



FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO

**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE GENES
INVOLUCRADOS EN EL DESARROLLO DEL ENDOSPERMO
EN CARIOPSIS DE *Paspalum notatum***

BIÓL. FLORENCIA I. POZZI

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR EN CIENCIAS AGRARIAS

DIRECTORA: DRA. SILVINA A. FELITTI

2019

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE GENES INVOLUCRADOS EN EL DESARROLLO DEL ENDOSPERMO EN CARIOPSIS DE *Paspalum notatum*

BIÓL. FLORENCIA I. POZZI

Bióloga– Universidad Nacional de Córdoba

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 _____, durante el período comprendido entre _____, bajo la dirección de _____.

Biól. Florencia I. Pozzi:

Dra. Silvina A. Felitti:

Defendida:de 20__.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi directora, la Dra. Silvina Felitti, por brindarme la posibilidad de realizar esta tesis, por su honorable dirección, transmisión de conocimientos, predisposición, amabilidad, positivismo, y sobre todo por su excelencia como persona.

A los Dres. Carlos Acuña y Guillermo Pratta por el asesoramiento, el apoyo y el tiempo dedicado.

A la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Rosario (FCA-UNR) y al Instituto de Investigaciones en Ciencias Agrarias de Rosario (IICAR) por permitirme disponer de sus instalaciones.

Al ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación de la provincia de Santa Fe por el financiamiento otorgado en la sección biotecnológica de la presente investigación.

A cada uno de los que pertenecen a la sala de estudios de postgrado, porque todos han contribuido a mi formación durante la realización de esta tesis.

A mis amigos del Doctorado: José Luis, Vicky, Gise, Mica, Lour, Flor, Dana, Meli, Mara, Agus, Luci, Ana.

A mi querida compañera de cátedra y amiga: Elena.

A la gente del INTA Marcos Juárez: Lucio, Mechi y Celina.

A mí querida familia: Mamá, Papá, Gusti y Ago.

Por sobre todo a mi sostén fundamental: Marcelo

A todos, muchas gracias!!

Los resultados informados en este trabajo de tesis fueron volcados en las siguientes publicaciones y reuniones científicas:

Artículos publicados en revistas científicas

Xenia in Bahiagrass: Gene Expression at Initial Seed Formation. Florencia I. Pozzi, Guillermo R. Pratta, Carlos A. Acuña, Silvina A. Felitti. 2019. Seed Science Research. 29: 29-37. ISSN: 0960-2585 (Print), 1475-2735 (Online).

Identification of Genes Related to Endosperm Balance Number Insensitivity in *Paspalum notatum* Flüggé. M.B. Depetris, C.A. Acuña, F.I. Pozzi, C.L. Quarín, S.A. Felitti. 2018. Crop Science. 58: 813-822. ISSN: 0011-183X (Print), 1435-0653 (Online).

Identificación de genes relacionados con el desarrollo del endospermo en *Paspalum notatum* Flüggé. Pozzi F.I., C.A. Acuña, M.B. Depetris, S.A. Felitti. Sociedad de Biología de Rosario. 2018. 1 (1): pp. 228. ISSN on-line: 2314-1484 (Resumen).

Caracterización de la expresión génica relacionada con la insensibilidad al número de balance endospermico en *Paspalum notatum* Flüggé. Depetris, Mara B.; Acuña, Carlos A.; Pozzi, Florencia I.; Quarín, Camilo L.; Felitti, Silvina A. Sociedad de Biología de Rosario. 2017. 1 (1): pp. 71. ISSN on-line: 2314-1484 (Resumen).

Herramientas bioinformáticas para el análisis de secuencias en la búsqueda de genes candidatos. Pozzi, Florencia I.; Green, Gisela Y.; Rodríguez, Gustavo R.; Felitti, Silvina A. Sociedad de Biología de Rosario. 2016. Año 1 (1). 22. ISSN on-line: 2314-1484 (Resumen).

Efecto xenia al inicio de la formación de la semilla en *Paspalum notatum*. Pozzi, F.I.; Pratta, G.R.; Acuña, C.A.; Felitti, S.A. Journal of Basic and Applied Genetics. 2016. Vol. XXVII (1). ISSN on line: 1852-6233 (Resumen).

Desarrollos tecnológicos

Bases de datos de secuencias expresadas (EST). Números de acceso: LC409285-LC409308 disponibles en DDBJ: https://www.ddbj.nig.ac.jp/ddbj/full_index-e.html. Florencia I. Pozzi, Guillermo R. Pratta, Carlos A. Acuña, Silvina A. Felitti. 2018.

Bases de datos de secuencias expresadas (EST). Números de acceso: JZ979091-JZ979108 disponibles en NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>. F.I.Pozzi, C.A. Acuña, M.B. Depetris, C. Quarín, S.A. Felitti. 2018

Bases de datos de secuencias expresadas (EST). Números de acceso: JZ979604-JZ979627 disponibles en NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>. M.B. Depetris, C.A. Acuña, F.I. Pozzi, C.L. Quarin, S.A. Felitti. 2018.

Paquete de R: CleanBSequences0.4.0. Florencia I. Pozzi, Gisela Y. Green, Ivana G. Barbona, Gustavo R. Rodríguez, Silvina A. Felitti. <https://cran.r-project.org/web/packages/CleanBSequences/index.html>. Mantenedora: Florencia I. Pozzi <florenciapoz at hotmail.com>. Licencia: GPL-3. 2018

Congresos Internacionales

Conferencia Latinoamericana sobre Uso de R en Investigación + Desarrollo. Desarrollo de una función en R para agilizar y automatizar la limpieza de secuencias obtenidas por la técnica de cDNA-AFLP. Florencia I. Pozzi, Gisela Y. Green, Gustavo R. Rodríguez y Silvina A. Felitti. 4 y 5 de septiembre de 2018 (Póster).

IX Congreso Internacional de Semillas Forrajeras y Céspedes. Analysis of expressed sequences to characterize the xenia effect on seeds of *Paspalum notatum*. F.I. Pozzi, G.R. Pratta, C.A. Acuña, S.A. Felitti. 31 de octubre al 6 de noviembre de 2107. Pergamino, Argentina.

XVI congreso latinoamericano de genética IV congreso de la sociedad uruguaya de genética XLIX reunión anual de la sociedad de genética de Chile XLV congreso argentino de genética. Efecto Xenia al inicio de la formación de la semilla en *Paspalum notatum*. Pozzi, F.I.; Pratta, G.R.; Acuña, C.A.; Felitti, S.A. 9 al 12 de octubre de 2016. Montevideo, Uruguay.

Congresos Nacionales

XX Congreso y XXXVIII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Identificación de genes relacionados con el desarrollo del endospermo en *Paspalum notatum* Flügge. Pozzi F.I., C.A. Acuña, M.B. Depetris, S.A. Felitti. Conferencista. 27 y 28 noviembre de 2018.

III Jornadas Regionales de Genética del Litoral. Análisis de la expresión diferencial de genes durante el desarrollo de semillas de *Paspalum notatum* Flügge. Pozzi F.I., C.A. Acuña, M.B. Depetris, C. Quarin, S.A. Felitti. Panelista. 27 y 28 de junio de 2018, EEA INTA Rafaela.

II Jornadas de divulgación de Mejoramiento genético vegetal del instituto superior de tecnología médica. Conferencia: “Identificación y caracterización de genes involucrados en el desarrollo del endospermo en cariopsis de *Paspalum notatum*”. Conferencista. 24 de octubre de 2017. Rosario.

XIX Congreso y XXXVII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Caracterización de la expresión génica relacionada con la insensibilidad al número de balance endospermico en *Paspalum notatum* Flügge. Depetris, Mara B.; Acuña, Carlos A.; Pozzi, Florencia I.; Quarin, Camilo L.; Felitti, Silvina A. Rosario, 28 y 29 de noviembre de 2017. Sede de Gobierno de la Universidad Nacional de Rosario

XVIII Congreso y XXXVI Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Herramientas bioinformáticas para el análisis de secuencias en la búsqueda de genes candidatos. Pozzi, Florencia I.; Green, Gisela Y.; Rodríguez, Gustavo R.; Felitti, Silvina A. Rosario, 05 y 06 de diciembre de 2016. Sede de Gobierno de la Universidad Nacional de Rosario.

I Jornadas de divulgación de Mejoramiento genético vegetal del instituto superior de tecnología médica. Conferencia: “Efecto Xenia en *P. notatum*”. Conferencista. 25 de octubre de 2016. Rosario.

Premio obtenido:

Mejor Trabajo Científico en el Área Agropecuaria 2018. Identificación de genes relacionados con el desarrollo del endospermo en *Paspalum notatum* Flügge. Pozzi F.I., C.A. Acuña, M.B. Depetris, S.A. Felitti. Otorgado por la Sociedad de Biología de Rosario.

ÍNDICE

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	1
RESUMEN.....	3
ABSTRACT.....	5
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	7
HIPÓTESIS GENERAL.....	13
OBJETIVO GENERAL.....	14
CAPÍTULO I: ANÁLISIS DEL EFECTO XENIA A NIVEL MOLECULAR EN EL ENDOSPERMO HÍBRIDO DE <i>P. notatum</i>	15
1. INTRODUCCIÓN.....	15
1.1. Definición de xenia y mecanismo de acción.....	15
1.2. Efecto xenia en cultivos de interés agronómico.....	16
1.3. Importancia del endospermo para comprender el efecto xenia.....	16
1.4. <i>P. notatum</i> como especie modelo para el estudio de xenia.....	17
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
2.1. Material vegetal.....	19
2.2. Cruzamientos.....	19
2.3. Aislamiento de ARN, síntesis de cDNA y análisis por cDNA-AFLP.....	21
2.4. Análisis del patrón de expresión génica en geles de poliacrilamida.....	23
2.5. Aislamiento, secuenciación de los DETDFs y análisis bioinformático.....	23
2.6. Observaciones fenotípicas del efecto xenia.....	26
3. RESULTADOS.....	27
3.1. Expresión génica diferencial para el estudio del efecto xenia.....	29
3.2. Análisis de las categorías funcionales.....	33
3.3. Análisis de secuencias.....	33

3.4. Efecto xenia a nivel fenotípico en <i>P. notatum</i>	34
4. DISCUSIÓN.....	37
4.1. Categorías funcionales.....	37
4.2. Efecto del genotipo del polen durante la germinación y desarrollo del tubo polínico y la interacción polen-pistilo.....	38
4.3. Efecto del genotipo del polen sobre los procesos metabólicos que ocurren en el desarrollo y producción de semillas (efecto xenia)	39
4.4. Moléculas relacionadas al efecto xenia	41
4.5. Efecto xenia en semillas obtenidas de la autopolinización y polinización abierta.....	42
5. CONCLUSIONES.....	44
CAPÍTULO II: ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DURANTE EL DESARROLLO DEL ENDOSPERMO 48h LUEGO DE OCURRIDA LA POLINIZACIÓN EN <i>P. notatum</i>	45
1. INTRODUCCIÓN.....	45
1.1. Endospermo.....	45
1.2. Desarrollo del endospermo.....	45
1.3. Importancia de entender el desarrollo del endospermo en <i>P. notatum</i>	47
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	50
2.1. Material Vegetal.....	50
2.2. Cruzamientos.....	50
2.3. Aislamiento de ARN, síntesis de cDNA y análisis de cDNA- AFLP.....	51
2.4. Análisis del patrón de expresión génica en geles de poliacrilamida.....	51
2.5. Aislamiento, secuenciación de los DETDFs y análisis bioinformático.....	51
3. RESULTADOS.....	53
3.1. Expresión génica diferencial para el desarrollo de endospermo luego de 48h de ocurrida la polinización.....	54
3.2. Análisis de las categorías funcionales.....	60
4. DISCUSIÓN.....	61
4.1. Categorías funcionales.....	61
4.2. Secuencias relacionadas con el desarrollo del endospermo durante la formación de la semilla.....	61

5. CONCLUSIONES.....	65
CAPÍTULO III: ESTUDIO FUNCIONAL DE UNA SECUENCIA CANDIDATA DE <i>P. notatum</i> EN <i>A. thaliana</i> POR MEDIO DE SILENCIAMIENTO GÉNICO POST- TRANSCRIPCIONAL.....	66
1. INTRODUCCIÓN.....	66
1.1. Análisis funcionales de genes.....	66
1.2. Silenciamiento génico en plantas.....	66
1.2.1. Silenciamiento génico transcripcional (en inglés TGS).....	66
1.2.2. Silenciamiento génico post-transcripcional (en inglés PTGS) o ARN interferencia (ARNi).....	67
1.2.3. Silenciamiento génico por microARN (regulación de la traducción).....	69
1.3. Métodos utilizados para inducir silenciamiento génico en estudios funcionales.....	70
1.3.1. Requieren transgénesis.....	70
1.3.1.1. Secuencia sentido y antisentido.....	71
1.3.1.2. Secuencias con estructura de horquilla (en inglés: hpRNA).....	71
1.3.1.3. miRNA artificiales.....	72
1.3.2. No requieren transgénesis.....	72
1.3.2.1. Silenciamiento génico inducido por virus (en inglés: VIGS).....	72
1.4. Aplicaciones del silenciamiento génico en el análisis funcional del genes en plantas.....	73
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	75
2.1. Expresión transitoria de un gen reportero.....	75
2.1.1. Crecimiento de plantas.....	75
2.1.2. Cepa de <i>Agrobacterium</i> transformante.....	75
2.1.3. Transformación de <i>A. thaliana</i> por Floral dip.....	75
2.1.4. Selección de transformantes.....	76
2.2. Silenciamiento génico en <i>A. thaliana</i> con el gen GG13 de <i>P. notatum</i> y su análisis funcional.....	76
2.2.1. Selección de la secuencia candidata GG13.....	76
2.2.2. Generación del constructo para el silenciamiento génico (hpRNA).....	77

2.2.3. <i>Agrobacterium</i> competentes.....	79
2.2.4. Transformación de células competentes de <i>Agrobacterium</i>	79
2.2.5. Crecimiento de plantas y transformación de <i>A. thaliana</i> por Floral dip.....	79
2.2.6. Análisis fenotípico de <i>A. thaliana</i>	79
2.2.7. Validación por RT-qPCR.....	81
3. RESULTADOS.....	83
3.1. Expresión transitoria de un gen reportero.....	83
3.2. Silenciamiento génico en <i>A. thaliana</i> con el gen GG13 de <i>P. notatum</i> y su análisis funcional.....	84
3.2.1. Construcción del hpRNA y transformación de <i>A. thaliana</i> por Floral dip.....	84
3.2.2. Análisis fenotípico de <i>A. thaliana</i>	86
3.2.3. Validación por RT-qPCR.....	86
4. DISCUSIÓN.....	90
4.1. Expresión transitoria de un gen reportero.....	90
4.2. Análisis funcional del gen GG13 de <i>P. notatum</i> mediante silenciamiento génico en <i>A. thaliana</i>	90
5. CONCLUSIONES.....	92
CONCLUSIONES GENERALES.....	93
BIBLIOGRAFÍA.....	95

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ARN	Ácido ribonucleico.
ARNm	ARN mensajero.
ARNi	ARN de interferencia.
BLAST	Programa de alineamiento de secuencias de tipo local, del inglés <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> .
cDNA	ADN copia, del inglés <i>DNA copy</i> .
cDNA-AFLP	Polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados en ADN copia, del inglés <i>cDNA amplified fragment length polymorphism</i> .
DCL	Dicer, del inglés <i>dicer-like</i> .
DETDF	TDF de expresión diferencial, del inglés <i>differentially expressed TDF</i> .
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfato.
dsRNA	ARN doble cadena, del inglés <i>double stranded RNA</i> .
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetra-acético, del inglés <i>ethylene-diamine-tetraacetic acid</i> .
EST	Etiquetas de secuencias expresadas, del inglés <i>Expressed Sequence Tag</i> .
g.l ⁻¹	Gramos por litro.
h	Hora.
hpRNA	ARN en horquilla, del inglés <i>hairpin RNA</i> .
LOD	Luego de ocurrida la polinización.
M	Molar.
miRNA	micro ARN, del inglés <i>micro RNA</i> .
Min	Minuto.
mg.l ⁻¹	Miligramos por litro.
mM	Milimolar.

m.v ⁻¹	Masa en volumen.
Pb	Pares de bases.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa, del inglés <i>polymerase chain reaction</i> .
PTGS	Silenciamiento génico post-transcripcional, del inglés <i>post-transcriptional gene silencing</i> .
RISC	Complejo de silenciamiento inducido por ARN, del inglés <i>RNA-induced silencing complex</i> .
RITS	Silenciamiento génico transcripcional inducido por ARN, del inglés <i>RNA-induced transcriptional silencing</i> .
RT-qPCR	PCR cuantitativa con transcriptasa reversa, del inglés <i>quantitative reverse transcription PCR</i> .
s	Segundo.
siRNA	ARN de interferencia corto, del inglés <i>small interfering RNA</i> .
TBE	Tris-Borato-EDTA.
TDF	Fragmento derivado de transcripto, del inglés <i>transcript-derived fragment</i> .
TGS	Silenciamiento génico transcripcional, del inglés <i>transcriptional gene silencing</i> .
V	Volts.
x	Número cromosómico.
μl	Microlitro.
°C	Grado centígrado.
α	Nivel de significación.
>	Mayor.
<	Menor.
%	Por ciento.
=	Igual.
+	Más.

RESUMEN

La especie *Paspalum notatum* Flüggé (*P. notatum*) es utilizada como modelo en genética reproductiva vegetal debido a que presenta citotipos diploides de reproducción sexual y citotipos poliploides apomícticos y pseudógamos. Esta característica permitió evaluar: 1- El efecto directo del genotipo del polen en el desarrollo y características de la semilla y fruto (efecto xenia) y 2- Las diferencias durante la formación de semillas entre citotipos apomícticos y sexuales.

En el capítulo I, se exploró el efecto xenia, el cual se define como el efecto directo del genotipo del polen en el desarrollo de la semilla o fruto. Tiene gran importancia agronómica, utilizándose en el mejoramiento genético vegetal, por ejemplo, en la búsqueda del incremento del rendimiento de granos. Aunque se reportan numerosos estudios sobre xenia, su efecto a nivel molecular ha sido poco estudiado. Por ello, se realizó un estudio molecular utilizando la especie *P. notatum*. Los objetivos del presente trabajo fueron: 1- Analizar el efecto de xenia en el desarrollo del endospermo a nivel molecular. 2- Evaluar si los genes expresados diferencialmente ejercen funciones durante el desarrollo de la semilla. 3- Explorar los procesos metabólicos y la(s) molécula(s) señal(es) que median el efecto xenia en el endospermo. Para ello, luego de tres horas de ocurrida la polinización, momento en el que ya ha ocurrido la fecundación de los núcleos polares, se realizó la comparación mediante cDNA-AFLP de una planta madre testigo sin polinizar, de genotipo Q4117 (4x apomíctico pseudógamo), con respecto a dos cruzamientos de esta madre con distintos dadores de polen: Q4117xH398 (2x sexual) y Q4117xQ3775 (4x apomíctico pseudógamo). Del análisis de la expresión génica diferencial se obtuvieron bandas únicas, tanto para el cruzamiento Q4117xH398 como para el cruzamiento Q4117xQ3775. A partir del análisis del patrón de bandas obtenidas, se encontraron 33 bandas de expresión diferencial únicas para los cruzamientos analizados, de las cuales 24 fueron secuenciadas, y se les asignó una posible función biológica mediante búsquedas blastn, blastx y blastp. Del análisis funcional de secuencias se obtuvo que siete de ellas (CG5, GA4, GA6, GG5, CG3, TG2 y CC1) presentaron homología con *loci* de *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) con funciones asociadas al desarrollo del saco embrionario, desarrollo del tubo polínico, doble fertilización, formación del cigoto y el endospermo. En artículos previos se puso en evidencia que al generarse fenotipos mutantes de *A. thaliana* para estos *loci* el tamaño de la silicua, el número, tamaño y el set de semillas (porcentaje de semillas llenas con respecto al número total de semillas)

disminuye. Estos resultados mostraron evidencias del efecto xenia en las funciones asociadas a la reproducción y de que el genotipo del polen es uno de los factores que determinan la expresión de diferentes transcritos que podrían estar asociados con el rendimiento de granos. Además, las secuencias CC3, GA4, GA6 y GA2 estuvieron asociadas a *loci* de *A. thaliana* que codifican para ARNm móviles, lo cual sería evidencia de que el mecanismo para xenia estaría relacionado con ARNm móviles que difundirían desde el tubo polínico por la micrópila del óvulo.

En el capítulo II se trabajó en base a la teoría del número de balance endospermico (NBE), la cual establece que la relación de las contribuciones genómicas debe ser 2materna:1paterna para el normal desarrollo del endospermo. Sin embargo, las plantas apomícticas de *P. notatum* son NBE insensibles. Los objetivos del presente trabajo fueron: 1) Realizar cruzamientos entre diferentes genotipos, a fin de generar semillas con distintos niveles de ploidía por las vías sexual y apomíctica. 2) Realizar un análisis de la expresión génica diferencial 48h luego de ocurrida la polinización (LOP). Para ello, a partir del ARNm de 20 ovarios de cada cruzamiento 48h LOP, se llevó a cabo el análisis de la expresión génica diferencial mediante la técnica cDNA-AFLP. Se obtuvieron numerosas secuencias candidatas: AC1, AC2, AC3, AC4, AC5, GG1 y GG3 para ser utilizadas en futuros análisis funcionales en *A. thaliana*, las cuales se expresarían en distintos estadios de desarrollo de la semilla y estarían relacionadas con el desarrollo del endospermo y con la viabilidad o no de la semilla en *P. notatum*.

En el capítulo III se trabajó sobre el silenciamiento génico post-transcripcional en *A. thaliana* a partir de secuencias candidatas de *P. notatum*. Para ello, se evaluó en primer lugar la eficiencia del método de transformación por Floral dip mediante la expresión transitoria del gen *gus*. Posteriormente, se seleccionó la secuencia candidata GG13 (gen GG13) de *P. notatum* con el objetivo de ser silenciada en *A. thaliana* y se generó un hpRNA, el cual contenía las secuencias del gen GG13 en sentido y anti-sentido separadas por un intrón. Se validó el silenciamiento mediante una RT-qPCR y el subsiguiente cálculo de expresiones relativas. Además, se evaluaron caracteres fenotípicos en silicuas de plantas silenciadas y control. Los resultados obtenidos a partir del análisis fenotípico permitieron concluir que el gen GG13 afecta tempranamente el número y la forma de las semillas y el largo de silicua. Por lo tanto, se evidenció la correspondencia entre los resultados obtenidos por el análisis funcional con lo predicho por el análisis bioinformático.

ABSTRACT**Identification and characterization of genes involved in the development of the endosperm in caryopses of *Paspalum notatum***

Paspalum notatum Flüggé (*P. notatum*) is a model species in plant reproductive genetics because it presents diploid cytotypes of sexual reproduction and apomictic and pseudogous polyploid cytoplasm. This characteristic allowed to evaluate: 1- Xenia effect and 2- The differences in seed development between apomictic and sexual cytotypes.

In Chapter I, the pollen genotype's direct effect on seed or fruit development (xenia) was explored. A molecular study was carried out using *P. notatum*. cDNA-AFLP technique was carried out to compare a Q4117 control mother plant without pollination with two crosses: Q4117xH398 and Q4117xQ3775 three hours after pollination. Twenty-four unique bands were found for the crosses analyzed and assigned a biological function. Seven of them presented homology with *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) loci with functions associated with embryo sac development, tube development pollinic, double fertilization, formation of the zygote and the endosperm, changing the size of the siliques and the seed set. These results show evidence of the xenia effect. In addition, the four sequences were associated to loci of *A. thaliana* that code for mobile mRNA, so xenia would be related to mobile mRNAs signaling.

In Chapter II, we worked based on the theory of endospermic balance number (NBE), which establishes 2 maternal: 1paternal genomic contributions for the normal development of the endosperm. However, the apomictic plants of *P. notatum* are insensitive NBE. The aims of the present work were: 1-To carry out crosses between different genotypes. 2- Perform an analysis of differential gene expression 48h after pollination using cDNA-AFLP technique. Numerous candidate sequences were obtained to be used in future functional analyzes in *A. thaliana*. This sequences would be expressed in different stages of seed development and would be related to the development of the endosperm and with the viability or not of the seed in *P. notatum*.

In Chapter III, we worked on the post-transcriptional gene silencing in *A. thaliana* with the candidate sequences of *P. notatum*. Therefore, the efficiency of the Floral dip method was evaluated using *gus* gene expression as proof of concept. The candidate sequence GG13 (gene GG13) from *P. notatum* was selected and hpRNA was generated. The silencing was validated by an RT-qPCR. Phenotypic characters were evaluated in siliques of silenced and control plants. We

concluded that GG13 gene affects both, the number and shape of the seeds and also the length of the silique.

INTRODUCCIÓN GENERAL

La formación de semillas es un proceso clave en el ciclo de vida de las plantas con flores. Su desarrollo inicia con el evento de doble fecundación, uno de los gametos masculinos fertiliza el óvulo y el otro a la célula central binucleada. Esto conduce al desarrollo coordinado del embrión y del endospermo, respectivamente, donde cada uno de ellos cuenta con diferentes niveles de ploidía. Dicho proceso se lleva a cabo dentro del saco embrionario, que está rodeado por capas de células nucleares y tegumentos formados por tejidos somáticos de origen materno (Chaudhury *et al.*, 2001; Berger y Chaudhury, 2009; Ortiz *et al.*, 2013). Por tanto, la interrelación de los diferentes genomas determina el éxito del desarrollo de la semilla. En el proceso intervienen diversos tejidos con varios niveles de ploidía y diferentes orígenes genéticos, por lo que su caracterización a nivel del transcriptoma es sin duda un reto (Chaudhury *et al.*, 2001).

Durante la reproducción sexual, una célula madre de la megaspora se diferencia iniciando la megasporogénesis, generando una reducción meiótica para producir cuatro megasporas haploides, de las que degeneran tres (Hanna y Bashaw, 1987; Ortiz *et al.*, 2013). La megaspora sobreviviente sufre megagametogénesis, que implica tres rondas de mitosis sin citocinesis, generando un sincitio de ocho núcleos. Eventos posteriores de diferenciación celular resultan en la formación de un gametofito femenino maduro (saco embrionario) que contiene un óvulo, dos sinérgidas, tres antípodas y una célula central con dos núcleos (Koltunow *et al.*, 2013).

La apomixis hace referencia a una forma de reproducción asexual a través de semillas, que origina progenies genéticamente idénticas a la planta madre (Nogler, 1984; Hanna y Bashaw, 1987). Este tipo de reproducción fue descrito en más de 400 especies pertenecientes a 35 familias diferentes de angiospermas. A pesar de su amplia distribución en las plantas con flores, la apomixis está presente sólo en algunas especies de interés agronómico, que incluyen a un grupo de gramíneas forrajeras, a la mandioca, la manzana, los citrus, el mango y las fresas (Hanna y Bashaw, 1987; Dwivedi *et al.*, 2010; Ortiz *et al.*, 2013).

Nogler (1984) ha dividido los mecanismos de la apomixis de acuerdo al origen de los embriones asexuales en dos categorías: la ruta esporofítica y la ruta gametofítica. En la primera, los

embriones se originan directamente a partir de células de la nucela o de los tegumentos del óvulo (Hanna y Bashaw, 1987; Koltunow *et al.*, 1995). Comúnmente se forman embriones somáticos (esporofíticos) múltiples que comparten el ovario junto con el embrión de origen sexual y utilizan su endospermo para desarrollarse (Koltunow, 1993). En la ruta gametofítica se observa la formación de un gametofito femenino cromosómicamente no reducido, ya que no ocurre la meiosis (apomeiosis). Este gametofito femenino, puede originarse por diplosporía o aposporía, lo cual dependerá del tipo de célula que origine el saco embrionario no reducido. En la primera, la célula madre de la megaspóra no reduce su contenido cromosómico y es la que da origen al saco embrionario. En cambio, en el segundo caso, el desarrollo del gametofito femenino se inicia a partir de una célula de la nucela, observándose la formación de uno o varios sacos embrionarios no reducidos, conteniendo una ovocélula, las sinérgidas, núcleos polares y pueden o no poseer antípodas (Koltunow *et al.*, 2013; Ortiz *et al.*, 2013). El embrión se desarrolla a partir de la oófera por partenogénesis (en ausencia de fecundación) y la formación del endosperma ocurre en forma autónoma o luego de la fecundación de los núcleos polares (pseudogamia) (Savidan *et al.*, 2001; Koltunow *et al.*, 2013).

La apomixis gametofítica ha sido más profundamente estudiada que la apomixis esporofítica, específicamente por ser el tipo presente en las gramíneas, donde muchas especies son de valor agronómico (Ozias-Akins y Van Dijk, 2007; Ortiz *et al.*, 2013). Por otra parte, la apomixis gametofítica está casi siempre asociada a la poliploidía. Varios grupos de investigación han realizado importantes contribuciones al conocimiento de la biología y herencia de la apomixis en distintas especies (Ozias-Akins y van Dijk, 2007; Tucker y Koltunow, 2009; Pupilli y Barcaccia, 2012; Ortiz *et al.*, 2013). Se ha invertido una enorme cantidad de recursos para identificar los genes involucrados en la formación del embrión clonal en distintas especies apomícticas. Sin embargo, se han realizado muy pocos estudios tendientes a entender el desarrollo del endospermo en estos sistemas.

Actualmente, se considera, que este tipo de reproducción ha evolucionado como un sistema alternativo a la sexualidad a través de las vías de desarrollo del ovario (Grimanelli *et al.*, 2001). Se especula que la vía apomíctica no funciona en forma completamente independiente de la vía sexual, ya que los genes que la controlan podrían no ser genes distintos, sino genes que exhiben una

regulación alterada con respecto a la presente en los genotipos sexuales (Ozias-Akins y Van Dijk, 2007).

La especie en estudio

La especie utilizada en el presente trabajo de tesis es *Paspalum notatum* Flüggé (*P. notatum*), también conocida como pasto horqueta o bahiagrass, la cual es una hierba rizomatosa perenne que presente una inflorescencia dual terminal, con dos espigas tipo racimos conteniendo múltiples espiguillas. Dentro de cada espiguilla hay una flor con estigmas y estambres, negros. El fruto es una cariopsis o cariósipide oval. Pertenece a la familia de las gramíneas (Poaceae o Graminae), subfamilia Panicoideae, tribu Paniceae, y a un género con alrededor de 330 especies distribuidas principalmente en las regiones tropicales y subtropicales de América (Zuloaga y Morrone, 2005).

La especie presenta tolerancia a los suelos infértiles, a la sequía, al calor, además de resistencia a insectos y enfermedades, (Zhang. *et al.*, 2007). Es una de las especies de mayor importancia económica del género al que pertenece, utilizándose principalmente como forrajera y como césped (Acuña *et al.*, 2009).

