

## Tesis de Posgrado

# Herencia de la reproducción apomíctica e identificación de marcadores moleculares ligados al carácter en *Paspalum notatum*

Martinez, Eric Javier

2001

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Martinez, Eric Javier. (2001). Herencia de la reproducción apomíctica e identificación de marcadores moleculares ligados al carácter en *Paspalum notatum*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3312\\_Martinez.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3312_Martinez.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Martinez, Eric Javier. "Herencia de la reproducción apomíctica e identificación de marcadores moleculares ligados al carácter en *Paspalum notatum*". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2001.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3312\\_Martinez.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3312_Martinez.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

**Universidad de Buenos Aires**



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**

**HERENCIA DE LA REPRODUCCIÓN  
APOMÍCTICA E IDENTIFICACIÓN DE  
MARCADORES MOLECULARES LIGADOS  
AL CARÁCTER EN *PASPALUM NOTATUM*.**

Trabajo de tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias  
Biológicas.

**Ing. Agr. Eric Javier MARTÍNEZ**

**Director: Dr. Horacio Esteban Hopp**

**Co-director: Ing. Agr. Camilo L. Quarín**

**2001**

Lugares de trabajo: Instituto de Biotecnología, CICV, INTA Castelar  
Instituto de Botánica del Nordeste, FCA-UNNE

**A MIS PADRES GLORIA Y ROBERTO**

**A MI ESPOSA ELI**

# HERENCIA DE LA REPRODUCCIÓN APOMÍCTICA E IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES LIGADOS AL CARÁCTER EN *PASPALUM NOTATUM*

## RESUMEN

La manipulación de la apomixis, reproducción asexual por medio de semillas, puede tener un gran impacto en la agricultura. La apomixis es el modo principal de reproducción en *Paspalum notatum*, una gramínea forrajera nativa de América Central y del Sur. Los citotipos diploides son sexuales mientras los tetraploides son apomícticos. Los objetivos de este trabajo fueron estudiar el control genético de la apomixis e identificar marcadores moleculares ligados al carácter. Se generaron progenies F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>s y retrocruzas a partir de un cruzamiento original entre una planta tetraploide 100 % sexual con una apomíctica obligada. Las progenies fueron clasificadas en sexuales o apomícticas mediante la observación directa de sacos embrionarios en 60 óvulos por cada planta. Las plantas que poseían únicamente sacos meióticos fueron consideradas sexuales, mientras que se clasificó como apomíctica a aquella que tenía sacos apospóricos. En todos los cruzamientos sexuales X apomícticos la segregación fenotípica fue cercana a 3:1 (sexuales:apomícticas). La autopolinización de plantas F<sub>1</sub> sexuales y los cruzamientos entre ellas, siempre dieron origen a descendientes sexuales. Estos resultados no se ajustan a un modelo Mendeliano clásico para una herencia de tipo tetrasómica y con control monogénico. Es probable que algún mecanismo de distorsión gamética o genotípica provoque la muerte de algunas gametas o genotipos que condicionan para apomixis. El análisis de segregantes en grupos (Bulked Segregant Analysis) fue usado para identificar marcadores de RAPD, AFLP y RFLP asociados con la apomixis. Diez plantas fueron incluidas en cada uno de los grupos (S y A). Se probaron cuatrocientos iniciadores de RAPD y se utilizaron 10 combinación de pares de oligonucleótidos de AFLP. Se ensayaron 77 sondas de RFLP de maíz y arroz. Dos marcadores RAPD, 2 de AFLP y 2 RFLP mostraron diferencias entre los grupos. Todos fueron específicos del padre y del grupo apomíctico. El análisis de segregación en una población de 175 individuos F<sub>1</sub> para RAPD, 100 para AFLP y 132 para RFLP, mostró un ligamiento completo entre el locus Apo y los seis marcadores moleculares descubiertos. El locus de la apomixis fue encontrado relacionado con el extremo distal del brazo largo del cromosoma 12 de arroz. Los marcadores moleculares confirmaron que el carácter posee un control monogénico y es dominante sobre la sexualidad, pero la segregación también mostró distorsión de las proporciones Mendelianas esperadas.

## INHERITANCE OF APOMICTIC REPRODUCTION AND IDENTIFICATION OF MOLECULAR MARKERS LINKED TO CHARACTER IN *PASPALUM NOTATUM*

### ABSTRACT

Manipulation of apomixis, asexual reproduction by seeds, may have a great impact in agriculture. Apomixis is the main mode of reproduction of *Paspalum notatum*, a forage grass native to Central and South America. Diploid cytotypes are sexual while tetraploids are apomictic. The objectives of this work were to study the genetic control of apomixis and the identification of molecular markers linked to the trait. F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>s and backcrosses were generated by crossing a 100 % sexual tetraploid plant with an obligated apomictic one. The progeny was classified in sexual or apomictic individuals by direct observation of embryo sacs in 60 clarified ovaries for each plant. Sexual plant was considered that only had meiotic embryo sacs, while apomictic plant that had aposporous embryo sacs. The segregation in all crosses of sexual x apomictic plants was close to 3:1 (sexual:apomictic). Self-pollination of sexual F<sub>1</sub> plants and crosses between two F<sub>1</sub> plants gave always origin to 100 % sexual offsprings. Taking in account tetrasomic inheritance, these results do not adjust to a classic Mendelian model for monogenic inheritance. It is probable that some mechanisms of gametic or genotype distortion cause the death of some gametes or genotypes conditioning apomixis. Bulk segregant analysis was used to identify RAPD, AFLP and RFLP markers associated with the trait. Ten plants were included in each group (sex, apo). Four hundred RAPD primers and 10 pairs of oligonucleotides for AFLP were tested. 77 RFLP probes of maize and rice were evaluated as well. Two RAPD, 2 AFLP and 2 RFLP markers showed differences between the groups. All markers resulted specific to the apo group and were present in the apo parent. Linkage analysis performed using 175 individuals with RAPD, 100 with AFLP and 132 with RFLP showed complete association between the apo locus and the six molecular markers detected. The apo locus is related with the telomeric region of the long arm of rice chromosome. Molecular markers confirmed that apo locus have a monogenic control and is dominant over sexuality, but the segregation also showed distortion from the expected Mendelian proportions.

## ABREVIATURAS

**A** = alelo dominante para apomixis  
**a** = alelo recesivo para apomixis  
**ADN** = ácido desoxiribonucleico  
**ADNc** = ácido desoxiribonucleico complementario  
**AFLP** = Polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados ("amplified fragment length polymorphism")  
**ARN** = ácido ribonucleico  
**ARNm** = ácido ribonucleico mensajero  
**ASGR** = región genómica específica de la aposporia ("aposporic specific genomic region")  
**BA** = mezcla de ADN de 10 individuos apomícticos  
**BC** = retrocruza  
**B<sub>II</sub>** = híbrido formado por la unión de una gameta femenina reducida (n) con otra masculina también reducida (n)  
**B<sub>III</sub>** = híbrido formado por la unión de una gameta femenina no reducida (2n) con otra masculina reducida (n).  
**BS** = mezcla de ADN de 10 individuos sexuales  
**BSA** = análisis de segregantes combinados ("bulked segregant analysis")  
**cm** = centímetro  
**cM** = centiMorgan, unidad que expresa la distancia relativa entre los marcadores o genes sobre un cromosoma.  
**CSPD** = Disodium 3 - (4 - metoxispiro{1,2 - dioxetane - 3,2' - (5' - cloro)tricyclo[3.3.1.1<sup>3,7</sup>]decano} - 4 - yl)phenil phosphate, molecular weight: 461.  
**CTAB** = Bromuro de cetiltrimetil amonio ("cetyltrimethyl ammonium bromide")  
**ddH<sub>2</sub>O** = agua bidestilada o ultrapura  
**DDRFs** = fragmentos de restricción de doble dosis ("double-dose restriction fragment")  
**DIC** = Contraste de interferencia diferencial ("Differential Contrast Interference")  
**Dig-dUTP** = desoxiuridintrifosfato-digoxigenina  
**dNTPs** = nucleótidos libres (adenina, guanina, citosina y timina)  
**DTT** = ditionitrito  
**dTTP** = desoxitimidintrifosfato  
**EDTA** = Ácido etilendiamino-tetraacético ("Ethylenediamine tetraacetic acid")  
**EtBr** = Bromuro de etidio  
**F<sub>1</sub>** = primera generación en un cruzamiento  
**F<sub>2</sub>** = segunda generación en un cruzamiento  
**gr/l** = gramos por litro  
**KAc** = acetato de potasio  
**LB** = medio básico para cultivo de bacteria  
**M** = molaridad  
**mg** = miligramo  
**mg/l** = miligramo por litro  
**MgAc** = Acetato de magnesio  
**MgCl<sub>2</sub>** = cloruro de magnesio  
**ml** = mililitro  
**mM** = milimolar  
**N** = normalidad  
**n** = número cromosómico haploide de una especie  
**2n** = número cromosómico diploide de una especie  
**NaOH** = hidróxido de sodio  
**NaCl** = cloruro de sodio  
**NaAc** = Acetato de sodio  
**ng** = nanogramos  
**NH<sub>4</sub>OAc** = Acetato de amonio

