



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

FACULTAD DE CIENCIAS BIOQUIMICAS Y FARMACEUTICAS

UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO

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

LIC. JULIANA STEIN

TESIS PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLOGICAS

DIRECTORES: DR. JUAN PABLO A. ORTIZ

DRA. SILVINA C. PESSINO

ROSARIO - ARGENTINA

2006



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

Juliana Stein

Licenciada en Biotecnología – UNR

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido previamente presentada para la obtención de otro título en ésta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en los Laboratorios de Fisiología Vegetal y Biología Molecular, dependientes de la Facultad de Ciencias Agrarias – UNR, y en el Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE), Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Nordeste (UNNE), durante el período comprendido entre agosto de 2001 y febrero de 2006, bajo la dirección del Dr. Juan Pablo A. Ortiz y la Dra. Silvina C. Pessino.

Dr. Juan Pablo A. Ortiz

Dra. Silvina C. Pessino.....

.....

.....

.....

Defendida:de 2006.

Agradecimientos

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

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

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

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

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

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

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

A todos, MUCHAS GRACIAS.

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

Artículos en revistas

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

Stein J, Quarin CL, Martínez EJ, Pessino SC and Ortiz JPA (2004) Tetraploid races of *Paspalum notatum* show polysomic inheritance and preferential chromosome pairing around the apospory-controlling locus. *Theoretical and Applied Genetics*, 109: 186-191.

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

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

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

Presentaciones a Congresos y Reuniones Científicas

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

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

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

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

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

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

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

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

INDICE

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

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

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

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

ABREVIATURAS, SIMBOLOS Y ANGLICISMOS

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario

ADS: alelos en dosis simple

ADD: alelos en dosis doble

AFLP: polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados

AgNO₃: nitrato de plata

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

ARNasa: ribonucleasa

BSA: albúmina sérica bovina 1- acetilada

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

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

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

CTAB: bromuro de cetiltrimetil amonio

°C: grados centígrados

HCl: ácido clorhídrico

H₂O_d: agua destilada

DIC: contraste de interferencia diferencial

Dig-dUTP: desoxiuridin trifosfato-digoxigenina

dNTPs: desoxinucleótidos trifosfato

DTT: ditioneitol

EDTA: ácido etilendiamino-tetracético

BrEt: bromuro de etidio

F₁: primera generación en un cruzamiento

gl: grados de libertad

gr/l: gramos por litro

KAc: acetato de potasio

M: molar

mA: miliamperes

mg: miligramo

mg/l: miligramos por litro

MgAc: acetato de magnesio

MgCl₂: cloruro de magnesio

ml: mililitro

mM : milimolar

N: normal

n: número cromosómico haploide de una especie

2n : número cromosómico diploide de una especie

NaOH: hidróxido de sodio

NaCl: cloruro de sodio

ng: nanogramos

NH₄OAc: acetato de amonio

nm: nanómetro ($1 \cdot 10^{-6}$ m)

PCR: reacción en cadena de la ADN polimerasa

pb: pares de bases

RAPD: polimorfismos por amplificación al azar del ADN

RFLP: polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción

SDS: sulfato de dodecil sódico

SSC: cloruro de sodio-citrato de sodio

TAE: Tris-ácido acético-EDTA

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

TBE: Tris-ácido bórico-EDTA

TE: Tris-EDTA

Tris: N-Tris-(hidoximetil)-aminoetano

U: unidad de actividad enzimática

UBC: Universidad de la Columbia Británica

µg: microgramos ($1 \cdot 10^{-6}$ g)

µl: microlitro ($1 \cdot 10^{-6}$ l)

UV: ultravioleta

V: voltios

W: wats

x: número cromosómico básico de una especie

χ²: prueba de bondad de ajuste

RESUMEN

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

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

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

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

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

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

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

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

I- INTRODUCCION

I.1- El género *Paspalum*

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

I.1.3.1- *Conceptos generales sobre poliploidía*

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

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

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

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

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

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

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

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

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

enteros (Lacadena 1988).