Genéticamente es una especie multiploide, incluyendo un citotipo diploide y varios citotipos poliploides: triploide (3x), tetraploide (4x), pentaploide (5x), hexaploide (6x) y octoploide (8x), de los cuales el 98% son tetraploides (Tischler y Burson, 1995; Pozzobon y Valls, 1997). Su número básico de cromosomas es $x=10$, siendo el citotipo diploide ($2n=2x=20$) sexual y autoincompatible (Burton, 1955) y los poliploides apomícticos, pseudógamos y autofértiles. El citotipo 4x ($2n=4x=40$) es el más frecuente y ampliamente distribuido (Burton, 1948; Bashaw *et al.*, 1970).

En esta especie, la aposporía es heredada como un gen mendeliano simple y dominante, con segregación distorsionada (Martínez *et al.*, 2001). Este carácter se encuentra en una región genómica caracterizada por la supresión de la recombinación y el apareamiento cromosómico preferencial (Martínez *et al.*, 2003; Stein *et al.*, 2004; 2007). La forma diploide (*P. notatum* var. *saurae* Parodi), variedad botánica conocida como pasto horqueta diploide (Pensacola bahiagrass en EEUU), es nativa de las cuencas de los ríos Paraná y Uruguay en el noreste de Argentina. Luego de

ser introducida accidentalmente a principios del siglo veinte en Florida, hoy es una de las forrajeras cultivadas más importantes de los estados del golfo en el sur de los Estados Unidos. Las poblaciones diploides naturales son poco frecuentes y están restringidas a los suelos sueltos de los márgenes de los ríos Uruguay, Paraná, afluentes y planicies arenosas de las islas del río Paraná (Gates *et al.*, 2004).

La apomixis en *P. notatum*

La apomixis en *P. notatum* está determinada por la formación de sacos embrionarios no reducidos a partir de células de la nucela (aposporía y apomeiosis), el desarrollo partenogenético de embriones (sin fertilización del óvulo) y el desarrollo del endospermo después de la fertilización de los núcleos polares (pseudogamia) (Martínez *et al.*, 2001; 2003). En los tetraploides, la formación del endospermo (pseudógamo) requiere de la fecundación de los núcleos polares no reducidos ($2n + 2n$) por un núcleo espermático reducido (n) produciendo una relación genómica 4:1 materna: paterna ($m:p$) diferente de la relación en las angiospermas sexuales (Burton, 1948; Grimanelli *et al.*, 1997; Quarin, 1999). Por lo cual, el desarrollo del endospermo en los tetraploides es indiferente a cambios en esa relación (NBE insensible). Además, se ha demostrado que produce semilla (con embrión y endospermo) independientemente de la variación desde 2:1 hasta 8:1 en el aporte genómico materno:paterno (Quarin, 1999). Si la fecundación de los núcleos polares no ocurre, el endospermo no desarrolla y, por ende, las subsiguientes etapas del desarrollo del embrión no suceden y la planta aborta. Por lo tanto, el efecto directo del polen en cruzamientos con madres apomícticas solo se dará a nivel del endospermo (Burton, 1948; Quarin, 1999).

La apomixis y el mejoramiento de las especies vegetales

La perspectiva de clonar genotipos híbridos posee un gran potencial debido a la creciente comercialización en los distintos cultivos y al enorme costo que representa la generación anual de la semilla, tanto para los cultivos alógamos, como el maíz y el girasol, como para los autógamos, como el arroz y el algodón. Esta herramienta sería una importante ayuda para productores agropecuarios de países en desarrollo, permitiendo sostener altos rendimientos año tras año utilizando parte de las semillas cosechadas por ellos mismos.

El uso de la tecnología de apomixis podría aplicarse a cruzamientos de especies emparentadas (pool génico secundario y terciario), cuyo germoplasma es actualmente inaccesible o difícil de explotar (Spillane *et al.*, 2004). En este sentido, podría ser sencillo mantener líneas puras sin necesidad de aislamiento físico, simplificando los programas de mejoramiento de híbridos mediante la eliminación de la necesidad de líneas restauradoras y mantenedoras (Spillane *et al.*, 2004). Esto es debido a la falta de fecundación de la oósfera, que mantiene al embrión con una constitución génica idéntica a la madre (línea pura). Además, la aplicación de esta estrategia permitiría reproducir por semillas muchas especies que actualmente se propagan por métodos vegetativos (Vielle-Calzada *et al.*, 1996; Spillane *et al.*, 2004) disminuyendo costos y aumentando rendimientos.

Se estima que la transferencia de la apomixis a los cultivos de mayor importancia agronómica produciría un enorme impacto en la agricultura ya que posibilitaría la fijación de combinaciones híbridas, su mantenimiento y multiplicación por semillas (Vielle-Calzada *et al.*, 1996; Dwivedi *et al.*, 2010). Un análisis económico que considera el acceso libre a la tecnología y el traspaso del carácter solamente al arroz, con una relativa modesta tasa de aceptación por parte de los productores, prevé un beneficio económico global de alrededor de 4 billones de dólares anuales (McMeniman y Lubulwa, 1997).

Otra ventaja es que se facilitaría la tecnología de transgénicos, ya que una vez introducido un transgen en un fondo genético apomítico, no sería necesario realizar retrocruzas para que sea heredado de manera uniforme por la progenie. Simplificaría el uso de transformantes ya que una planta transgénica apomítica fijaría inmediatamente el nuevo carácter y se convertiría en un cultivar luego de su multiplicación.

Básicamente, existirían tres tipos de procedimientos para transferir la apomixis a especies sexuales: 1- la hibridación interespecífica entre una planta sexual y un pariente silvestre apomítico, 2- la transformación genética de cultivares sexuales con genes considerados disparadores del carácter y 3- la iniciación de la expresión de la apomixis por experimentos de bloqueo de genes. Hasta el momento, la transferencia del carácter apomixis a otros cultivos de interés ha fracasado (Petrov *et al.*, 1979; Kindiger *et al.*, 1996; Savidan, 2000; Ortiz *et al.*, 2013). Una de las mayores

dificultades para la incorporación de este carácter, deriva de la condición estricta de que se cumpla la relación genómica 2 materna: 1 paterna necesaria para desarrollar el endospermo en la mayoría de las angiospermas, que impide la formación de semilla en los híbridos (Johnston *et al.*, 1980; Savidan, 2000).

Al centrarse la apomixis en tres procesos: apomeiosis, partenogénesis y la formación del endospermo, debería, en teoría, ser posible desarrollar conjuntos de transgenes que disparen cada uno de estos elementos y combinarlos para generar plantas apomícticas a partir de plantas sexuales (Pupilli y Barcaccia, 2012).

***P. notatum* como modelo en genética reproductiva**

Aunque ya se ha descrito la importancia económica de *P. notatum* como forrajera y como césped, una de las utilidades más importantes de la especie, es su uso como modelo en estudios de genética reproductiva vegetal. Dado que una de sus características más importantes es su modo de reproducción, que puede ser tanto sexual (citotipos diploides) como apomíctico (citotipos poliploides), ésto permite evaluar:

- 1- El efecto directo del genotipo del de polen en el desarrollo y características de la semilla y fruto (efecto xenia).
- 2- Las diferencias en el desarrollo del endospermo durante la formación de semillas entre citotipos diploides y tetraploides, sexuales y apomícticos.

HIPÓTESIS GENERAL

Existen diferencias en el transcriptoma de ovarios de plantas apomíticas y sexuales en el momento de la polinización y a las 48 horas luego de producida la misma.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar el transcriptoma durante la formación de cariopsis provenientes de plantas apomíticas y sexuales de *P. notatum*, con particular énfasis en la identificación de genes asociados al efecto xenia y al desarrollo del endospermo.

CAPÍTULO I: ANÁLISIS DEL EFECTO XENIA A NIVEL MOLECULAR EN EL ENDOSPERMO HÍBRIDO DE *P. notatum*.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Definición de xenia y mecanismo de acción

Xenia se define como el efecto directo del genotipo del polen en el desarrollo y características de la semilla y fruto (incluyendo embrión, endospermo y tejidos maternos), en el período comprendido entre la fecundación y la germinación de la semilla (Rieger *et al.*, 1968; Denney, 1992). Como consecuencia del efecto xenia, se producen variaciones en las características fenotípicas de la semilla o fruto cuando el mismo parental femenino es fertilizado con diferentes dadores de polen, aunque estas variaciones no son heredadas por la progenie. Este efecto es de gran importancia agronómica para la producción de frutos y semillas, teniendo aplicaciones en el mejoramiento genético de cultivos, en la búsqueda del incremento del rendimiento de granos y/o del tamaño y calidad de fruto (Denney, 1992; Bulant y Gallais, 1998; Dogterom *et al.*, 2000; Kaczmarek *et al.*, 2001; Weingartner *et al.*, 2002; Liu, 2008).

Aunque el proceso biológico de xenia a nivel molecular ha sido poco estudiado, muchos autores han propuesto un mecanismo para este efecto y a partir de ello han elaborado distintas hipótesis para explicarlo. Algunas de ellas apuntan a moléculas que difunden por los tejidos maternos y que las mismas dependen del polen que fecunde al saco embrionario. Dichas moléculas fueron llamadas gémulas por Darwin (1868), u hormonas por Swingle (1928) y Dag y Mizrahi (2005). Denney (1992) propone la hipótesis de los ARNm móviles como mediadores del efecto xenia. Evidencias posteriores permitieron sugerir que dichas moléculas estarían representadas por ARNm y microARN (miARN) (Kim *et al.*, 2001; Kudo y Harada, 2007). El ARN puede actuar dentro de la célula donde fue generado o como molécula señal, desplazándose entre las células y regulando la expresión génica de otros tejidos, siendo capaz de causar efectos fenotípicos en el desarrollo del tejido blanco (Kim *et al.*, 2001; Kudo y Harada, 2007; Piotto *et al.*, 2013). Durante la fertilización, el polen liberaría moléculas de ARNm, las cuales difundirían en los tejidos de la

planta madre causando los cambios de color, tamaño, composición química de semillas y frutos. Estos cambios dependen del parental masculino particular (Liu, 2008).

1.2. Efecto xenia en cultivos de interés agronómico

Se ha demostrado el efecto xenia en cultivos como la alfalfa (*Medicago sativa* L.), en donde, se obtuvieron vainas de mayor tamaño y con mayor número de semillas luego de la fecundación cruzada (Bullant y Gallais, 1998). Los resultados fueron similares en centeno (*Secale cereale* L.), en donde, al comparar tamaño y peso de 1000 granos entre una línea endocriada y la misma línea cruzada con un tester, la fecundación cruzada arrojó los mayores valores de variable. Además, se evidenció que cuanto más pequeña es la semilla resultante de una línea endogámica, más efecto ejercerá el genotipo del polen cuando la fecundación es cruzada (Kaczmarek *et al.*, 2001). En arándano (*Vaccinium corymbosum* L.), xenia puede incrementar no solo el número de semillas y masa de frutos, sino también la calidad de los mismos (disminuyendo el tiempo de maduración lo cual es una característica deseada para el productor) (Dogterom *et al.*, 2000). También se ha demostrado su efecto en tomate (*Solanum galapagense* S. y *Solanum lycopersicum* L.), especie para la que se comprobó que un parental masculino silvestre puede aumentar la densidad de tricomas del fruto y disminuir el tamaño de las semillas al ser cruzado con genotipos cultivados (Piotto *et al.*, 2013). La mayor cantidad de estudios sobre xenia han sido realizados en maíz (*Zea mays* L.) debido a su naturaleza alógama y a la búsqueda del vigor híbrido. En este cultivo, se determinó que el efecto de xenia puede incrementar el rendimiento de granos hasta en un 35% y la cantidad de proteínas (zeinas) en un 44%, atribuyendo este incremento en la acumulación proteica a un alargamiento del período efectivo del llenado de grano (Bullant y Gallais, 1998). También se evidenció que el mayor rendimiento de grano para este cultivo se obtuvo al combinar la macho esterilidad con xenia. Además, se ha propuesto que los efectos del polen son mayores cuanto mayor es la distancia genética entre el parental femenino y el masculino (Weingartner *et al.*, 2002).

1.3. Importancia del endospermo para comprender el efecto xenia

El endospermo resulta de la fertilización de la célula central del saco embrionario por una célula espermática, y tiene por función nutrir al embrión durante el desarrollo de la semilla y la

germinación. Este tejido es una importante fuente de energía y proteínas para humanos y animales, es por ello que el valor de los cereales como el maíz y el trigo está determinado en gran parte por la composición del endospermo. Tiene gran importancia alimentaria y económica siendo utilizado como materia prima para la preparación de numerosos alimentos, bienes y biocombustibles (Brown y Lemmon, 2007; Nguyen *et al.*, 2007; Sabelli y Larkins, 2009). Otra característica importante con respecto al endospermo es que ha sido central durante la evolución del concepto de xenia, ya que a la largo de la historia del concepto se ha ido haciendo foco sobre el efecto del genotipo del polen (xenia) en distintos tejidos de la semilla: en el endospermo, en el embrión y el endospermo, en el endospermo y tejidos maternos y por último en el embrión, el endospermo y tejidos maternos. Aunque los tejidos seminales sobre los cuales se creía que el genotipo del polen ejercía su efecto fue cambiando en cada definición, todas las definiciones de xenia tuvieron en cuenta el efecto del genotipo del polen sobre el endospermo (Denney, 1992). En consecuencia, debido a la importancia económica y alimentaria del endospermo y a su relevancia en el concepto de xenia, estudios sobre el desarrollo del endospermo con diferentes donantes de polen son fundamentales para comprender su efecto.

1.4. *P. notatum* como especie modelo para el estudio de xenia

P. notatum es la especie utilizada en este estudio para analizar el efecto de xenia a nivel molecular. Dicha especie es empleada como modelo en estudios de genética reproductiva vegetal dado que una de sus características más importantes es su modo de reproducción, sexual o apomíctica. La apomixis en el citotipo tetraploide ($2n = 4x = 40$) es gametofítica e incluye aposporía (células nucelares desarrollan sacos embrionarios no reducidos), partenogénesis (desarrollo embrionario sin fertilización del óvulo) y pseudogamia (formación del endosperma después de la fertilización de los núcleos polares) (Martínez *et al.*, 2003; Depetris *et al.*, 2018). En individuos apomícticos, no se requiere la fertilización del óvulo, aunque la fertilización de los núcleos polares (pseudogamia) es necesaria para el desarrollo del endospermo (Burton, 1948, Quarín, 1999). Por lo tanto, la contribución del efecto directo del genotipo del polen sobre el endospermo híbrido podría evaluarse en esta especie mediante el análisis de cruzamientos en los que las plantas apomícticas se utilizan como progenitores femeninos. En consecuencia, el uso de especies pseudógamas apospóricas para estudiar el efecto de xenia a nivel molecular representa una gran ventaja debido a

las dificultades técnicas para separar el embrión de otros tejidos de semillas para obtener muestras de ARN. Como el embrión se origina directamente de las células maternas, es un embrión clonal, por lo cual los efectos moleculares del genotipo del polen (efecto xenia) solo serán observables a nivel del endospermo híbrido.

Teniendo en cuenta el objetivo general y los antecedentes anteriores sobre el concepto de xenia, la importancia de su efecto en el mejoramiento genético vegetal de especies de interés agronómico, la ausencia de información sobre su mecanismo de acción a nivel molecular y la importancia del endospermo en la producción de semillas, se definen los objetivos específicos del presente capítulo de tesis:

1) Analizar el efecto de xenia en el desarrollo del endospermo a nivel molecular mediante el estudio de la expresión génica diferencial en cruzamientos entre una misma planta materna apospórica pseudógama con dos genotipos paternos diferentes.

2) Evaluar si los genes expresados diferencialmente ejercen funciones durante el desarrollo de la semilla.

3) Explorar los procesos metabólicos y la(s) molécula(s) señal(es) que median el efecto xenia en el endospermo en esta especie.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Material vegetal

Los genotipos utilizados para el estudio del efecto xenia en el endospermo híbrido a nivel molecular fueron:

- **H398**: 2x=20 Sexual, Empedrado, Corrientes, Argentina.
- **Q4117**: 4x=40 Apomítico, Río Grande do Sul, Brasil (Martínez *et al.*, 2001).
- **Q3775**: 4x=40 Apomítico, Tamaulipas, México (Martínez *et al.*, 2001).

2.2. Cruzamientos

Se realizaron cruzamientos experimentales a fin de obtener sacos embrionarios fertilizados con 2 genotipos de polen diferentes: Q4117xH398 (4x apomítico x 2x sexual) y Q4117xQ3775 (4x apomítico x 4x apomítico). Además, se utilizó como testigo una planta madre castrada y no polinizada del genotipo Q4117 (4x apomítico) (Tabla 1). Los cruzamientos fueron llevados a cabo en el Instituto de Botánica de Noreste (IBONE), Corrientes.

En la fase de floración se realizó la castración de las hembras (Figura 1A), eliminando las anteras inmediatamente después de la antesis, en cámara húmeda (Burton, 1948). El polen de las plantas utilizadas como progenitor masculino, se recolectó introduciendo las inflorescencias en un sobre de papel sulfito. Finalmente, este polen fue utilizado para polinizar las inflorescencias emasculadas, introduciendo dichas inflorescencias dentro del sobre que contenía el polen (Figura 1B).

Para poder detectar el efecto xenia a nivel del endospermo durante la formación de semillas de *P. notatum*, se aislaron ovarios de flores utilizando pinzas y bajo la lupa, luego de 3h de ocurrida la polinización (Figura 2A y 2B). En este momento, ya ha ocurrido la doble fertilización y, por ende, la fecundación de los núcleos polares (Burson, 1987). Se muestrearon 20 ovarios para cada

cruzamiento y de la planta madre testigo sin polinizar los cuales fueron inmediatamente congelados en nitrógeno líquido (Felitti *et al.*, 2015).

Tabla 1. Genotipos de la planta madre testigo y de los cruzamientos utilizados

Muestra ¹	Genotipo Parental ²	
	Femenino	Masculino
C1	Q4117 (4x A)	H398 (2x S)
C2	Q4117 (4x A)	Q3775 (4x A)
T	Q4117 (4x A)	-----

¹ C1: cruzamiento 1, C2: cruzamiento 2 y T: Planta madre sin polinizar (control).

² Parentales clasificados de acuerdo al nivel de ploidía (2x = diploide, 4x = tetraploide) y modo de reproducción (S = sexual, A = apomíctico).

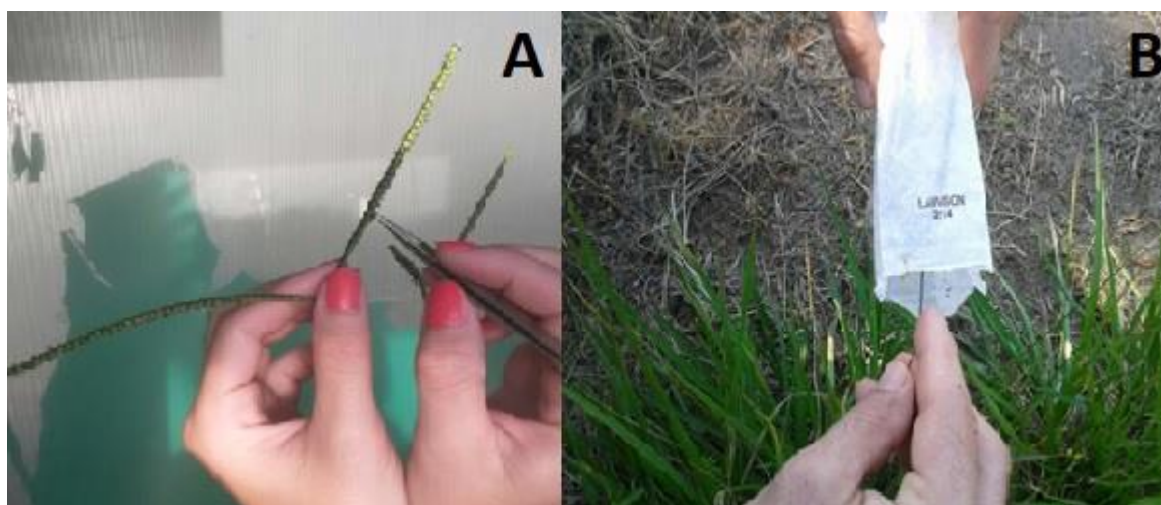


Figura 1. Cruzamiento entre distintos genotipos de *P. notatum*. A) Emasculación de la hembra. B) Polinización de la hembra emasculada.

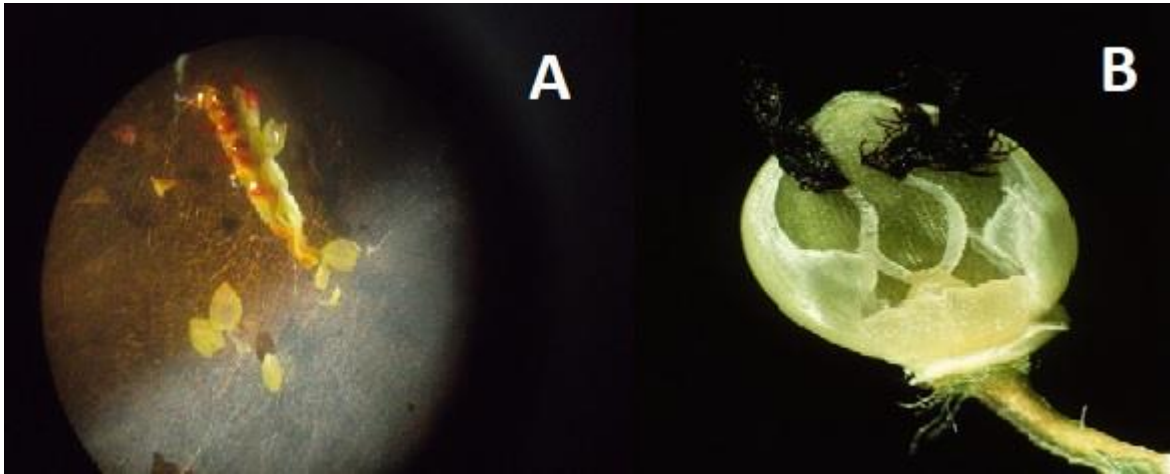


Figura 2. Aislamiento de ovarios bajo lupa: A) Espiga. B) Flor disectada.

2.3. Aislamiento de ARN, síntesis de cDNA y análisis por cDNA- AFLP

Se extrajo el ARN mediante kit “SV Total RNA Isolation Kit” (Promega) a partir de los 20 ovarios muestreados por cruzamiento y para la planta madre testigo sin polinizar. Se cuantificó su concentración y pureza por espectrofotometría y su integridad por medio de electroforesis en geles de agarosa al 1,5% m.v⁻¹.

Los perfiles de cDNA-AFLP fueron obtenidos a partir de la retrotranscripción del ARNm de las muestras Q4117 (T), Q4117xH398 (C1) y Q4117xQ3775 (C2), según el protocolo descrito por Vuylsteke *et al.* (2007) y Xiao *et al.* (2009) (Figura 3). La combinación de enzimas restricción utilizadas fue *CviAII/TaqI*, seleccionadas a través del programa AFLPinSilico (Stölting *et al.*, 2009). Las combinaciones de los pares de cebadores (Tabla 2) fueron utilizadas para los programas de PCR preselectiva y selectiva (Vuylsteke *et al.*, 2007). Cada muestra de cDNA fue pre-amplificada y luego diluida 1/3 con agua ultrapura y utilizada como templado en la amplificación selectiva, para la cual se utilizó un total de 16 combinaciones de cebadores. Las condiciones de reacción de pre-amplificación fueron las siguientes: 95°C, 5 min; 30 ciclos de 94°C, 30 s; 55°C, 30 s; 72°C, 1 min; 72°C, 10 min (extensión final) y para la reacción de amplificación selectiva: 95°C, 5min; 12 ciclos de 94°C, 30 s; 65°C (disminución de 0.7°C por cada ciclo), 30 s; 72°C, 1 min, y 24 ciclos de 94°C, 30 s; 55°C, 30 s; 72°C, 1 min; 72°C,10 min (extensión final) como se indicó en Felitti *et al.* (2015). Luego, se adicionó a cada muestra *Loading Buffer* (formamida 98% m.v⁻¹,

EDTA 10 mM pH 8.0, azul de bromofenol y xilen cianol), las muestras fueron desnaturalizadas a 94 °C por 5 min, sembradas y corridas en un gel de poliacrilamida al 6% m.v⁻¹. La corrida electroforética fue de aproximadamente 2:30h a 1200V usando TBE 0,5X (Tris-HCl 100 mM, ácido bórico 90 mM, EDTA1 mM pH 8.0) en la bandeja superior de la cuba y TBE 1X en la bandeja inferior de la cuba. Las bandas obtenidas fueron detectadas mediante tinción con AgNO₃. Se realizaron réplicas técnicas para determinar la reproducibilidad de la técnica. Las réplicas biológicas de las muestras utilizadas y la validación de la técnica por PCR en Tiempo Real fue reportada en Felitti *et al.* (2015), en donde se utilizó *β-tubulina* como gen de referencia para analizar los niveles de expresión en ovarios de *P. notatum* (Pfaffl *et al.*, 2004; Felitti *et al.*, 2015).

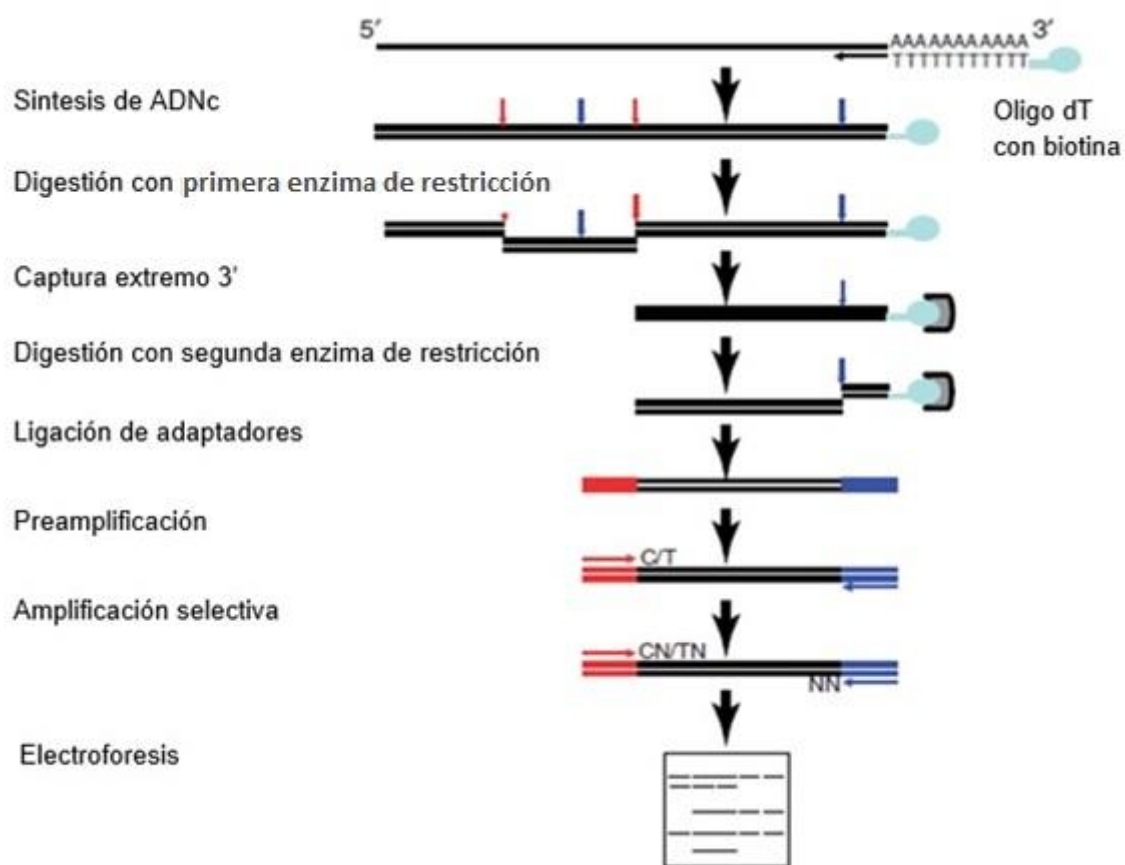


Figura 3. Esquema de la técnica de cDNA-AFLP (extraído de Vuylsteke *et al.*, 2007).

Tabla 2. Pares de cebadores usados para la PCR preselectiva y selectiva (5´- 3´)

PCR Preselectiva	
CviAII	TaqI
CTCGTAGACTGCGTACCAT	GACGATGAGTCCTGACCGA
PCR Selectiva	
CviAII	TaqI
GACTGCGTACCATGA	GATGAGTCCTGACCGAA
GACTGCGTACCATGC	GATGAGTCCTGACCGAC
GACTGCGTACCATGG	GATGAGTCCTGACCGAG
GACTGCGTACCATGT	GATGAGTCCTGACCGAT

2.4. Análisis del patrón de expresión génica en geles de poliacrilamida

En plantas apomíticas de *P. notatum* el embrión desarrolla por partenogénesis (embrión clonal), mientras que el endospermo desarrolla luego de la fertilización de los núcleos polares (endospermo híbrido) (Quarin, 1999; Martinez *et al.*, 2003). Por lo cual, para el análisis de la expresión diferencial de genes para el efecto xenia, se consideró como de origen materno aquellos fragmentos derivados de transcritos (TDFs) presentes de manera simultánea en T, C1 y C2. Los TDFs presentes en C1 y C2 fueron analizados como efecto de la interacción entre el embrión clonal y el endospermo híbrido y aquellos TDFs únicos para C1 o C2 fueron considerados como efecto del genotipo del polen (xenia) en el endospermo. Los TDFs fueron considerados diferencialmente expresados (DETDFs) cuando diferían en la presencia/ausencia de las bandas entre los cruzamientos (C1 y C2) y la planta madre testigo (T).

2.5. Aislamiento, secuenciación de los DETDFs y análisis bioinformático

Los DETDFs considerados como efecto paterno (o efecto xenia) fueron aislados, re-amplificados y enviados a secuenciar a MacroGen Inc. (Corea). Aquellas bandas únicas para cada uno de los cruzamientos analizados (C1 o C2) fueron hidratadas con 10µl de agua destilada, cortadas del gel de poliacrilamida con un bisturí e incubadas en 30µl de buffer de elución (NH₄Ac 0,5 M y EDTA 1 mM pH 8,0) con agitación ocasional por 4 h a 37 °C. Luego, cada banda de interés

fue re-amplificada por PCR utilizando 1µl de la muestra eluída como templado con las mismas condiciones de ciclado descritas para la reacción de amplificación selectiva. Se chequearon los productos obtenidos en las re-amplificaciones en geles de agarosa al 2% m.v⁻¹ teñidos con Syber Safe (Invitrogen), y se incluyó un marcador de peso molecular (100 bp Quick-load, New England Biolabs). Las bandas que presentaron el tamaño y calidad correcta fueron enviadas a secuencias a Macrogen Inc. (Corea). Las secuencias y cromatogramas provistos por Macrogen Inc. fueron analizados.