**nm** = nanómetro  
**OD** = índice de absorbancia  
**PCR** = reacción en cadena de la polimerasa ("polymerase chain reaction")  
**pb** = pares de bases o nucleótidos  
**RAPD** = ADN polimórfico amplificado al azar ("random amplified polymorphism DNA")  
**RFLP** = Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción ("restriction fragment length polymorphism")  
**RGP** = Programa genómico de arroz (Japón)  
**RL** = restricción-ligación  
**S** = alelo dominante para sexualidad  
**s** = alelo recesivo para sexualidad  
**S:A** = sexual versus apomictica  
**SCAR** = regiones amplificables caracterizadas por secuencia ("sequence-characterized amplified region")  
**SDRFs** = fragmentos de restricción de dosis simple ("single-dose restriction fragment")  
**SDS** = sulfato de dodecil sódico  
**SEA** = saco embrionario apospórico  
**SEa** = saco embrionario abortado o ausente  
**SEI** = saco embrionario inmaduro o poco desarrollado  
**SEM** = saco embrionario meiótico  
**SSC** = Cloruro de sodio-citrato de sodio  
**TAE** = Tris-Ácido acético-EDTA  
**Taq** = enzima polimerizante obtenida de *Thermus aquaticus*  
**TBE** = Tris-Ácido bórico-EDTA  
**TE** = Tris-EDTA  
**Tris-HAc** = Tris-acético  
**U** = unidad de enzima  
**UBC** = Universidad Británica de Columbia ("University British Columbia")  
**µg** = microgramos  
**µl** = microlitro  
**UV** = ultravioleta  
**V/cm** = voltaje / centímetro  
**x** = número cromosómico básico de una especie  
**χ<sup>2</sup>** = prueba de bondad de ajuste

# I. INTRODUCCIÓN

## ÍNDICE

	Página
1. Apomixis.....	1
1.1. Definiciones.....	1
1.2. Diferentes tipos de apomixis.....	2
1.2.1. Embrionía adventicia.....	3
1.2.2. Apomixis gametofítica.....	5
1.2.2.1. Aposporia.....	5
1.2.2.1.1. Tipo " <i>Hieracium</i> ".....	5
1.2.2.1.2. Tipo " <i>Panicum</i> ".....	6
1.2.2.1.3. Variantes en <i>Paspalum</i> .....	8
1.2.2.2. Diplosporia.....	8
1.2.2.2.1. Tipo " <i>Antenaria</i> ".....	9
1.2.2.2.2. Tipo " <i>Taraxacum</i> ".....	9
1.2.2.2.3. Tipo " <i>Allium</i> ".....	10
1.3. El proceso sexual.....	11
1.4. Principales características de la reproducción apomítica.....	14
1.4.1. Variabilidad en plantas apomíticas.....	14
1.4.2. Apomixis y poliploidía.....	16
1.4.3. Apomixis e hibridización.....	20
1.5. Importancia agronómica de la apomixis.....	22
1.6. Antecedentes de transferencia de la apomixis a cultivos sexuales.....	24
1.6.1. Maíz.....	25
1.6.2. Mijo perla (Pearl Millet).....	26
1.6.3. Trigo.....	27
1.7. Genética de la apomixis.....	28
1.8. Marcadores moleculares como herramienta para estudios genéticos.....	33
1.8.1. RFLP.....	35
1.8.2. RAPD.....	37
1.8.3. AFLP.....	40
1.8.4. Microsatélites o SSR.....	44
1.8.5. Criterios de elección de los marcadores más apropiados.....	44
1.8.6. Antecedentes del uso de marcadores moleculares para la caracterización genética y genómica de la apomixis.....	46
1.9. <i>Paspalum</i> : Su importancia como género apomítico.....	49
1.9.1. La especie <i>Paspalum notatum</i> .....	51
1.9.1.1. Taxonomía.....	51
1.9.1.1.1. Descripción botánica.....	51
1.9.1.1.2. Variedades botánicas.....	52
1.9.1.2. Genética.....	52
1.9.1.2.1. Número cromosómico.....	52
1.9.1.2.2. Niveles de ploidía.....	53
1.9.1.2.3. Métodos de reproducción.....	54
1.9.1.2.4. Herencia de la apomixis en <i>P. notatum</i> : estudios previos.....	56
1.9.1.3. Distribución y Adaptación.....	57
1.9.1.3.1. Centro de origen.....	57
1.9.1.3.2. Geográfica.....	59

## 1. Apomixis

### 1.1. Definiciones

El término apomixis deriva del griego “*apo*” que significa falta o ausencia, y “*mixis*” que significa unión o mezcla. Hace referencia a la falta de unión de gametas de origen sexual.

El término apomixis fue utilizado por primera vez por Haacke (1893 a, b) y luego por Maire (1900 a, b); aunque según Battaglia (1991) la primera definición de apomixis se la atribuye a Winkler (1908). El mismo reemplazó a *apogamia*, el cual había sido erróneamente utilizado hasta ese momento. En la actualidad se utiliza el término *apogamia* para referirnos a la falta o pérdida de fertilización (Battaglia 1991). La descripción de apomixis hecha por Winkler (1908) fue utilizada en un sentido mucho más amplio, ya que incluía no solamente la reproducción asexual por semillas, sino también, a toda forma de propagación vegetativa, como puede ser la viviparidad, pseudoviviparidad, multiplicación por bulbos, rizomas, estolones, etc. Esto llevó a que Gustafsson (1946) hiciera una subdivisión del término apomixis en *agamospermia* y *reproducción vegetativa*. El primero se refería a todo proceso de reproducción por semilla; mientras que el segundo quedaba restringido a los diferentes mecanismos de multiplicación vegetativa.

En la actualidad el término apomixis se usa exclusivamente para referirnos a todo proceso de reproducción asexual por medio de verdaderas semillas (Nogler 1984a, Asker y Jerling 1992). De acuerdo a la definición moderna de apomixis, la misma es considerada sinónimo de *agamospermia* (Nogler 1984a)

La formación de semilla sin fertilización fue observada por primera vez por J. Smith en 1841 en plantas femeninas de *Alchornea ilicifolia* perteneciente a la familia de las *Euforbiáceas* (Gustafsson 1946). A principios del siglo XIX se hicieron los primeros estudios embriológicos en plantas apomícticas. La primera revisión sobre el desarrollo del proceso apomíctico fue hecha por Stebbins en 1941. Pocos años más tarde, Gustafsson (1946, 1947a, 1947b) publicó tal vez la más completa revisión sobre apomixis en plantas superiores que exista en la actualidad. A partir de entonces fueron varios los artículos que se dedicaron a discutir el fenómeno de la apomixis (Nygren 1954; Asker 1979 y 1980; Nogler 1984a; Asker y Jerling 1992; Mogie 1992; Koltunow 1993; Naumova 1993; Den Nijs y Van Dijk 1993; Hayward 1998; Savidan 2000).

## **1.2. Diferentes tipos de apomixis**

Se han propuesto varias clasificaciones para describir los diferentes mecanismos o vías de desarrollo del proceso apomíctico (Fagerlind 1940a; Stebbins 1941; Gustafsson 1946; Battaglia 1963; Nogler 1984a; Asker y Jerling 1992; Crane 1999). De acuerdo a Crane (1999) existen en teoría 45 tipos diferentes de apomixis, 9 maneras distintas de producir sacos embrionarios no reducidos y por lo menos 5 patrones diferentes para el desarrollo del embrión y el endosperma. Sin embargo, la mayoría de los investigadores utilizan la definición y clasificación de apomixis hecha por Nogler (1984a).

Nogler (1984a) dividió a la apomixis en dos mecanismos distintos para la generación de embriones de origen asexual: ***Embrionía adventicia*** y ***Apomixis gametofítica***.

### **1.2.1. Embrionía adventicia**

En la embrionía adventicia los embriones se originan directamente a partir de células somáticas del óvulo, sin que se forme un megagametófito o saco embrionario no reducido (Figura 1); mientras que el endosperma es producido en el saco embrionario de origen meiótico. Por otra parte, de acuerdo al tejido en el cual se originan los embriones, la embrionía adventicia se subdivide en: a) embrionía nucelar y b) integumentaria (Gustaffsson 1946; Naumova 1993).

En la embrionía nucelar los embriones se originan directamente de células del tejido nucelar del óvulo; mientras que en la embrionía integumentaria es a partir de células de los tegumentos del óvulo. A la embrionía adventicia también se la conoce como apomixis esporofítica (Koltunow *et al.* 1995).



Figura 1. Esquema del origen y desarrollo embrionario a partir de un proceso sexual y otro por apomixis con embrionía adventicia (ver descripción en 1.2.1.)

## 1.2.2. Apomixis gametofítica

En la apomixis gametofítica los embriones se originan directamente por partenogénesis de una gameta femenina de un saco embrionario o gametofito femenino citológicamente no reducido. De acuerdo al origen de los sacos embrionarios se subdivide en dos grupos: **Aposporia** y **Diplosporia**.

### 1.2.2.1. Aposporia

Los sacos embrionarios se originan a partir de células somáticas del óvulo, fundamentalmente del tejido nucelar, a partir de dos o tres mitosis. De acuerdo a su formación y estructura los sacos embrionarios apospóricos pueden presentar distintas variantes: tipo "*Hieracium*" o bipolar, tipo "*Panicum*" o monopolar, además de algunas variantes típicas del género *Paspalum* (Figura 2).

#### 1.2.2.1.1. Tipo "*Hieracium*"

La denominación se debe a que fue descrita por primera vez en el género *Hieracium* por Rosenberg (1908). Se trata de la primer planta apospórica analizada embriológicamente. 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 (Figura 2). La diferencia con este último reside en que cada núcleo es no-reducido. Es un tipo de apomixis am-

pliamente distribuida en diferentes géneros como son *Hieracium* (Rosenberg 1908, 1930), *Hypericum perforatum* (Noack 1939), *Poa pratensis* (Tinney 1940), *P. granítica* (Skalinska 1959), *Elatostema acuminatum* (Fagerlind 1944), *Ranunculus cassubicus* (Izmailow 1965), *R. auricomus* (Nogler 1971), *Hierochloë* (Weimarck 1967, 1970), Beta sección *Corollinae* (Jassem 1976), *Paspalum secans* (Snyder 1957), y *P. simplex*, aunque en esta especie también tiene otras variantes de sacos apospóricos (Caponio y Quarín 1987).