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

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

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

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

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

I.2- Apomixis

I.2.1- Definición del término apomixis

La apomixis es un modo de reproducción asexual (agámica), por semillas, que conduce a la generación de progenies genéticamente idénticas a la planta madre (Nogler 1984a). El término apomixis deriva del griego “apo” que significa falta o ausencia, y “mixis” que significa unión o mezcla, haciendo referencia a la falta de unión de gametas de origen sexual. La apomixis fue descrita por primera vez en 1841 en la planta australiana *Alchornea ilicifolia* por J. Smith cuando un ejemplar femenino de esta especie dioica (llevado a los Kew Gardens de Londres desde Asia) creciendo en forma aislada floreció y produjo semillas en abundancia. Paradójicamente, los primeros experimentos con plantas apomícticas fueron realizados en forma involuntaria por Gregor Mendel, quien utilizó cruces entre especies del género *Hieracium* para intentar confirmar los resultados obtenidos con sus famosos estudios sobre la herencia de arvejas de jardín. Mendel describió la curiosa situación de que en sus experimentos obtenía progenies F₁ segregantes y numerosas F₂ no segregantes. El investigador atribuyó erróneamente la falta de segregación observada en estas poblaciones a una “frecuente autopolinización”. Hoy se sabe que muchas especies de este género son apomícticas (Asker y Jerling 1992).