Se desarrolló un paquete para el Software libre R (<https://www.r-project.org/>), llamado CleanBSequences0.4.0, (<https://cran.r-project.org/web/packages/CleanBSequences/index.html>) a fin de eliminar los fragmentos de secuencia que correspondían a los cebadores selectivos CviAII y TaqI utilizados, de manera gratuita, simultánea, masiva y sin errores ni conexión a internet. Para realizar la limpieza de las secuencias de interés el paquete utiliza la función “TwoPrimerRemove” a fin de alinear los archivos fasta que contienen por un lado las secuencias a limpiar y por el otro las secuencias de los cebadores CviaAII y TaqI, generando luego, un nuevo archivo fasta con todas las secuencias limpias o curadas. Únicamente las secuencias con alta calidad fueron analizadas usando parámetros de mejor similitud para inferir las funciones proteicas. El análisis de similitud fue realizado usando el programa BLAST 2.2.25 del sitio NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Los alineamientos fueron limitados a plantas (Taxa: 3193). Se realizó BLASTn contra la base de datos de secuencias expresadas (ESTs) y en donde los mejores ESTs resultantes fueron alineados a la base de datos: secuencias de proteínas no redundantes (nr), mediante un BLASTx. La similitud con el genoma de *Arabidopsis thaliana* fue llevada a cabo mediante el uso de la herramienta BLASTp 2.2.8 del sitio TAIR Arabidopsis Information Resource (<http://www.arabidopsis.org/Blast/>) (Figura 4).

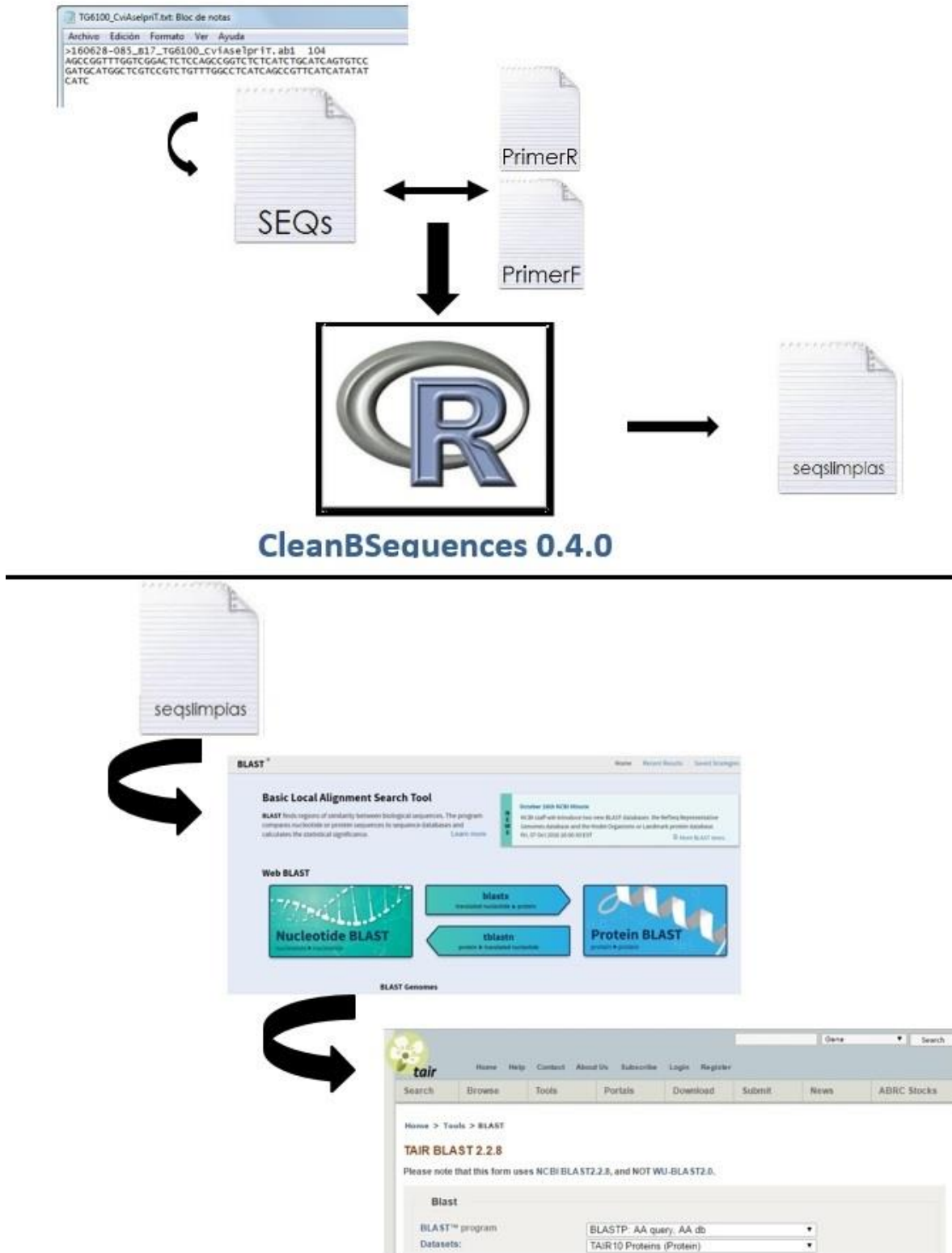


Figura 4. Esquema de la limpieza de secuencias y análisis funcional.

2.6. Observaciones fenotípicas del efecto xenia

Con el fin de caracterizar a nivel fenotípico el efecto xenia en semillas de *P. notatum*, se llevó a cabo la autopolinización y polinización abierta de los genotipos Q4064, Q4294, SV2893, Q3775 y Q3776 ($2n=4x=40$, apomíticos). Luego se recolectaron las semillas resultantes para comparar lo observado para cada genotipo y lo obtenido por autopolinización y polinización abierta: el set de semilla (porcentaje de semillas llenas con respecto al número total de semillas), largo y ancho de semilla, índice de forma (largo/ancho). Las mediciones se realizaron usando el software público ImageJ1.52e (<https://imagej.nih.gov/ij/>) y el análisis estadístico para cada variable constó de una prueba T-Student realizada en el software Infostat versión estudiantil (Di Rienzo *et al.*, 2016) a fin de comparar las medias muestrales de las variables analizadas.

3. RESULTADOS

Con el objetivo de caracterizar el efecto xenia a nivel del endospermo se llevó a cabo un estudio de la expresión génica diferencial entre cruzamientos que involucran diferentes genotipos paternos, utilizando el análisis de cDNA-AFLP. Se utilizaron dos genotipos de *P. notatum* como donantes de polen. En promedio, se obtuvieron aproximadamente 60 fragmentos por cada combinación cebadores, con pesos moleculares que variaban de 100 a 800 pb. La Figura 5 muestra una sección de un gel de poliacrilamida típico para el análisis de cDNA-AFLP.

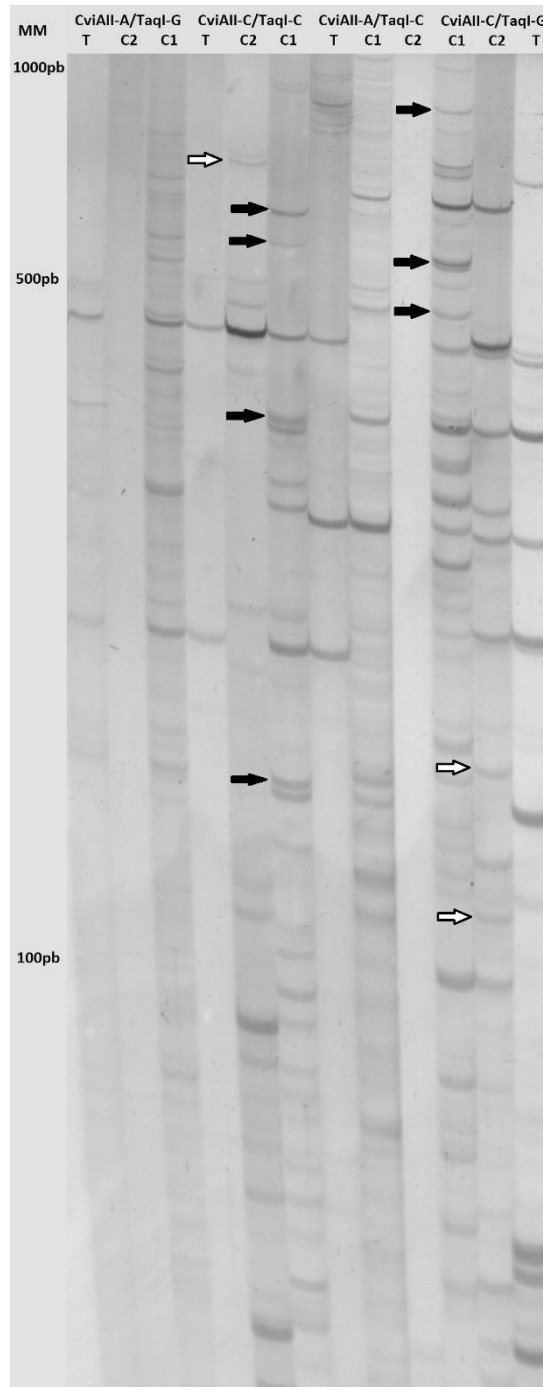


Figura 5. Gel de poliacrilamida al 6% m.v⁻¹. Se observa el patrón típico de bandas obtenido por la metodología cDNA-AFLP. Los TDFs resultaron de la amplificación selectiva de las combinaciones de cebadores (CviAII / TaqI): A/G, C/C, A/C y C/G (indicado arriba en la figura). Las calles del gel corresponden a la madre testigo sin polinizar (T) y a los dos cruzamientos: Cruzamiento 1 (C1): Q4117 (4x A) x H398 (2x S) y Cruzamiento 2 (C2): Q4117 (4x A) x Q3775 (4x A). Las combinaciones de cebadores A/G y A/C no mostraron productos de amplificación en el C2. En las combinaciones de cebadores C/C y C/G, las flechas negras muestran algunos ejemplos de DETDFs únicos para C1 y las flechas blancas ejemplos de DETDFs solo presentes en C2 (efecto xenia).

3.1. Expresión génica diferencial para el estudio del efecto xenia

A partir del análisis de 16 combinaciones de cebadores selectivos, 11 de las combinaciones presentaron productos de PCR. Las combinaciones de cebadores selectivos CviAII/TaqI: A/C, A/G y G/T fueron eliminadas del análisis ya que no presentaron productos de amplificación en la muestra C2 (Figura 5).

Del total de TDFs detectados, 39 fueron considerados como de origen materno, diez como efecto de la interacción entre el embrión clonal y el endospermo híbrido y 33 (28 correspondientes a C1 y cinco correspondientes a C2), fueron considerados como efecto xenia a nivel del endospermo híbrido. Estos últimos fueron aislados del gel y veinticuatro de los 33 DETDFs (23 para C1 y uno para C2) fueron correctamente re-amplificados, secuenciados y clasificados por función (Tabla 3, Figura 6). Las secuencias de los DETDFs obtenidos están disponibles en <https://www.ddbj.nig.ac.jp/index-e.html> (números de acceso LC409285 al LC409308).

Tabla 3. Resultados de las búsquedas BLAST de clones con similitud significativa de secuencia

Cruzamiento	DETDFs	EST con BLASTn	Proteína por BLASTx del mejor EST	TAIR BLASTp	Proceso
		ID; nombre; e-value	ID; nombre; e-value	ID; funciónGO; e-value	
C1	CC1	FL254388.1; 16661026 CERES-504 <i>Zea mays</i> cDNA clone; $4e^{-04}$	NP_001148104.1; uncharacterized protein LOC100281712 [<i>Zea mays</i>]; $5e^{-09}$	AT5G67230; Actividad Transferasa; $2e^{-60}$	Metabolismo
	CC3	CT857629; <i>Oryza sativa</i> Indica Group cDNA clone OSIGCFA222E11; $1e^{-01}$	PREDICTED: D-3-phosphoglycerate dehydrogenase 1, chloroplastic [<i>Oryza sativa</i> Japonica Group]	AT1G17745; Unión a proteínas; 0.0	Metabolismo
	CG1	GW883551.1; Ti_Con_121 Timothy drought stress Library <i>Phleum pratense</i> cDNA; $8e^{-02}$	n	N	Desconocido
	CG3	GR510905.1; ELPLPC2010F06-b1FSP_20010821 Perennial ryegrass 3 wk seedlings, cold-acclim. for 7 days at 4 deg. library <i>Lolium perenne</i> cDNA; $8e^{-01}$	XP_003558043.1; PREDICTED: dnaJ protein homolog [<i>Brachypodium distachyon</i>]; $6e^{-92}$	AT3G44110; Plegado de proteínas; e^{-160}	Síntesis de Proteínas
	CG4	n	-	-	Desconocido
	CG5	BE358268.1; DG1_27_A06.b2_A002 Dark Grown 1 <i>Sorghum bicolor</i> cDNA; $3e^{-73}$	KRH17766.1; hypothetical protein GLYMA_13G013900 [<i>Glycine max</i>]; $3e^{-7}$	AT1G15440; Unión a snoARN; $1e^{-02}$	Síntesis de Proteínas
	CG7	FL185963.1; 15193031 CERES-502 <i>Zea mays</i> cDNA clone; $5e^{-01}$	XP_008653125.1; PREDICTED: phosphatidylinositol N-acetylglucosaminyltransferase gpi3 subunit-like isoform X5 [<i>Zea mays</i>]; $9e^{-23}$	AT3G45100; Actividad Transferasa; e^{-122} .	Metabolismo
	CG8	n	-	-	Desconocido
	CG9	BI956709.1; HVcDNA0015 <i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i> cDNA clone; $1e^{-01}$	EMS61840.1; Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 24 [<i>Triticum urartu</i>]; $2e^{-26}$	AT4G30270; Actividad Hidrolasa; $4e^{-67}$	Metabolismo
	GA1	BG365200.1; HVcDNA0010 (20 DAP) <i>Hordeum vulgare</i>	ADW78607.1; heat shock protein 17 [<i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>spontaneum</i>]; $6e^{-33}$	AT5G59720; Respuesta al calor; $5e^{-39}$.	Enfermedad/ Defensa

	subsp. <i>vulgare</i> cDNA clone; $1e^{-02}$				
GA2	GW883549.1; Ti_Con_119 Timothy drought stress Library <i>Phleum pratense</i> cDNA; $7e^{-01}$	CAD30024.2; ferredoxin-NADP(H) oxidoreductase [<i>Triticum aestivum</i>]; $3e^{-25}$	AT1G20020; Union a poli U-ARN; e^{-148}	Enfermedad/ Defensa	
GA4	JZ515962.1; GG13 ovaries 3 hs after pollination <i>Paspalum notatum</i> cDNA; $2e^{-03}$	ACF84459.1; unknown [<i>Zea mays</i>]; $8e^{-12}$	AT2G47470; Actividad proteína disulfuro isomerasa; $5e^{-52}$	Síntesis de Proteínas	
GA6	JZ515962.1; GG13 ovaries 3 hs after pollination <i>Paspalum notatum</i> cDNA; $2e^{-01}$	ACF84459.1; unknown [<i>Zea mays</i>]; $8e^{-12}$	AT2G47470; Actividad proteína disulfuro isomerasa; $5e^{-52}$	Síntesis de Proteínas	
GG1	CI653564.1; CI653564 <i>Oryza sativa</i> Japonica Group cDNA clone; $6e^{-01}$	XP_015613138.1; PREDICTED: chlorophyllase-2, chloroplastic [<i>Oryza sativa</i> Japonica Group]; $1e^{-37}$	AT5G43860.1; Actividad Clorofilasa; $1e^{-63}$	Metabolismo	
GG2	HS557334.1; CCPN1718.g1 developing embryos (L) <i>Wrightia tinctoria</i> cDNA clone; $3e^{-02}$	KZV22603.1; COBW domain-containing protein 1 [<i>Dorcoceras hygrometricum</i>]; $3e^{-58}$	AT1G80480; Función molecular; $5e^{-57}$	Desconocido	
GG3	GR391418.1 ICC1882 dehydration stressed root cDNA library <i>Cicer arietinum</i> cDNA clone; $1e^{-22}$	ACL54967.1; MADS FLC-like protein 3 [<i>Cichorium intybus</i>]; $1e^{-05}$	AT5G10140; Union a ADN; $2e^{-56}$	Transcripción	
GG5	EV007516.1; BNAEN3GH <i>Brassica napus</i> cDNA; $4e^{-33}$	CDY10992.1; BnaA03g46510D [<i>Brassica napus</i>]; $6e^{-29}$	AT4G24190; Unión a ATP; 0.0	Síntesis de Proteínas	
TG1	n	-	-	Desconocido	
TG2	GE562482.1; CCHT20496 Niger Seed <i>Guizotia abyssinica</i> cDNA clone; $8e^{-01}$	XP_015866072.1; PREDICTED: protein ECERIFERUM 1-like [<i>Ziziphus jujuba</i>]; $8e^{-92}$	AT1G02205; Catabolismo del aldehído; 0.0	Metabolismo	
TG3	n	-	-	Desconocido	
TG4	EY748269.1; Sweet orange flower, greenhouse plant <i>Citrus sinensis</i> cDNA; $1e^{-01}$	KDO43347.1; hypothetical protein CISIN_1g0336531mg [<i>Citrus sinensis</i>]; $9e^{-24}$	AT5G43500; Función molecular; $7e^{-01}$	Regulación de la expresión génica	
TG5	n	-	-	Desconocido	
TG6	n	-	-	Desconocido	
C2	CG2	JZ515963.1; GG15 ovaries 3 hs after	XP_015639675.1; PREDICTED: probable	AT1G79620; ATP binding; 0.0	Señalización

		pollination <i>Paspalum notatum</i> cDNA; $7e^{-03}$	leucine-rich repeat receptor-like protein kinase At5g49770 [<i>Oryza sativa</i> Japonica Group]; $1e^{-06}$	
--	--	--	--	--

_ : sin alineamiento

n: similitud por debajo del umbral utilizado (e-value menor a 1).

Cruzamientos: Agrupamiento de DETDFs basado en los cruzamientos analizados (C1 y C2).

DETDFs: CC, CG, GA, y TG indican la combinación de cebadores selectivos.

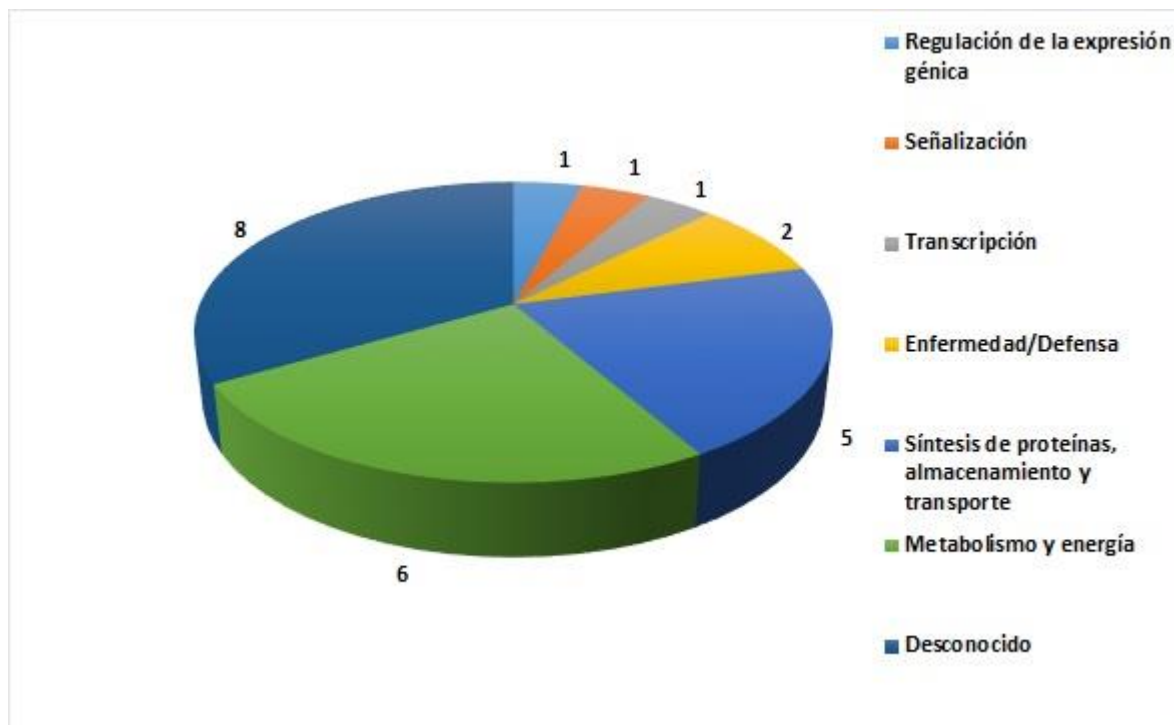


Figura 6. Categorías funcionales de las secuencias analizadas.

3.2. Análisis de las categorías funcionales

Los 24 DETDFs obtenidos fueron clasificados en siete categorías funcionales. La mayoría de los genes predichos a partir de las secuencias analizadas, estuvieron involucrados con el Metabolismo y energía (25%), la Síntesis de proteínas, almacenamiento y transporte (21%) y con Resistencia a enfermedad/ respuesta a estrés (8%). Una menor cantidad de DETDFs estuvieron asociados a las categorías Transcripción, Señalización y Regulación de la expresión génica (4% de cada categoría). El resto de las secuencias analizadas (34%) estuvieron incluidas en la categoría función Desconocida (Figura 6).

3.3. Análisis de secuencias

Los 24 DETDFs obtenidos se expresaron sólo en uno u otro cruzamiento analizado y no en el testigo, por lo cual se considera que los mismos podrían estar asociadas al efecto xenia en *P.*

notatum. Las secuencias CG7, GG5, GA1 y TG2 fueron caracterizadas en *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) y se determinó que las mismas están relacionadas con el efecto del polen en procesos metabólicos que ocurren durante la germinación y el desarrollo del tubo polínico y en la interacción polen-pistilo. Las secuencias CG5, GA4, GA6, GG5, CG3, TG2 y CC1 fueron relacionadas con el número y el tamaño de la semilla (Wang *et al.*, 2008a, Hajduch *et al.*, 2010, Bourdenx *et al.*, 2011, Missbach *et al.*, 2013, Voiniciuc *et al.*, 2015, Salas-Muñoz *et al.*, 2016).

Las secuencias CC3, GA4, GA6 y GA2 estuvieron asociadas a *loci* de *A. thaliana* que codifican para ARNm móviles, los cuales pueden desplazarse célula a célula en el mismo tejido o hacia tejidos cercanos o distantes vía floema (Thieme *et al.*, 2015). Los patrones de expresión de algunos DETDFs obtenidos de ovarios luego de 3h de ocurrida la polinización para los cruzamientos utilizados, fueron validados mediante el análisis por PCR en Tiempo Real y los perfiles de expresión fueron confirmados para cuatro de los cinco DETDFs seleccionados (Felitti *et al.*, 2015).

3.4. Efecto xenia a nivel fenotípico en *P. notatum*

Las comparaciones de medias para las variables analizadas entre la autopolinización y polinización abierta dentro de los genotipos Q4064, Q4294, SV2893, Q3775 y Q3776 en *P. notatum* se muestran en la Tabla 4. Los resultados muestran que se obtuvieron los mayores valores para el largo y ancho de semilla cuando la polinización fue abierta. Aunque no hubo diferencias significativas del índice de forma entre los tipos de polinización analizados. Solo para el genotipo Q4064 se evidenció un valor significativamente mayor en el set de semillas en la polinización abierta. En el genotipo Q4064 el valor medio de semillas llenas fue de 41 en autopolinización y de 123 en polinización abierta, mientras que para el genotipo Q4294 la media de semillas llenas fue de 50 para autopolinización y de 151 para polinización abierta (Figura 7).

Tabla 4. Análisis del efecto xenia en semillas obtenidas por autopolinización y por polinización abierta

		Set de semillas (%)	Largo de Semilla (cm)	Ancho de semilla (cm)	Índice de forma (L/A)
Q4064	AT	12,29	0,30	0,24	1,32
	PA	24,24	0,34	0,26	1,34
	p-valor	0,0292*	0,0067*	0,0193*	0,7287
Q4294	AT	20,27	0,32	0,23	1,39
	PA	32,25	0,38	0,25	1,45
	p-valor	0,1912	0,0069*	0,0174*	0,5066
SV2893	AT	22,07	0,28	0,20	1,46
	PA	26,26	0,33	0,24	1,43
	p-valor	0,6136	0,0006*	<0,0001*	0,7109
Q3775	AT	20,56	0,3	0,24	1,36
	PA	26,35	0,36	0,27	1,36
	p-valor	0,0923	0,0006*	0,0923	0,9982
Q3376	AT	26,69	0,31	0,22	1,48
	PA	29,9	0,37	0,26	0,145
	p-valor	0,2664	<0,0001*	0,0021*	0,7472

*Significancia a un $\alpha=0,05$. AT: autopolinización. PA: polinización abierta.

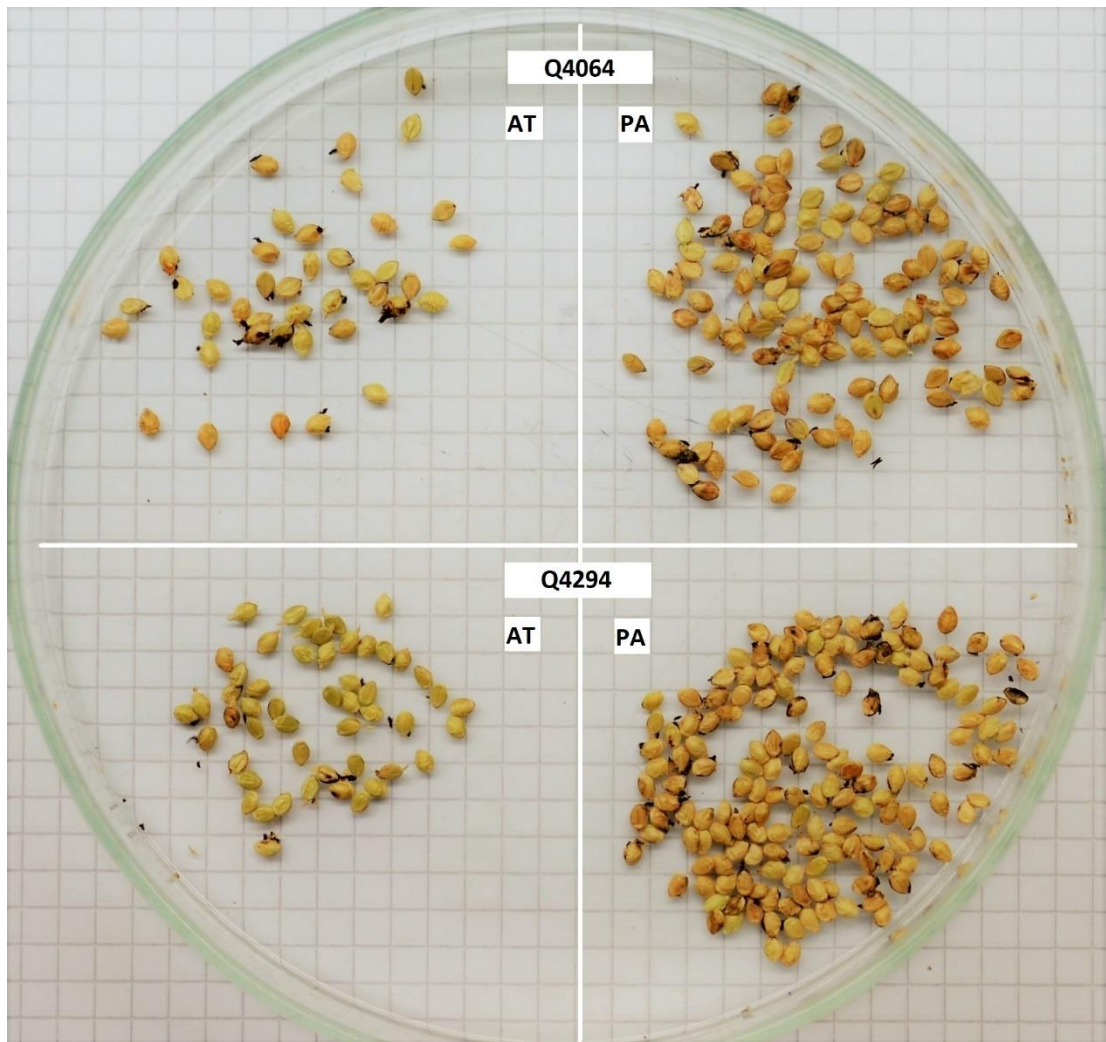


Figura 7. Media de semillas llenas resultantes de la autopolinización (AT) y polinización abierta (PA) de los genotipos Q4064 y Q4294.

4. DISCUSIÓN

Se han reportado numerosos estudios sobre el efecto xenia en las características de la semilla y fruto en especies de interés agronómico. Dejando en evidencia la importancia del efecto del genotipo del polen en el tamaño, color, características químicas y rendimiento de granos, además de sus implicancias en el mejoramiento genético vegetal y la producción de semillas (Bullant y Gallais, 1998; Dogterom *et al.*, 2000; Kaczmarek *et al.*, 2001; Weingartner *et al.*, 2002; Piotto *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013). Se ha reportado sólo un estudio de xenia a nivel molecular y en especies apomícticas (Wang *et al.*, 2013). Wang *et al.* (2013) reportaron que existe gran variabilidad fenotípica (largo, tamaño y peso) en la semilla y fruto de la nuez china (*Carya cathayensis*) dependiendo del genotipo de polen utilizado. Los autores encontraron que la progenie analizada con marcadores RAPD y AFLP muestra grandes diferencias con el progenitor masculino, pero no con el progenitor femenino. Debido al escaso avance en el conocimiento de xenia a nivel molecular, es fundamental proveer más información sobre este efecto a fin de poder generar nuevas herramientas que asistan al mejoramiento genético de cultivos en la búsqueda de un incremento en el rendimiento de granos y mayor calidad de frutos. Es por ello que en el presente trabajo se caracterizaron secuencias diferencialmente expresadas obtenidas de cada uno de los dos cruzamientos analizados cuando fueron comparados entre ellos y con una madre testigo sin polinizar. Diferentes genotipos de polen generaron patrones de expresión diferencial y se determinó que algunos DETDFs estuvieron asociados a mecanismos reproductivos, estando implicados en la doble fertilización y en el desarrollo de la semilla *per se*. Además, el efecto xenia a nivel molecular comienza en estadíos tempranos del desarrollo de la semilla de *P. notatum*, porque este efecto fue detectado luego de 3 horas de ocurrida la polinización.

4.1. Categorías funcionales

De las siete categorías funcionales, distintas a la categoría Desconocido, las que incluyeron un mayor número de secuencias fueron Metabolismo y energía (25%), Síntesis de proteínas, almacenamiento y transporte (21%), Resistencia a enfermedades/ respuesta a estrés (8%), y Transcripción, Señalización y Regulación de la expresión génica (4% de cada categoría). Las categorías funcionales obtenidas fueron similares a lo reportado por Hajduch *et al.* (2010) sobre la

expresión génica en semillas en desarrollo (de 5 a 13 días de ocurrida la floración) de *A. thaliana*. Estos autores encontraron: 1° Metabolismo, 2° Síntesis de proteínas, almacenamiento y transporte, 3° Resistencia a enfermedades/respuesta a estrés y 4° Señalización. Las diferencias en el orden de importancia pueden deberse a la metodología, al número de categorías funcionales (11) y al elevado número de transcriptos que evalúan los autores Hajdуч *et al.* (2010).