#### 1.2.2.1.2. Tipo "*Panicum*"

La segunda variante de la aposporia fue denominada tipo "*Panicum*" o monopolar, debido a que fue descubierta por primera vez en la especie *Panicum maximum* (Warmke 1954). Los sacos embrionarios se forman a partir de células de la nucela del óvulo, mediante dos mitosis consecutivas, dando origen a cuatro núcleos, los cuales se distribuyen hacia un solo polo. Los sacos desarrollados están constituidos de un aparato oosférico, compuesto por dos sinérgidas y la ovocélula y una célula central con un solo núcleo polar, careciendo de antípodas (Figura 2). La apomixis apospórica de tipo "*Panicum*" está ampliamente distribuida entre las Gramíneas y en particular en las tribu *Panicoideae* y *Andropogoneae* (Brown y Emery 1958; Savidan 1978; Connor 1979; Maass *et al.* 1996; Carman 1997). Muchas gramíneas tropicales y subtropicales poseen el tipo "*Panicum*" de desarrollo de saco embrionario; mientras que muchas gramíneas de clima templado poseen sacos embrionarios del tipo "*Hieracium*".

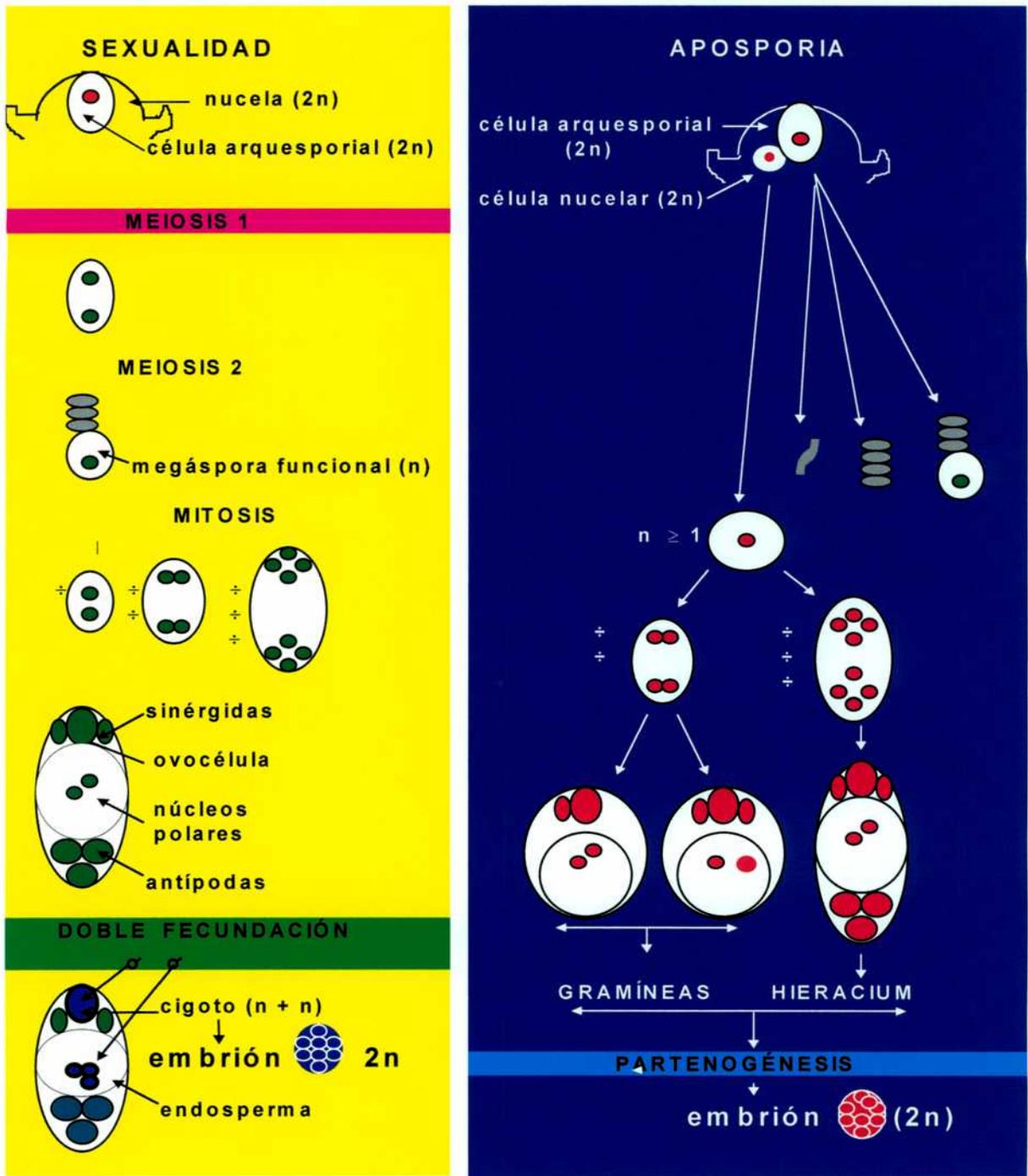


Figura 2. Esquema del origen y desarrollo embrionario a partir de un proceso sexual y por apomixis de tipo apospórica. En el esquema de la aposporia se muestran las dos variantes más importantes de sacos embrionarios (ver descripción en 1.2.2.1)

## 1.2.2.1.3. Variantes en *Paspalum*

En *Paspalum* existe una gran diversidad en la estructura, orientación en el óvulo y número de sacos embrionarios apospóricos por óvulo. La estructura más común de los sacos apospóricos es de forma globular, con una ovocélula acompañada por una o dos sinérgidas y una célula central binucleada o eventualmente trinucleada. Los nucleolos en esta 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. Sin embargo, a la madurez del óvulo se pueden observar sacos apospóricos constituidos por dos a varios núcleos, los que pueden tener varias posiciones dentro del saco. La característica más notable de los sacos apospóricos de *Paspalum* es la ausencia de antípodas (Norrman *et al.* 1989; Quarin y Burson 1991). La característica en común de todas las células que componen el saco embrionario apospórico, es que son citológicamente no reducidas (Nogler 1984a).

## 1.2.2.2. Diplosporia

Existen diferentes variantes de desarrollo de sacos embrionarios diplospóricos; sin embargo, acá solamente se detallarán los tres tipos principales, descritos recientemente por Savidan (2000) como los más importantes (Figura 3).

## 1.2.2.2.1. Tipo “*Antennaria*”

También conocido como diplosporia mitótica. Se caracteriza porque la *célula madre de las megásporas* no entra en meiosis, sino que después de una larga interfase, se produce un crecimiento acompañado por una profunda vacuolización, característica de las megásporas funcionales, para luego sufrir una primera mitosis. La propia *célula madre de las megáspora* funciona como megáspora no reducida (diploide). Posteriormente, se producen otras dos mitosis, que dan origen a un saco embrionario maduro compuesto por ocho núcleos (todos no reducidos) (Figura 3). Este tipo de apomixis diplospórica es el que está más ampliamente difundido. Entre los géneros más importantes con este tipo de apomixis se encuentran: *Antennaria* (Stebbins 1932), *Erigeron* y *Eupatorium* (Holmgren 1919; Sparvoli 1960), *Hieracium* (Bergman 1941), *Poa alpina* (Håkansson 1943), *Parthenium* (Esau 1946), *Calamagrostis* (Nygren 1946), entre otras.

## 1.2.2.2.2. Tipo “*Taraxacum*”

También conocida como diplosporia meiótica, debido a que la *célula madre de las megásporas* 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, uniéndose en el centro celular y luego, uniéndose a las fibras del huso separan 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 se forma únicamente en la meiosis femenina (Nogler 1984a). Este tipo de apomixis diplospórica está ampliamente distribuida en la familia de las Compuestas: *Taraxacum* (Osawa 1913; Fagerlind 1947a; Battaglia 1948; Malecka 1971), *Chondrilla* (Bergman 1950) y en ciertas razas de *Antennaria carpatica* (Bergman 1951). Entre las gramíneas, fue observada en *Agropyron scabrum* (Hair 1956), *Paspalum conjugatum* (Chao 1980), *P. minus* (Bonilla y Quarin 1997), entre algunas de las especies con esta variante de diplosporia.

#### 1.2.2.2.3. Tipo "Allium"

Se caracteriza porque el número cromosómico es duplicado mediante una endoduplicación premeiótica. Luego, se produce una meiosis femenina normal, con apareamientos de cromosomas idénticos (autobivalentes), formando una tétrada de núcleos no reducidos. Debido a que no hay formación de pared celular en la díada chalazal, y luego de sufrir dos mitosis consecutivas, se forma el saco embrionario maduro (Nogler 1984a) (Figura 3). Este tipo de apomixis es muy poco frecuente y se la describió en algunas especies como *Potentilla collina* (Müntzing 1958b), *Saccharum* (Bremer 1963), y *Ranunculus auricomus* (Izmailow 1976).