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

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

1.2.2- El proceso sexual

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

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

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

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

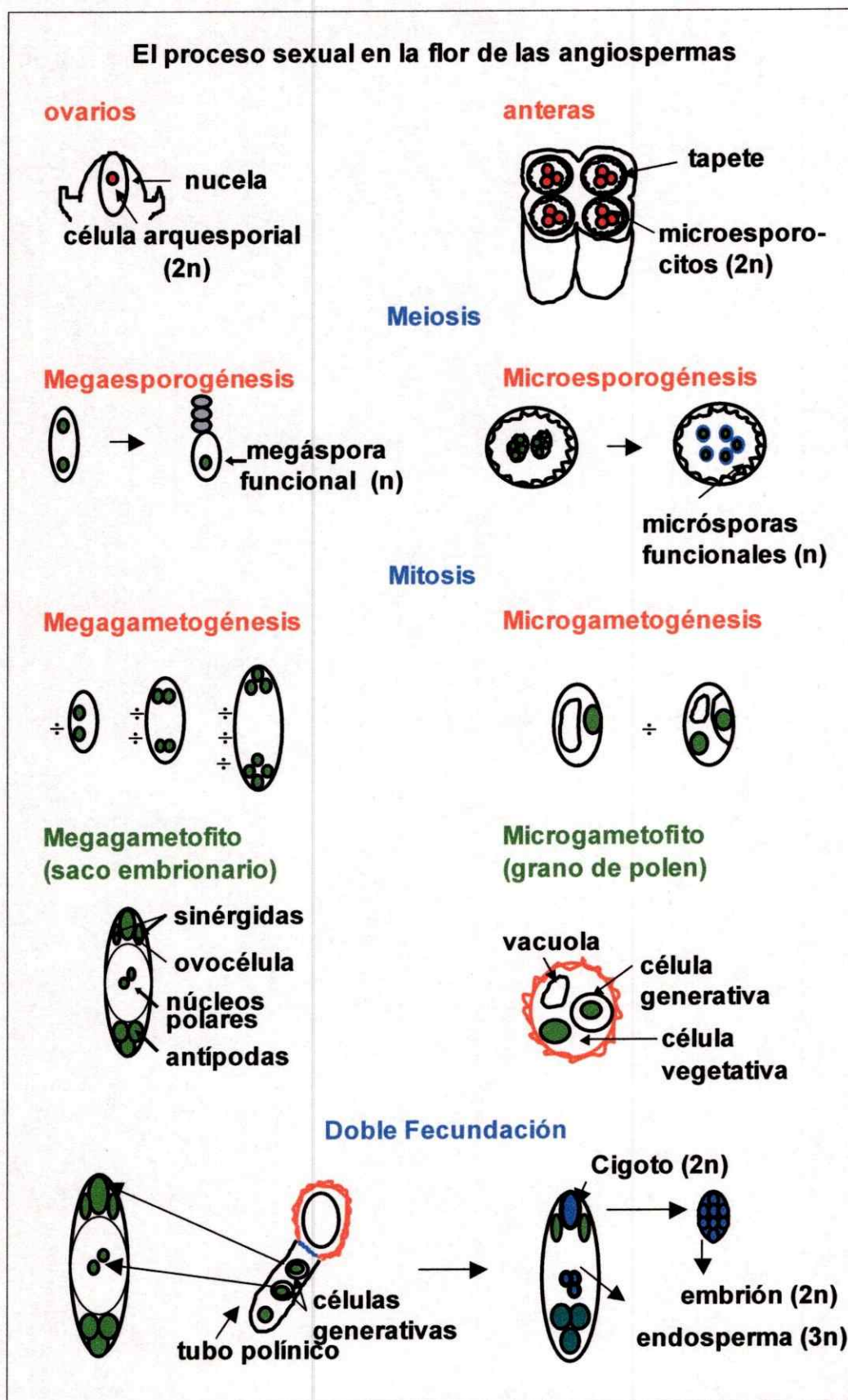


Figura2: esquema mostrando el proceso de reproducción sexual en una planta angiosperma: desarrollo de un saco embrionario de tipo *Polygonum* en el ovario, formación de los granos de polen en las anteras, doble fecundación y desarrollo del embrión. ÷: indican números de divisiones mitóticas.