Los resultados de las categorías funcionales obtenidos en este trabajo son consistentes con los genes predichos envueltos en el desarrollo del endospermo en pastos (Brown y Lemmon 2007; Sabelli y Larkins 2009). Durante el desarrollo del endospermo en cereales, las tasas metabólicas y de síntesis de proteínas son elevadas, debido a que ambos procesos juegan un rol fundamental durante la activa división celular que ocurre en estadios tempranos del desarrollo de la semilla. Las proteínas de almacenamiento son las prolaminas y globulinas y se acumulan en cuerpos proteicos. Además, la acumulación de prolaminas es controlada a nivel transcripcional. Durante el desarrollo del endospermo hay un incremento del tamaño celular, de la diferenciación celular y de la acumulación de almidón. Estos procesos están asociados a altos requerimientos energéticos, sugiriendo que las fases de expansión celular y acumulación de almidón están asociadas a una alta actividad metabólica (Sabelli y Larkins 2009)

4.2. Efecto del genotipo del polen durante la germinación y desarrollo del tubo polínico y la interacción polen-pistilo

Las secuencias CG7, GG5, GA1 y TG2 estuvieron relacionadas a *loci* de *A. thaliana* asociados con la germinación, crecimiento del tubo polínico e interacción polen-pistilo. CG7 mostró alta similitud (e^{-122} BLASTp) con el *locus* AT3G45100 (nombre alternativo: SETH2) que codifica para una proteína involucrada en la germinación del grano de polen y el crecimiento del tubo polínico: glicosilfosfatidilinositol de anclaje (GPI anchor). Mutantes para SETH2 muestran un bloqueo en la transmisión masculina y en la función del polen, asociado a la deposición anormal de calosa, lo que sugiere el importante rol de GPI en la formación y metabolismo del tubo de polínico (Lalanne *et al.*, 2004). GG5 mostró alta similitud (0.0 BLASTp) con el *locus* AT4G24190 (nombre alternativo: SHD). Se demostró que su expresión génica es constante durante el período comprendido entre el estadio de polen maduro disecado hasta el estadio tubo polínico desarrollado

(Wang *et al.*, 2008b). La secuencia GA1 mostró alta similitud ($5e^{-39}$ BLASTp) con el *locus* AT5G59720, el cual codifica para una heat shock protein de bajo peso molecular (nombre alternativo: HSP18.2). Se demostró la expresión génica de este *locus* durante la germinación del grano de polen y en el crecimiento del tubo polínico (Wang *et al.*, 2008b). Además, se demostró que los niveles de expresión génica aumentan desde la condición polen maduro disecado hasta la condición polen maduro hidratado, en donde los niveles del transcrito se mantienen a nivel máximo constante hasta el desarrollo de tubos polínicos (Wang *et al.*, 2008b). Por último, TG2 presentó alta similitud (0.0 BLASTp) con el *locus* AT1G02205 (nombre alternativo: CER1), importante en la interacción polen-pistilo, y asociado a la estructura y composición de la cera del polen, por lo que, a su vez, está implicado en el desarrollo y fertilidad del grano de polen (Preuss *et al.*, 1993). Al generar mutantes en *A. thaliana* en los cuales se eliminaba la capa de cera del polen, se descubrió que el estigma puesto en contacto con este polen no exponía calosa y no se llevaba a cabo la fertilización (el polen no germina) interrumpiéndose así las interacciones polen pistilo. Estos resultados demostraron que la cera es necesaria para la fertilización (Aarts *et al.*, 1995).

4.3. Efecto del genotipo del polen sobre los procesos metabólicos que ocurren en el desarrollo y producción de semillas (efecto xenia)

Las secuencias CG5, GA4, GA6, GG5, CG3, TG2 y CC1 estuvieron relacionadas a *loci* de *A. thaliana* asociados con el desarrollo y producción de semillas. CG5 presentó alto grado de similitud ($1e^{-02}$ BLASTp) con el *locus* AT1G15440, el cual codifica para una proteína que actúa como cofactor en la biogénesis de la subunidad 40S del ribosoma (nombre alternativo: PWP2) (Missbach *et al.*, 2013). En estudios en los que se generaron mutantes heterocigotas en *A. thaliana* (PWP2+/-) observaron que las silicuas reducen un 25% su tamaño y las semillas fueron muy pequeñas o abortaron tempranamente, por lo cual el número de semillas se redujo en un 50% (Missbach *et al.*, 2013). Al realizar el análisis del transcriptoma en diferentes órganos y momentos del desarrollo, la mayor expresión de PWP2 fue encontrada en tejidos reproductivos y en aquellos donde existe una elevada tasa de división celular (semillas, silicuas, etc.) (Missbach *et al.*, 2013). La secuencia CG3, presentó alta similitud (e^{-160} BLASTp) con el *locus* AT3G44110 (nombre alternativo: AtDjA3). Estudios realizados en fenotipos mutantes y silvestres para este *locus*, demostraron que los fenotipos mutantes presentaron una disminución del 24% del tamaño y peso de 500 semillas con respecto al

wild type (Salas-Muñoz *et al.*, 2016). Además, se observó que la falta de transcripción del gen alteró la forma de la columela de las semillas, razón por la cual podría observarse la alteración de la forma y tamaño de la semilla. Es decir, el gen *AtDjA3* podría ser un factor importante en la formación de la semilla (Salas-Muñoz *et al.*, 2016). Por otro lado, la secuencia CC1 presentó alta similitud ($2e^{-60}$ BLASTp) con el *locus* AT5G67230 (nombre alternativo: IR14-L), el cual codifica para un miembro de la familia proteica glicosil transferasa 43 (GT43) y es esencial para la síntesis de xilano altamente ramificado en células epidérmicas del recubrimiento de las semillas. Es el más abundante en el mucílago de la semilla de *A. thaliana* y se requiere para mantener su arquitectura (Voiniciuc *et al.*, 2015). Estas ramas únicas parecen ser necesarias para la fijación de pectina a la superficie de la semilla, mientras que la columna vertebral de xilano mantendría la distribución de celulosa. En estudios de expresión para este *locus* se demostró su expresión en distintos momentos del desarrollo de la semilla para los estadíos analizados, aunque en distintos lugares y niveles según el estadío (Voiniciuc *et al.*, 2015).

Las secuencias GA4 y GA6 mostraron alta similitud ($5e^{-52}$ BLASTp) con el *locus* AT2G47470 (nombre alternativo: UNE5), el cual codifica para una proteína disulfuro isomerasa 2-1 (PDIL2-1) que está involucrada en la maduración de las proteínas de la membrana plasmática o de secreción (Wang *et al.*, 2008a). Mutantes para este gen de *A. thaliana* mostraron una reducción en la producción de semillas, silicuas pequeñas y reducido número de semillas. Además, se demostró que hay una interrupción en la guía del tubo polínico a nivel funicular y micropilar, alterando la orientación del tubo polínico (Wang *et al.*, 2008a). Aunque estudios anteriores atribuyen la función del gen al crecimiento correcto del tubo polínico (Wang *et al.*, 2008a; Boavida *et al.*, 2009), estudios de expresión génica durante el desarrollo de la semilla de *A. thaliana* han demostrado que hay un nivel máximo de expresión de este gen a los 5 días luego de ocurrida la floración (DAF) y luego los niveles de expresión van disminuyendo (Hajdуч *et al.*, 2010). Los resultados sugieren que este gen cumple una función más allá de guiar al tubo polínico hacia la micrópila del óvulo. Teniendo en cuenta que la fertilización de *A. thaliana* ocurre 3h luego de la floración (Mansfield y Briarty, 1991) y que entre los 5 y 13 DAF es el período de mayor almacenaje de aceites y proteínas, síntesis y deposición en la semilla de *A. thaliana* (Hajdуч *et al.*, 2010), es

probable que este gen tenga una importante función durante el desarrollo de la semilla de *A. thaliana*.

El gen *SHD* de *A. thaliana* asociado a la secuencia GG5 parece comportarse de manera similar al gen *UNE5* asociado a las secuencias GA4 y GA6, cuya función se ejerce en momentos previos a la fecundación (desarrollo del tubo polínico) y durante el desarrollo de la semilla en *A. thaliana* (Hajdich *et al.*, 2010). Por otro lado, el gen *CER1* asociado a la la secuencia TG2 mostró un comportamiento similar a los genes asociados a las secuencias GA4, GA6 y GG5, además de cumplir una importante función en la interacción polen-pistilo (Preuus *et al.*, 1993; Aarts *et al.*, 1995), sigue ejerciendo funciones durante el desarrollo de la semilla y fruto (Bourdenx *et al.*, 2011). Estudios previos han demostrado que las ceras no sólo están implicadas en los procesos de dehiscencia, sino que, además, la abundancia relativa de transcritos para *CER1* muestra los mayores niveles de expresión en flores y silicuas. Además, *CER1* está participando en la biosíntesis de ceras en flores y frutos (Bourdenx *et al.*, 2011).

4.4. Moléculas relacionadas al efecto xenia

Liu (2008) propuso dos hipótesis para el mecanismo de xenia, la primera plantea que el efecto estaría mediado por hormonas que son secretadas por el embrión y/o el endospermo y que el efecto de dichas hormonas dependería del parental masculino. La segunda hipótesis plantea que las moléculas que estarían mediando xenia serían ARNm móviles, los cuales serían liberados en el momento de la fecundación desde el tubo polínico y difundirían a los tejidos maternos de la semilla y fruto, produciendo variaciones fenotípicas. Se ha demostrado que los ARNm pueden moverse largas distancias vía floema o plasmodesmo y que, además, están involucrados en la señalización entre el parental masculino y femenino, lo cual afectaría las características de la semilla y/o fruto, causando cambios fenotípicos de los tejidos en desarrollo (Kim *et al.*, 2001; Kudo y Harada, 2007; Liu, 2008; Wang *et al.*, 2008a; Piotto *et al.*, 2013; Thieme *et al.*, 2015). Piotto *et al.* (2013) sustentan la hipótesis de los ARNm como molécula señal, ya que su difusión podría explicar la transmisión de la señal dentro del fruto del tomate y, por lo tanto, podrían estar implicados en la expresión observada de xenia. Wang *et al.* (2013) concluyen que al no encontrar diferencias genéticas (por marcadores AFLP y RAPD) entre el progenitor femenino y la progenie, pero sí entre la F1 con el

progenitor masculino, el efecto del polen no es a nivel genético, sino hormonal o por otro mecanismo.

En el presente trabajo se detectaron cuatro DETDFs (CC3, GA4, GA6 y GA2) según el genotipo de grano de polen utilizado (Tabla 3). Estos transcritos presentaron un grado de similitud significativo con *loci* de *A. thaliana* que codifican para ARNm móviles (Wang *et al.*, 2008a; Toujani *et al.*, 2013; Benstein *et al.*, 2013). De ellos, CC3 mostró alta similitud (0.0 BLASTp) con el *locus* AT1G17745, el cual codifica para una D-3-Fosfoglicerato Deshidrogenasa 2 (PGDH2), un miembro de la familia de isoenzimas PGDH. Los PGDH son componentes de la vía glucolítica de la fosfoserina (PS) y de la vía fosforilada de la biosíntesis de serina (PPBS), y juegan un rol importante en el desarrollo y el metabolismo de la planta. La vía PPBS tiene un rol esencial en la división celular activa de embriones y anteras (Toujani *et al.*, 2013). Además, una alteración en la expresión génica de la familia PGDH afecta el metabolismo primario de *A. thaliana*, por lo cual este ARNm móvil podría estar involucrado en el metabolismo primario y en el desarrollo de la semilla (Benstein *et al.*, 2013). GA4 y GA6 están asociadas con un *locus* de *A. thaliana* involucrado en la síntesis proteica. Mutantes para este *locus* mostraron una interferencia en la señalización entre el tubo polínico y la micrópila del óvulo durante la fecundación (Wang *et al.*, 2008a). Estos resultados son consistentes con la segunda hipótesis planteada por Liu (2008) y podrían agregarse a los resultados obtenidos por Piotto *et al.* (2013) que sustentaría la hipótesis de que los ARNm móviles estarían involucrados en el mecanismo de xenia funcionando como señal entre la parental masculino y femenino.

4.5. Efecto xenia en semillas obtenidas de la autopolinización y polinización abierta.

Los valores de largo y ancho de semilla obtenidas de la autopolinización y polinización abierta de plantas de genotipo Q4064, Q4294, SV2893, Q3775, Q3776 demuestran los efectos del genotipo del polen (xenia) a nivel fenotípico. Se obtuvieron mayores valores para estas variables en semillas resultantes de la polinización abierta en relación a las obtenidas por autopolinización (Figura 7). Por otro lado, no hubo diferencias significativas del índice de forma entre los tipos de polinización analizados, lo cual estaría indicando que las semillas aumentan de tamaño sin cambiar de forma. Sumado a lo anterior, se encontró que en el genotipo Q4064 el set de semillas fue significativamente

mayor en la polinización abierta. Los resultados obtenidos sobre xenia en semillas obtenidas de la autopolinización y polinización abierta de plantas de *P. notatum* son consistentes con las observaciones reportadas en cultivos como alfalfa, centeno (Kaczmarek *et al.*, 2001) y maíz (Bullant y Gallais, 1998; Weingartner *et al.*, 2002). Los diferentes genotipos de polen resultan en cambios medibles durante el desarrollo de la semilla, como el tamaño del grano (largo y ancho). Además, los resultados obtenidos en el presente trabajo evidencian una conexión entre los genes predichos envueltos en xenia (CG5, GA4, GA6, GG5, CG3, TG2 y CC1) y las diferencias fenotípicas en el set y tamaño de la semilla en *P. notatum*.

5. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el análisis de expresión génica diferencial en cruzamientos de *P. notatum* con distintos genotipos de polen luego de 3h de ocurrida la polinización, muestran evidencias del efecto xenia a nivel molecular en el endospermo híbrido. Además, el efecto del genotipo del polen en *P. notatum* podría ser uno de los factores que determina la expresión diferencial de genes relacionados con el número, tamaño y peso de las semillas. Por lo tanto, este efecto del genotipo del polen podría estar asociado con el rendimiento del grano. Además, cuatro de los 24 DETDF encontrados resultaron particularmente interesantes, ya que codificarían para ARNm móviles, los cuales estarían mediando las vías de señalización entre los tejidos maternos y paternos. Estos resultados presentan evidencia de que estas moléculas de ARNm móviles podrían ser las señales involucradas en el efecto xenia a nivel del endospermo en la especie en estudio. Dada la importancia del genotipo del polen en el mejoramiento genético de especies de interés agronómico como maíz, alfalfa, centeno, tomate y arándano, consideramos que los resultados obtenidos en este trabajo de tesis serían una de las primeras contribuciones a la descripción de xenia en el endospermo a nivel molecular. Además, se demostró el efecto xenia a nivel fenotípico en semillas de *P. notatum*.

CAPÍTULO II: ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DURANTE EL DESARROLLO DEL ENDOSPERMO 48h LUEGO DE OCURRIDA LA POLINIZACIÓN EN *P. notatum*

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Endospermo

El endospermo es el tejido de almacenamiento de las semillas y determina el valor cualitativo y cuantitativo de los cultivos de interés agronómico. Es una fuente importante de alimento para la nutrición humana y animal, y por lo tanto es de gran importancia económica (Sabelli y Larkins, 2009). Este tejido resulta de la fertilización de los núcleos polares de la célula central del saco embrionario por parte de una célula espermática, generándose así un núcleo triploide (3x) (Brown y Lemmon, 2007; Sabelli y Larkins, 2009). Además de nutrir al embrión durante su desarrollo y en el momento de la germinación de la semilla, tiene por función detectar las hibridaciones y poliploidias inadecuadas evitando así, el gasto energético en la producción de semillas inviables. El 70% de las plantas con flores tienen un endospermo 3x, lo que sugiere que un elevado nivel de ploidía es evolutivamente ventajoso (Brown y Lemmon, 2007; Nguyen *et al.*, 2007; Sabelli y Larkins, 2009; Bewley *et al.*, 2013).

1.2. Desarrollo del endospermo

El desarrollo del endospermo es una parte esencial en la formación de la semilla ya que la función más importante de este tejido es la de transferir nutrientes al embrión, además de que en él ocurre el *imprinting* de genes. El endospermo se desarrolla a una velocidad considerablemente mayor que el embrión, ya que durante su desarrollo temprano de tipo nuclear (observado en cereales, legumbres y *A. thaliana*, entre otras especies) no hay citocinesis ni formación de pared celular (Sabelli y Larkins, 2009).

En gramíneas se han descrito cuatro fases para el desarrollo del endospermo, luego de ocurrida la fertilización de los núcleos polares de la célula central del saco embrionario (Figura 8): 1º Fase sincitial: caracterizada por una elevada tasa mitótica. 2º Fase de celularización: comienza

cuando la tasa mitótica de la fase sincitial tiende a cero. Las etapas 1° y 2° forman parte del desarrollo temprano del endospermo, y se determinó que en maíz esta fase abarca entre los dos y seis días luego de ocurrida la polinización. 3° Fase de crecimiento y diferenciación: En esta fase se diferencian los distintos tipos celulares que formarán parte del endospermo: células de la aleurona, células de transferencia, células del endospermo amiláceo y las células que rodean al embrión. De esta manera, durante esta fase quedarán definidas las partes del endospermo, las cuales son:

- A- Capa de la aleurona: formada por 1 o más capas de células que rodean al endospermo. Tiene la función de protección contra la desecación, de sintetizar hormonas y, durante la imbibición de la semilla, activar la expresión génica de proteínas proteolíticas e hidrolíticas que digieren las paredes del endospermo movilizándolo el almidón y las proteínas almacenadas para que el embrión crezca.
- B- Células de Transferencia: tiene por función transportar metabolitos, como aminoácidos y carbohidratos, entre el sistema vascular materno y el resto del endospermo facilitando la absorción de estos metabolitos por el tejido endospermático.
- C- Endospermo Amiláceo: Almacena principalmente almidón. Por lo cual, para acumularlo, requiere mucho gasto energético en forma de moléculas de ATP. Su desarrollo está muy relacionado con un elevado metabolismo de carbohidratos, altos niveles de señalización celular y con la regulación de estados energéticos.
- D- Región que Rodea al Embrión: constituido por varias capas de células que rodean al embrión. En maíz se observó que luego de 12 días de ocurrida la polinización solo quedan vestigios de esta región. Las células de esta región son metabólicamente muy activas, ya que suministran azúcares al embrión, además de participar en la defensa contra patógenos y en la señalización entre el endospermo y el embrión.

4° Fase de Maduración: En esta fase ocurre la muerte celular programada, la dormición y desecación de la semilla (Brown y Lemmon, 2007; Nguyen *et al.*, 2007; Sabelli y Larkins, 2009; Bewley *et al.*, 2013).

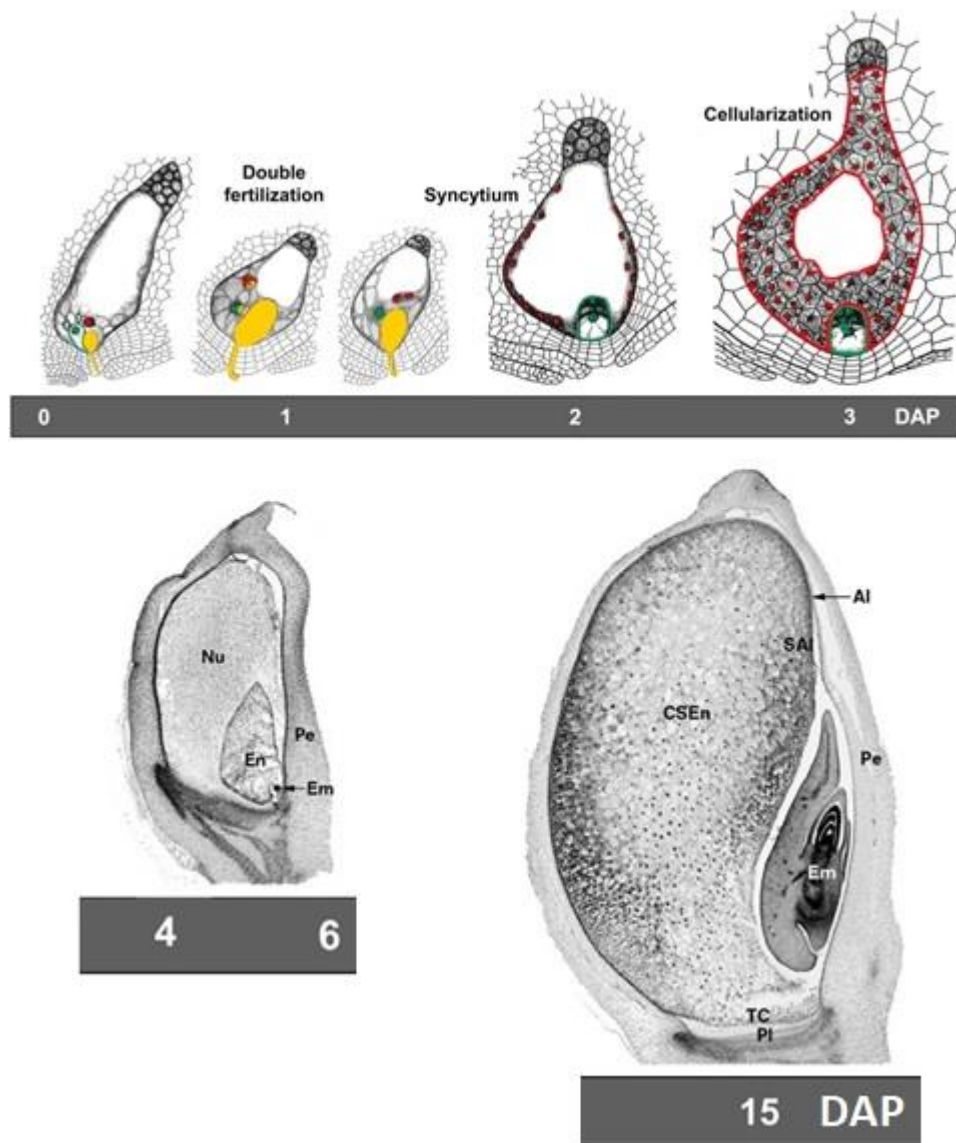


Figura 8. Desarrollo de endospermo en gramíneas. DAP: Días después de la polinización (Extraído y modificado de Sabelli y Larkins, 2009).

1.3. Importancia de entender el desarrollo del endospermo en *P. notatum*

En individuos de *P. notatum* con reproducción sexual o apomítica, se requiere de la fertilización de los núcleos polares de la célula central del saco embrionario para el normal desarrollo del endospermo (Quarin, 1999; Felitti *et al.*, 2015; Depetris *et al.*, 2018).

En la mayoría de las angiospermas el desarrollo del endospermo depende de las contribuciones genómicas materna:paterna (m:p), la cual según la teoría del Número de Balance Endospermico (NBE) debe mantener una relación 2:1. Pero en plantas apomícticas de *P. notatum* el endospermo se desarrolla independientemente de estas contribuciones (NBE insensibles) (Quarin, 1999; Felitti *et al.*, 2015; Depetris *et al.*, 2018). Por lo cual, entender el desarrollo del endospermo es fundamental para incorporar el carácter apomixis en aquellos cultivos de interés agronómico que requieren una contribución genómica 2m:1p (NBE sensibles) para el normal desarrollo del endospermo (Quarin, 1999; Felitti *et al.*, 2015; Depetris *et al.*, 2018).

Por otro lado, aunque se ha demostrado que existe, es poca la información con la que se cuenta sobre el mecanismo de comunicación, entre el endospermo y el tegumento de la semilla y entre el endospermo y el embrión (Berger *et al.*, 2006). Y en particular, en el caso de la especie en estudio. Se ha demostrado que existe comunicación entre el endospermo y el tegumento de la semilla en *A. thaliana*, en donde para mutantes *ttg2*, se evidenció una disminución de la elongación de las células del tegumento lo que llevó a una disminución en el crecimiento del endospermo (García *et al.*, 2005). A su vez, el desarrollo del endospermo es controlado por los genes *HAIKU* (*IKU*), y se evidenció que en mutantes *iku* el tamaño del endospermo era menor que en el genotipo silvestre, al igual que la elongación de las células del tegumento (García *et al.*, 2005). Por otro lado, también se demostró la comunicación entre el embrión y el endospermo en *A. thaliana* (Nowack *et al.*, 2006). El polen mutante en *Cdc2a*, sólo produce una célula espermática en lugar de 2, la cual fecunda específicamente a la ovocélula. El endospermo igualmente desarrolla por una señal positiva de la fertilización de la ovocélula (Nowack *et al.*, 2006).

En función de los antecedentes sobre la formación del endospermo y de su importancia en el desarrollo de la semilla, es clara la necesidad de un mayor conocimiento sobre el desarrollo del endospermo en individuos NBE sensibles e insensibles. Teniendo en cuenta el objetivo general de este trabajo de tesis y lo expuesto anteriormente, se desprenden los objetivos específicos de este capítulo de tesis:

- 1) Realizar cruzamientos entre distintos genotipos de *P. notatum* a fin de generar semillas con distintos niveles de ploidía y colectar ARN total 48h luego de ocurrida la polinización.

2) Realizar un análisis del transcriptoma 48h luego de ocurrida la polinización en ovarios provenientes de apomixis y sexualidad.

3) Identificar y aislar transcritos con expresión diferencial durante el desarrollo de cariopsis de *P. notatum*, con el fin de ser usados como genes candidatos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Material vegetal

Los genotipos utilizados, con el fin de generar semillas con distintos niveles de ploidía por las vías sexual y apomíctica fueron:

- **H398**: $2x=20$ Sexual, Empedrado, Corrientes, Argentina.
- **Q4084-8**: $2x=20$ Sexual, población diploide sexual, Cayastá, Santa Fe, Argentina.
- **Q4117**: $4x=40$ Apomíctico, Río Grande do Sul, Brasil (Martínez *et al.*, 2001).
- **Q3775**: $4x=40$ Apomíctico, Tamaulipas, México (Martínez *et al.*, 2001).
- **Q4188**: $4x=40$ Sexual, híbrido proveniente del cruzamiento entre Q3664 ($4x$ sexual, Tifton, USA) x Q3853 (Capivarí, Rio Grande do Sul, Brasil) (Quarin *et al.*, 2003).
- **C4-4x**: $4x=40$ Sexual inducido mediante el tratamiento con colchicina de una planta proveniente de una población diploide sexual, Cayastá, Santa Fe, Argentina (Quarin *et al.*, 2001).

2.2. Cruzamientos

Se realizaron cruzamientos experimentales a fin de generar semillas con distintos niveles de ploidía predichos para el endospermo (Quarin, 1999; Felitti *et al.*, 2015; Depetris *et al.*, 2018), por las vías sexual y apomíctica (Tabla 5). Los cruzamientos fueron llevados a cabo en el Instituto de Botánica de Noreste (IBONE), Corrientes. En la fase de floración se realizó la castración de las hembras, eliminando las anteras inmediatamente después de la antesis, en cámara húmeda (Burton, 1948). El polen de las plantas utilizadas como progenitor masculino se recolectó introduciendo las inflorescencias en un sobre de papel sulfito. Finalmente, este polen fue utilizado para polinizar las inflorescencias emasculadas, introduciendo dichas inflorescencias dentro del sobre que contenía el polen (Figura 1).

Para poder analizar en *P. notatum* el desarrollo del endospermo en semillas con distintos niveles de ploidía generadas por las vías sexual y apomíctica, se aislaron ovarios de flores mediante pinzas y bajo la lupa, luego de 48h de ocurrida la polinización. Este momento, es previo al colapso postcigótico (96h LOP) en *Paspalum* descrito por Norrmann *et al.* (1994). Se muestrearon 20 ovarios para cada cruzamiento, los cuales fueron congelados inmediatamente en nitrógeno líquido (Felitti *et al.*, 2015).

Tabla 5. Cruzamientos entre genotipos de *P. notatum*.

Progenitor femenino ^a	Polinizador ^a	Ploidía del embrión ^b	Ploidía del endospermo ^b	Relación m:p asumida en el endospermo
Q4117 (4x A)	H398 (2x S) ^c	4x (2n+0)	9x (2n+2n+n)	8:1
	Q3775 (4x A) ^c	4x (2n+0)	10x (2n+2n+n)	4:1
Q4188 (4x S)	H398 (2x S) ^d	3x (n+n)	5x (n+n+n)	4:1
	Q3775 (4x A) ^c	4x (n+n)	6x (n+n+n)	2:1
C4-4x (4x S)	Q4084-8 (2x S) ^d	3x (n+n)	5x (n+n+n)	4:1

^aLos progenitores están clasificados según sus niveles de ploidía (2x = diploide, 4x = tetraploide) y también por su modo reproductivo (S = sexual, A = apomíctico).

^bNiveles de ploidía esperados.

^cCruzamientos que producen semillas.

^dCruzamientos que no producen semillas.

2.3. Aislamiento de ARN, síntesis de cDNA y análisis de cDNA- AFLP

Se llevó a cabo tal como se describe en el capítulo I, apartado 2.3., pág. 21

2.4. Análisis del patrón de expresión génica en geles de poliacrilamida

Para el análisis del perfil de expresión diferencial de genes para el desarrollo del endospermo 48h luego de ocurrida la polinización, se consideró en el patrón de expresión génica: la presencia/ausencia de bandas y si provenían de cruzamientos con hembras sexuales (NBE sensible), hembras apomícticas (NBE insensible) o de ambos. Además se consideró si se esperaba o no la producción de semilla, para lo que se tuvo en cuenta el modo de reproducción de la planta utilizada como hembra y la relación m:p esperada en el endospermo.

2.5. Aislamiento, secuenciación de los DETDFs y análisis bioinformático

Se llevó a cabo tal como se describe en el capítulo I, apartado 2.5., pág. 23

3. RESULTADOS

Con el objetivo de caracterizar el desarrollo del endospermo luego de 48h de ocurrida la polinización en semillas con distintos niveles de ploidía originadas por las vías sexual y apomítica, se llevó a cabo un estudio de expresión génica diferencial entre cruzamientos que involucran diferentes genotipos maternos y paternos, mediante la técnica de cDNA-AFLP. En promedio, se obtuvieron aproximadamente 60 fragmentos por cada combinación cebadores, con pesos moleculares que variaban de 100 a 800 pb. La Figura 9 muestra una sección de un gel de poliacrilamida típico para el análisis de cDNA-AFLP.