Existe una cuarta variante descrita por Nogler (1984) presente en *Ixeris dentata* y a la cual la denominó tipo "*Ixeris*". Al igual que en la diplosporia de tipo "*Taraxacum*" se produce una profase meiótica asindética que conduce a la formación de un núcleo de restitución, el cual sufre una división nuclear sin que exista división celular. Por lo tanto, la megáspora contiene dos núcleos no reducidos en lugar de cuatro núcleos reducidos. Luego de dos mitosis se forma un saco embrionario con ocho núcleos no reducidos. Este tipo de diplosporia es menos frecuente.

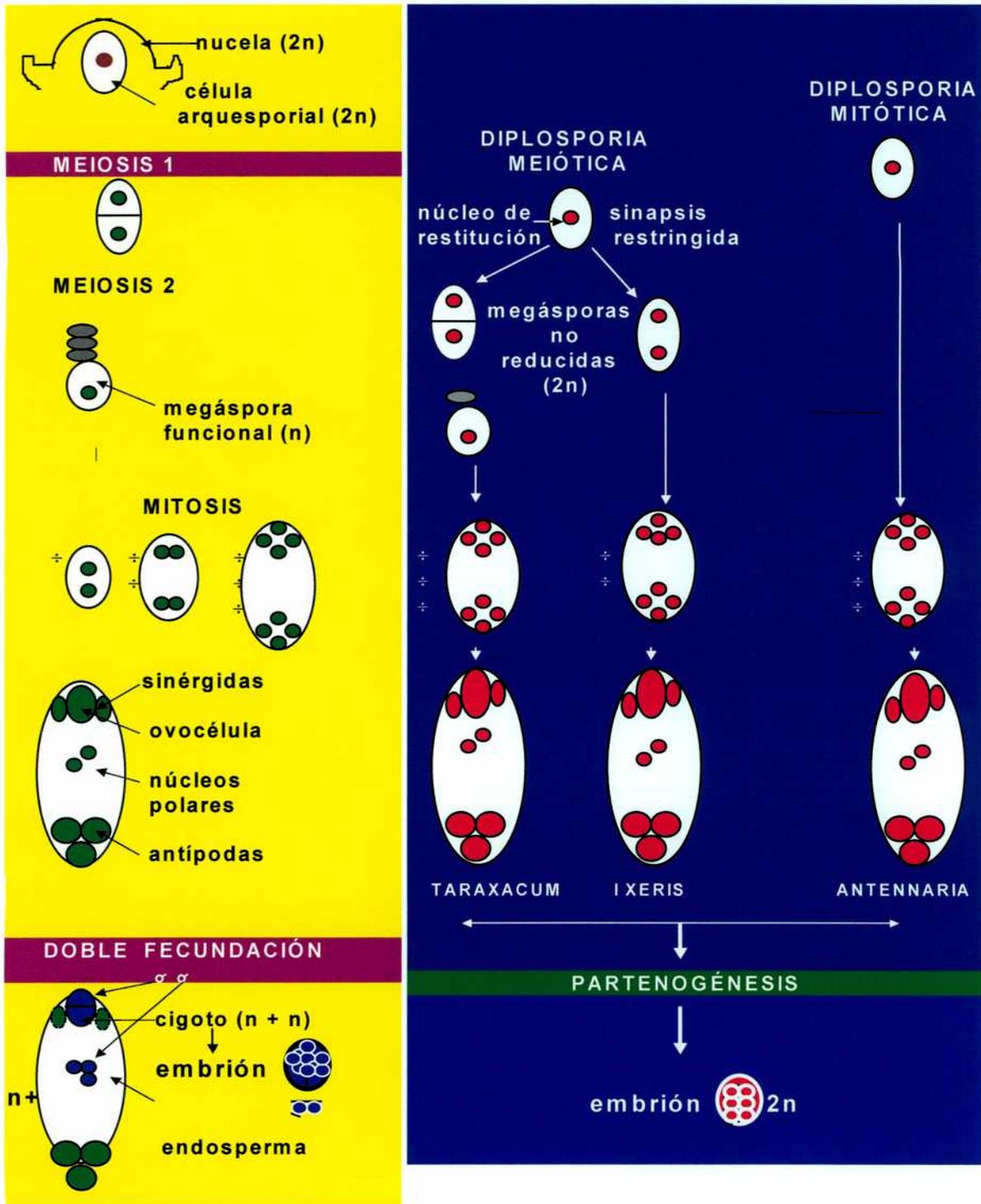
### 1.3. El proceso sexual

Generalmente en las Gramíneas de reproducción sexual, una célula especializada de la nucela, denominada *célula arquesporial* o *célula madre de las megásporas*, se divide meióticamente para formar cuatro *megásporas* reducidas ( $n$ ). Una de las megásporas, da origen mediante varias divisiones nucleares mitóticas y posterior diferenciación, al *gametofito femenino* o *saco embrionario*. Habitualmente, el saco embrionario de la mayoría de las Gramíneas contiene muchas células las que se ordenan de la siguiente forma: el "*aparato oosférico*" formado por la *oosfera* o gameta femenina, rodeada por dos *sinérgidas*, el cual 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 del óvulo, denominado extremo chalazal, se encuentra un gran número de *antípodas* que puede variar de 6 o 7 hasta varias decenas. En algunas especies de la familia de las Gramíneas, las antípodas pueden ser tres como en otras angios-

permas, aunque la mayoría de las especies tienen múltiples antípodas. Estos sacos embrionarios, por originarse en una megáspora que es el producto de la meiosis, se denominan "*meióticos*". Se clasifican como *monospórico*, porque se forman de una sola megáspora (Figuras 1, 2 y 3), y se conocen también como de tipo *Polygonum*, por haber sido descriptos para ese género.

En las anteras, la meiosis sucede en los *microsporocitos* o *células madres de las microsporas*, dando origen a cuatro *microsporas*. Cada *microspora* 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*. En las Gramíneas, esto último ocurre generalmente después de la germinación del polen.

El polen germina sobre el estigma desarrollando un tubo polínico que crece por el estilo y entra al óvulo a través de la apertura micropilar, y los núcleos espermáticos ingresan al saco embrionario después de la penetración del tubo polínico a través de una sinérgida. Uno de los núcleos espermáticos fertiliza a la oosfera para dar origen al *embrión* ( $n + n$ ), y el otro se une con los núcleos polares para originar el *endosperma* ( $2n + n$ ). De esta manera se reestablece el número cromosómico diploide de la especie. (Figuras 1, 2 y 3).



**Figura 3.** Esquema del origen y desarrollo embrionario a partir de un proceso sexual y otro por apomixis diplospórica. En el esquema de la diplosporia se muestran las tres variantes más importantes de formación de sacos embrionarios (ver descripción en 1.2.2.2.)

## 1.4. Principales características de la reproducción apomítica

### 1.4.1. Variabilidad en plantas apomíticas

En la mayoría de las angiospermas la reproducción sexual es el principal proceso por el cual se generan nuevos esporofitos. Este mecanismo se caracteriza por la ocurrencia de una doble fertilización, en la cual una gameta femenina y otra masculina, ambas con número cromosómico reducido, se unen para formar el embrión y de esta manera reestablecer el número cromosómico esporofítico. Por otro lado, la otra gameta masculina reducida se une con los núcleos polares de la célula central para dar origen al endosperma. Si bien este mecanismo es característico de muchas especies vegetales, no es el único por el cual pueden originarse embriones. En muchas especies existe la reproducción asexual a través de semillas, *apomixis*, la cual puede coexistir o reemplazar al proceso sexual descrito anteriormente.

El proceso apomítico ocurre en el óvulo y afecta tanto a la megasporogénesis como a la megagametogénesis. Usualmente, la apomixis no afecta la formación del polen y por lo tanto como consecuencia de la meiosis masculina se forman granos de polen portadores de gametas reducidas (Nogler 1984a).

Otra característica importante de las plantas apomíticas es el hecho que generalmente la apomixis se comporta como un carácter facultativo, ya que algunas progenies pueden originarse por fertilización de dos gametas reducidas. A partir de ello, cuatro tipos de embriones pueden formarse en una planta apomítica de tipo apospórico:

- 1) Los embriones denominados B<sub>II</sub> ( $n + n$ ) los cuales se originan por la unión de dos gametas reducidas. Interviene un saco embrionario meiótico y polen normal.
- 2) Los embriones de origen maternal ( $2n + 0$ ) los cuales se originan por partenogénesis de una gameta femenina no reducida. Interviene un saco embrionario apospórico.
- 3) Los embriones denominados B<sub>III</sub>, los cuales se originan por fecundación de una gameta femenina no reducida por otra masculina reducida ( $2n + n$ ). En este caso, la oosfera de un saco apospórico es fecundada por polen normal.
- 4) Los embriones haploides ( $n + 0$ ) originados por partenogénesis de una gameta reducida (Savidan 2000). Se produce en un saco meiótico

Algunos autores incluyen otras variantes menos comunes como son embriones del tipo  $n + 2n$  (Asker 1977), o  $2n + 2n$  (Harlan y de Wet 1975; Huff y Bara 1993).

La apomixis es considerada obligada cuando el 100 % de la progenie es de origen materno. Si bien muchas plantas son consideradas dentro de esta categoría, existen muchos ejemplos de variabilidad originada a partir de poblaciones apomícticas. En los trabajos de Gustafsson (1947b) se menciona que las plantas apomícticas, especialmente las apospóricas, retienen cierto grado de sexualidad. Existen algunos trabajos donde se demostró el origen de progenies variables a partir de plantas consideradas apomícticas obligadas como es

el caso de *Taraxacum* (Ford y Richards 1985; Mogie 1988; van Oostrum *et al.* 1985). En *Paspalum notatum* se ha analizado embriológicamente una colección muy importantes de ecotipos tetraploides apomícticos, en los cuales, en prácticamente todos ellos, se encontró un grado variable de sexualidad residual (Altamiranda 1983). Por otra parte, en un trabajo reciente en *P. notatum* (Ortiz *et al.* 1997), se analizó mediante marcadores moleculares la progenie de dos plantas tetraploides apomícticas, una considerada facultativa y la otra obligada, y de una planta tetraploide sexual. Los resultados fueron similares a las observaciones embriológicas, determinando que aún en la planta considerada apomíctica obligada, se originaron individuos por la vía sexual.