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

1.2.3- Diferentes tipos de apomixis

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

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

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

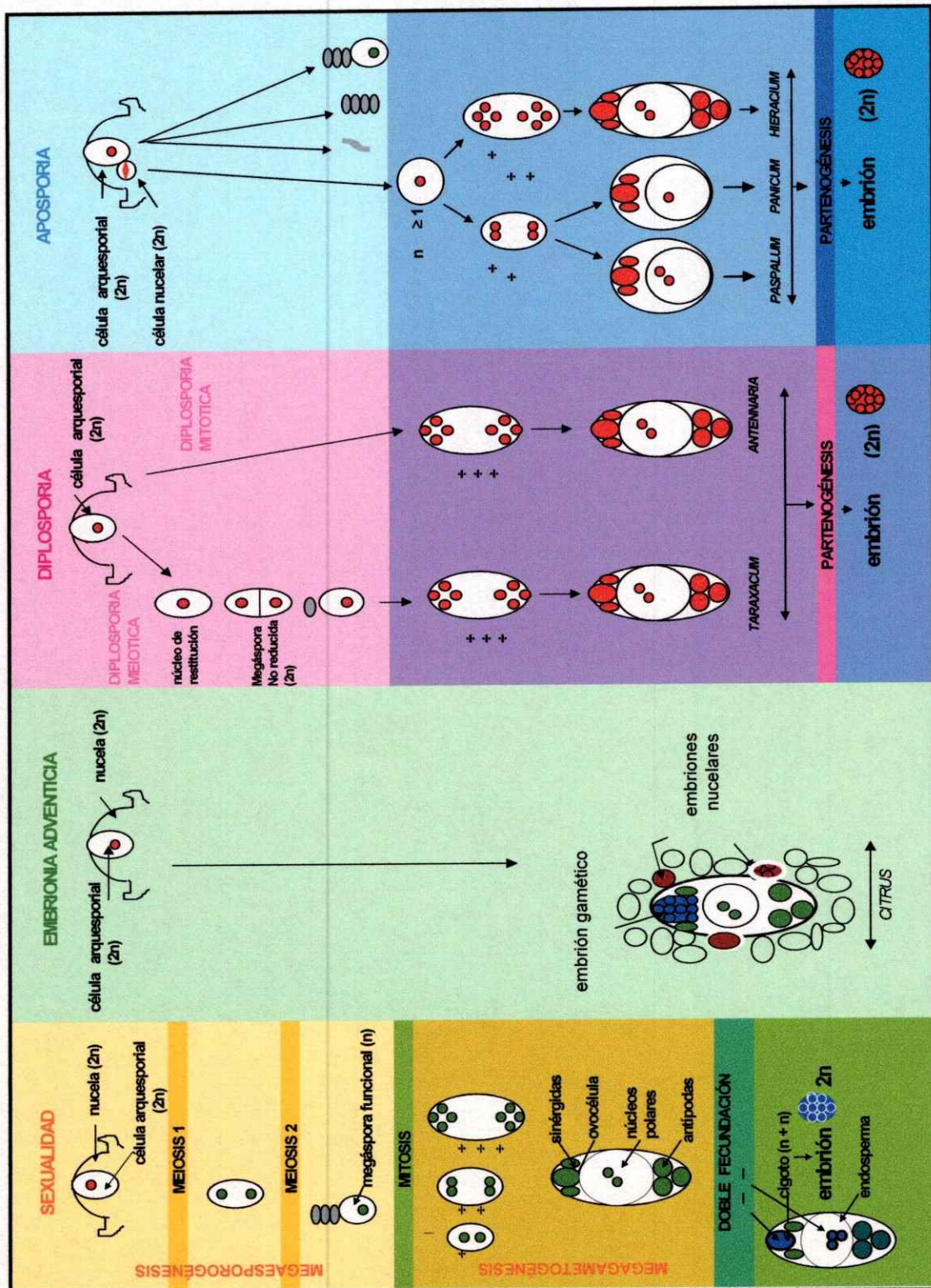


Figura 3: esquema mostrando una comparación de los modos de reproducción sexual y apomíctico. Dentro de la apomixis se distinguen la ruta esporfítica (embriónia adventicia) y la ruta gametofítica (diplosporia y aposporia). +: indica número de divisiones mitóticas.

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

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

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

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

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

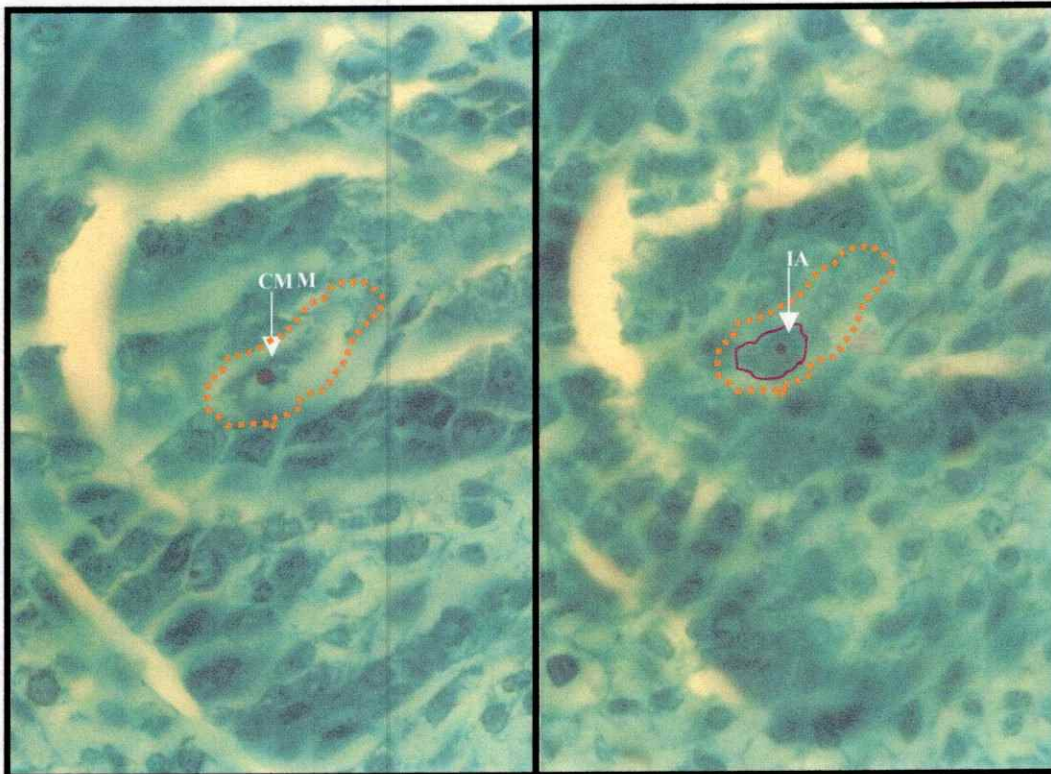


Figura 4: fotografía tomada al microscopio óptico de dos cortes consecutivos de un óvulo de *Paspalum notatum* apomíctico en estado muy joven (antes de la meiosis femenina), teñido con safranina-fast green. En el corte de la izquierda se ve la célula madre de la megáspora (CMM) completa, con su típica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