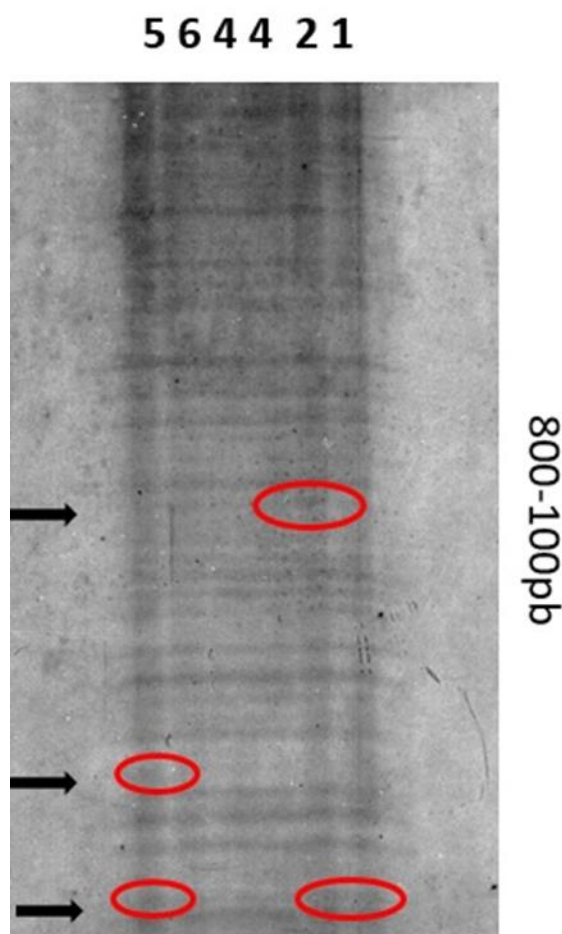


Figura 9. Gel de poliacrilamida al 6% m.v⁻¹. La combinación de cebadores selectivos utilizados fue CviAII-T/ TaqI-T. Código de cruzamiento: 5: Q4188 (4x S) x Q3775 (4x A). 6: C4-4x (4x S) x Q4084-8 (2x S). 4: Q4188 (4x S) x H398 (2x S). 2: Q4117 (4x A) x Q3775 (4x A) y 1: Q4117 (4x A) x H398 (2x S).

3.1. Expresión génica diferencial para el desarrollo de endospermo luego de 48h de ocurrida la polinización

A partir del análisis de 16 combinaciones de cebadores selectivos utilizados, se detectaron un total de 66 DETDFs (Tabla 6), los cuales se agruparon y categorizaron de acuerdo al patrón de expresión: si provenían de cruzamientos con hembras sexuales (NBE sensible), hembras apomícticas (NBE insensible) o de ambos. Fueron clasificados en relación a la producción de semilla en diferentes clases teniendo en cuenta el modo de reproducción de la planta utilizada como hembra, su relación m:p esperada en el endospermo y el total en cada clase (Tabla 6). 39 de los 66 DETDFs aislados a partir del gel de poliacrilamida fueron correctamente re-amplificados, secuenciados y clasificados por función (Tabla 7, Figura 10). Las secuencias de los DETDFs obtenidos están disponibles en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> (números de acceso JZ979091 al JZ979108). De los 39 DETDFs analizados en cuanto a su función, 14 DETDFs se encontraron en aquellos cruzamientos para los que se espera la producción de semillas, de ellos cuatro pertenecieron a la clase D (AC1, AC2, AC3, GG1), dos a la clase G (GG2, GG3) y ocho a la clase H (AC8, AA2, AA3, AA4, AA6, AA7, AA8, AA11) (Tabla 6). Dos de los DETDFs obtenidos pertenecieron a la clase E (AC4 y AC5), es decir, a cruzamientos para los que no se espera la producción de semillas. Además, se determinó que la mayoría (32/46) de los DETDFs obtenidos se corresponden con cruzamientos para los cuales se espera la producción de semillas (Tabla 6).

Tabla 6. Clases de DETDFs

Análisis endospermo 48h	Producción de semillas	Clase	m:p				N° de DETDFs
			H4xA		H4xS		
			M4xA	M2xS	M2xS	M4xA	
		4:1	8:1	4:1	2:1		
Hembra sexual	NO	A			X		12
(NBE sensible)	SI	B				X	4
Hembra apomítica (NBE insensible)	SI	C	X	X			10
Hembra Apomítica y sexual	Si/Si/Si	D	X	X		X	4
	No/No	E			X		2
	Si/No/No	F	X		X		13
	Si/Si	G		X		X	2
	Si/Si	H	X			X	12
	Si/No	I	X		X		3
	Si/Si/Si/No/No	J	X	X	X	X	4
Total							66

Tabla 7. Resultados de las búsquedas BLAST de clones con similitud significativa de secuencia

DETDFs	Clase	EST con BLASTn	Proteína por BLASTx del mejor EST	TAIR BLASTx	Proceso
		ID; Nombre; e-value	ID; Nombre; e-value	ID; Función GO; e-value	
GA3	C	HO776090.1; vsu-ars_001123_LI10B00508 VSU-ARS-L10 <i>Phaseolus acutifolius</i> cDNA; 1e ⁻⁰⁹	KRH17766.1; hypothetical protein; GLYMA_13G013900 [<i>Glycine max</i>]; 5e ⁻⁵⁰	AT1G15440; Unión a Proteína; 1,1e ⁻⁰²	Síntesis de proteínas
GA4	C	BF263146.1; Hordeum vulgare seedling green leaf EST library <i>Hordeum vulgare</i> subsp. vulgare cDNA clone; 8e ⁻⁰⁴	EMS65358.1; hypothetical protein TRIUR3_33397 [<i>Triticum urartu</i>]; 2e ⁻³²	AT2G15220; Proteína de secreción; 4e ⁻⁴³	Proteínas de transporte y almacenamiento
GA5	C	BF260339.2; HVSMEf0021L19f <i>Hordeum vulgare</i> subsp. vulgare cDNA clone; 9e ⁻⁰³	CAA10664.1; beta-tubulin 2 [<i>Hordeum vulgare</i> subsp. vulgare]; 8e ⁻⁶⁰	AT5G12250; Actividad GTPasa; e ⁻¹⁷⁵	Estructura celular
GA6	C	DB996156.1 Bg05 Burma mangrove cDNA library <i>Bruguiera gymnorhiza</i> cDNA clone; 3e ⁻⁰⁶	n	-	Desconocido
GA1	A	FL806617.1; Panicum virgatum late flowering buds + seed development (H) <i>Panicum virgatum</i> cDNA clone; 5,6e ⁻⁰²	XP_004957139.1; PREDICTED: BURP domain-containing protein 15-like [<i>Setaria italica</i>]; 1e ⁻⁴²	n	Desconocido
GA2	A	EY274919.1; BG1 Malted Morex <i>Hordeum vulgare</i> subsp. vulgare cDNA; 2e ⁻⁰⁴	XP_013442961.1; hypothetical protein MTR_0055s0030 [<i>Medicago truncatula</i>]; 1e ⁻⁵⁵	n	Desconocido
GA7	A	GR999328.1; ransId-215195 CACATN1 <i>Coffea arabica</i> cDNA clone; 2,3 e ⁻⁰²	CDP06495.1; unnamed protein product [<i>Coffea canephora</i>]; 1e ⁻¹⁶⁹	AT3G08940; Unión a Clorofila; e ⁻¹²⁴	Metabolismo
GA8	A	GE136847.1; 454GmaGlobSeed879495 Soybean Seeds Containing Globular-Stage Embryos <i>Glycine max</i> cDNA; 7,9e ⁻⁰¹	KHN36936.1; Putative rhamnose biosynthetic enzyme 1 [<i>Glycine max</i>]; 6e ⁻⁵²	AT1G53500; Actividad UDP-4-keto-6-deoxi-glucosa-3,5-epimerasa; 0.0	Metabolismo
GA9	A	AW668101.1; GA_Ea0012L05 <i>Gossypium arboreum</i> 7-10 dpa fiber library <i>Gossypium arboreum</i> cDNA clone; 6e ⁻⁰⁵	XP_012490289.1; PREDICTED: putative pentatricopeptide repeat-containing protein At1g02420 [<i>Gossypium raimondii</i>]; 5e ⁻⁵¹	AT1G02420; Desconocido; 0.0	Desconocido
GA10	A	CD447312.1; E04912707F09.g Endosperm_1 <i>Zea mays</i> cDNA; 1e ⁻¹¹	NP_001106011.1; Select seq ref[NP_001106011.1] zein-alpha 19D1 precursor [<i>Zea mays</i>]; 1e ⁻¹²	n	Desconocido

GC1	C	FY257746.1; <i>Cryptomeria japonica</i> needle spring growth of a 6-year-old tree <i>Cryptomeria japonica</i> cDNA clone; 1,9e ⁻⁰²	PIA30233.1; hypothetical protein AQUCO_05700144v1 [<i>Aquilegia coerulea</i>]; 2e ⁻⁶⁶	AT4G20410; Transporte; 6e ⁻⁷²	Transporte intracelular
AC1	D	JZ515900.1; AC2 ovaries 3 hs after pollination <i>Paspalum notatum</i> cDNA; 3e ⁻²⁹	AAK62411.1; casein kinase II alpha subunit [<i>Arabidopsis thaliana</i>]; 7e ⁻¹⁹	AT5G67380; Actividad quinasa; e ⁻¹¹⁰	Señalización
AC2	D	CB085678.1; hg14c09.g1 Hedyotis centranthoides flower - Stage 2 (NYBG) <i>Kadua centranthoides</i> cDNA clone; 3,3e ⁻⁰²	PIN21347.1; hypothetical protein CDL12_05951 [<i>Handroanthus impetiginosus</i>]; 1e ⁻⁴⁵	AT1G74520; Desconocido; 8e ⁻³⁵	Respuesta a estrés/Resistencia a enfermedad
AC3	D	FD941153.1; RS1GX74TF RS1(AR) <i>Raphanus sativus</i> var. oleiformis cDNA 1,1e ⁻⁰²	XP_018442344.1; PREDICTED: histone deacetylase HDT2-like [<i>Raphanus sativus</i>]; 2e ⁻⁶²	AT5G22650; Actividad histona desacetilasa; 2e ⁻²⁸	Transcripción
AC4	E	JZ515900.1; AC2 ovaries 3 hs after pollination <i>Paspalum notatum</i> cDNA; 9e ⁻²³	AAK62411.1; casein kinase II alpha subunit [<i>Arabidopsis thaliana</i>]; 7e ⁻¹⁹	AT5G67380; Actividad quinasa; e ⁻¹¹⁰	Señalización
AC5	E	JZ515900.1; AC2 ovaries 3 hs after pollination <i>Paspalum notatum</i> cDNA; 6e ⁻²¹⁹	AAK62411.1; casein kinase II alpha subunit [<i>Arabidopsis thaliana</i>]; 7e ⁻¹⁹	AT5G67380; Actividad quinasa; e ⁻¹¹⁰	Señalización
GC3	C	CA399431.1; EL01N0319A05.g Endosperm_3 <i>Zea mays</i> cDNA; 3,3e ⁻⁰²	NP_001148735.1; uncharacterized protein LOC100282351 [<i>Zea mays</i>]; 9e ⁻⁴⁴	AT2G37190; Unión al zinc; 9e ⁻⁸²	Síntesis de proteínas
GC4	A	GO244915.1; OEAA-070810_Plate5o21.b1 cDNA library from Olive leaves y fruits <i>Olea europaea</i> cDNA; 1e ⁻⁰⁴	XP_022842474.1 serine/threonine-protein kinase PBL27-like [<i>Olea europaea</i> var. <i>sylvestris</i>]; 5e ⁻⁹⁸	AT5G18610; Actividad quinasa; 0.0	Señalización
GG1	D	EY658062.1; CS00-C1-100-132-B09-CT.F Sweet orange leaf, greenhouse plant <i>Citrus sinensis</i> cDNA; 3e ⁻⁰⁸	GAY56740; hypothetical protein CUMW_174170, partial [<i>Citrus unshiu</i>]; 2e ⁻⁴⁴	AT2G24260; Unión al ADN; 2e ⁻⁵⁷	Transcripción
GG2	G	EY747771.1; CS00-C5-003-048-G05-CT.F Sweet orange flower, greenhouse plant <i>Citrus sinensis</i> cDNA; 3,2e ⁻⁰²	AFK47985.1; unknown [<i>Lotus japonicus</i>]; 1e ⁻¹¹	AT2G37470; Unión al ADN; 8e ⁻⁴⁸	Transcripción
GG3	G	CO441708.1; MZCCL10035C10.g Maize Endosperm cDNA Library <i>Zea mays</i> cDNA; 3,1e ⁻⁰²	ACG31522.1; Select seq gb ACG31522.1 17.5 kDa class II heat shock protein [<i>Zea mays</i>]; 3e ⁻⁷³	AT5G12020; Plegado de proteínas; 1e ⁻³⁵	Síntesis de proteínas

GG4	A	DR958840.1; ZM_BFb0063D12.f ZM_BFb <i>Zea mays</i> cDNA; $8e^{-04}$	n	-	Desconocido
GG5	A	FL364156.1; 24457224 CERES-505 <i>Zea mays</i> cDNA clone 1613391; $6,9e^{-02}$	n	-	Desconocido
GG6	A	JG873047.1; UNQ108- P10.x1d-t UNQ (<i>Panicum virgatum</i> cv. Alamo-AP13) <i>Panicum virgatum</i> cDNA; $2e^{-03}$	NP_001136479.1; uncharacterized protein LOC100216593 [<i>Zea mays</i>]; $8e^{-26}$	AT5G27640; Unión a Proteínas; e^{-150}	Proteínas de transporte y almacenamiento
GG7	A	JG946532.1; UNQ107- E05.x1d-t UNQ (<i>Panicum virgatum</i> cv. Alamo-AP13) <i>Panicum virgatum</i> cDNA; $3e^{-05}$	AQK71444.1; 1,4-alpha- glucan-branching enzyme 2, chloroplastic/amyloplastic [<i>Zea mays</i>]; $4e^{-131}$	AT5G03650; Actividad 1,4- alfa-glucano; 0.0	Metabolismo
GG8	A	HO041044.1; ocpsga0_0424_H03.ab1 Soybean immature seed full- length-enriched cDNA library <i>Glycine max</i> cDNA; $5,6e^{-02}$	KRH74203.1; hypothetical protein GLYMA_01G005600 [<i>Glycine max</i>]; $8e^{-52}$	AT4G29240; Desconocido; e^{-123}	Desconocido
AC8	H	FL220928.1; 2016995 CERES-196 <i>Zea mays</i> cDNA clone 419368; $7,3e^{-01}$	ACF81437.1; unknown [<i>Zea mays</i>]; $1e^{-76}$	AT3G51030; Unión a Proteínas; $2e^{-33}$	Metabolismo
AA2	H	CJ949480; Y. Ogihara unpublished cDNA library; $6,2e^{-01}$	EMS63026.1: Select seq EMS63026.1 hypothetical protein TRIUR3_12257 [<i>Triticum urartu</i>]; $2e^{-101}$	n	Desconocido
AA3	H	CJ963282.1; Y. Ogihara unpublished cDNA library; $1,9e^{-01}$	XP_020177071.1; uncharacterized protein LOC109762608 [<i>Aegilops tauschii</i> subsp. <i>tauschii</i>]; $7e^{-100}$	AT1G10585; unión de factor de transcripción del ADN; $2e^{-09}$	Transcripción
AA4	H	JZ515893.1; AA6 ovaries 3 hs after pollination <i>Paspalum notatum</i> cDNA; $1,1e^{-02}$	PAN07877.1; hypothetical protein PAHAL_A03141 [<i>Panicum hallii</i>]; $1e^{-12}$	AT5G55830; Unión al ATP; $4e^{-98}$	Respuesta a estrés/Resistencia a enfermedad
AA6	H	FK978195.1; 2758608 CERES-227 <i>Zea mays</i> cDNA clone; $3,7e^{-01}$	AQK38824.1; Protein DETOXIFICATION 21 [<i>Zea mays</i>]; $1e^{-30}$	AT1G33110; Actividad antiporter; e^{-128}	Transporte Intracelular
AA7	H	JZ515891.1; AA1 ovaries 3 hs after pollination <i>Paspalum notatum</i> cDNA; $2e^{-02}$	ACG35856.1; CER1 [<i>Zea mays</i>] $4e^{-29}$	AT1G02205; Actividad aldehído descarboxilasa; 0.0	Metabolismo

AA8	H	GR316807.1; CCOO3260.g1 CCOO <i>Avena barbata</i> leaf, grown under ambient rainfall (H) <i>Avena barbata</i> cDNA clone; $3,9 \times 10^{-01}$	XP_020177938.1; cytochrome P450 81D11- like [<i>Aegilops tauschii</i> subsp. Tauschii]; 4×10^{-139}	AT4G37340; Unión al Oxígeno; 1×10^{-98}	Metabolismo
AA11	H	GW883551.1; Ti_Con_121 Timothy drought stress Library <i>Phleum pratense</i> cDNA; 2×10^{-06}	n	-	Desconocido
GA11	I	FD493788.1; Ltu01b_111_B01_C012.g2 Liriodendron Flower Bud Library <i>Liriodendron tulipifera</i> cDNA clone; $8,8 \times 10^{-02}$	OVA16281.1; Select seq OVA16281.1 YjeF C- terminal domain [<i>Macleaya</i> <i>cordata</i>]; 7×10^{-120}	AT5G19150; Actividad ADP-dependente de NAD(P)H-hidrato dehidratasa; e^{-129}	Metabolismo
TA4	B	CX108251.1; BI148C22 A normalized whole-life-cycle cDNA library of rice <i>Oryza</i> <i>sativa</i> Indica Group cDNA clone; 3×10^{-03}	n	-	Desconocido
TA5	B	FG177597.1; AGN_RNC118x111f1.ab1 AGN_RNC <i>Nicotiana</i> <i>tabacum</i> cDNA; 3×10^{-04}	XP_022139274.1; alpha- galactosidase-like [<i>Momordica charantia</i>]; 2×10^{-59}	AT5G08370; Actividad alfagalactosidasa; e^{-179}	Metabolismo
TC2	J	FL922341.1; CCGO14217.g1 CCGO <i>Panicum virgatum</i> root (H) <i>Panicum virgatum</i> cDNA clone; 3×10^{-04}	PAN12062.1; hypothetical protein PAHAL_B02400 [<i>Panicum hallii</i>]; 5×10^{-100}	AT5G15080; Actividad quinasa; 0.0	Señalización
AA17	F	DY763058.1; 7S2 Transcript- derived fragments specifically found in SS2-2 <i>Glycine max</i> cDNA; $3,3 \times 10^{-02}$	KHN15783.1; Protein TIME FOR COFFEE [<i>Glycine</i> <i>max</i>]; 3×10^{-10}	AT3G22380; Desconocido; 4×10^{-97}	Metabolismo

_: sin alineamiento

n: similitud por debajo del umbral utilizado (e-value menor a 1).

3.2. Análisis de las categorías funcionales

Los 39 DETDFs obtenidos fueron clasificados en nueve categorías funcionales. La mayoría de los genes predichos a partir de las secuencias analizadas estuvieron involucrados con el Metabolismo (23%), Señalización (13%), Transcripción (10%), Síntesis de Proteínas (8%). Una menor cantidad de DETDFs estuvieron asociados a las categorías Respuesta a estrés/Resistencia a enfermedad, Proteínas de transporte y almacenamiento, Transporte intracelular (5% de cada categoría) y por último la categoría Estructura celular (3%). El resto de las secuencias analizadas (28%) estuvieron incluidas en la categoría función Desconocida (Figura 10).

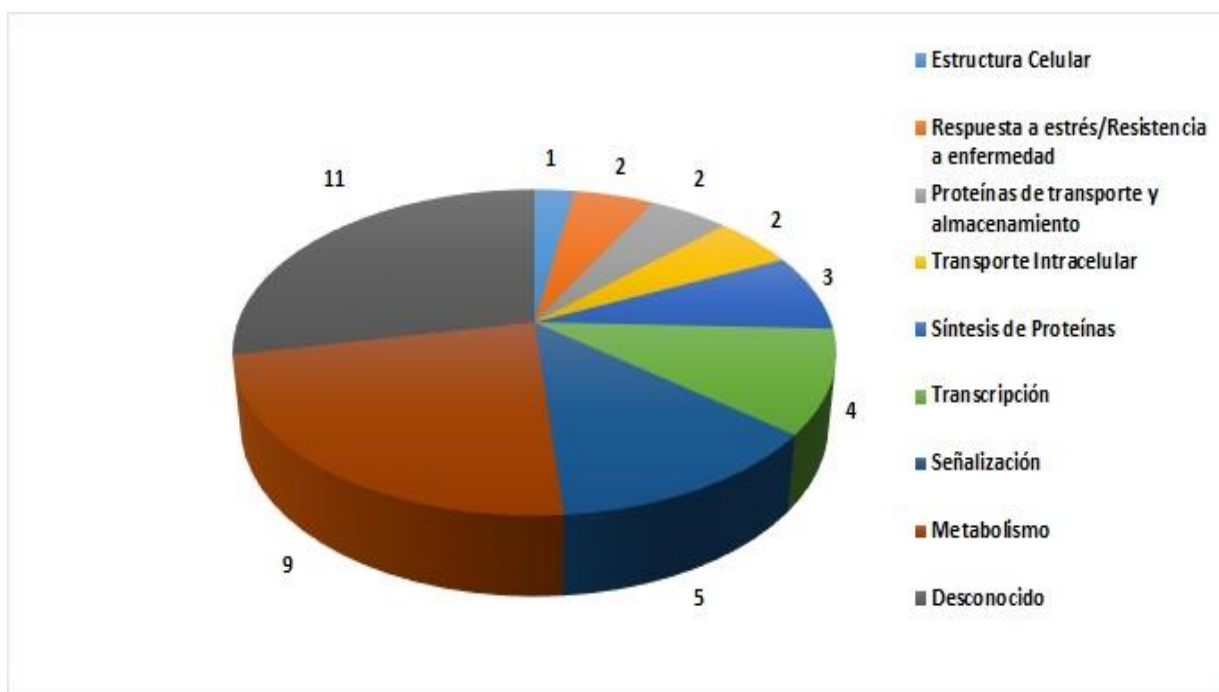


Figura 10. Categorías funcionales de las secuencias analizadas.

4. DISCUSIÓN

4.1. Categorías funcionales

Se determinó que la mayoría de los fragmentos derivados de transcritos de expresión diferencial obtenidos, distintos a la categoría Desconocido, se encontraron en la categoría funcional Metabolismo (23%), seguida por Señalización (13%). Estos resultados son semejantes a los encontrados a las 3h y 24h luego de ocurrida la polinización en *P. notatum* (Felitti *et al.*, 2015; Depetris *et al.*, 2018). El hecho de que el mayor porcentaje de DETDFs identificados pertenezcan a las categorías funcionales Metabolismo y Señalización es consistente con lo esperado para el desarrollo temprano de la semilla en pastos y cereales, ya que los requerimientos energéticos aumentan, además de que las señales extracelulares estarían desencadenando respuestas que llevan o no a la generación de semillas (Brown y Lemmon, 2007; Nguyen *et al.*, 2007; Sabelli y Larkins, 2009; Depetris *et al.*, 2018).

4.2. Secuencias relacionadas con el desarrollo del endospermo durante la formación de la semilla

Las secuencias AC1, AC2, AC3, AC4, AC5, GG1y GG3 aportaron información relevante sobre el desarrollo del endospermo de la semilla en *P. notatum*. AC1, AC4 y AC5 mostraron una alta similitud con un *locus* de *A. thaliana* (AT5G67380; e⁻¹¹⁰) que codifica para una caseína quinasa alfa1 (CKA1), la cual forma parte del complejo caseína quinasa 2 (CK2). En *A. thaliana*, CK2 está involucrada en la señalización y la respuesta a las condiciones fisiológicas y medioambientales, en la división celular y en la replicación de ADN. En plantas, CK2 está relacionada con procesos de crecimiento y desarrollo, además de estar implicada en la señalización por ácido abscísico (ABA) y por ende, en los procesos relacionados con la maduración, dormición y germinación de las semillas (Finkelstein *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2014; Vilela *et al.*, 2015; Depetris *et al.*, 2018). Se ha demostrado que la CK2 de maíz actúa fosforilando a Opaque2 (O2), el cual es un factor de transcripción que activa a los genes que codifican para zeínas. Dicha activación lleva a un aumento de la cantidad de proteínas de almacenamiento en el endospermo de la semilla en forma de zeínas. La participación de Opaque2 en la regulación de los genes de zeínas está controlada por CK2 en

respuesta a diferentes condiciones fisiológicas y medioambientales (Grasser *et al.*, 1989; Ciceri *et al.*, 1999; Kemper *et al.*, 1999; Łebska *et al.*, 2010). De los 3 DETDFs secuenciados y luego asociados a la función CKA1, dos de ellos (AC4 y AC5) corresponden a la clase E y uno de ellos (AC1) a la clase D, por lo cual esta función está relacionada a cruzamientos para los que no se espera la producción de semilla (E) y para los que sí se espera la producción de semilla (D) (Tabla 6). El hecho de que en los cruzamientos que no se espera la producción de semilla se hayan encontrado dos DETDFs a diferencia de un único DETDF encontrado en los cruzamientos que sí producen semillas, puede estar indicando la presencia de una mutación en el *locus* que codifica para esa proteína. Esta mutación podría haber generado un nuevo sitio de corte para las enzimas de restricción utilizadas en la técnica de cDNA-AFLP, o, alternativamente, puede tratarse de un *splicing* diferencial de genes. Esta mutación o *splicing* diferencial puede estar generando, en los cruzamientos para los que no se espera la producción de semillas, una proteína CK2 aberrante lo cual llevaría a que la semilla no desarrolle por problemas en la acumulación de proteínas del endospermo (Depetris *et al.*, 2018). Es decir, que la acumulación de la proteína caseína quinasa II (AC1, clase D) dispararía el éxito en la producción de semillas, o la acumulación de su forma mutada (AC4 y AC5, clase E), desencadenaría el fracaso en la formación de las semillas. En los análisis realizados a las 3h y 24h luego de ocurrida la polinización en *P. notatum* (Felitti *et al.*, 2015; Depetris *et al.*, 2018), se han encontrado secuencias asociadas a CK2 en cruzamientos para los cuales se espera la producción de semillas, pero también en aquellos para los que no se espera la producción de semillas. Siendo consistente con lo encontrado a las 48h de análisis, y demostrando la importancia de la caseína quinasa II durante los distintos estadios del desarrollo de la semilla. Es por ello que, las secuencias obtenidas con estas características serán utilizadas como candidatas en futuros análisis funcionales por medio de silenciamiento génico post-transcripcional en *A. thaliana*.

La secuencia AC2 (Clase D, Tabla 6) mostró alta similitud con un *locus* de *A. thaliana* (AT1G74520; $8e^{-35}$) que codifica para una proteína (ATHVA22A) que se expresa en presencia de ABA, el cual es requerido para la maduración de la semilla y para mantener la dormición de la misma. Mientras el ABA es esencial para mantener la dormición de la semilla, la giberelina (GA) es necesaria para la germinación de la misma. En cebada, la expresión del gen *HVA22* está

correlacionada con el estado de dormición de la semilla: el ARNm de *HVA22* se acumula gradualmente en la capa de aleurona (endospermo) durante la etapa tardía de la maduración de la semilla, cuando los niveles de biosíntesis del ABA endógeno son elevados a fin de mantener la dormición de la semilla. El ABA induce la acumulación de *HVA22*, la cual regula negativamente la formación de vacuolas digestivas mediadas por GA, siendo ésto un aspecto importante en la muerte celular programada en células de la aleurona. De esta manera, se impide la movilización de nutrientes hacia el embrión, retardando la germinación de las semillas y el crecimiento de las plántulas (Guo y Ho, 2008).

La secuencia AC3 (clase D, Tabla 6) presentó una alta similitud con un *locus* de *A. thaliana* (AT5G22650; $2e^{-28}$) que codifica para una histona deacetilasa 2B (HD2B), la cual modifica la estructura de la cromatina, determinando la accesibilidad de los reguladores transcripcionales al ADN diana y contribuyendo a la regulación de la expresión génica. Esta regulación epigenética está estrechamente asociada con la diferenciación celular (Lee *et al.*, 2016). Se ha identificado al gen de la HD2B como un factor genético asociado con la dormición y germinación de la semilla en *A. thaliana* (Yano *et al.*, 2013). Se ha demostrado que la HD2B de trigo actúa como sustrato y es fosforilada por CK2 (Dennis y Browning, 2009). Además, el análisis de la expresión de los genes *HD2* demostró que se expresan en todos los tejidos de la semilla de cebada y en todas las etapas de su desarrollo. Estos resultados sugieren una estrecha asociación entre la expresión de estos genes y el desarrollo de la semilla (Demetriou *et al.*, 2009). Sumado a lo anterior, se demostró que estos genes responden a tratamientos con hormonas como el ácido jasmónico (JA), ácido abscísico (ABA) y ácido salicílico (SA), todas ellas relacionadas a situaciones de estrés para la planta. Estas observaciones estarían indicando que existe una asociación de estos genes con la resistencia a estrés abiótico (Demetriou *et al.*, 2009). Además, se ha sugerido que los genes *HD2* tendrían un posible papel en la regulación epigenética durante el desarrollo de semillas (Demetriou *et al.*, 2009).

La secuencia GG1 (clase D, Tabla 6) evidenció alta similitud con un *locus* de *A. thaliana* (AT2G24260; $2e^{-57}$) que codifica para la proteína Región Defectuosa del Polen 1 (DRO1). Zhang *et al.* (2017) demostraron mediante experimentos de *RNA-seq* que DRO1 se expresa principalmente en semillas. Por otro lado, las mutantes para DRO1 en *A. thaliana* producen polen

sin células espermáticas, el cual se comporta como el *wild-type*, lo que demuestra que las células espermáticas son prescindibles para el desarrollo normal del tubo polínico (Zhang *et al.*, 2017).

La secuencia GG3 (clase G, Tabla 6) demostró un elevado nivel de similitud con el *locus* de *A. thaliana* (AT5G12020; $2e^{-36}$) que codifica para una proteína 17.6 kDa class II heat shock (HSP17.6II). Se ha demostrado que los genes *Hsp* aumentan su expresión génica desde la etapa siete hasta la etapa diez del desarrollo de la semilla en *A. thaliana* (Kotak *et al.*, 2007). La abundancia de los genes *Hsp* durante la maduración tardía de la semilla demuestra el importante rol que juegan estos genes en el desarrollo de la semilla (Kotak *et al.*, 2007).

5. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en el presente capítulo de tesis podemos concluir que se encontró la mayor cantidad de DETDFs agrupados en aquellas categorías funcionales esperadas como predominantes para el desarrollo del endospermo (Metabolismo y Señalización), ya que durante esta etapa del desarrollo del endospermo predominan los procesos metabólicos sobre todo los asociados a la síntesis de carbohidratos y a la señalización entre el endospermo y el embrión y entre el tegumento de la semilla y el endospermo.

Se obtuvieron numerosas secuencias candidatas: AC1, AC2, AC3, AC4, AC5, GG1 y GG3 para ser utilizadas en futuros análisis funcionales por medio de silenciamiento génico post-transcripcional en *A. thaliana*. Dichas secuencias se expresarían en distintos estadios de desarrollo de la semilla y estarían relacionadas con el desarrollo del endospermo y con la viabilidad o no de la semilla en *P. notatum*. Se encontraron DETDFs relacionados con etapas tardías del desarrollo de la semilla (maduración y dormición) y sensibles al ABA, lo que sugiere que a las 48h de ocurrida la polinización en *P. notatum* la semilla comienza a expresar genes relacionados con estas etapas.