Las plantas apomícticas pueden ser utilizadas en cruzamientos únicamente como progenitores masculinos. Contrariamente a lo que sucede en la formación de gametófitos femeninos de estas plantas, donde los núcleos no están citológicamente reducidos, en los gametófitos masculinos sí existe reducción. Por tanto, los sacos embrionarios portan una gameta femenina no reducida ( $2n$ ), mientras que las gametas masculinas en los granos de polen son reducidas ( $n$ ).

#### 1.4.2. Apomixis y poliploidía

Existe una relación estrecha entre apomixis y poliploidía. En general, todas las plantas con apomixis gametofítica que se conocen, son poliploides (Asker y Jerling 1992; Savidan 2000). Sin embargo, la apomixis es común en plantas diploides con embriogenia adventicia, tales como *Citrus*, *Nothoscordum*,

*Sarcococca*, y *Euphorbia* (Gustafsson 1946). La descripción de algunos diploides con apomixis gametofítica parece ser la excepción a la regla. Sin embargo, existe mucha controversia al respecto, a tal punto que repeticiones del análisis de algunas de esas excepciones determinaron lo contrario (Holm y Ghatnekar 1996; Holm *et al.* 1997). En gramíneas apospóricas existen algunos ejemplos de dihaploides apomícticos como son el complejo *Dichanthium-Bothriochloa* (de Wet 1968, 1971) y *Panicum maximum* (Savidan 1982a). En ambos casos las plantas eran de origen experimental y se comportaron como estériles, tanto en la parte masculina como en la femenina. Sin embargo, el análisis embriológico determinó la presencia de algunos sacos embrionarios múltiples no reducidos. Esto sugiere que la *aposporia* puede ser transmitida, pero la apomixis no puede expresarse. En varios citotipos diploides de *Paspalum* se ha mencionado la presencia de sacos embrionarios apospóricos junto a los sacos embrionarios meióticos normales (Norrman *et al.* 1989; Quarin *et al.* 1989; Quarin y Norrman 1990). Sin embargo, nunca se confirmó que la apomixis se exprese efectivamente en especies diploides.

Existen dos teorías que explican la ausencia de apomixis a nivel diploide: Una fue propuesta por Nogler (1982) y sostiene que el alelo dominante **A**, responsable de la aposporia, no puede ser transmitido a través de gametas haploides, con lo cual la apomixis no puede ser encontrada en diploides naturales.

La segunda hipótesis fue propuesta por Mogie (1988) y sostiene la existencia de un dosaje génico para un alelo mutante  $a^*$ , en presencia del alelo sal-

vaje  $a^+$ , para que el carácter se exprese. De acuerdo a esta teoría la ausencia de apomixis en los diploides naturales se debe más bien a una falta de expresión, en lugar de la no-transmisión propuesta por Nogler (1988). Mogie (1988) sugiere que se necesitan dos copias del alelo  $a^-$  (frecuencia mayor a 0.5) para la expresión de la apomixis. En contraste con esta teoría, Noirot (1993) propone que el alelo  $A$  no debería estar presente en una frecuencia mayor de 0.25.

Una pregunta que nos hacemos es si los poliploides por sí solos pueden convertirse en apomícticos. Existen ejemplos de duplicaciones cromosómicas de diploides sexuales mediante colchicina que no afectaron el modo de reproducción, como en *Taraxacum kok-saghyz* (Stebbins 1950), *Parthenium argentatum* (Hashemi *et al.* 1989), *Panicum maximum* (Hanna 1992). Por otro lado, Nygren (1948) mediante tratamiento con colchicina obtuvo, a partir de diploides sexuales de *Calamagrostis canescens* con  $2n = 28$ , autotetraploides con  $2n = 56$  fenotípicamente similares a *C. purpurea*, los cuales fueron, probablemente, apomícticos. Duplicaciones cromosómicas de diploides sexuales de *Paspalum hexastachyum*, produjeron autotetraploides apomícticos facultativos (Quarin y Hanna 1980). Otro ejemplo de transformación de diploides sexuales en autotetraploides apospóricos fue obtenido en *Paspalum notatum* (Quarin y Bovo 1995). Mediante cruzamientos entre dos razas diploides de *Dichanthium aristatum* y *D. caricosum* ( $2x=10$ ) se obtuvieron híbridos tetraploides apospóricos, productos de la fusión de dos gametas no reducidas ( $2n + 2n$ ) (d'Cruz y Reddy 1971).

En algunas especies es común la formación de individuos dihaploides, originados a partir del desarrollo partenogenético de gametas no reducidas de individuos tetraploides apomícticos. En híbridos apospóricos de *Ranunculus auricomus*, Nogler (1982) obtuvo un gran número de dihaploides, los cuales se comportaron como vigorosos y fértiles. Por otro lado, Savidan (1980) en *Panicum maximum* obtuvo dihaploides muy débiles y totalmente estériles, tanto en la parte masculina como en la femenina. Plantas parecidas a polihaploides fueron observadas en *Pennisetum* (Dujardin y Hanna 1986; Hanna *et al.* 1993). Por su parte, Leblanc *et al.* (1996) observó dihaploides apomícticos entre los derivados de los híbridos de maíz-*Tripsacum*, portando un genoma de maíz ( $x=10$ ) y uno de *Tripsacum* ( $x=18$ ), con lo cual sugieren que la apomixis y la poliploidía no necesariamente están ligadas y por lo tanto sería factible que pueda expresarse en cultivos diploides.

Un caso interesante es el ciclo "diploide-tetraploide-dihaploide" presente en algunos complejos agámicos. Los cambios que se producen en el nivel de ploidía conllevan a un cambio en el modo de reproducción. Estos ciclos fueron descritos en el complejo *Bothriochloa-Dichanthium* por de Wet (1968) y de Wet y Harlan (1970). En poblaciones naturales, los tetraploides apomícticos facultativos predominan, pero una pequeña parte de la población consiste de diploides sexuales. Mediante la fusión de una gameta femenina no reducida de las plantas  $2x$ , con gametas reducidas de plantas  $4x$ , se originan autotetraploides sexuales. Por medio de partenogénesis haploide, los tetraploides dan origen a nuevos diploides (dihaploides), los cuales son sexuales fértiles y vigoro-

sos. Esto permite el intercambio génico eventual entre diploides y tetraploides y viceversa.

Un ciclo similar ocurre en *Panicum maximum* (Savidan 1978) donde los tetraploides apomícticos facultativos predominan, pero existen poblaciones diploides locales; obteniéndose autotetraploides sexuales a partir de dichos diploides. Los tetraploides sexuales no son capaces de mantenerse por sí mismo en la naturaleza. No existen diploides apomícticos, pero sí se obtienen dihaploides a partir de tetraploides apomícticos, los cuales se comportan como sexuales o estériles.

En *Potentilla argentea* ocurre un ciclo "diploide-tetraploide-haploide" donde los diploides se comportan como apomícticos facultativos en los cruzamientos, aunque en poblaciones naturales ellos se reproducen por sexualidad. Sin embargo, los autotetraploides se reproducen solo por fertilización de gametas reducidas, y en este nivel de ploidía los cruzamientos con otras taxas son posibles. Mediante retrocruzas reiteradas con diploides, se originan diploides recombinantes, los cuales son nuevamente apomícticos facultativos (Asker 1971, 1977). Sin embargo, en trabajos recientes se pone en duda la presencia de apomixis en plantas diploides de *Potentilla argentea* (Holm *et al.* 1997).

#### **1.4.3. Apomixis e hibridización**

Desde el comienzo de los estudios sobre apomixis, a principio del siglo XX, se postuló a la hibridización como una causa posible del origen de la apomixis (Ernst 1918). Sin embargo, Holmgren (1919) cuestionó la hipótesis de

Ernst y estableció que la hibridación es solamente un prerequisite para la apomixis. Como en el caso de la poliploidía, la hibridización en sí misma no induce a la reproducción apomíctica. Tal es así que en la mayoría de las hibridaciones entre especies sexuales no se obtienen híbridos de reproducción apomíctica (Stebbins 1950). En la literatura existen algunas pocas excepciones, como las reportadas por Nygren (1948, 1951) en cruzamientos entre especies sexuales de *Calamagrostis epigeios* y *C. canescens* que dieron origen a híbridos diplospóricos apomícticos, morfológicamente similares a la especie apomíctica *C. purpurea*. Otra excepción fue la mención de la obtención de híbridos intergenéricos de *Raphanobrassica* obtenidos por Ellerström y Zagorcheva (1977), los cuales mostraron una abundante presencia de sacos embrionarios apospóricos. En híbridos de *Festuca pratensis* X *F. arundinacea* también se encontró una cierta tendencia a la aposporia (Gröber, citado por Nogler 1984a).