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

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

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

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

1.2.4- Rasgos distintivos del carácter apomixis

1.2.4.1- Apomixis y sexualidad

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

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

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

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

1.2.4.2- Apomixis y poliploidía

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

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

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

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

1.2.4.3- Apomixis y desarrollo del endosperma

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

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

1.2.4.4- Apomixis e "imprinting" genómico

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

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

1.2.4.5- *Apomixis vs. embriogénesis somática*

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

1.2.5- *Importancia agronómica de la apomixis*

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

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

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

1.2.6- Transferencia del carácter apomixis a especies de interés agronómico

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

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

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

Los primeros experimentos dirigidos a introducir la apomixis a través de cruza fueron realizadas cerca de 40 años atrás por D.F. Petrov, quien realizó hibridaciones de razas tetraploides de maíz y *Tripsacum dactyloides* (que presenta apomixis de tipo diplospórica) (Petrov et al. 1979). Posteriormente otros grupos de investigación obtuvieron híbridos interespecíficos de maíz-*Tripsacum* que se reproducen por apomixis (Kidinger et al. 1996, Savidan 2000). Sin embargo, como los híbridos obtenidos luego de una serie de retrocruzas son completamente machoestériles, el progreso en la recuperación del genoma de maíz está fuertemente asociado con la posibilidad de generar al menos algunos individuos con sacos embrionarios meióticos. Una dificultad adicional es el fuerte requerimiento de una relación 2:1 en el número de genomas haploides maternos y paternos que contribuyen a la formación del endosperma. Estos problemas han demorado el progreso de la introducción de la apomixis en maíz en los últimos años y constituyen el obstáculo más importante que presenta esta estrategia. En cambio, la apomixis ha sido transferida exitosamente al mijo por un programa de mejoramiento iniciado al final de los 70 y que es considerado el más avanzado de su clase (Hanna et al. 1993). Se han obtenido individuos apomícticos parcialmente macho fértiles pero

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

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

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

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

1.2.7- *La apomixis en Paspalum notatum*

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



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

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

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

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

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

I.3- Control genético de la apomixis

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.3.2- Rol funcional de la poliploidía

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

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

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

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

1.3.3- Caracterización molecular de la apomixis

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

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

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

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

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

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

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

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

I.4- Mapas de ligamiento genético

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Una vez elegidos los progenitores, las poblaciones de mapeo más simples para monitorear las frecuencias de recombinación entre pares de marcadores son aquellas generaciones derivadas de una F₁ clásica ya que solo dos alelos están segregando por *locus* y la distribución de los mismos en los cromosomas parentales (fase de ligamiento) es conocida o puede determinarse con relativa facilidad. Las poblaciones más usadas son F₂, retrocruzas (BC), líneas recombinantes endocriadas (RILs) y líneas doble haploides (DH), siendo las F₂ completamente clasificadas las más informativas (Kearsey y Pooni 1996). Las fórmulas