CAPÍTULO III: ESTUDIO FUNCIONAL DE UNA SECUENCIA CANDIDATA DE *P. notatum* EN *A. thaliana* POR MEDIO DE SILENCIAMIENTO GÉNICO POST-TRANSCRIPCIONAL.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Análisis funcional de genes

Para estudiar la funcionalidad de un gen candidato se utilizan distintas estrategias: 1) El bloqueo de genes (*knockout*). 2) La sobreexpresión del gen del que se quiere analizar su funcionalidad, a fin de generar cambios que puedan ser observables y cuantificables. 3) El silenciamiento génico (*knockdown*): la disminución de los niveles de expresión del gen de interés (Levitus *et al.*, 2010; Binder *et al.*, 2014; Tiwari *et al.*, 2014).

1.2. Silenciamiento génico en plantas

El silenciamiento génico es una de las estrategias más utilizada ya que permite silenciar uno o varios genes de manera simultánea además de permitir distintos niveles de silenciamiento y generar un silenciamiento eficiente a partir de secuencias candidatas cortas (Levitus *et al.*, 2010).

Puede definirse al silenciamiento génico como un proceso molecular en el que hay una disminución de la expresión de genes específicos. El mismo se habría originado como un mecanismo de defensa contra virus y transposones, ya que estos generan ARN doble hebra, tipo de molécula necesaria para que se dispare el silenciamiento génico. El descubrimiento de los mecanismos que disparan este silenciamiento ha permitido ampliar el espectro de posibilidades en la búsqueda de conocer la funcionalidad y controlar la expresión de genes (Souza *et al.*, 2007).

En plantas, existen distintas vías de silenciamiento génico, las cuales tienen gran importancia en la diferenciación y en la regulación génica. El silenciamiento puede ocurrir en distintos niveles: transcripcional (metilando el ADN), post-transcripcional (degradando el ARNm) y traduccional (inhibiendo la traducción) (Figura 11) (Levitus *et al.*, 2010; Binder *et al.*, 2014; Tiwari *et al.*, 2014).

1.2.1. Silenciamiento génico transcripcional (en inglés: TGS)

En este proceso ocurre una disminución en la síntesis de ARN debido a modificaciones en el ADN o en las proteínas asociadas. Ocurre un bloqueo en la expresión génica mediante un proceso que involucra la metilación del ADN, lo cual promueve la unión a proteínas que reconocen las citosinas metiladas, llevando a la remodelación de la cromatina y evitando así la unión de factores de transcripción (Souza *et al.*, 2007; Levitus *et al.*, 2010; Tiwari *et al.*, 2014).

1.2.2. Silenciamiento génico post-transcripcional (en inglés: PTGS) o ARN interferencia (ARNi)

Proceso que involucra la degradación de un ARN mensajero secuencia específica y que se inicia con la presencia de ARN de doble cadena (en inglés: dsRNA), cuya síntesis se desencadena por la acción de enzimas ARN polimerasas dependientes de ARN (en inglés: RdRPs). Esta molécula es reconocida por la enzima Dicer (en inglés: DCLs), perteneciente a la familia de las nucleasas ARNasa tipo III y que está muy conservada en los distintos grupos de organismos (Souza *et al.*, 2007; Levitus *et al.*, 2010; Bologna y Voinnet, 2014; Tiwari *et al.*, 2014). Las enzimas RdRPs y DCLs son codificadas por familias génicas. En *Arabidopsis* se ha descrito que las enzimas RdRPs pueden ser codificadas por seis *loci* y DCLs por cuatro *loci* distintos (Tiwari *et al.*, 2014). Dicer corta o escinde el dsRNA de manera específica en dúplexos de 21 a 25 nucleótidos con un fosfato en el extremo 5' y dos nucleótidos en el extremo 3', generando así ARNs de interferencia cortos (en inglés: siRNA). Luego, la hebra guía de siRNA, la cual es antisentido del ARN blanco, se exporta al citosol mediante la acción de las proteínas exportadores HASTY y pasa a formar un complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC), que incluye a una proteína de la familia Argonauta. El complejo RISC corta al ARNm blanco, en la mitad de la región complementaria, diez nucleótidos corriente arriba del nucleótido apareado con el final 5' de la secuencia guía siRNA. Al menos una proteína de la familia Argonauta, presente en el complejo RISC actúa como endonucleasa, escindiendo o cortando los ARNm blanco. Esta escisión lleva a silenciar el ARNm blanco evitando la lectura del mensaje por la maquinaria de traducción. La señal de silenciamiento puede propagarse sistémicamente en plantas y para ello se requiere del paso de la señal de célula a célula y de una estrategia de amplificación de esa señal (Sijen *et al.*, 2000; Souza *et al.*, 2007;

Bologna y Voinnet, 2014; Tiwari *et al.*, 2014). Las hipótesis planteadas para estos mecanismos son dos: una relacionada con los siRNA, en la cual se plantea que estas moléculas son capaces de migrar hacia las células vecinas por plasmodesmos e inducir en estas últimas el silenciamiento, además de que se generarían nuevos siRNA que amplificarían la señal a toda la planta. La segunda hipótesis está relacionada con que el dsRNA largo inicial podría ser amplificado y transportado por proteínas de transporte, hipótesis avalada por el hecho de que se ha demostrado que las plantas tienen enzimas RdRPs, las que podrían amplificar el dsRNA inicial transmitiendo así la señal de silenciamiento. En ambos casos se habla de señalización a corta distancia. Existiría además una vía de señalización a larga distancia mediante la cual, la señal migraría por el floema llegando a sectores muy distantes del lugar en que se originó. Para esta vía de señalización aún no se ha logrado identificar la molécula señal (Souza *et al.*, 2007).

Actualmente los siRNA se clasifican en primarios y secundarios. Los siRNA primarios se generan a partir de la actividad de la enzima Dicer, mientras que los secundarios se originan por una vía distinta en la cual participa de manera obligatoria una enzima ARN polimerasa dependiente de ARN. Se estima que el siRNA secundario regula la expresión de los genes en los casos donde la amplificación de la señal es importante y para los casos en los que el desencadenante inicial del ARNi no esté presente (Souza *et al.*, 2007; Levitus *et al.*, 2010).

En un principio, los resultados obtenidos sugerían que TGS y PTGS se habrían originado como mecanismos independientes. Sin embargo, los últimos descubrimientos estarían indicando que estos mecanismos de silenciamiento génico podrían ser rutas alternativas, pero no necesariamente excluyentes. En plantas, se ha asociado el ARNi a la metilación *de novo* del ADN (TGS), lo que sugiere una metilación del ADN dirigida por ARN (RdDM) en donde la señal iría desde el citoplasma al núcleo celular mediado por siRNA (Souza *et al.*, 2007).

Por otra parte, se ha descrito el complejo efector ARNi denominado Iniciador del silenciamiento génico transcripcional inducido por ARN (RITS). Este complejo parece ser necesario para el montaje de heterocromatina en la fisión de levaduras y se sugiere que existen similitudes entre los complejos RISC y RITS. El complejo RITS se dirigiría a las secuencias de ADN y/o a los transcriptos de ARN que inician la formación de heterocromatina y

consecuentemente el TGS (Souza *et al.*, 2007). Es posible que un fenómeno similar ocurra en plantas, ya que se han encontrado semejanzas entre miembros de la familia de las proteínas Argonauta de *A. thaliana* y las proteínas presentes en RITS (Souza *et al.*, 2007).

1.2.3. Silenciamiento génico por microARN (Regulación de la traducción)

Los microARN o miRNA (en inglés) son ARNs endógenos de unos 21 a 22 nucleótidos de largo, y son las moléculas más abundantes con papel regulatorio. Los miRNA pueden reprimir la expresión génica del ARNm blanco mediante su degradación (proceso más común en plantas, por medio del complejo RISC) o inhibición de la traducción (proceso más común en animales, por medio del complejo miRNP) (Hake, 2003; Souza *et al.*, 2007).

En las plantas, los miRNAs están involucrados en el control del desarrollo de hojas y flores. Son moléculas conservadas y aparentemente provienen de genes endógenos. Además, por investigaciones recientes se sugiere que los miRNA estarían involucrados en mecanismo de respuesta a stress y a cambios ambientales (Hake, 2003). En el núcleo de las células, los pre-miRNAs (transcriptos que se repliegan sobre si mismos) son procesados por DCL1. Una vez maduros, los miRNA son de cadena simple, ya que la cadena complementaria (miRNA*) es degradada y pueden unirse al complejo efector RISC o al complejo miRNA (miRNP). El primero dirige la escisión o corte del ARNm y el segundo es responsable de la represión traduccional (Hake, 2003; Sijen *et al.*, 2000; Souza *et al.*, 2007; Bologna y Voinnet, 2014; Tiwari *et al.*, 2014).

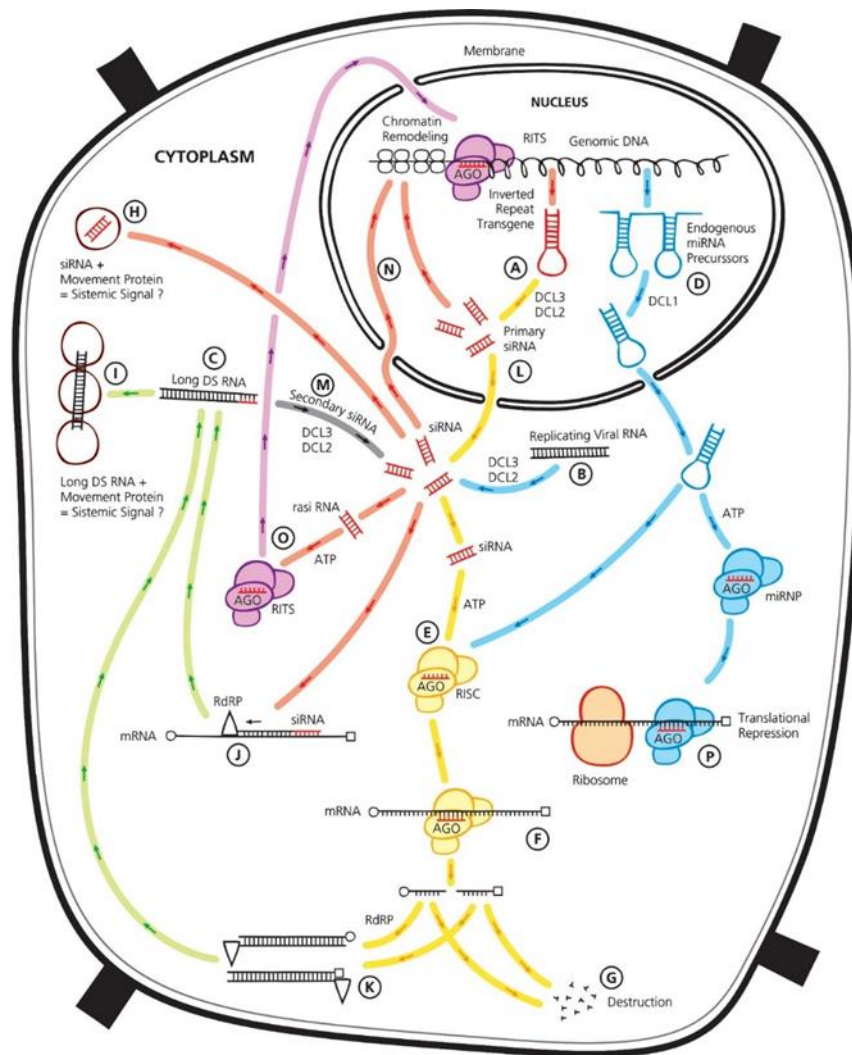


Figura 11. Vías de silenciamiento génico en plantas (Extraído de Souza *et al.*, 2007)

1.3. Métodos utilizados para inducir silenciamiento génico en estudios funcionales

Estos métodos son utilizados para disminuir la expresión de un gen en estudio y por ende para analizar su funcionalidad.

1.3.1. Requieren transgénesis

Como la obtención de plantas transgénicas es laboriosa y puede requerir mucho tiempo, se recomienda utilizar transformación transitoria a fin de evaluar la efectividad del constructo genético a utilizar.

1.3.1.1. Secuencia sentido y antisentido

Son construcciones que llevan el gen candidato en sentido o en antisentido. En este caso el porcentaje de silenciamiento post-transcripcional es bajo 4% y 7%, respectivamente (Figura 12) (Levitus *et al.*, 2010).






Construcción genética	Estructura del transcripto de RNA	% PTGS	n
Gen candidato en sentido		7	27
Gen candidato en antisentido		4	25
hpRNA (brazos de gen candidato, gen GUS como secuencia espaciadora)		58	43
hpRNA (brazos de gen candidato, intrón en antisentido como secuencia espaciadora)		65	34
hpRNA (brazos de gen candidato, intrón en sentido como secuencia espaciadora)		96	23

Figura 12. Tabla de evaluación de la eficiencia en PTGS según el constructo genético utilizado. (Extraído de Levitus *et al.*, 2010).

1.3.1.2. Secuencias con estructura de horquilla (en inglés: hpRNA)

Son construcciones conformadas por la secuencia sentido y antisentido del gen a silenciar, que se transcriben como dsRNA, por lo cual son procesados a siRNA, disparando de esa manera PTGS (Figura 12). Se ha visto favorecida la eficiencia del constructo para disparar el PTGS cuando entre las secuencias del gen de interés (sentido y antisentido) se coloca un intrón. Para utilizar este mecanismo es recomendable utilizar genes con secuencias conservadas, que no presenten

homología con otro gen y con un tamaño no menor 50pb (Helliwell y Waterhouse, 2003). Helliwell y Waterhouse (2003) desarrollaron constructos para silenciamiento por medio de hpRNA en plantas, en donde el vector pHELLSGATE que utiliza el mecanismo Gateway permitió disminuir el tiempo y el esfuerzo de trabajo además de brindar eficiencia en el silenciamiento (Figura 13).

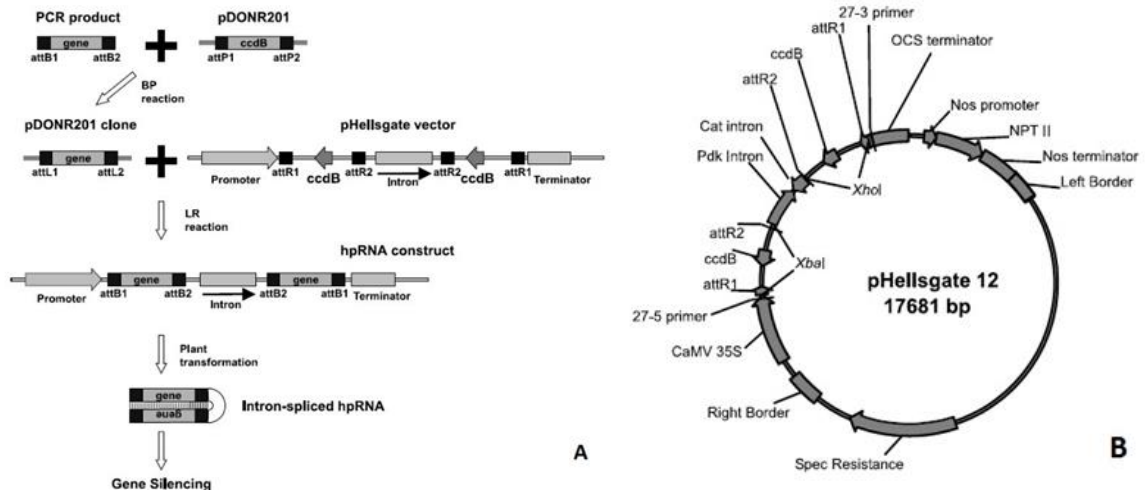


Figura 13. Tecnología Gateway. A- Protocolo para generar silenciamiento génico por hpRNA, mediante recombinación. B- Mapa del vector pHELLSGATE12 (Extraídas y modificadas de Helliwell y Waterhouse, 2003).

1.3.1.3. miRNA artificiales

Es un pre-miRNA al que se le modificaron 21 a 22 pares de nucleótidos por los de la secuencia del gen de interés, aunque manteniendo las características estructurales lo más similares posible al pre-miRNA (Levitus *et al.*, 2010; Tiwari *et al.*, 2014).

1.3.2. No requieren transgénesis:

1.3.2.1. Silenciamiento génico inducido por virus (en inglés: VIGS)

Para esta técnica se utilizan vectores virales que contengan secuencias derivadas del gen que se quiere silenciar (Velásquez *et al.*, 2009).

1.4. Aplicaciones del silenciamiento génico en el análisis funcional de genes en plantas

La utilización de las distintas vías de silenciamiento génico en la búsqueda de conocer la función de genes de interés es una herramienta muy poderosa. Es por ello que se han reportado numerosos y muy diversos estudios sobre la temática. Inicialmente, la utilización de las técnicas de silenciamiento génico estaba relacionada con la generación de plantas resistentes a virus a partir de la transformación genética, mientras que en paralelo se iban adquiriendo nuevos conocimientos sobre la bioquímica del silenciamiento génico. Scorza *et al.* (2001) demostraron que el PTGS funciona como un mecanismo para la resistencia de virus. Para ello, obtuvieron ciruelas transgénicas resistentes a virus, las cuales contenían el gen de la proteína de recubrimiento del virus de la viruela del ciruelo silenciado (PPV). En estas plantas se pudieron observar signos de PTGS tales como alto nivel de transcripción del transgén en el núcleo, pero con bajos niveles de ARNm transgénico en el citoplasma y metilación del transgén silenciado. Además de buscar generar plantas resistentes a virus, las investigaciones científicas estuvieron y están relacionadas con mejorar la calidad nutricional, como la reducción de los niveles de cafeína de granos de café o el incremento del valor nutricional de proteínas de maíz y tomate (Souza *et al.*, 2007). La calidad de la fruta, como manzanas y naranjas, también ha sido abordada mediante experimentos de silenciamiento génico. En plantas transgénicas de manzanas, se silenciaron enzimas claves para la producción de etileno, lo cual llevó a obtener frutas más firmes y con mayor vida post cosecha (Dandekar *et al.*, 2004). Además, Gilissen *et al.* (2005) obtuvieron, mediante la expresión de un hpRNA, manzanas con cantidades reducidas del alérgeno Mald1. Por lo cual, es posible producir manzanas transgénicas hipoalérgicas utilizando ARNi. Flachowsky *et al.* (2012) estudiaron la funcionalidad del gen MdTFL1-1 de esta misma especie, el cual es homólogo al gen TFL1 de *A. thaliana* cuya función es reprimir la floración. Para ello, el gen MdTFL1-1 fue silenciado generando transgénicos que expresan una construcción en horquilla que contenía unos 323 pb del MdTFL1-1. Obtuvieron plantas en las que se observó una disminución de los niveles de ARNm del MdTFL1-1. A nivel fenotípico, las plantas florecían de manera anormal y morían o se encontraba inhibido su crecimiento vegetativo. Estos resultados mostraron evidencias del importante papel de los genes MdTFL1 en el mantenimiento del crecimiento vegetativo como requisito previo para un ciclo de vida perenne. También se realizaron estudios en cultivos frutales

mediante silenciamiento génico con genes de resistencia a virus y bacterias que permitieron estudiar aspectos fisiológicos como la autofertilidad (Souza *et al.*, 2007).

Por otro lado, se han reportado estudios dirigidos a la investigación de la síntesis de lignina, relacionada con el rendimiento y la calidad de especies forestales. Para ello, se ha buscado disminuir los niveles de síntesis de lignina silenciando genes involucrados en su biosíntesis (Hu *et al.*, 1999; Lapierre *et al.*, 1999). Zhu *et al.* (2010) implementaron con éxito un sistema VIGS basado en el virus del sonajero del tabaco (TRV). Este trabajo tenía como objetivo estudiar las funciones de los genes implicados en la formación de pared celular primaria o secundaria en plantas de *Nicotiana benthamiana*.

A partir de los antecedentes anteriores sobre las posibilidades y potencialidades de la utilización del silenciamiento génico en el análisis funcional de genes candidatos, sumado al gran número de secuencias candidatas para estudios funcionales generadas por el grupo de trabajo (Felitti *et al.*, 2015; Depetris *et al.*, 2018), se plantearon como objetivos específicos para el presente capítulo de tesis:

- 1- Puesta a punto del método de transformación Floral dip en nuestro laboratorio.
- 2- Construir vectores conteniendo las secuencias de interés de *P. notatum* para transformar *A. thaliana*.
- 3- Realizar estudios funcionales de expresión de genes candidatos seleccionados.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Expresión transitoria de un gen reportero

A fin de evaluar la eficiencia el método de transformación Floral dip mediado por *Agrobacterium tumefaciens* (*Agrobacterium*), debido a que la obtención de plantas transgénicas es laboriosa y puede requerir mucho tiempo se evaluó la expresión transitoria del gen reportero *uidA* (*gus*) (Levitus *et al.*, 2010).

2.1.1. Crecimiento de plantas

Se sembraron semillas de *A. thaliana* en macetas con tierra/vermiculita (1:1) y luego se saturó con agua. Se vernalizaron 3 días a 4°C en oscuridad y posteriormente se las pasó a una cámara de cultivo con un fotoperíodo de 8h de luz/16h de oscuridad a 23°C por 3 semanas. Pasadas las tres semanas, se modificó el fotoperíodo a 16h de luz/8h de oscuridad a 23°C.

2.1.2. Cepa de *Agrobacterium* transformante

La cepa de *Agrobacterium* GV2260, contiene el plásmido pBI121, el cual incluye en la región del ADN-T, el sitio de múltiple clonado pUC19, seguido del gen *uidA* (*gus*) que codifica para la enzima β -glucuronidasa, y corriente debajo de este gen, la señal de poliadenilación de la nopalina sintetasa (NOS). En el extremo derecho del ADN-T, corriente arriba del sitio de múltiple clonado, fusionado entre un promotor NOS y un terminador NOS se encuentra el gen marcador para selección en plantas *nptII* (codifica para la enzima neomicina fosfotransferasa que confiere resistencia a kanamicina). El plásmido pBI121 posee en el sitio de múltiple clonado el promotor 35S del virus del mosaico del coliflor (CaMV35S) (Bermejo *et al.*, 2014).

2.1.3. Transformación de *A. thaliana* por Floral dip

Para la transformación con Floral dip mediada por *Agrobacterium* se utilizó el protocolo descrito por Clough y Bent (1998). Una vez que las plantas de *A. thaliana* comenzaron a florecer se llevó a cabo la transformación por Floral dip. Para ello, se realizó un pre-cultivo y un cultivo de *Agrobacterium* en medio LB por 48h a 28°C, hasta alcanzar una $DO_{600} = 2,4-2,5$. Se realizó la centrifugación del medio LB con *Agrobacterium*, se eliminó el sobrenadante y las bacterias fueron

re-suspendidas en el medio de transformación de plantas (sacarosa 50 g.l⁻¹, MS 2,1 g.l⁻¹, tween20 0,02% v.v⁻¹, pH 5,7). Previo a la transformación de *A. thaliana*, se eliminaron de las plantas todas las flores con pétalos visibles (estadío floral 13-14), dejando sólo capullos florales sin abrir (estadío floral 12-13) (Alvarez-Buylla *et al.*, 2010). Luego, las plantas fueron sumergidas en el medio de transformación durante 30 segundos y dispuestas en posición horizontal en cámara húmeda. Posteriormente, se colocaron en cámara de cultivo con un fotoperiodo de 16h de luz y 8h de oscuridad a 23°C durante 24h. Pasado este período, se eliminó la cámara húmeda y las plantas fueron colocadas en posición vertical en cámara de cultivo hasta el momento de cosechar las semillas, las cuales fueron conservadas en heladera.

2.1.4. Selección de transformantes

Las semillas de *A. thaliana* fueron sembradas en cajas de Petri con medio MS y el antibiótico kanamicina (50mg.l⁻¹). Se realizó un control negativo en medio MS + kanamicina (50mg.l⁻¹) + semillas Wild type. Una vez que las plantas susceptibles murieron y las que mostraron resistencia al antibiótico desarrollaron raíces, fueron transferidas de caja de Petri a maceta. Posteriormente, se tomaron muestras de hojas y de flores de las plantas transformadas y control y se realizó la prueba histoquímica para detectar la enzima β -glucuronidasa, utilizando el protocolo provisto por Agrobiotec (FCA). Las muestras tomadas se incorporaron en una solución que contenía 200mM buffer fosfato (pH 7,0), 20 mM ferrocianuro de potasio, 20 mM 5-bromo-4-cloro-3-indolil glucurónido (X-Gluc) y fueron incubadas en oscuridad por 36h a 37°C. Luego, se cortó la reacción eliminando la solución de tinción y añadiendo etanol al 70% v.v⁻¹. Posteriormente, se visualizaron y analizaron los resultados de la prueba histoquímica en lupa estereoscópica LED (Numak) y microscopio óptico Leica DM2500 con cámara Leica DMC2900.

2.2. Silenciamiento génico en *A. thaliana* con el gen GG13 de *P. notatum* y su análisis funcional

2.2.1. Selección de la secuencia candidata GG13

Teniendo en cuenta el trabajo de Felitti *et al.* (2015) sobre el análisis de expresión génica del desarrollo del endospermo a las 3h de ocurrida la polinización en *P. notatum* y el trabajo sobre xenia realizado en la misma especie, (capítulo I de este trabajo de tesis), se seleccionó la secuencia

candidata GG13 (gen GG13), para la realización de un estudio funcional por silenciamiento génico en *A. thaliana*. Dicha secuencia está asociada funcionalmente al *locus* AT2G47470 de *A. thaliana* (UNE5), el cual codifica para una proteína disulfuro isomerasa 2-1 (PDIL2-1) (Felitti *et al.*, 2015). Los criterios de selección de la secuencia fueron, en primer lugar, el tamaño, ya que la secuencia de interés tenía 168pb, lo cual es mayor al mínimo recomendado (50pb) por Helliwell y Waterhouse (2003). En segundo lugar, se tuvo en cuenta su función predicha a partir de los resultados de BLASTx, que indicaron que esta secuencia estaría relacionada con la doble fertilización y el desarrollo del endospermo, afectando el número de semillas y el tamaño de las silicuas (Wang *et al.*, 2008a; Felitti *et al.*, 2015) con un valor de e de $5e^{-52}$ (ver secuencias GA2 y GA4, Capítulo I, pág. 40).

2.2.2. Generación del constructo para el silenciamiento génico (hpRNA)

A fin de construir el vector de expresión de un hpRNA para inducir el silenciamiento génico post-transcripcional en *A. thaliana*, se utilizó el plásmido pHELLSGATE12 (CSIRO, Australia) (Figura 13. B), al cual se le insertaron las secuencias del gen candidato GG13 en sentido y anti-sentido separadas por un intrón, mediante el mecanismo de recombinación genética Gateway de Invitrogen (Helliwell y Waterhouse, 2003). Para ello se realizó:

- A. Diseño de cebadores para la secuencia del gen candidato seleccionado, productos de PCR attB y purificación de productos attB: Se diseñaron los cebadores mediante el uso de Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) (Tabla 8). A dichos cebadores se les adicionó los extremos attB1 y attB2 requeridos por el protocolo de construcción del vector de expresión mediante recombinación (Tabla 8). Se generaron luego productos de PCR attB: 94°C, 3min; 35 ciclos a 94°C, 45s; 55°C, 30s; 72°C, 90s; 72°C, 10min de extensión final. Se purificaron los productos attB, eliminando el exceso de cebadores y se chequeó la correcta amplificación y purificación de los productos en gel de agarosa al 2% m.v⁻¹. Tamaño de banda esperado: 168pb.
- B. Generación de los clones de entrada: Se llevó a cabo la reacción de recombinación BP utilizando el producto de PCR attB, la enzima BP Clonasa y el vector pDONR™221 (confiere resistencia a kanamicina), el cual contiene los sitios attP1 y attP2 y el marcador

de selección negativo gen *ccdB* (MultiSite Gateway® Three-Fragment Vector Construction Kit, Invitrogen). Luego, se generaron *E. coli* DH5 α competentes las cuales fueron transformadas químicamente y crecidas a 37°C. A partir de colonias aisladas transformantes (resistentes a 50mg.l⁻¹ de kanamicina), se obtuvo para cada clon de entrada, ADN plasmídico purificado usando el kit AxyPrep Plasmid Miniprep (Axygen Biosciences). Con el fin de determinar la correcta transformación de las colonias de *E. coli* DH5 α y generación de los clones de entrada se realizó una PCR: 95°C, 5 min; 30 ciclos a 96°C, 30seg; 50°C, 15s; 60°C, 4min. Utilizando el ADN plasmídico purificado como templado y los pares de cebadores M13 (Tabla 8). A partir de ello, se verificó el tamaño esperado de la banda (400pb) en gel de agarosa al 2% m.v⁻¹, utilizando un marcador de peso molecular (100 bp Quick-load, New Englands Biolabs). Posteriormente, los productos de PCR se enviaron a secuenciar a Macrogen Inc. (Corea).

- C. Generación de clones de expresión: Se llevó a cabo la reacción LR mediante el uso de ADN plasmídico purificado del clon de entrada, la enzima LR clonasa y el vector de expresión pHELLSGATE12 (confiere resistencia a espectinomicina) (MultiSite Gateway® Three-Fragment Vector Construction Kit, Invitrogen). Se transformaron *E. coli* DH5 α y se evaluaron los transformantes, por resistencia a antibiótico (100mg.l⁻¹ de espectinomicina). Se obtuvo el DNA plasmídico purificado, ahora denominado pGG13, el cual fue utilizado como molde para la posterior amplificación por PCR: 95°C, 2min; 30 ciclos a 95°C, 30s; 60°C, 30s; 72°C, 1min; 72°C 5min de extensión final. Se utilizaron los cebadores attR1 y attR2. Luego se realizó un gel de agarosa 2% m.v⁻¹ para controlar el tamaño del fragmento obtenido (tamaño esperado de 226pb).

Tabla 8. Pares de cebadores usados para las PCR de protocolo Gateway (5' - 3').

Cebadores	Nombre	Secuencia (5'-3')
<i>GG13</i>	GG13F	GAAAGACCTATGTGACCATTGC
	GG13R	TGAGTCCTGACCGACTTCTC
<i>attB</i>	attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT
	attB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT
<i>M13</i>	M13F	GTAAAACGACGGCCAG
	M13R	CAGGAAACAGCTATGAC
<i>attR</i>	attR1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT
	attR2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT

2.2.3. *Agrobacterium* competentes

Se utilizó la cepa de *Agrobacterium* GV3001 (pMP90) resistente a rifampicina (100 mg.l⁻¹) y gentamicina (75 mg.l⁻¹). Para la obtención de células competentes, se dejaron crecer las bacterias en LB (conteniendo los antibióticos correspondientes) hasta una OD₅₉₅= 0,4-0,6. Luego de centrifugar y descartar el sobrenadante, se agregó CaCl₂ 100 mM frío y se incubó en hielo (este proceso se repitió tres veces). Se agregó glicerol 20% v.v⁻¹ y se congeló rápidamente por inmersión en N₂ líquido (Wang, 2006).