Por otro lado, la apomixis ha sido considerada una vía de escape a la esterilidad en híbridos interespecíficos poliploides (Darlington 1939; de Wet y Harlan 1970; Gröber *et al.* 1974, 1976, citados por Asker 1979). Nogler (1984) vincula a la apomixis gametofítica con la alopoloidía, hibridación y heterocigocidad. Sin embargo, Gustafsson (1947) considera que la hibridación cubre solamente una parte de la verdad; mientras que de Wet y Harlan (1970) reconocen que la autoploidía juega un rol muy importante en la evolución de muchos complejos poliploides, caracterizados por la presencia de citotipos diploides y tetraploides. Quarin (1992) considera que la autoploidía o la alopoloidía segmental

son el origen de muchos tetraploides apomícticos de *Paspalum*. De hecho, autotetraploides inducidos a partir de plantas 2x de *P. hexastachyum*, que eran fenotípicamente sexuales, se comportan como apomícticos a nivel 4x (Quarin y Hanna 1980). Lo mismo ocurre con autotetraploides inducidos de *P. notatum* (Quarin y Bovo 1995)

### **1.5. Importancia agronómica de la apomixis**

La apomixis ha sido observada en más de 400 especies de plantas pertenecientes a 35 familias, siendo las Gramíneas, Compuestas, Rosáceas y Rutáceas, las que están más ampliamente representadas (Richards 1986; Asker y Jerling 1992; Carman 1997).

En la Tabla 1 se resume una lista de algunos de los géneros de gramíneas apomícticas tropicales y subtropicales más importantes.

Las potenciales ventajas de la apomixis 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.* 1996).

**Tabla 1.** Géneros de gramíneas apomícticas tropicales y subtropicales más importantes. Adaptado de Maass et al. (1996), Carman (1997) y Czapik (2000).

SUBFAMILIA	TRIBU	GÉNERO	REPRODUCCIÓN
<i>Chloridoideae</i>	<i>Eragrostideae</i>	<i>Eragrostis</i> von Wolf	D
	<i>Chlorideae</i>	<i>Chloris</i> Swartz	A
<i>Panicoideae</i>	<i>Paniceae</i>	<i>Brachiaria</i> (Trin.) Grisebach	A
		<i>Cenchrus</i> L.	A, EA
		<i>Melinis</i> P. Beauvois	A
		<i>Panicum</i> L.	A
		<i>Paspalum</i> L.	A, D
		<i>Pennisetum</i> Richard	A, D, EA
		<i>Setaria</i> P. Beauvois	A
		<i>Urochloa</i> P. Beauvois	A
		<i>Andropogoneae</i>	<i>Dichanthium</i> Willemet
	<i>Hyparrhenia</i> Fournier		A
			<i>Sorghum</i> Moench
		<i>Tripsacum</i> L.	D

A = Aposporia; D = Diplosporia; EA = embrionía adventicia

Las principales ventajas de la apomixis fueron descritas por Savidan (2000) como las siguientes:

- 1) 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.
- 2) facilidad para producir semilla pura de alta calidad sin requerimientos de aislamientos.

- 3) facilidad y eficiencia en el desarrollo y aplicación de nuevos procedimientos de mejoramiento.

Estas ventajas permitirían lograr, por un lado, el interés por parte de los mejoradores ya que es factible lograr fijar el vigor híbrido en los cultivos; por otro lado, el interés por parte de las compañías semilleras, las cuales deberían lograr producir semilla híbrida a un menor costo de producción y por último, el interés por parte de los agricultores de áreas marginales.

En los países subdesarrollados se cultivan variedades de polinización abierta adaptadas a dichas zonas, debido fundamentalmente a que los agricultores no pueden afrontar los costos de las semillas mejoradas. Debido a ello, es común que los mismos guarden sus propias semillas para la próxima generación de cultivo. Si bien se seleccionan los mejores granos, al ser plantas de reproducción sexual y de polinización cruzada, segregarán para todos los caracteres incluyendo la producción. Si en dichos sistemas agrícolas se pudiera introducir un porcentaje de reproducción apomíctica, se lograría mantener las características positivas de los genotipos seleccionados para semilla. Por ello, Hanna (1995) sostiene que el mayor impacto de la incorporación de la apomixis en los grandes cultivos se produciría más que nada en los países pobres y en vías de desarrollo.

### **1.6. Antecedentes de transferencia de la apomixis a cultivos sexuales**

La apomixis es un carácter que no se encuentra naturalmente entre las especies cultivadas de mayor importancia económica, a excepción de algunos

árboles frutales, como los cítricos (*Citrus*) y el mango (*Mango indica*), los cuales poseen embriogénesis adventicia (van Dijk y van Damme 2000). Sin embargo, existen algunas especies cultivadas que poseen parientes silvestres con reproducción apomíctica, como es el caso del maíz, trigo y mijo perla.

Se han realizado algunos intentos por introducir la apomixis en cultivos sexuales mediante métodos de mejoramiento tradicional (Hanna y Bashaw 1987). Sin embargo, hasta el momento dichos intentos no han sido del todo exitosos. Uno de los ejemplos es el caso del maíz (*Zea mays*), cuya especie apomíctica emparentada es *Tripsacum*.

#### **1.6.1. Maíz**

Los primeros intentos de transferencia de la apomixis al maíz comenzaron en 1962 por intermedio de científicos rusos dirigidos por Petrov (Petrov *et al.* 1979). Ellos realizaron cruzamientos entre maíz tetraploide [ $2n=4x=40$  cromosomas (M) de maíz] y un tetraploide apomíctico de *Tripsacum dactyloides* [ $2n=4x=72$  cromosomas (T) de *Tripsacum*]. Obtuvieron 5 híbridos  $F_1$  macho estériles ( $2n=56=20M+36T$ ) de los cuales uno solo se comportó como apomíctico facultativo. Luego de varias retrocruzadas por maíz se obtuvieron progenies  $2n=38=20M+18T$  las cuales poseían un alto porcentaje de plantas originadas por apomixis (84,5%). Este programa tuvo el inconveniente del bajo rango de plantas formadas sexualmente, lo cual implicaba producir y analizar un gran número de progenies hasta obtener plantas de origen sexual ( $n+n$ ) con bajo número cromosómico y que se reproduzcan por apomixis.

Otros proyectos se desarrollaron posteriormente con el mismo objetivo. Uno de ellos fue realizado por Kindiger *et al.* (1996) a partir del mismo esquema realizado por los rusos. El otro proyecto fue desarrollado en el IRD-CIMMYT por el grupo de Savidan (Berthaud y Savidan 1989; Savidan y Berthaud 1994; Savidan *et al.* 1992, 1994, 1995). Se analizó una larga serie de progenies producto de retrocruzadas ( $BC_1 - BC_5$ ) tratando de lograr genotipos apomícticos que posean el complemento cromosómico completo de maíz ( $2n=20$ ) y el menor número de cromosomas de *Tripsacum*. Hasta el momento los esfuerzos realizados mediante esta estrategia no fueron del todo exitosos.

#### 1.6.2. Mijo Perla (Pearl Millet)

En el mijo perla (*Pennisetum glaucum*), un cereal importante en algunas regiones del mundo, también se trabajó en la transferencia de la apomixis a partir de hibridaciones con especies silvestres (Hanna y Dujardin 1986; Dujardin y Hanna 1989a). Si bien se obtuvieron varios híbridos apomícticos, todos ellos resultaron ser estériles en la parte masculina, con lo cual fue imposible poder transferir dicho carácter a las siguientes generaciones. El esquema consistió en la realización de hibridaciones entre tres especies, *P. glaucum* (sexual,  $2n = 4x = 28$ ), *P. squamulatum* (apomíctica,  $2n = 6x = 54$ ) y una especie puente, *P. purpureum* (sexual,  $2n = 4x = 28$ ) (Dujardin y Hanna 1989b). A partir de un esquema similar al utilizado en maíz, mediante una serie sucesiva de retrocruzadas, obtuvieron dos plantas  $BC_4$  apomícticas facultativas con  $2n= 29$  cromosomas.

somas. Sin embargo, hasta la fecha no se ha podido obtener una planta de mijo perla comercial que se de reproducción apomíctica.

En otro trabajo, realizado por Morgan *et al.* (1998), sobre la base de las plantas BC<sub>3</sub> obtenidas por Dujardin y Hanna (1989b), reportaron que las plantas con  $2n=28$  se comportaban como tetraploides de mijo perla, pero con reproducción apomíctica. Estas plantas mostraban un alto grado de esterilidad, produciendo solamente entre un 4% a un 6% de semillas, en autofecundación y en polinización abierta respectivamente. Esta alta esterilidad fue atribuida por Morgan *et al.* (1998) a modificaciones en la estructura de los sacos embrionarios; los cuales poseían dos núcleos polares, en lugar de uno solo. Esta característica impide la formación de un endosperma normal en cultivos diploides.

### 1.6.3. Trigo

Se realizaron hibridaciones interespecíficas, con una especie silvestre emparentada, *Elymus rectisetus* ( $2n = 6x = 42$ ), la cual se reproduce por apomixis obligada (Liu *et al.* 1994). Los cruzamientos realizados por una accesión de *Elymus rectisetus* que produce principalmente granos de polen  $2n$ , produjo dos tipos de híbridos: B<sub>II</sub> ( $n + n$ ) y B<sub>III</sub> ( $2n + n$ ), ambos macho-estériles. Cuando se utilizaron estos híbridos como madres, produjeron plantas BC<sub>1</sub> con 54 y 60 cromosomas y un 10% y 5% de polen fértil, respectivamente. En dicho trabajo se concluye que la utilización de la accesión de *E. rectisetus* con polen  $2n$ , puede mejorar la producción de retrocruzas y por lo tanto la transferencia de la apomixis. Sin embargo, en otro trabajo se utilizó la misma accesión de *E.*

*rectisetus* con polen  $2n$ , y se obtuvieron híbridos  $B_{III}$  de reproducción sexual (Peel *et al.* 1997).