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.4.3- Mapeo en poliploides

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

I.4.4- Mapeo comparativo

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

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

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

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

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

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

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

II- OBJETIVOS

II.1- Objetivo general

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

II.2- Objetivos específicos

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

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

III- MATERIALES Y METODOS

III.1- Material vegetal

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

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

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

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

III.2- Observaciones citoembriológicas

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

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

III.3- Análisis citogenético

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

III.4- Estudios de viabilidad de granos de polen

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

III.5- Extracción de ADN

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

III.6- Generación de marcadores moleculares

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

Las reacciones de amplificación para obtener los marcadores de RAPD (Williams et al. 1990) se realizaron según lo descrito por Martínez et al. (2003) en un volumen final de 25 μ l conteniendo 20 ng de ADN, 30 ng de cebador, buffer de PCR 1X (Promega), $MgCl_2$ 1,5 mM, dNTPs 100 μ M y Taq polimerasa 1U (Promega), en al menos dos experimentos independientes. Las condiciones de reacción consistieron en una etapa inicial de desnaturalización de 1 min a 93 °C seguida de 45 ciclos de 1 min a 93° C, 1 min a 36 °C, 2 min a 72 °C y 5 min finales de elongación a 72 °C. Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador MJ Research, Inc. PTC-100 Programmable Thermal Controller. Los productos de PCR fueron suplementados con 5 μ l de buffer de siembra (sacarosa 40%, azul de bromofenol 0,25 % p/v) y resueltos en geles de agarosa al 2 % p/v en TAE 1X. Luego de 4 horas de electroforesis a 40 V, los geles se tñieron con solución de bromuro de etidio (10 μ g/ml) y se visualizaron usando un transiluminador UV. Los resultados fueron documentados con un sistema de fotografía digital Kodak C290.

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

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

ng/ μ l, a 37 °C durante 2 horas. Luego de la digestión se agregaron a cada tubo 10 μ l de una mezcla conteniendo: 5 pmoles de adaptador *EcoRI*, 50 pmoles de adaptador *MseI* (Key Gene), 1U de ADN ligasa T4 (promega), ATP 1 mM, OPA 1X, DTT 5 mM y albúmina sérica bovina (BSA) 50 ng/ μ l. La ligación de los adaptadores se realizó a 37° C por 3 horas. La pre-amplificación de las muestras se realizó en un volumen final de 25 μ l conteniendo 2 μ l de la mezcla de ligación, 1,2 ng/ μ l de cada cebador conteniendo una base selectiva en el extremo 3' (*EcoRI*+A y *MseI*+A), (Key Gene), dNTPs 0,2 mM, Taq polimerasa 1U (Promega), MgCl₂ 1,5 mM y buffer de PCR 1X (Promega). Las reacciones de amplificación incluyeron una etapa de desnaturalización inicial de 30 s a 94 °C seguida de 20 ciclos de 30 s a 94° C, 30 s a 60 °C, 1 min a 72 °C y 5 min finales de elongación a 72 °C. Los productos de PCR se diluyeron 1/10 en una solución compuesta por Tris-HCl 10 mM pH 8,0 y EDTA 0,1 mM [solución de trabajo de ADN pre-amplificado (pre-AFLP WS)]. Las amplificaciones selectivas se realizaron utilizando 47 combinaciones de cebadores *EcoRI* – *MseI*, en un volumen final de 10 μ l conteniendo 2 μ l de pre-AFLP WS, 1,2 ng/ μ l de cada cebador *EcoRI* +3 y *MseI* +3 (tomados de la serie KeyGene, AFLP Protocol for Public Release, Version 2.0, Netherlands, 1994), dNTPS 0,2 mM, Taq polimerasa 0,5U (Promega), MgCl₂ 1,5 mM y buffer de PCR 1X (Promega). Las condiciones de amplificación incluyeron una desnaturalización inicial de 30 s a 94 °C, un ciclo de 30 s a 94° C, 30 s a 65 °C, 1 min a 72 °C, seguido de 12 ciclos iguales donde la temperatura de anillado fue disminuyendo 0,7 °C por ciclo hasta llegar a 56 °C y 22 ciclos finales de 30 s a 94° C, 30 s a 56 °C, 1 min a 72 °C con una elongación de 5 min a 72 °C. Los productos de amplificación fueron suplementados con 5 μ l de buffer de siembra (formamida 95% p/v, NaOH 10 mM y azul de bromofenol 2 mg/ml), denaturalizados a 96 °C por 5 min y sembrados en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 5%