2.2.4. Transformación de células competentes de *Agrobacterium*

Se descongelaron las células de *Agrobacterium* competentes en hielo. Luego se agregó 1µl del constructo pGG13 y se incubó en hielo. Se colocaron las células a 42°C y luego se transfirieron rápidamente a un baño de hielo. Se plaqueó en medio LB con 100 mg.l⁻¹ de rifampicina, 75 mg.l⁻¹ de gentamicina y 100 mg.l⁻¹ de espectinomicina y se incubó a 28°C toda la noche (Wang, 2006).

2.2.5. Crecimiento de plantas y transformación de *A. thaliana* por Floral dip

El crecimiento de plantas y la transformación por Floral dip se llevó a cabo de la misma manera que para la transformación transitoria (pág. 75). Se utilizaron plantas control, las que se trataron con un medio de transformación con *Agrobacterium* sin el constructo pGG13. Luego de ocho días de realizado el Floral dip se tomaron las silicuas de plantas control y de las plantas potencialmente transformadas para el análisis fenotípico y la validación del silenciamiento por RT-qPCR. El tiempo de toma de muestra se determinó por bibliografía previa, la cual indicaba que durante el desarrollo de la semilla de *A. thaliana* el nivel máximo de expresión del gen *UNE5*, asociado bioinformáticamente al gen candidato GG13, se evidenció a los 5 días luego de ocurrida la floración (DAF), para luego comenzar a declinar (Hajduch *et al.*, 2010).

2.2.6. Análisis fenotípico de *A. thaliana*

Para el análisis fenotípico se tomaron silicuas de plantas control y silicuas de las plantas transformadas, 8 días luego de realizada la transformación con Floral dip (DLT). Se realizó la

fijación de las silicuas, utilizando FAA modificado (Lersten y Curtis, 1988) con cantidades iguales de Solución A (25 ml ácido acético, y 250 ml de etanol 95% v.v⁻¹) y Solución B (glutaldehído 25% v.v⁻¹, formaldehído 40% v.v⁻¹ y agua destilada). Luego se realizó una decoloración en solución de Hoyer (3 hidrato cloral: 1 agua: 1 glicerol) (Wang *et al.*, 2008a; Boavida *et al.*, 2009) por 24h. Se montaron en porta objeto y se observó en lupa estereoscópica LED (Numak). En 18 silicuas control y 22 silicuas silenciadas se obtuvieron valores para las variables número de semillas por silicua y número de abortos por silicua. En 21 silicuas control y silenciadas se midió el largo de silicua. En siete silicuas de ambos tratamientos se determinó mediante el software público ImageJ1.52e (<https://imagej.nih.gov/ij/>) el ancho de semilla (A, μm) y largo de semilla (L, μm) (Figura 14) y a partir de estos valores se calculó el índice de forma: L/A. Los valores del índice de forma próximos a 1 indican una semilla redonda, mientras que valores próximos a 2 corresponden a una semilla alargada. Las imágenes fueron adquiridas con el microscopio óptico Leica DM2500 usando microscopía de contraste por interferencia diferencial (DIC) y objetivos 20X y 40X. Las imágenes se capturaron con el software *Leica Application Suite* usando la cámara Leica DMC2900. Para cada variable analizada se determinó si los datos presentaban distribución normal por medio de la prueba de normalidad de Shapiro-Wilks modificada. En aquellas variables que mostraron distribución normal, se compararon las medias muestrales por medio de una prueba T-Student. En el caso de las variables que no mostraron distribución normal, se evaluó la diferencia de medias muestrales por medio del test no paramétrico de Wilcoxon (Mann-Whitney U), utilizando el software Infostat versión estudiantil (Di Rienzo *et al.*, 2016).

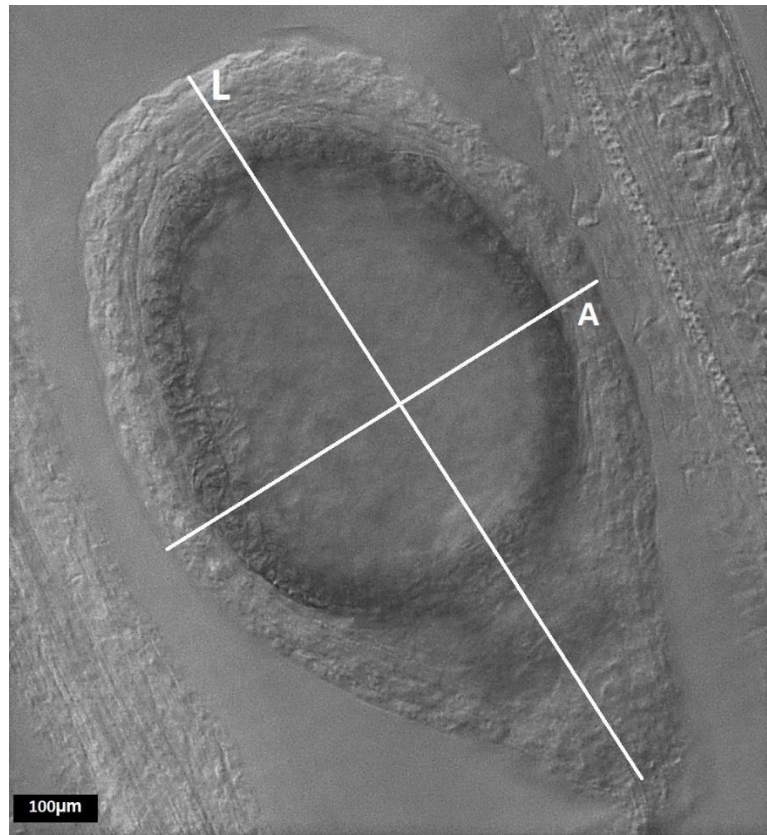


Figura 14. Largo (L) y ancho (A) de semilla de *A. thaliana*

2.2.7. Validación por RT-qPCR

Para la validación por RT-qPCR de los menores niveles de expresión génica de las muestras silenciadas con respecto a las muestras control, se extrajo el ARN total de silicuas con sus respectivas réplicas biológicas, mediante el kit “SV Total RNA Isolation Kit” (Promega). A partir de 20 ng de ARN total extraído de cuatro muestras (dos control y dos silenciadas) se llevó a cabo la retrotranscripción (RT), utilizando la enzima Transcriptasa reversa SuperscriptII (Invitrogen) y el oligonucleótido d(T)₁₅. Luego se realizó la qPCR: 94°C, 2 min; 94°C, 15 s; 30 ciclos a 50°C, 30 s; 70°C, 40 s, en el termociclador Rotor-Gen Q (Qiagen). La mezcla de reacción incluyó 1X SYBR Green PCR Master Mix (Biodynamics), 10 µM de los cebadores específicos para la secuencia del gen candidato GG13 y para los genes de referencia y 1µl cDNA (diluido 1/4). Se utilizó como referencia el gen *TIP41-like* (AT4G34270) (Czechowski *et al.*, 2005) y tres réplicas técnicas para cada tratamiento (control y silenciadas). La cuantificación de los ciclos (Cq) y la eficiencia de

amplificación (E) se obtuvieron del software de cuantificación comparativa suministrado por Corbett Research para Rotor Gene (Qiagen). El valor de la expresión normalizada para el gen GG13 se calculó según la eficiencia de amplificación (E) y Cq en comparación con el gen de referencia según la fórmula de Simon (Simon, 2003) y la expresión relativa se calculó como la expresión normalizada relativa al valor normalizado más bajo para el gen en las condiciones estudiadas (Livak y Schmittgen, 2001; Pfaffl, 2001). Los datos se analizaron para determinar su significancia estadística mediante la prueba T-Students utilizando el software Infostat versión estudiantil (Di Rienzo *et al.*, 2016).

3. RESULTADOS

3.1. Expresión transitoria de un gen reportero

La germinación de las semillas y el crecimiento de las plantas de *A. thaliana* en cámara fueron exitosas (Figura 15. A). Luego de la transformación con Floral dip, se obtuvieron plantas resistentes al antibiótico kanamicina (50 mg.l^{-1}) dando el primer indicio de que las plantas habían incorporado el ADN-T de interés (Figura 15. B-D). A partir de la visualización bajo lupa y microscopio de las muestras de hojas (Figura 16 A, B y C) y flores (Figura 16. D) de *A. thaliana* transformadas con el ADN-T que incluía el gen reportero *gus*, se obtuvo una expresión positiva de dicho gen en todos los tejidos analizados (Figura 16), por lo cual se consideró eficiente la transformación con Floral dip y por ende fue el método de transformación utilizado para realizar el análisis funcional del gen candidato GG13.

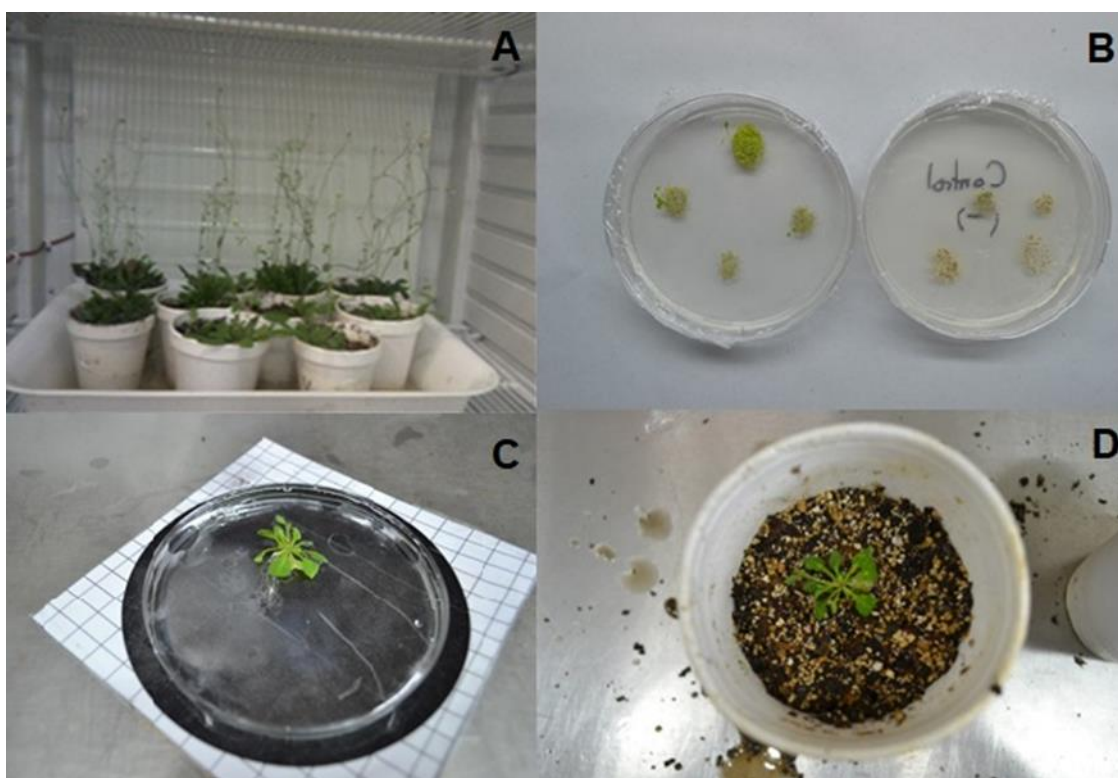


Figura 15. Pasos de transformación con Floral dip. A) Plantas de *A. thaliana* listas para transformar. B) Control (-) y plantas resistentes a kanamicina (50 mg.l^{-1}). C) Planta seleccionada para pasar a maceta. D) planta en maceta.

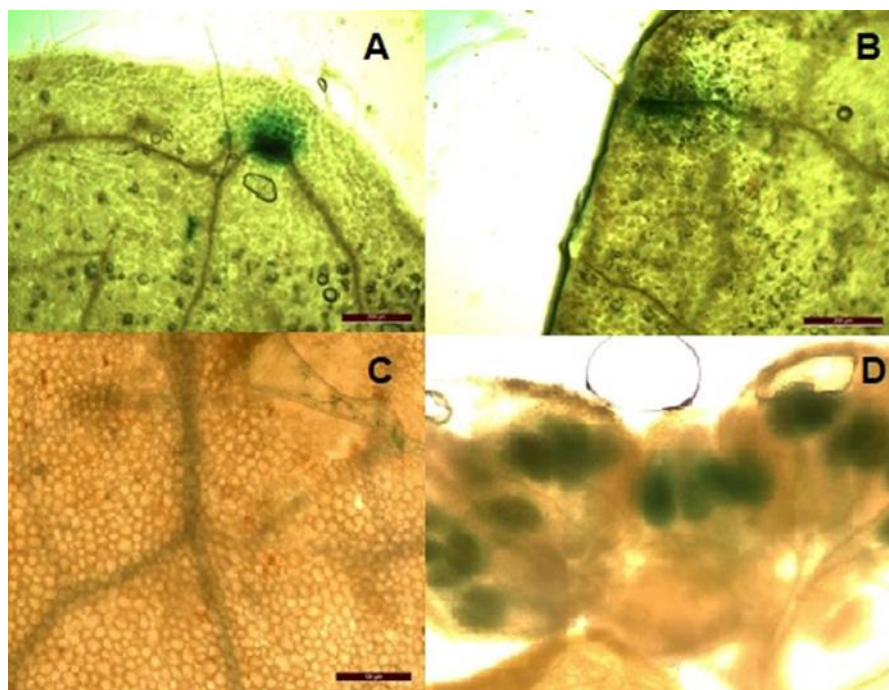


Figura 16. Resultados de las pruebas histoquímicas para revelar *gus* al microscopio óptico, aumento 40x. A, B y C) Preparados de hojas. D) Preparado de flores.

3.2. Silenciamiento génico en *A. thaliana* con el gen GG13 de *P. notatum* y su análisis funcional

3.2.1. Construcción del hpRNA y transformación de *A. thaliana* por Floral dip

Se construyó el vector de expresión pGG13 mediante el mecanismo de recombinación genética del sistema Gateway de Invitrogen (Helliwell y Waterhouse, 2003). Este vector contenía las secuencias del gen candidato GG13 en sentido y anti-sentido separadas por el intrón Pdk (767pb), el cual proviene de la especie *Flaveria trinervia* en pHELLSGATE12 (CSIRO, Australia). Todos los chequeos realizados durante el proceso de generación del constructo mostraron los resultados esperados, ya sea en cuanto al tamaño de los fragmentos attB (Figura 17 A) y de los insertos en plásmidos entrada (pDONR™221) y expresión (pHELLSGATE12) (Figura 17 B y C), como lo obtenido en cuanto a las colonias de *E. coli* DH5α resistentes a los antibióticos kanamicina (50 mg.l⁻¹) y espectinomicina (100 mg.l⁻¹), resultantes de las raciones BP y LR, respectivamente (Figura 18).

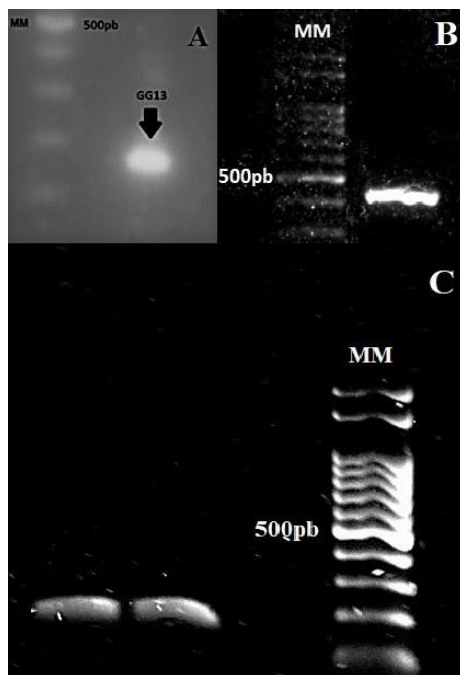


Figura 17. Gel de agarosa al 2% $m.v^{-1}$. A) Fragmentos conteniendo la secuencia del gen GG13 + cebadores attB, tamaño aproximado de banda obtenido: 168pb. B) Inserto en plásmido entrada pDONR™221 con un tamaño aproximado de banda obtenido: 400pb. C) Inserto GG13 en plásmido expresión pHELLSGATE12 (pGG13). Tamaño aproximado de banda obtenido: 226pb.

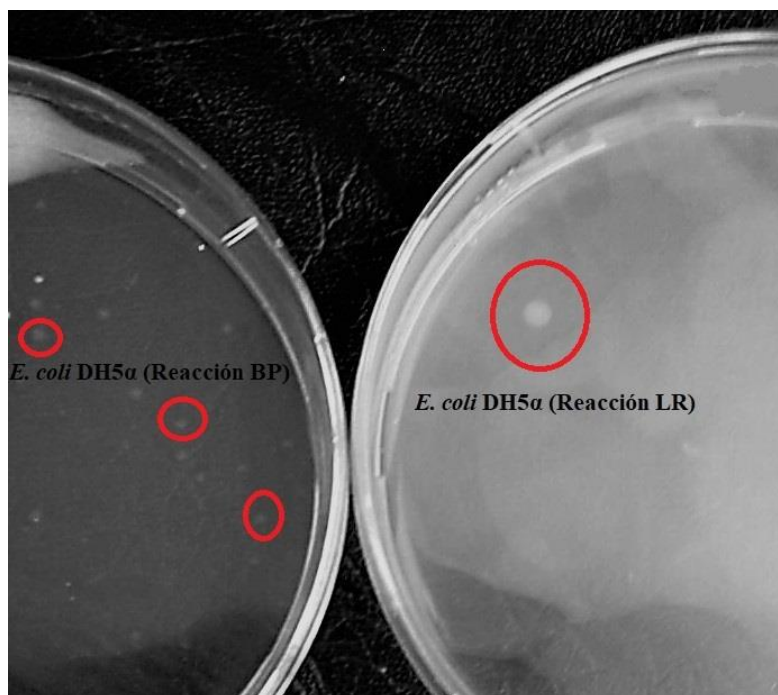


Figura 18. Placas de Petri con colonias de *E. coli* DH5 α marcadas en círculo rojo. Caja de Petri izquierda: Colonias resistentes a kanamicina ($50mg.l^{-1}$), resultantes de la reacción BP. Caja de Petri derecha: Colonia resistente a espectinomicina ($100mg.l^{-1}$), resultante de la reacción LR.

3.2.2. Análisis fenotípico de *A. thaliana*

A fin de determinar si las variables analizadas se distribuían normalmente se realizó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilks modificada y se obtuvo que sólo la variable índice de forma presentaba este tipo de distribución ($p > \alpha$). Es por ello que para la comparación de medias muestrales se utilizó en índice de forma, la prueba paramétrica T-Student y para el resto de las variables analizadas (Largo de silicua, N° de abortos/silicua, N° de semillas/silicua, largo y ancho de semilla), el test no paramétrico de Wilcoxon (Mann-Whitney U). Todas las variables analizadas mostraron diferencias significativas entre las medias de las plantas control y las silenciadas (Tabla 9). El número de abortos/silicua (Figura 19 A-C), largo de semilla e índice de forma es significativamente mayor en las plantas de *A. thaliana* silenciadas. Mientras que el resto de las variables analizadas, largo de silicua (Figura 20), número de semillas/silicua y ancho de semilla presentaron mayores valores en las plantas control.

Al observar las semillas dentro de silicuas de las plantas silenciadas 8 DLT en microscopio DIC (40X), se evidenció que los abortos encontrados fueron de tipo temprano, ya que se pudo observar la presencia de un cigoto y un endospermo, ambos con un solo núcleo y detenidos en su desarrollo (Figura 19 B-C) (Andreuzza *et al.*, 2010).

Tabla 9. Análisis fenotípico de en plantas silenciadas y control de *A. thaliana*

	Tratamiento		
	Silenciada	Control	p-valor
Largo de silicua (cm)	0,76	1,27	<0,0001**
N° de abortos/silicua	6	1	0,0005**
N° de semillas/silicua	16	34	<0,0001**
Largo de Semilla (µm)	755,82	672,85	<0,0001**
Ancho de semilla (µm)	415,97	436,02	0,0289*
Índice de forma (L/A)	1,83	1,57	<0,0001**

*Significancia a un $\alpha = 0,05$

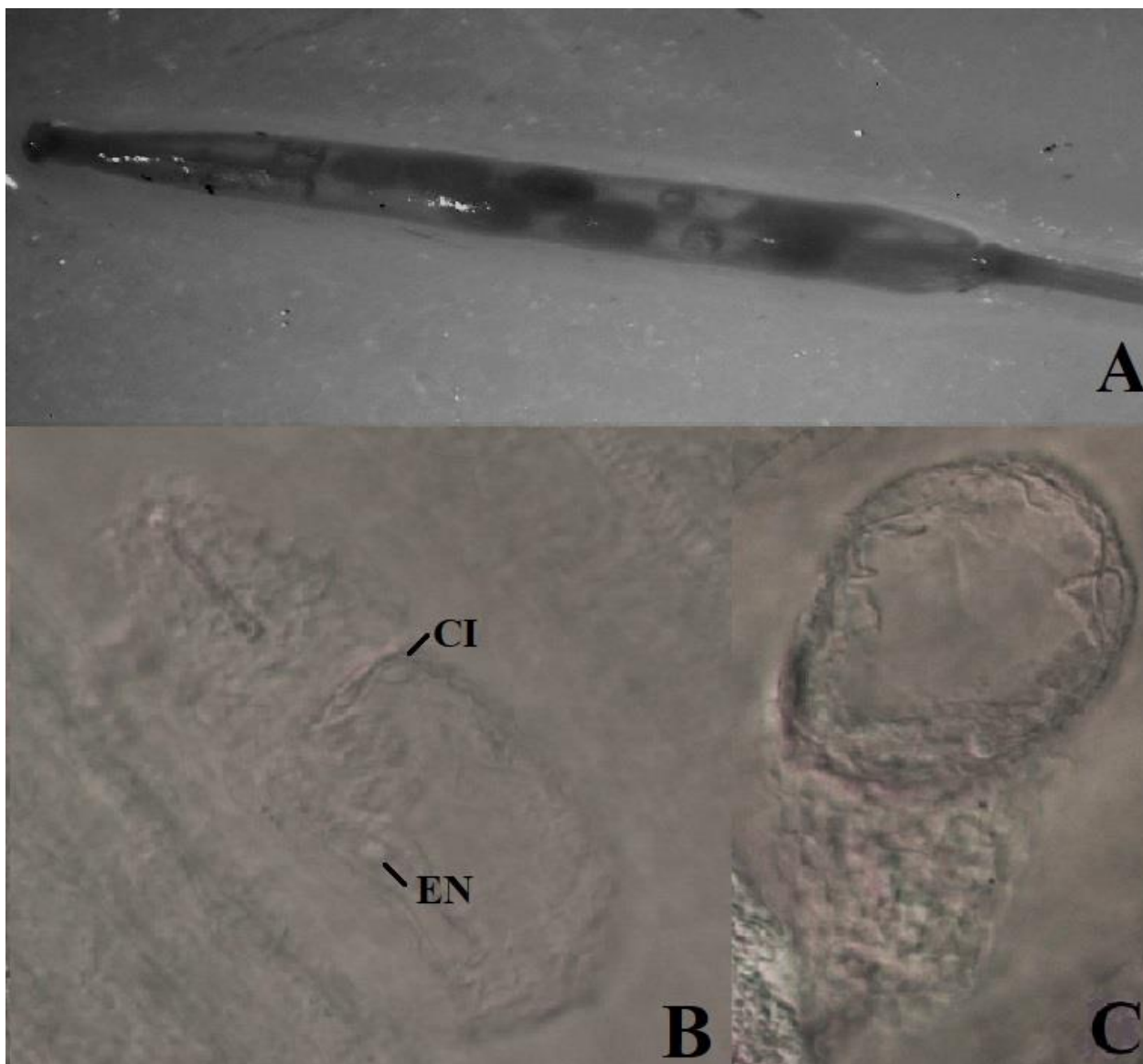


Figura 19. Análisis fenotípico de silicuas de *A. thaliana*. A) Silicua silenciada de *A. thaliana* (5X). B y C) Ejemplos de abortos de la silicua de la imagen A (40X). CI: cigoto. EN: endospermo.



Figura 20. Silicuas obtenidas 8 DLT. Ss: Silicuas silenciadas. Sc: Silicuas control.

3.2.3. Validación por RT-qPCR

El gen *TIP41-like* (AT4G34270) demostró ser adecuado para su uso como gen de referencia en el experimento, ya que sus niveles de expresión se mantuvieron estables en los distintos tratamientos analizados (p -valor=0,1057; α =0,05). Es decir, no se observaron diferencias significativas entre la media de los niveles de expresión relativa de las silicuas control con respecto a los niveles de expresión relativa de las silicuas silenciadas. Los niveles de expresión relativa del gen GG13 en las silicuas silenciadas fue significativamente menor (p -valor= 0,0026; α =0,05) que en las silicuas control, siendo la expresión relativa en las silicuas de plantas control de 7,29 y de 1,93 en las silicuas silenciadas, respectivamente (Figura 21).

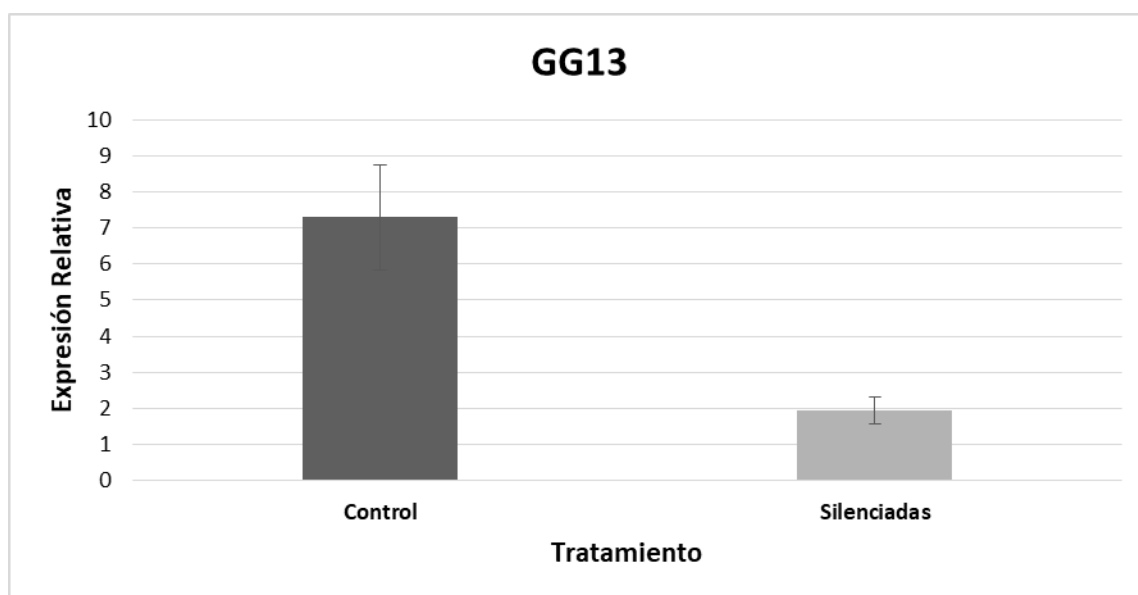


Figura 21. Niveles de expresión relativa de silicuas de plantas control y silenciadas.

4. DISCUSIÓN

4.1. Expresión transitoria de un gen reportero

Luego de la transformación con Floral dip, se obtuvieron plantas de *A. thaliana* resistentes al antibiótico kanamicina (50mg.l^{-1}) y además se obtuvo una expresión positiva del gen *gus* en los tejidos analizados. Estos resultados demuestran que la selección del método de transformación por Floral dip fue la adecuada para el estudio funcional del gen candidato GG13 en *A. thaliana*. Las ventajas de su utilización son que se trata de un método sencillo, fiable y con una alta tasa de transformantes. Además, se evita el cultivo de tejidos y la regeneración de plantas, lo cual disminuye el tiempo requerido para la generación de plantas transgénicas (Clough y Bent, 1998; Das y Joshi, 2011).

4.2. Análisis funcional del gen GG13 de *P. notatum* mediante silenciamiento génico en *A. thaliana*

A partir del vector pHELLSGATE12 (CSIRO, Australia) y mediante el mecanismo Gateway (Invitrogen) (Heliwell y Waterhouse, 2003), se logró desarrollar un hpRNA el cual quedó constituido por las secuencias del gen candidato GG13 en sentido y anti-sentido separadas por un intrón (Pdk). Dicho constructo permitió disparar el silenciamiento del gen GG13 en *A. thaliana*.

En cuanto al análisis fenotípico de las silicuas de plantas silenciadas con respecto a las plantas control, se observó que las semillas de las plantas silenciadas fueron significativamente más largas ($755,82\ \mu\text{m}$) y más angostas ($415,97\ \mu\text{m}$) que las semillas de las plantas control ($436,02\ \mu\text{m}$ de ancho y $672,85\ \mu\text{m}$ de largo). Por lo tanto, se determinó que las semillas de las plantas silenciadas presentaron forma más alargada (1,83) que las semillas de las plantas control (1,57). Se observó una disminución significativa en el número de semillas y en el tamaño de la silicua en plantas silenciadas, además de un incremento significativo en el número de abortos tempranos (Andreuzza *et al.*, 2010). Estas observaciones son consistentes con lo esperado y predicho bioinformáticamente para el gen GG13, ya que este gen de *P. notatum* presenta similitud con el gen de *A. thaliana* *UNE5* involucrado con el desarrollo del tubo polínico, doble fertilización, formación del cigoto y el

endospermo (capítulo I, pág. 40). Más específicamente con el tamaño de la silicua y el set de semillas (Wang *et al.*, 2008a, Hajduch *et al.*, 2010), ya que fenotipos mutantes para *UNE5* en *A. thaliana* evidenciaron una reducción en la producción de semillas debido a: semilla abortadas tempranamente, silicuas pequeñas y un reducido número de semillas (Wang *et al.*, 2008a, Hajduch *et al.*, 2010). La función del gen *UNE5* primero fue atribuída al crecimiento correcto del tubo polínico o al desarrollo del saco embrionario (Wang *et al.*, 2008a; Boavida *et al.*, 2009), pero luego Hajduch *et al.* (2010) evidenciaron que el gen podría estar ejerciendo sus funciones luego de la fecundación, ya que los mayores niveles de expresión para el gen se obtuvieron 5 DAF. En este trabajo se encontró que los efectos del gen candidato GG13 pueden ocurrir luego de la fecundación, ya que en los abortos observados en silicuas de plantas silenciadas con GG13, se puede apreciar un cigoto que detuvo su desarrollo y un endospermo de un solo núcleo (Andreuzza *et al.*, 2010). Estas observaciones son consistentes con lo reportado por Hajduch *et al.* (2010) para el *UNE5* (asociado bioinformáticamente a GG13). Sumado a lo anterior, los niveles de expresión del gen GG13 fueron validados por RT-qPCR, en donde se obtuvo que la expresión relativa de las silicuas de plantas silenciadas con el gen candidato GG13 fue significativamente menor que la expresión relativa de las silicuas de plantas control.

5. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente capítulo de tesis podemos concluir que la transformación por Floral dip resultó un método adecuado para la incorporación del hpRNA en el genoma de *A. thaliana*.