### 1.7. Genética de la apomixis

Se ha comprobado que la apomixis es un sistema que está regulado genéticamente (Nogler 1984a). En los últimos años varios autores discutieron el mecanismo de regulación genética de dicho carácter en diferentes especies (Nogler 1984a; Asker y Jerling 1992; Mogie 1992; Koltunow 1993; Pessino *et al.* 1999; Savidan 2000). Sin embargo, debido a la complejidad del proceso apomíctico, existen diferentes interpretaciones sobre como está controlado genéticamente. Los primeros análisis genéticos de la apomixis se llevaron a cabo en el género *Hieracium*, el cual posee aposporia, y en el cual mediante cruzamientos entre plantas sexuales y apomícticas se determinó que el carácter posee un control genético simple y es dominante sobre sexualidad (Ostenfeld 1910, Christoff 1942). Estos resultados han sido actualmente confirmados en un análisis exhaustivo de progenies segregantes generadas por cruzamientos entre dos especies apomícticas de *Hieracium* y genotipos sexuales (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).

Stebbins (1950) por su parte estableció que la condición apomíctica es recesiva con respecto a la sexualidad, aunque incrementando el número cromosómico a menudo se incrementa su tendencia hacia la dominancia. Por otro

lado, Powers (1945) propuso un modelo teórico de regulación genética de la apomixis para el género *Parthenium*, el cual posee diplosporia. En dicho trabajo, el autor asumió que la homocigosis de tres genes recesivos es un prerrequisito para la reproducción apomíctica. El genotipo *aa* sería el responsable de la no reducción meiótica; el genotipo *bb* provocaría la falla de la fecundación de la gameta femenina y un tercero *cc* permitiría el desarrollo partenogenético de la oosfera para originar el embrión. De esta forma las plantas apomícticas tendrían el genotipo *aabbcc* y es probable que la apomixis se origine a nivel diploide.

Entre las Gramíneas, el género *Poa* ha sido el más extensamente estudiado. Se propusieron diferentes modelos de control genético. Müntzing (1940) propuso un balance genético controlado por muchos genes. Åkerberg y Nygren (1959) lo atribuyeron a varios genes recesivos; mientras que Funk y Han (1967) a dos modificadores dominantes. Por otro lado, y más recientemente, Matzk (1991) determinó que al menos el componente partenogenético estaría regulado por un gen simple dominante. Barcaccia *et al.* (1998) llegaron a la misma conclusión a partir del uso de la prueba de auxina y marcadores moleculares. En el complejo *Bothriochloa-Dichanthium*, se propuso que la apomixis es un carácter dominante pero independiente de la sexualidad, y ambos no son modos alternativos de reproducción, tanto genéticamente como operacionalmente, sino fenómenos simultáneos e independientes (Harlan *et al.* 1964). En *Pennisetum ciliare*, los primeros estudios realizados por Taliaferro y Bashaw (1966) mediante análisis de progenies segregantes, tanto de la madre autofecundada como de híbridos F<sub>1</sub>, se determinó que el método de reproducción está contro-

lado por dos genes. Un gen "A" el cual condiciona para apomixis y un gen "B" el cual condiciona para sexualidad y es epistático con el gen "A". Por su parte, en *Panicum maximum*, Hanna *et al.* (1973) establecieron que la sexualidad es dominante sobre apomixis y que la misma estaría controlada por al menos dos loci y a su vez condicionada por un efecto de dosaje de dos o más alelos dominantes. Posteriormente, ambas especies fueron nuevamente analizadas, mediante estudios embriológicos en diferentes progenies (F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>s, retrocruzas, etc.), y en ambos casos se propuso que la apomixis está gobernada por un factor Mendeliano simple y el mismo sería dominante sobre sexualidad (Savidan 1982; Sherwood *et al.* 1994). De acuerdo a Savidan, los primeros resultados obtenidos por Taliaferro y Bashaw (1966) y Hanna *et al.* (1973), se debieron al hecho que las plantas tetraploides naturales utilizadas como madre pudieron haber sido apomícticas facultativas de genotipo **Aaaa** con un alto grado de expresión sexual debido a genes modificadores. La capacidad apospórica de los padres pudo no haber sido reconocida debido a la limitación de los métodos citológicos y a la prueba de progenie utilizada en aquellos años (Sherwood *et al.* 1994). En *Bracharia*, otra gramínea tropical apospórica, también se sugirió que la apomixis tendría una herencia monogénica y dominante sobre sexualidad (do Valle *et al.* 1994; Miles y Escandon 1997; do Valle y Savidan 1996). En el complejo *Ranunculus auricomus*, perteneciente a la familia de las Ranunculaceas, se obtuvieron resultados similares a los anteriores, pero con algunas variantes (Nogler 1975, 1982, 1984b). A partir de cruzamientos interespecíficos entre un diploide sexual de *R. cassubicifolius* (2n=2x=16) y un tetraploide apo-

mítico de *R. megacarpus* ( $2n=4x=32$ ) y el estudio de cuatro generaciones de cruzamientos y retrocruzas, se concluyó que la apomeiosis en el género posee un control monogénico. Tres hechos interesantes fueron registrados en este estudio: 1) la formación de dihaploides apomíticos en la segunda retrocruza, algunos de los cuales fueron fértiles y pudieron ser usados para producir la siguiente generación de retrocruzas; 2) la ausencia en la transmisión del alelo "A" en gametas haploides y 3) la obtención de un trisómico apomítico en la primera generación de retrocruzas.

En el género de gramínea diplospórica *Tripsacum*, Leblanc *et al.* (1995) y Grimanelli *et al.* (1998a) encontraron una segregación 1:1 en híbridos  $F_1$  de maíz-*Tripsacum*. Por su parte, en otro estudio realizado por Kindiger y Dewald (1997) en híbridos entre las mismas especies, concluyeron que la apomeiosis y la partenogénesis en *Tripsacum dactyloides* están controladas por dos loci independientes. Según Savidari (2000), estos resultados difieren con los anteriores por tratarse de cruzamientos entre individuos de diferentes niveles de ploidía. A conclusiones similares a las de Kindiger y Dewald (1997) se llegaron en otros géneros diplospóricos. Kojima *et al.* (1994) observaron en la especie *Allium tuberosum*, la presencia de dos híbridos que poseían un desarrollo y un control genético de la apomeiosis y la partenogénesis independiente. En un estudio reciente en la especie diplospórica *Erigeron annuus* (*Asteraceae*), realizado mediante cruzamientos entre un citotipo diploide sexual ( $2n=2x=18$ ) y otro triploide apomítico ( $2n=3x=27$ ), se determinó que los dos componentes principales del proceso apomítico, como son la formación de sacos embrionarios no

reducidos y la partenogénesis, no están ligados entre sí y por lo tanto son heredados en forma independiente (Noyes 2000; Noyes y Rieseberg 2000). Por el contrario, en *Taraxacum*, otro género diplospórico, Mogie (1988) propuso un control genético diferente a los anteriores. De acuerdo a Mogie (1988) el control de la meiosis reside en un solo locus, donde el alelo silvestre  $a^+$  controla la reducción meiótica, mientras que las copias en exceso del alelo mutante  $a^-$  para apomixis, controla la producción de gametas femeninas no reducidas. La relación de dominancia entre los alelos está determinada por su proporción y por el medio ambiente.

Una cuestión importante a tener en cuenta es la influencia que tienen los factores ambientales sobre la expresión de la apomixis. Los cambios estacionales en los regímenes de temperatura y luz pueden influenciar el comportamiento reproductivo en las poblaciones (Asker y Jerling 1992). En *Eragrostis curvula*, una gramínea con diplosporia facultativa, la exposición en condiciones experimentales a un fotoperíodo de días cortos, disminuyó el porcentaje de sacos embrionarios no reducidos (Brix 1977). Entre las gramíneas apospóricas, el fotoperíodo también ejerce su influencia sobre la mayor o menor producción de sacos embrionarios no reducidos. En *Dichanthium annulatum* el acortamiento de las horas de luz aumenta significativamente el porcentaje de sacos embrionarios apospóricos (Knox y Heslop-Harrison 1963). Quarin (1986) analizó la incidencia del fotoperíodo en la formación de sacos embrionarios en óvulos maduros de tres citotipos de *Paspalum cromyorrhizon*, bajo condiciones naturales y experimentales. Las plantas diploides de reproducción sexual mostraron

durante la primavera los valores más altos de presencia de sacos embrionarios mixtos (meióticos + apospóricos) mientras que los tetraploides apomícticos facultativos también tuvieron una mayor expresión de sacos embrionarios apospóricos durante la primavera-verano. Esto es coincidente con fotoperíodos largos de 14 hs de luz y 10 hs de oscuridad. Sin embargo, en condiciones de fotoperíodos cortos (12 hs de luz y 12 de oscuridad) hay una mayor incidencia de sacos embrionarios de origen meiótico.