576.3 Ste
7326 ej 1
20.10.10

(acriamida:bisacrilamida (19:1) 5%, TBE 0,5X, urea 7,5 M). La electroforesis se realizó empleando un equipo de secuenciación Gibco-BRL modelo S2, USA a 60 W por 2:30 h (1 h sin las muestras y 1:30 h con las muestras) usando como soluciones reguladoras TBE 0,5X y 1X pH 8,0 en los reservorios superior e inferior, respectivamente. Los geles se revelaron con nitrato de plata siguiendo el protocolo descrito por el "DNA Silver Staining System" (Promega). Brevemente, el gel se incubó 20 min en solución fijadora (ácido acético glaciar 10% v/v), seguido de 3 lavados en H₂O de 2 min cada uno e incubación en solución de tinción (AgNO₃ 1 g/l, formaldehído 0,1% v/v) por 30 min. Luego se lavó por 10 s en H₂O y se reveló con solución desarrolladora (carbonato de sodio 30 g/l, formaldehído 0,1% v/v, tiosulfato de sodio 2 mg/l) preenfriada, deteniéndose la reacción con agregado de la solución fijadora. Los geles se lavaron exhaustivamente con agua y se tomaron los datos directamente sobre el vidrio luego del secado en estufa a 37 °C por al menos 2 hs. Los marcadores de AFLP fueron nombrados con la sigla "exmx", siendo ex y mx los cebadores correspondientes a los extremos *EcoRI* y *MseI* utilizados para las diferentes amplificaciones y una letra final que corresponde a la posición relativa en el gel comenzando por las más cercanas al sitio de siembra.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

c: marcadores presentes en ambos genotipos

d: alelos en dosis simple

e: alelos en dosis doble

f: alelos en dosis triple

g: alelos en dosis cuádruple

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

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

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

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

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

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

III.9- Construcción de mapas de ligamiento genético

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

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

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

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

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

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

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

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

III.10- Clonado de fragmentos de interés

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

IV- RESULTADOS

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

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

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

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

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

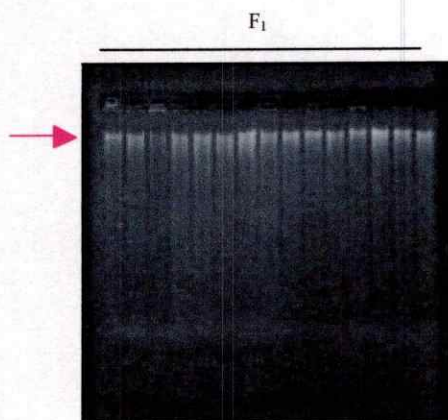


Figura 6: ADN genómico de *P. notatum*. El gel de agarosa 0,8 % teñido con bromuro de etidio donde se muestran las bandas de alto peso molecular (indicadas por la flecha) correspondientes a los ADN genómicos de 15 plantas de la población de mapeo. Las muestras de ADN se extrajeron por el método de Saghai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

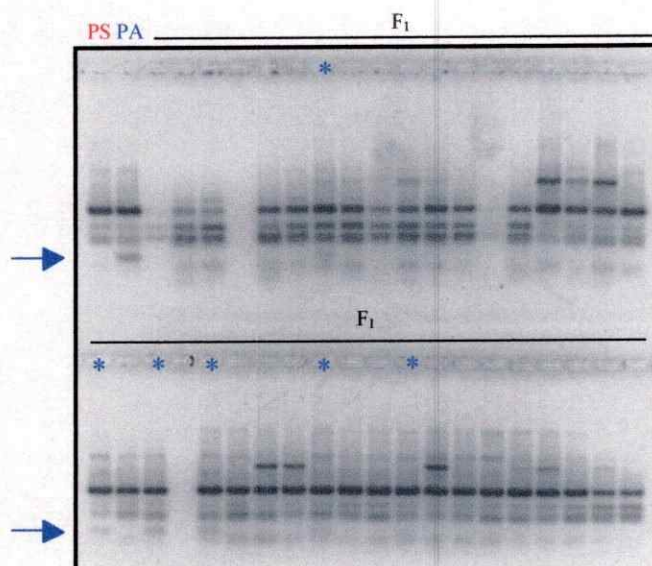


Figura 7: Clasificación de los individuos de la población de mapeo con el marcador UBC 243-377. Gel de agarosa 2,5% teñido con bromuro de etidio mostrando productos de amplificación obtenidos con el cebador UBC 243 para los ADN genómicos de Q4188 (PS), Q4117 (PA) y 38 individuos F_1 . Las flechas indican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