Por otro lado, podemos decir que se logró construir exitosamente un plásmido para expresar un hpRNA, contituido con fragmentos en sentido y antisentido del gen GG13 separados por el intrón Pdk. Este constructo permitió evaluar la funcionalidad del gen GG13 en *A. thaliana* por medio del silenciamiento génico post-transcripcional. A partir del análisis fenotípico de las plantas transformadas se demostró que el gen GG13 afecta el número y la forma de las semillas y el largo de silicua. Además, se demostró que sus efectos ocurren en etapas iniciales del desarrollo de la semilla, ya que los abortos tempranos observados mostraron un endospermo de único núcleo y un cigoto cuyo desarrollo estaba detenido. Por lo tanto, se evidenció la correspondencia entre los resultados obtenidos por el análisis funcional con lo predicho por el análisis bioinformático.

La disminución de los niveles de expresión de las silicuas silenciadas con respecto a las silicuas control fue comprobada por RT-qPCR.

CONCLUSIONES GENERALES

En el capítulo I, del análisis de expresión génica diferencial en cruzamientos de *P. notatum* con distintos genotipos de polen luego de 3h de ocurrida la polinización se logró evidenciar el efecto xenia a nivel molecular en el endospermo híbrido y a nivel fenotípico en la semilla. Dicho efecto estaría regulando la expresión de genes relacionados con la producción y rendimiento de granos como: el número, tamaño y peso de las semillas. Además, se sumaron evidencias que describen una vía de acción para xenia por ARNm móviles, los cuales estarían mediando las vías de señalización entre los tejidos maternos y paternos. Las secuencias relacionadas relacionadas a xenia: CC1, CC3, CG5, GA2, GA4, GA6, GG5, CG3 y TG2 podrían ser utilizadas como candidatas en futuros análisis funcionales en *A. thaliana*.

Como en el capítulo I, en el capítulo II se analizó la expresión génica a las 48h de ocurrida la polinización en *P. notatum* y se obtuvieron numerosas secuencias candidatas: AC1, AC2, AC3, AC4, AC5, GG1 y GG3 para ser utilizadas en futuros análisis funcionales por medio de silenciamiento génico post-transcripcional en *A. thaliana*. Dichas secuencias se expresarían en distintos estadios de desarrollo de la semilla y estarían relacionadas con el desarrollo del endospermo y con la viabilidad o no de la semilla en *P. notatum*. Se encontraron DETDFs relacionados con etapas tardías del desarrollo de la semilla (maduración y dormición) y sensibles al ABA, lo que sugiere que a las 48h de ocurrida la polinización en *P. notatum* la semilla comienza a expresar genes relacionados con estas etapas.

En el capítulo III y en relación a lo obtenido en el capítulo I y II del presente trabajo de tesis se estableció la eficiencia del método de transformación por Floral dip para la incorporación de un hpRNA en el genoma de *A. thaliana*, debido a su rapidez, simpleza y fiabilidad. Además, se logró contruir exitosamente el hpRNA, contituido por el gen GG13 en sentido y antisentido separados por el intrón Pdk, el cual permitió evaluar la funcionalidad del gen GG13 en *A. thaliana* por medio del silenciamiento génico post-transcripcional y se demostró que el gen GG13 afecta el número y la forma de las semillas y el largo de silicua. Sumado a lo anterior, se evidenció el efecto temprano de dicho gen durante el desarrollo de la semilla y la correspondencia entre los resultados obtenidos por el análisis funcional con lo predicho por el análisis bioinformático.

La disminución de los niveles de expresión de las silicuas silenciadas con respecto a las silicuas control fue comprobada por RT-qPCR.

BIBLIOGRAFÍA

Aarts, M.G., C.J. Keijzer, W.J. Stiekema, A. Pereira. 1995. Molecular characterization of the CER1 gene of *Arabidopsis* involved in epicuticular wax biosynthesis and pollen fertility. *The Plant Cell*. 7:2115-27.

Acuña, C.A., A.R. Blount, K.H. Quesenberr, K.E. Kenworthy, W.W. Hanna. 2009. Bahiagrass tetraploid germplasm: reproductive and agronomic characterization of segregating progeny. *Crop Sci*. 49:581–588.

Alvarez-Buylla, E.R., M. Benítez, A. Corvera-Poiré, Á.C. Cador, S. de Folter, A.G. de Buen, A. Garay-Arroyo, B. García-Ponce, F. Jaimes Miranda, R.V. Pérez-Ruiz, A. Piñeyro-Nelson, Y.E. Sánchez-Corrales. 2010. Flower Development In: *The Arabidopsis Book*. The American Society of Plant Biologists; Rockville, MD. doi:10.1199/tab.0127.

Andreuzza, S., J. Li, A. Guitton, J. Faure, S. Casanova, J. Park, Y. Choi, Z. Chen, F. Berger. 2010. DNA LIGASE I exerts a maternal effect on seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Development*. 137:73-81.

Bashaw, E.C., A.W. Hovin, E.C. Holt. 1970. Apomixis, its evolutionary significance and utilization in plant breeding. In: *Proceedings of the 11th International Grassland Congress*. Ed. M.J.T. Norman. University of Queensland Press, St. Lucia, 245-248.

Benstein, R.M., K. Ludewig, S. Wulfert, S. Wittek, T. Gigolashvili, H. Frerigmann, M. Gierth, U. Flügge, S. Krueger. 2013. *Arabidopsis* Phosphoglycerate Dehydrogenase1 of the Phosphoserine Pathway Is Essential for Development and Required for Ammonium Assimilation and Tryptophan Biosynthesis. *The Plant Cell*. 25:5011–5029.

Berger, F., A.M. Chaudhury. 2009. Parental memories shape seeds. *Trends in Plant Science*, 14:550-556.

Berger, F., P.E. Grini, A. Schnittger. 2006. Endosperm: an integrator of seed growth and development. *Plant Biology*. 9:664–670.

Bernejo, C., R. Rodriguez, E.L. Cointry. 2014. Transformación genética de lenteja (*Lens culinaris* Medik) mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. XLIII Congreso Argentino de Genética-IV Reunión Regional SAG-La Pampa Patagonia. San Carlos de Bariloche.

Bewley, J. D., K. J. Bradford, H.W.M. Hilhorst, H. Nonogaki. 2013. *Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy*. Springer. Doi: 10.1007/978-1-4614-4693-4.

Binder, A., J. Lambert, R. Morbitzer, C. Popp, T. Ott, T. Lahaye, M. Parniske. 2014. A Modular Plasmid Assembly Kit for Multigene Expression, Gene Silencing and Silencing Rescue in Plants. *PLoS ONE*. 9(2):e88218.

Boavida, L.C., B. Shuai, H. Yu, G.C. Pagnussat, V. Sundaresan, S. McCormick. 2009. A Collection of Ds Insertional Mutants Associated with Defects in Male Gametophyte Development and Function in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*. 181:1369–1385.

Bologna, N.G., O. Voinnet, O. 2014. The diversity, Biogenesis, and Activities of Endogenous Silencing Small RNAs in *Arabidopsis*. *Annu. Rev. Plant Biol.* 65(28):1-31.

Bourdenx, B., A. Bernard, F. Domergue, S. Pascal, A. Léger, D. Roby, M. Pervent, D. Vile, R.P. Haslam, J.A. Napier, R. Lessire, J. Joubès. 2011. Overexpression of *Arabidopsis* ECERIFERUM1 promotes wax very-long-chain alkane biosynthesis and influences plant response to biotic and abiotic stresses. *Plant Physiol.* 156:29-45.

Brown, R.C., B.E. Lemmon. 2007. *The Developmental Biology of Cereal Endosperm*. O.-A. Olsen: Endosperm. *The Plant Cell Monogr* 8:1-20

Bullant, C., A. Gallais. 1998. Xenia Effects in Maize with Normal Endosperm: I. Importance and Stability. *Crop Sci.* 38:1517-1525.

Burson, B.L. 1987. Pollen germination, pollen tube growth and fertilization following self and interspecific pollination of *Paspalum* species. *Euphytica*, 36:641–650.

Burton, G.W. 1948. The method of reproduction in common Bahia grass, *Paspalum notatum*. *Journal of American Society of Agronomy*. 40:443–452.

Burton, G.W. 1955. Breeding pensacola bahiagrass, *Paspalum notatum*: I. Method of reproduction. *Agron. J.* 47:311-314.

Chaudhury, A.M., A. Koltunow, T. Payne, M. Luo, M.R. Tucker, E.S. Dennis, W.J. Peacock. 2001. Control of early seed development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17:677-699.

Ciceri, P., F. Locatelli, A. Genga, A. Viotti, R.J. Schmidt. 1999. The activity of the maize Opaque2 transcriptional activator is regulated diurnally. *Plant Physiol.* 121:1321–1328.

Clough, S.J., A.F. Bent. 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*. 16 (6):735-743

Czechowski, T., M. Stitt, T. Altmann, M.K. Udvardi, W. Scheible. 2005. Genome-Wide Identification and Testing of Superior Reference Genes for Transcript Normalization in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 139 (1):5-17.

Dag, A., Y. Mizrahi. 2005. Effect of pollination method on fruit set and fruit characteristics in the vine cactus *Selenicereus megalanthus* ('yellow pitaya'). *J. Hort. Sci. Biotechnol.* 80:618–622.

Dandekar, A.M., G. Teo, B.G. Defilippi, S.L. Uratsu, A.J. Passey, A.A. Kader, J.R. Stow, R.J. Colgan, D.J. James. 2004. Effect of down-regulation of ethylene biosynthesis on fruit flavor complex in apple fruit. *Transgenic Research*. 13:373-384.

Darwin, C. 1868. *The variation of animals and plants under domestication*. JohnMurray, London, UK.

Das, P., N.C. Joshi. 2011. Minor modifications in obtainable Arabidopsis floral dip method enhances transformation efficiency and production of homozygous transgenic lines harboring a single copy of transgene. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 2:59-67

Demetriou, K., A. Kapazoglou, A. Tondelli, E. Francia, M. A. Stanca, K. Bladenopoulos, A.S. Tsaftaris. 2009. Epigenetic chromatin modifiers in barley: I. Cloning, mapping and expression analysis of the plant specific HD2 family of histone deacetylases from barley, during seed development and after hormonal treatment *Physiologia Plantarum*, 136:358–368.

Denney, J.O. 1992. Xenia Includes Metaxenia. *HortScience*, 27:722-728.

Dennis, M.D., K.S. Browning. 2009. Differential Phosphorylation of Plant Translation Initiation Factors by *Arabidopsis thaliana* CK2 Holoenzymes. *JBC*, 284 (31): 20602–20614.

Depetris, M.B., C.A. Acuña, F.I. Pozzi, C.L. Quarín, S.A. Felitti. 2018. Identification of Genes Related to Endosperm Balance Number Insensitivity in *Paspalum notatum*. *Crop Sci.* doi: 10.2135/cropsci2017.04.0260.

Di Rienzo J.A., F. Casanoves, M.G. Balzarini, L. Gonzalez, M. Tablada, C.W. Robledo. 2016. InfoStat. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

Dogterom, M.H., M.L. Winston, A. Mukai. 2000. Effect of pollen load size and source (self, outcross) on seed and fruit production in highbush blueberry cv. 'Bluecrop' (*VACCINIUM CORYMBOSUM*; Ericaceae). *Am J Bot.* 87:1584-1591.

Dwivedi S.L., E. Perotti, H.D. Upadhyaya, R. Ortiz. 2010. Sexual and apomictic plant reproduction in the genomics era: exploring the mechanisms potentially useful in crop plants. *Sex. Plant Reprod.* 23:265-279.

Felitti, S.A., C.A. Acuña, J.P.A Ortiz, C.L. Quarín. 2015. Transcriptome analysis of seed development in apomictic *Paspalum notatum*. *Ann. Appl. Biol.* doi:10.1111/aab.12206.

Finkelstein, R.R., S.S.L. Gampala, C.D. Rock. 2002. Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *The Plant Cell* 14:S15–S45.

Flachowsky, H., I. Szankowski, S. Waidmann, A. Peil, C. Tränkner, M. Hanke. 2012. The MdTFL1 gene of apple (*Malus × domestica* Borkh.) reduces vegetative growth and generation time. *Tree Physiology*. 32:1288–1301.

García D., J.N. Fitzgerald, F. Berger. 2005. Maternal control of integument cell elongation and zygotic control of endosperm growth are coordinated to determinate seed size in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 17:52-60.

Gates R.N., C.L. Quarin, C.G.S. Pedreira. 2004. Bahiagrass. In: Warm-season (C4) grasses Eds. LE. Moser, B.L. Burson, and L.E. Sollenberger. *Agron. Monogr.* 45. ASA, CSSA, SSSA, Madison, WI. 651-680.

Gilissen, L.J.W.J., S.T.H. Bolhaar, C.I. Matos, G.J.A. Rouwendal, M.J. Boone, F.A. Krens, L. Zuidmeer, A. Van Leeuwen, J. Akkerdaas, K. Hoffmann-Sommergruber, A.C. Knulst, D. Bosch, W.E. Van De Weg, R. Van Ree. 2005. Silencing of the major apple allergen Mal 1 by using RNA interference approach. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 115:364-369.

Grasser, K.D., U.G. Maier, G. Feix. 1989. A nuclear casein type II kinase from maize endosperm phosphorylating HMG proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 162:456–463.

Grimanelli D., M. Hernández, E. Perotti, Y. Savidan. 1997. Dosage effects in the endosperm of diplosporous apomictic *Tripsacum* (Poaceae). *Sex. Plant Reprod.* 10:279-282.

Grimanelli D., O. Leblanc, E. Perotti, U. Grossniklaus. 2001. Developmental genetics of gametophytic apomixis. *Trends in Genetics*. 17:597-604.

Guo W., T.D. Ho. 2008. An ABA-Induced Protein HVA22 Inhibits GA-Mediated Programmed Cell Death in Cereal Aleurone Cells. *Plant Physiol.* 147:1710-1722.

Hajduch, M., L.B. Hearne, J.A. Miernyk, J.E. Casteel, T. Joshi, G.K. Agrawal, Z. Song, M. Zhou, D. Xu, J.J. Thelen. 2010. Systems Analysis of Seed Filling in Arabidopsis: Using General Linear Modeling to Assess Concordance of Transcript and Protein Expression. *Plant Physiol.* 152:2078-87.

Hake, S. 2003. MicroRNAs: A Role in Plant Development. *Current Biology.* 13(21):851-852.

Hanna, W.W., E.C. Bashaw. 1987. Apomixis: Its Identification and Use in Plant Breeding. *Crop Sci.* 27:1136-1139.

Helliwell, C., P. Waterhouse. 2003. Constructs and methods for high-throughput gene silencing in plants. *Methods.* 30:289–295.

Hu, W., S.A. Harding, J. Lung, J.L. Popko, J. Ralph, D.D. Stokke, C. Tsai, V.L. Chiang. 1999. Repression of lignin biosynthesis promotes cellulose accumulation and growth in transgenic trees. *Nature Biotechnology.* 17:808-812.

Johnston, S.A., T.P.M. den Nijs, S.J. Peloquin, R.E. Hanneman. 1980. The significance of genetic balance to endosperm development in interspecific crosses. *Theor. Appl. Genet.* 57:5-9.

Kaczmarek, J., H. Bujak, W. Kadłubiec, L. Grochowski, R. Galek. 2001. Analysis of xenia in F1 seeds of yellow-grain winter-rye lines. *Plant Breeding and Seed Science.* 45:4-10.

Kemper, E.L., G.C. Neto, F. Papes, K.C. Moraes, A. Leite, P. Arruda. 1999. The role of Opaque2 in the control of lysine-degrading activities in developing maize endosperm. *The Plant Cell.* 11:1981–1994.

Kim, M., W. Canio, S. Kessler, N. Sinha. 2001. Developmental changes due to long-distance movement of a homeobox fusion transcript in tomato. *Science.* 293:287–289.

Kindiger, B., D. Bai, V. Sokolov. 1996. Assignment of a gene(s) conferring apomixis in *Tripsacum* to a chromosome arm: cytological and molecular evidence. *Genome.* 39:1133-1141.

Koltunow A.M. 1993. Apomixis: embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. *The Plant Cell*. 5:1425-1437.

Koltunow, A.M. R.A. Bicknell, A.M. Chaudhury. 1995. Apomixis: molecular strategies for the generation of genetically identical seeds without fertilisation. *Plant Physiol*. 108:1345-1352.

Koltunow A.M. P. Ozias-Akins, I. Siddiqi. 2013. Apomixis. In: *Seed Genomics*, 1st edition. Ed. Philip W. Bercraft. Wiley and Sons, New York. 5:83-110.

Kotak, S., E. Vierling, H. Baumlein, P. von Koskull-Dring. 2007. A Novel Transcriptional Cascade Regulating Expression of Heat Stress Proteins during Seed Development of *Arabidopsis* *The Plant Cell*. 19:182–195.

Kudo, H., T. Harada. 2007. A graft-transmissible RNA from tomato rootstock changes leaf morphology of potato scion. *HortScience*. 42:225–226.

Lalanne, E., D. Honys, A. Johnson, G. Borner, K. Lilley, P. Dupree, U. Grossniklaus, D. Twell. 2004. SETH1 and SETH2, Two Components of the Glycosylphosphatidylinositol Anchor Biosynthetic Pathway, Are Required for Pollen Germination and Tube Growth in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 16:229–240.

Lapierre, C., B. Pollet, M. Petit-conil, G. Toval, J. Romero, G. Pilate, J. Leplé, W. Boerjan, V. Ferret, V. De Nadai, L. Jouanin. 1999. Structural alterations of lignins in transgenic poplars with depressed cinnamyl alcohol dehydrogenase or caffeic acid O-methyltransferase activity have an opposite impact on the efficiency of industrial kraft pulping. *Plant Physiol*. 119:153-164.

Łebska, M., A. Ciesielski, L. Szymona, L. Godecka, E. Lewandowska-Gnatowska, J. Szczegieliński, G. Muszyńska. 2010. Phosphorylation of maize eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) by casein kinase 2: Identification of phosphorylated residue and influence on intracellular localization of eIF5A. *J. Biol. Chem*. 285:6217–6226.

Lee, K., O. Park, S. Jung, P.I. Seo. 2016. Histone deacetylation-mediated cellular dedifferentiation in *Arabidopsis*. *Journal of Plant Physiol.* 191:95–100.

Lersten, N. R., J.D. Curtis. 1988. Secretory reservoirs (ducts) of two kinds in giant ragweed (*Ambrosia trifida*; Asteraceae). *Am. J. Bot.* 75(1): 1313-1323.

Levitus, G. V. Echenique, C. Rubinstein, E. Hopp, L. Mroginski. 2010. Capítulo 7: Usos del silenciamiento génico para el análisis funcional de genes candidatos. C. Vázquez Rovere, A. Bazzini, C. Rodríguez, N. Almasia, S. Asurmendi. En: *Biología y Mejoramiento Vegetal II*. Ed. INTA. 259-270.

Liu, Y. 2008. A Novel Mechanism for Xenia? *HortScience* 43:706.

Livak K.; T.D. Schmittgen. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method. *Methods* 25:402–408

Mansfield, S.G., L.G. Briarty. 1991. Early embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. II. The developing embryo. *Canadian Journal of Botany.* 69:461-476.

Martínez, E.J., H.E. Hopp, J. Stein, J.P.A. Ortiz, C.L. Quarín. 2003. Genetic characterization of apospory in tetraploid *Paspalum notatum* based on the identification of linked molecular markers. *Mol. Breed.* 12:319-327.

Martínez E.J., M.H. Urbani, C.L. Quarín, J.P.A. Ortiz. 2001. Inheritance of apospory in bahiagrass, *Paspalum notatum*. *Hereditas.* 135:9-25.

McMeniman, S.G. Lubulwa. 1997. Internal Report (Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra). 1-26.

Missbach, S., B.L. Weis, R. Martin, S. Simm, M.T. Bohnsack. 2013. 40S Ribosome Biogenesis Co-Factors Are Essential for Gametophyte and Embryo Development. *PLoS ONE*. doi:10.1371/journal.pone.0054084.

Nguyen, H.N., P.A. Sabelli, B.A. Larkins. 2007. Endoreduplication and Programmed Cell Death in the Cereal Endosperm. *The Plant Cell Monographs (Endosperm)*. 8:21-43.

Nogler G.A. 1984. Gametophytic apomixis. *Embryology of angiosperms*. Springer-Verlag: Berlin. 475-518.

Norrmann, G.A., O.A. Bovo, L. Camilo. 1994. Quarin Post-zygotic Seed Abortion in Sexual Diploid x Apomictic Tetraploid Intraspecific *Paspalum* Crosses. *Aust. J. Bot.* 42:449-456.

Nowack M.K., P.E. Grini, M.J. Jakoby, M. Lafos M, C. Koncz, A. Schnittger. 2006). A positive signal from the fertilization of the egg cell sets off endosperm proliferation in angiosperm embryogenesis. *Nat. Genet.* 38:63-67.

Ortiz J.P., C.L. Quarin, S.C. Pessino, C.A. Acuña, E.J. Martínez, F. Espinoza, D.H. Hojsgaard, M.E. Sartor, M-E. Cáceres, F. Pupilli. 2013. Harnessing apomictic reproduction in grasses: what we have learned from *Paspalum*. *Ann Bot.* 112(5):767-8.

Ozias- Akins, P., P.J. van Dijk. 2007. Mendelian genetics of apomixis in plants. *Ann. Rev. Genet.* 41:509-537. Petrov, D.F., N.I. Belousova, E.S. Fokina. 1979. Inheritance of apomixis and its elements in corn-Tripsacum hybrids. *Genetika.* 15:1827-1836.

Piotto, F.A., K.D. Batagin-Piotto, M. AlmeidaI, G.C.X. Oliveira. 2013. Interspecific xenia and metaxenia in seeds and fruits of tomato. *Sci. Agric.* 70:102-107.

Pfaffl, M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research.* 29 (9):2003-2007.

Pfaffl, N.W., A. Tichopad, C. Prgomet, T. Neuvians. 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: Best-Keeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol. Lett.* 26:509-515.

Preuss, D., B. Lemieux, G. Yen, R.W. Davis. 1993. A conditional sterile mutation eliminates surface components from *Arabidopsis* pollen and disrupts cell signaling during fertilization. *Genes Dev.* 7:974-85.

Pozzobon, M.T., J.F.M. Valls. 1997. Chromosome number in germoplasma accessions of *Paspalum notatum* (Gramineae). *Braz. J. Genetics.* 20:29-34.

Pupilli, F., G. Barcaccia. 2012. Cloning plants by seeds: inheritance models and candidate genes to increase fundamental knowledge for engineering apomixis in sexual crops. *Journal of Biotech.* 159:291-311.

Quarin, C.L. 1999. Effect of pollen source and pollen ploidy on endosperm formation and seed set in pseudogamous apomictic *Paspalum notatum*. *Sexual Plant Reproduction.* 11:331–335.

Rieger, R., A. Michaelis, M.M. Green. 1968. *A Glossary of Genetics and Cytogenetics: Classical and Molecular.* 3rd ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Sabelli, P.A., B.A. Larkins. 2009. The Development of Endosperm in Grasses. *Plant Physiol.* 149:14–26.

Savidan, Y. 2000. Apomixis: Genetics and Breeding. In: *Plant Breeding Reviews*, volume 18. Ed. J. Janick. John Wiley & Sons, Inc. London.

Savidan, Y, J.G. Carman, T. Dresselhaus. 2001. *The Flowering of Apomixis: From Mechanisms to Genetic Engineering.* Mexico, D.E: CIMMYT, IRD, European Commission OC VI. ISBN: 970-648-074-9.

Salas-Muñoz, S., A.A. Rodríguez-Hernández, M.A, Ortega-Amaro, F.B. Salazar-Badillo, J.F. Jiménez-Bremont. 2016. *Arabidopsis* AtDJA3 Null Mutant Shows Increased Sensitivity to Abscisic Acid, Salt, and Osmotic Stress in Germination and Post-germination Stages. *Front Plant Sci.* doi: 10.3389/fpls.2016.00220.

Scorza, R., A. Callahn, L. Levy, V. Damsteegt, K. Webb, M. Ravelonandro. 2001. Post-transcriptional gene silencing in plum pox virus resistant European plum containing the plum pox potyvirus coat protein gene. *Transgenic Research*. 10:201-209.

Sijen, T., I. Vijn, A. Rebocho, R. Van Blokland, D. Roelofs, J. Mol, J.M. Kooter. 2000. Transcriptional and posttranscriptional gene silencing are mechanistically related. *Current Biology*. 11(6):436-440.

Simon P. 2003. Q-Gene: processing quantitative real-time RT-PCR data. *Bioinformatics*. 19: 1439-1440.

Spillane, C., M.D. Curtis, U. Grossniklaus. 2004. Apomixis technology development-virgin births in farmers' fields? *Nat. Biotechnol*. 22:687-691.

Souza, A. J., B.M. Januzzi Mendes, F.A. Alves Mourão Filho. 2007. Gene Silencing: Concepts, Applications and perspectives in woody plants. *Rev. Sci. Agric*. 64(6): 645-656.

Stein, J., C.L. Quarín C.L., E.J. Martínez, S.C. Pessino S.C., J.P.A. Ortiz J.P.A. 2004. Tetraploid races of *Paspalum notatum* show polysomic inheritance and preferential chromosome pairing around the apospory-controlling locus. *Theor. Appl. Genet*. 109:186-191.

Stein, J., S.C. Pessino, E.J. Martinez, M.P. Rodríguez, L.A. Siena, C.L. Quarín, J.P.A. Ortiz. 2007. A genetic map of tetraploid *Paspalum notatum* Flüggé. (bahiagrass) based on single-dose molecular markers. *Mol. Breeding*. 20:153-166.

Stölting, K.N., G. Gort, C. Wüst, A.B. Wilson. 2009. Eukaryotic transcriptomics in silico: optimizing cDNA-AFLP efficiency. *BMC Genomics*. 10:565-579.

Swingle, W.T. 1928. Metaxenia in the date palm-Possibly a hormone action by the embryo or endosperm. *J. Hered*. 19:257-268.

Thieme, C., M. Rojas-Triana, E. Stecyk, C. Schudoma, W. Zhang, L. Yang, M. Miñambres, D. Walther, W Schulze, J. Paz-Ares. 2015. Endogenous *Arabidopsis* messenger RNAs transported to distant tissues. *Nature Plants*. 1:e15025.

Tischler, C.R., B.L. Burson. 1995. Evaluating different bahiagrass cytotypes for heat tolerance and leaf epicuticular wax content. *Euphy*. 84:229-235.

Tiwari, M., D. Sharma, P.K. Trivedi. 2014. Artificial microRNA mediated gene silencing in plants: progress and perspectives. *Plant Mol Biol*. 86:1–18

Toujani, W., J. Muñoz-Bertomeu, M. Flores-Tornero, S. Rosa-Téllez, A. Djoro Anoman, R. Ros. 2013. Identification of the phosphoglycerate dehydrogenase isoform EDA9 as the essential gene for embryo and male gametophyte development in *Arabidopsis*. *Plant Signaling & Behavior*, 8(11):e27207.

Tucker, M.R., A.M.G. Koltunow. 2009. Sexual and asexual (apomictic) seed development in flowering plants: molecular, morphological and evolutionary relationships. *Functional Plant Biol*. 36:490-504.

Velásquez, A.C., S. Chakravarthy, G.B. Martin. 2009. Virus-induced Gene Silencing (VIGS) in *Nicotiana benthamiana* and Tomato. *J Vis Exp*. 28:1292.

Vielle-Calzada, J-P., C.F. Crane, D.M. Stelly. 1996. Apomixis: The Asexual Revolution. *Science*. 274:1322-1323.

Vilela, B., M. Pagès, M. Riera. 2015. Emerging roles of protein kinase CK2 in abscisic acid signaling. *Front. Plant Sci*. 6:1–9.

Voiniciuc, C., M. Günl, M.H. Schmidt, B. Usadel. 2015. Highly Branched Xylan Made by IRREGULAR XYLEM14 and MUCILAGE-RELATED21 Links Mucilage to *Arabidopsis* Seeds. *Plant Physiol*. 169:2481-95.

Vuylsteke, M., J.D. Peleman, M.J.T. van Eijk. 2007. AFLPbased transcript profiling (cDNA-AFLP) for genome-wide expression analysis. *Nature Protocols*. 2:1399–1413.

Wang, K. 2006. *Agrobacterium protocols*. 2nd ed. Ed. Humana Press. 1:1-508.

Wang, Y., H. Chang, S. Hu, X. Lu, C. Yuan, C. Zhang. 2014. Plastid casein kinase 2 knockout reduces abscisic acid (ABA) sensitivity, thermotolerance, and expression of ABA- and heat-stress-responsive nuclear genes. *J. Exp. Bot.* 65:4159–4175.

Wang, H., L.C. Boavida, M. Ron, S. McCormick. 2008a. Truncation of a Protein Disulfide Isomerase, PDIL2-1, Delays Embryo Sac Maturation and Disrupts Pollen Tube Guidance in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*. 20:3300–3311.

Wang, Z.J., J.Q. Huang, Y.J. Huang, B. Zhang, B.S. Zheng. 2013. Study on Pollination Characteristics and Hybrid Offspring Analysis on Hickory (*Carya cathayensis*), *Advanced Materials Research*. 610:3289-3297.

Wang, Y., W. Zhang, L. Song, J. Zou, Z. Su, W. Wu. 2008b. Transcriptome Analyses Show Changes in Gene Expression to Accompany Pollen Germination and Tube Growth in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 148:1201–1211.

Weingartner, U., O. Kaeser, M. Long, P. Stamp. 2002. Combining Cytoplasmic Male Sterility and Xenia Increases Grain Yield of Maize Hybrids. *Crop Sci.* 42:1848–1856.

Xiao, X., H. Li, C. Tang. 2009. A silver-staining cDNA-AFLP protocol suitable for transcript profiling in the latex of *Hevea brasiliensis* (Para Rubber Tree). *Molecular Biotechnology*. 42:91–99.

Yano, R., Y. Takebayashi, E. Nambara, Y. Kamiya, M. Seo. 2013. Combining association mapping and transcriptomics identify HD2B histone deacetylase as a genetic factor associated with seed dormancy in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 74:815-828.

Zhang, J., Q. Huang, S. Zhong, A. Bleckmann, J. Huang, X. Guo, Q. Lin, H. Gu, J. Dong, T. Dresselhaus, L.J. Qu. 2017. Sperm cells are passive cargo of the pollen tube in plant fertilization. *Natura Plants*, 3:17079-17083.

Zhang, G., P. Lomba, F. Altpeter. 2007. Improved turf quality of transgenic bahiagrass (*Paspalum notatum* Fluggè) constitutively expressing the ATHB16 gene, a repressor of cell expansion. *Mol. Breeding*. 20:415-423.

Zhu, X., S. Pattathilb, K. Mazumderb, A. Brehmb, M.G. Hahn, S. P. Dinesh-Kumard, C. Josh. 2010. Virus-Induced Gene Silencing Offers a Functional Genomics Platform for Studying Plant Cell Wall Formation. *Molecular Plant*. 3(5):818–833.

Zuloaga, F.O., O. Morrone. 2005. Revisión de las especies de *Paspalum* para América del Sur Austral (Argentina, Bolivia, Sur de Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay). *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard*. 102:1-297.