AT1G78080

TABLA A.8: Clasificación GO de genes de *Arabidopsis thaliana* ortólogos a los genes de *Oryza sativa* que se identificaron en los *scaffolds* de *Paspalum notatum* asociados al ACR (continuación)

Categoría GO	Subcategoría GO	ID GO	Genes de <i>A. thaliana</i>
PB	→ Respuesta a estrés	GO:0006950	AT2G01830, AT2G02100, AT2G02870, AT2G17290, AT2G21620, AT2G33470, AT2G37040, AT2G37170, AT2G43090, AT2G44270, AT2G44660, AT3G04730, AT3G05550, AT3G01180, AT3G12810, AT3G15360, AT3G16890, AT3G22330, AT3G24440, AT3G27740, AT3G27960, AT3G46710, AT3G54420, AT3G59990, AT3G62270, AT3G63250, AT4G09650, AT4G11600, AT4G17560, AT4G19230, AT4G21670, AT4G23400, AT4G25960, AT4G26620, AT4G31180, AT4G33950, AT5G10230, AT5G13490, AT5G14040, AT5G17300, AT5G17920, AT5G18650, AT5G22060, AT5G24520, AT5G24760, AT5G27830, AT5G37680, AT5G37850, AT5G43080, AT5G52020, AT5G52660, AT5G56550, AT5G63310, AT5G63880, AT5G64930, AT1G09740, AT1G02205, AT1G15940, AT1G19020, AT1G22400, AT1G27450, AT1G30120, AT1G32540, AT1G49950, AT1G60010, AT1G60860, AT1G62740, AT1G63840, AT1G73660, AT1G74520, AT1G77180, AT1G78080
PB	→ Respuesta celular a estímulos	GO:0051716	AT2G01830, AT2G02870, AT2G17290, AT2G21620, AT2G28350, AT2G31400, AT2G40116, AT2G44660, AT3G13300, AT3G24440, AT3G27740, AT3G47090, AT3G54420, AT3G62270, AT4G09650, AT4G02060, AT4G21670, AT4G25960, AT4G26570, AT4G33950, AT5G07920, AT5G13490, AT5G17300, AT5G24520, AT5G43080, AT5G49980, AT5G54200, AT5G62880, AT5G63310, AT5G64930, AT1G09740, AT1G19020, AT1G22400, AT1G32540, AT1G63840, AT1G78080
PB	Segegación cromosómica	GO:0007059	AT3G23890, AT3G54670
PB	Señalización	GO:0023052	AT2G01830, AT2G17290, AT2G28350, AT2G31400, AT2G40116, AT3G16570, AT3G24440, AT3G47090, AT4G09650, AT4G02060, AT4G21670, AT4G25960, AT4G26570, AT4G33950, AT5G07920, AT5G17300, AT5G49980, AT5G54200, AT5G62880, AT5G63310, AT5G64930, AT1G15940, AT1G19020, AT1G22400, AT1G60860, AT1G63840, AT1G78080
PB	Señalización célula a célula	GO:0007267	AT3G16570, AT1G15940, AT1G60860
PB	→ Silenciamiento génico	GO:0016458	AT2G23740, AT2G27230, AT3G15390, AT3G23890, AT3G24440, AT3G54670, AT4G15950, AT4G17560, AT4G02060, AT5G44200, AT1G15940, AT1G23860, AT1G60860, AT1G61040
PB	→ Traducción de señales	GO:0007165	AT2G01830, AT2G17290, AT2G28350, AT2G31400, AT2G40116, AT3G24440, AT3G47090, AT4G09650, AT4G02060, AT4G21670, AT4G25960, AT4G26570, AT4G33950, AT5G07920, AT5G17300, AT5G49980, AT5G54200, AT5G62880, AT5G63310, AT5G64930, AT1G19020, AT1G22400, AT1G63840, AT1G78080

Las clasificaciones GO están desarrolladas al cuarto nivel. Las fechas indican la subcategoría de cada clase inmediatamente superior.