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

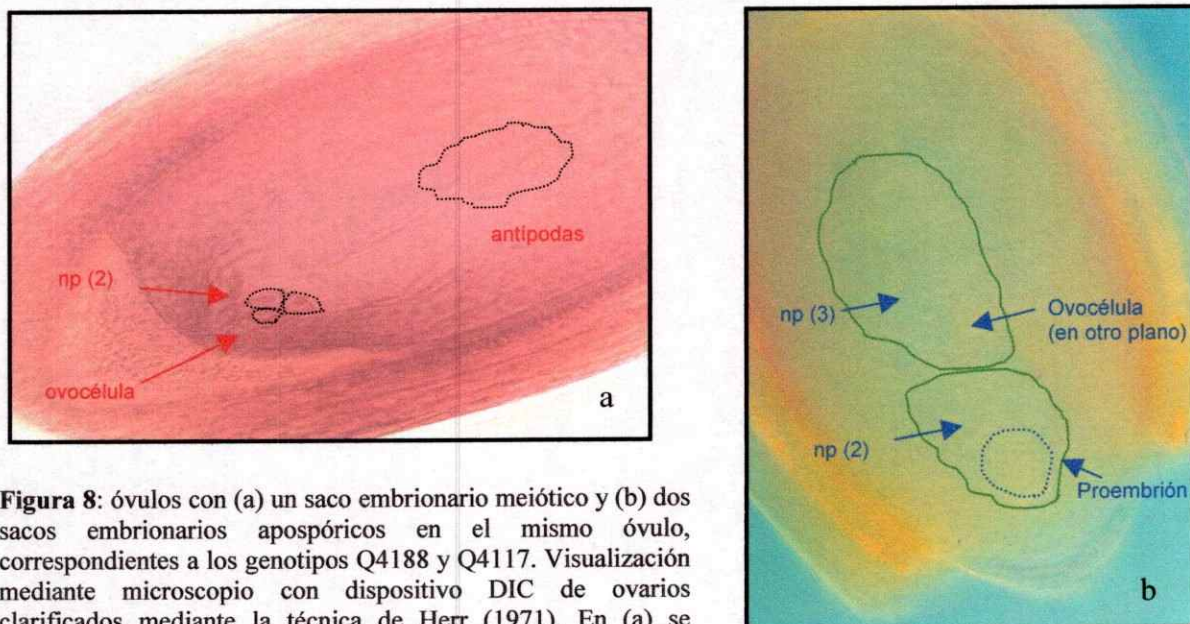


Figura 8: óvulos con (a) un saco embrionario meiótico y (b) dos sacos embrionarios apospóricos en el mismo óvulo, correspondientes a los genotipos Q4188 y Q4117. Visualización mediante microscopio con dispositivo DIC de ovarios clarificados mediante la técnica de Herr (1971). En (a) se observa la ovocélula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

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

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

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

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

SEM = Saco embrionario meiótico.

SEI = Saco embrionario inmaduro o poco desarrollado.

SEa = Saco embrionario ausente.

SEMX = Saco embrionario mixto.

SEA = Saco embrionario apospórico.

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

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

IV.1.2- Segregación del carácter aposporía en la población

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

<p>Q4188 Sexual progenitor femenino: PS Genotipo aaaa Gametas: aa</p>	<p>Q4117 Apomítico progenitor masculino: PA genotipo Aaaa Gametas: 1/2 aa y 1/2Aa</p>												
<table border="1" style="margin: auto; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding: 5px;"></td> <td style="padding: 5px; text-align: center;">PS</td> <td style="padding: 5px;"></td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px; text-align: center;">PA</td> <td style="padding: 5px;"></td> <td style="padding: 5px; text-align: center;">1</td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px; text-align: center;">1/2</td> <td style="padding: 5px; text-align: center;">aa</td> <td style="padding: 5px; text-align: center;">aaaa ½</td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px; text-align: center;">1/2</td> <td style="padding: 5px; text-align: center;">Aa</td> <td style="padding: 5px; text-align: center;">Aaaa ½</td> </tr> </table>			PS		PA		1	1/2	aa	aaaa ½	1/2	Aa	Aaaa ½
	PS												
PA		1											
1/2	aa	aaaa ½											
1/2	Aa	Aaaa ½											
<p>Segregación esperada: 1(aaaa):1(Aaaa)</p>													

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

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

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

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

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

IV.2.1- Análisis de apareamiento cromosómico

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