TABLA A.9: Resumen de los genes de *Oryza sativa* identificados en los diferentes estudios de esta Tesis

Gen de <i>O. sativa</i>	I	II	III	IV	V	Descripción
OS12G0594200	×		×		×	Gen conservado
OS12G0595000	×		×		×	EXS, C-terminal
OS12G0616200	×		×		×	HUELLENLOS
OS02G0672600	×		×	×		N ⁶ -adenosina-metiltransferasa
OS02G0760500			×	×	×	Proteína ER6
OS12G0597000			×	×	×	Proteína <i>sos3-like</i> de unión a calcio
OS02G0111600				×	×	Proteína serina/threonina relacionada con quinasas
OS02G0121500				×	×	Proteína conservada
OS02G0123600				×	×	CDP-diacilglicerol-inositol 3-fosfatiltransferasa 1
OS02G0126400				×	×	Proteína quinasa dependiente de calcio
OS02G0128100				×	×	Gen conservado
OS02G0128600				×	×	Factor ADP-ribosilación
OS02G0129900				×	×	Hidrolasa
OS02G0131600				×	×	Subunidad TOM22 de receptor de importador mitocondrial
OS02G0133800				×	×	NA
OS02G0133900				×	×	Proteína de función desconocida DUF829
OS02G0137400				×	×	Proteína de la maquinaria de corte y empalme
OS02G0137450				×	×	Proteína conservada
OS02G0146600				×	×	Factor 4A de iniciación eucariótica
OS02G0161900				×	×	Poliubiquitina de 7 monómeros de ubiquitina
OS02G0198600				×	×	Proteína DD1- <i>like</i> inducida por daño de ADN
OS02G0200900				×	×	Gen conservado
OS02G0216300				×	×	-
OS02G0221600				×	×	Proteína predicha
OS02G0223700				×	×	Proteína de función desconocida DUF3511
OS02G0297600				×	×	Proteína de función desconocida DUF707
OS02G0301100				×	×	Proteína de activación RAG1
OS02G0327100				×	×	Proteína ARL2 G
OS02G0467500				×	×	Amonotransferasa
OS02G0478600				×	×	Ribosoma 40S
OS02G0489550				×	×	Tetratricopéptido TPR-1
OS02G0522300				×	×	Proteína conservada
OS02G0525900				×	×	Acetil-coenzima A sintetasa
OS02G0560450				×	×	Proteína <i>Cmc1-like</i> de biogénesis de citocromo c oxidasa
OS02G0567200				×	×	Fosfatasa
OS02G0575500				×	×	Transportadora ABC
OS02G0580100				×	×	Proteína de función desconocida DUF580
OS02G0580300				×	×	Proteína 14-3-3 6
OS02G0583500				×	×	Transposasa
OS02G0596900				×	×	Actina-actina
OS02G0612300				×	×	Subunidad 2 de proteína de unión a la caperusa nuclear
OS02G0621300				×	×	Hidrolasa de ácidos grasos

TABLA A.9: Resumen de los genes de *Oryza sativa* identificados en los diferentes estudios de esta Tesis (continuación)

Gen de <i>O. sativa</i>	I	II	III	IV	V	Descripción
OS02G0652300				×	×	Dominio ELM, engullimiento y motilidad celular
OS02G0658900				×	×	Sec20
OS02G0810450				×	×	Endorribonucleasa
OS02G0828200				×	×	Tetratricopéptido-like
OS12G0102500				×	×	Proteína serina/threonina relacionada con quinasas
OS12G0122100				×	×	Proteína de función desconocida DUF607
OS12G0134000				×	×	Hidroximetilglutaril-CoA liasa
OS12G0137100				×	×	Dominio de tipo EF-Hand
OS12G0143750				×	×	Dedo de zinc
OS12G0152700				×	×	Dominio ACT de unión a aminoácidos
OS12G0183100				×	×	Subunidad alfa de alfa-keto acido deshidrogenasa de cadena ramificada
OS12G0237900				×	×	Dominio NB-ARC
OS12G0249900				×	×	Proteína quinasa
OS12G0443101				×	×	Gen conservado
OS12G0514400				×	×	Proteína de interacción a potyvirus Vpg
OS12G0552500				×	×	Dominio Rossman-like de plegado alfa/beta/alfa
OS02G0671800				×	×	Dominio de núcleo catalítico
OS02G0740600				×	×	Proteína conservada
OS12G0632700				×	×	Malato deshidrogenasa
OS12G0633200				×	×	Erg28-like
OS02G0617700			×		×	Unión a ácidos nucleicos
OS02G0743500			×		×	EDR1
OS02G0743700			×		×	Proteína ATL1Q RING-H2
OS02G0761100			×		×	<i>PPI</i> de tipo ciclofilina-40
OS02G0762300			×		×	Proteína de biosíntesis de ARNT de 2-tiocitidina
OS02G0767000			×		×	Remorina
OS02G0767100			×		×	Proteína de inducción al frío
OS02G0767500			×		×	Transportadora de fosfato mitocondrial
OS02G0770100			×		×	Dominio de repetición WD40
OS02G0770600			×		×	Proteína de función desconocida DUF1644
OS02G0771100			×		×	COP1
OS02G0771600			×		×	1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa
OS02G0771700			×		×	Hidrolasa de glicósidos
OS02G0775300			×		×	Proteína conservada
OS02G0775400			×		×	Proteína Kinesina de cadena pesada
OS02G0776800			×		×	Proteína de replocación y reparación del ADN
OS12G0597700			×		×	WRKY2
OS12G0600701			×		×	Proteína conservada
OS12G0615400			×		×	Precursor cloroplástico E37
OS12G0626200			×		×	Proteína SAUR de respuesta a auxinas
OS12G0594300			×		×	Gen conservado
OS12G0626400			×		×	Fitoene sintasa 1
OS02G0682500		×			×	TRANSPARENT TESTA GLABRA 1
OS02G0683500		×			×	Dominio B3 de unión a ADN

TABLA A.9: Resumen de los genes de *Oryza sativa* identificados en los diferentes estudios de esta Tesis (continuación)

Gen de <i>O. sativa</i>	I	II	III	IV	V	Descripción
OS02G0683900		×			×	Proteína de función desconocida DUF1084
OS02G0684000		×			×	Tetratricopéptido-like
OS02G0684300		×			×	Nucleoporina
OS02G0684400		×			×	oxs3
OS12G0568800		×			×	NA
OS12G0569200		×			×	Proteína conservada
OS12G0571900		×			×	Tetratricopéptido-like
OS12G0572400		×			×	Factor de <i>splicing</i> Sc35-like
OS12G0619700		×			×	Proteína conservada
OS12G0620400		×			×	Dominio de unión al grupo Metil-CpG del ADN
OS12G0621100		×			×	Proteína YABBY de flor filamentosa
OS12G0621300		×			×	Gen conservado
OS12G0621700		×			×	Proteína conservada
OS02G0666300	×				×	MAP3Ka
OS12G0571200		×		×		Subunidad Tim9 de translocasa de importador de membrana interna mitocondrial
OS02G0760300	×		×			<i>PPI</i> de tipo FKBP
OS02G0763000			×	×		Proteína de función desconocida ric en cistina
OS12G0596600			×	×		Proteína conservada

Las cruces indican en qué análisis de esta Tesis fue identificado cada gen. **I)** Gen con homología a marcadores del ACR —**Sección 3.6; Tabla 3.3**—; **II)** Gen identificado en bloques de sintenia translocados entre el On2 y On12 —**Sección 4.2.3; Tabla 4.10**—; **III)** Gen identificado con homología a secuencias codificantes en los *scaffolds* del R1 —**Sección 4.4.2; Tabla A.6**—; **IV)** Gen contenido en las regiones de estudio del Os2 y Os12 que presenta homología a transcritos diferenciales codificantes —**Sección 4.3**—; **V)** Gen contenido en las regiones de estudio del Os2 y Os12 que presenta homología a transcritos diferenciales no codificantes —**Sección 4.3**—.