### **1.8. Marcadores moleculares como herramienta para estudios genéticos**

Los marcadores moleculares constituyen uno de los principales aportes de la biología molecular a la genética vegetal. Estos comprenden un variado conjunto de técnicas que permiten detectar diferencias a nivel del ADN, que incluyen desde grandes deleciones e inserciones hasta mutaciones puntuales. Hasta mediados de la década del 60 los marcadores utilizados para el estudio de la genética y el mejoramiento vegetal eran controlados por genes asociados a caracteres morfológicos. Debido al escaso número de marcadores morfológicos que es posible diferenciar en una misma población, se reduce la probabilidad de encontrar asociaciones significativas entre estos marcadores y caracteres de importancia económica a través del estudio de poblaciones segregantes. Por otra parte, los marcadores morfológicos están restringidos a su identificación en unas pocas plantas de importancia económica, tales como el maíz, arroz y tomate; mientras que el resto de las especies carecía de información a este nivel. El número de marcadores genéticos disponibles, como así también

su potencial análisis en diferentes especies, pudo ser ampliado a partir del desarrollo de los marcadores isoenzimáticos. Con el advenimiento de las técnicas modernas de biología molecular, surgieron diversos métodos de detección de polimorfismo genético a nivel de ADN. Los ensayos a partir de los cuales se generan marcadores moleculares pueden ser divididos en cuatro principales categorías:

- (1) ensayos basados en digestión del ADN con endonucleasas y posterior hibridación, fundamentalmente **RFLP** (Polimorfismos para el largo de los fragmentos de restricción) (Botstein *et al.* 1980; Tanksley *et al.* 1989).
- (2) ensayos basados en la amplificación del ADN, representados principalmente por dos técnicas:
  - a. **RAPD** (Polimorfismos de ADN amplificados al azar) (Williams *et al.* 1990)
  - b. **AP-PCR** (PCR de iniciadores arbitrarios) (Welsh y McClelland 1990).
- (3) ensayos basados en la amplificación selectiva de fragmentos de restricción de ADN, denominados **AFLP** (Vos *et al.* 1995)
- (4) ensayos basados en la amplificación de secuencias repetitivas del ADN de 1-6 pb de longitud denominadas **Microsatélites** o **SSR** (repeticiones de secuencias simples) (Litt y Luty 1989)

**1.8.1. RFLP**

Los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) se basan en separar mediante electroforesis los fragmentos de ADN obtenidos por digestión con una enzima de restricción, y detectar mediante hibridación con fragmentos de ADN marcados (sondas), correspondientes a secuencias únicas o de bajo número de copias (Tanskley *et al.* 1989), que determinará la generación de un patrón simple de hibridación. Un RFLP ocurrirá cuando existan variaciones en la secuencia de ADN que involucren cambios en la distancia entre sitios de corte de la enzima, en fragmentos que incluyan la secuencia correspondiente a la sonda utilizada (Figura 4). Los RFLP detectan tanto mutaciones puntuales que afectan sitios de restricción, como rearrreglos cromosómicos (inversiones, deleciones e inserciones) en la vecindad de sitios de corte, siendo éstos últimos las causas más frecuentes de polimorfismos en vegetales superiores.

Los RFLP son alta y establemente heredables, de efecto fenotípico neutro, no influenciados ambientalmente, de segregación mendeliana, multialélicos y fueron los primeros marcadores que se desarrollaron con posibilidad de saturar un mapa. Si bien esto es teóricamente irrefutable, en la práctica existen dos limitaciones: el número de sondas desarrolladas y el escaso grado de polimorfismo encontrado en ciertos organismos.

El desarrollo de sondas para RFLP incluye el aislamiento, clonado y selección de fragmentos de ADN, y además requiere una extensiva evaluación

para identificar secuencias de bajo número de copias (o ADN de secuencia única).

Otra desventaja inherente a los RFLP es que son técnicamente complejos (requieren cierta infraestructura), de alto costo e involucran mucho trabajo. Además, la cantidad de ADN necesario (un mínimo de 10 µg por genotipo por carril electroforético) hace impracticable detectar RFLP para un gran número de sondas partiendo de plántulas.

En resumen se puede decir que las principales ventajas y desventajas de los RFLP son las siguientes:

### **Ventajas:**

- 1) Es una técnica de visualización co-dominante (permite observar 2 alelos en el heterocigota) y multialélica mostrando una alta información polimórfica, según el grupo de análisis.
- 2) Son altamente reproducibles y las sondas son en la mayoría de los casos de carácter público.
- 3) Sirven para establecer mapas comparativos entre distintas especies y aún entre distintos géneros (sintenia).
- 4) Son puntos de anclaje de otros marcadores en mapas de ligamiento.

### **Desventajas:**

- 1) El desarrollo de las genotecas es laborioso y costoso, al igual que la selección de los clones para secuencias de bajo número de copias.
- 2) Se requiere la utilización de mucha cantidad de ADN de gran pureza
- 3) La aplicación es muy laboriosa y costosa.

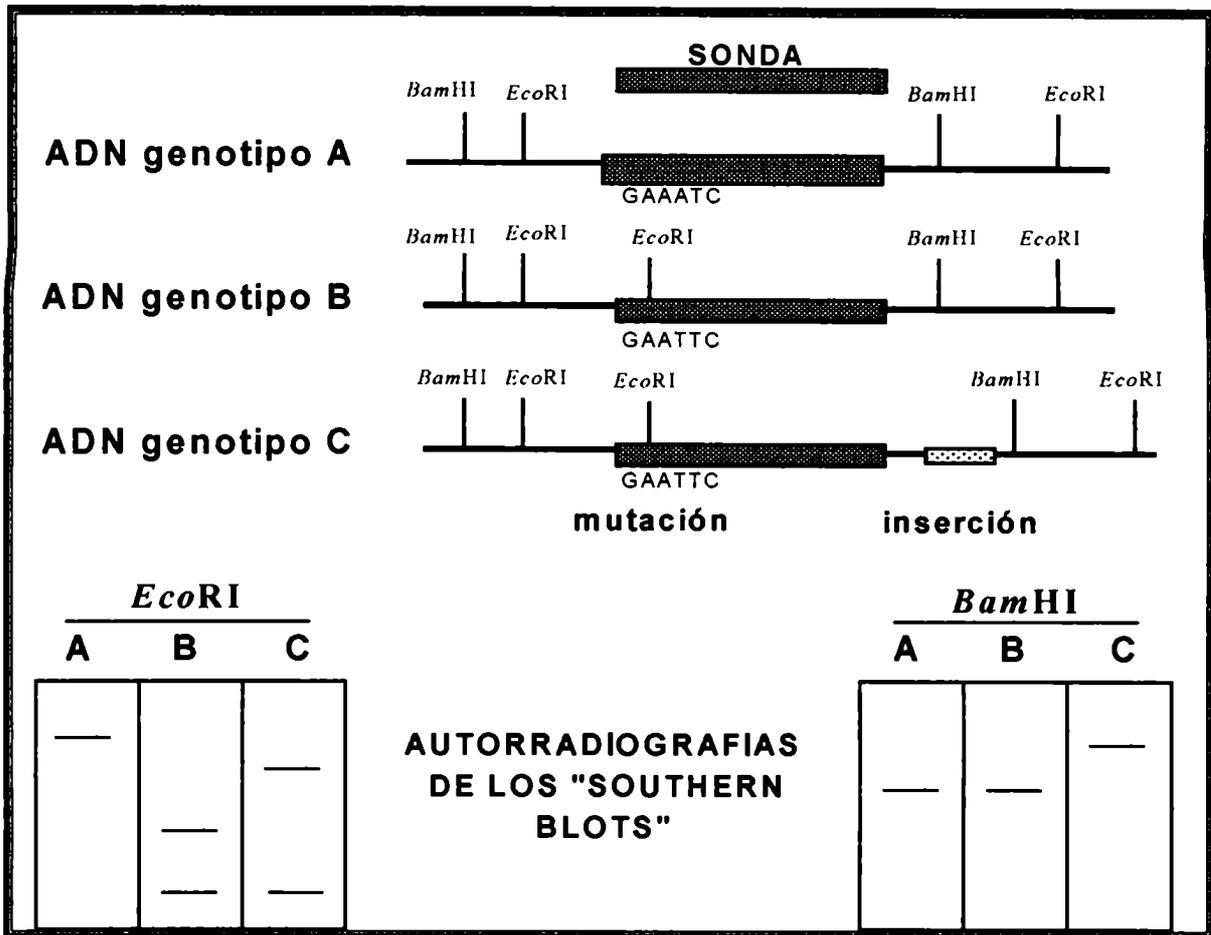


Figura 4: Detección de polimorfismos mediante la técnica de RFLP.

### 1.8.2. RAPD

En la técnica de **RAPD**, utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (**PCR**), un oligonucleótido ("primer") actúa como iniciador para la ADN polimerasa a lo largo de todo el genoma a partir de los sitios donde se presenten secuencias complementarias. Cuando dos "primers" hibriden en hebras complementarias y a una distancia de 200 a 3000 pares de bases entre ellos, el frag-

mento comprendido entre las secuencias complementarias a los "primers" será amplificado. El producto generado podrá visualizarse mediante una electroforesis en gel de agarosa. Si dos genotipos difieren en las secuencias complementarias a los primers, presentarán un **polimorfismo** entre ellos consistente en la presencia versus ausencia de una o más bandas (Figura 5) (Williams *et al.* 1990; Welsh y McClelland 1990).

### **Ventajas:**

- 1) Los ensayos requieren una muy pequeña cantidad de ADN
- 2) Suelen ser eficientes en la detección de polimorfismos
- 3) No requieren una tecnología sofisticada para su realización

### **Desventajas:**

- 1) Son marcadores de visualización dominante (como se mencionó anteriormente).
- 2) La información de un *locus* no puede ser siempre extrapolada entre especies. Es decir, a medida que aumenta la distancia genética aumenta la probabilidad de que 2 bandas que comigren pertenezcan a 2 loci diferentes.
- 3) No son altamente reproducibles entre distintos laboratorios.

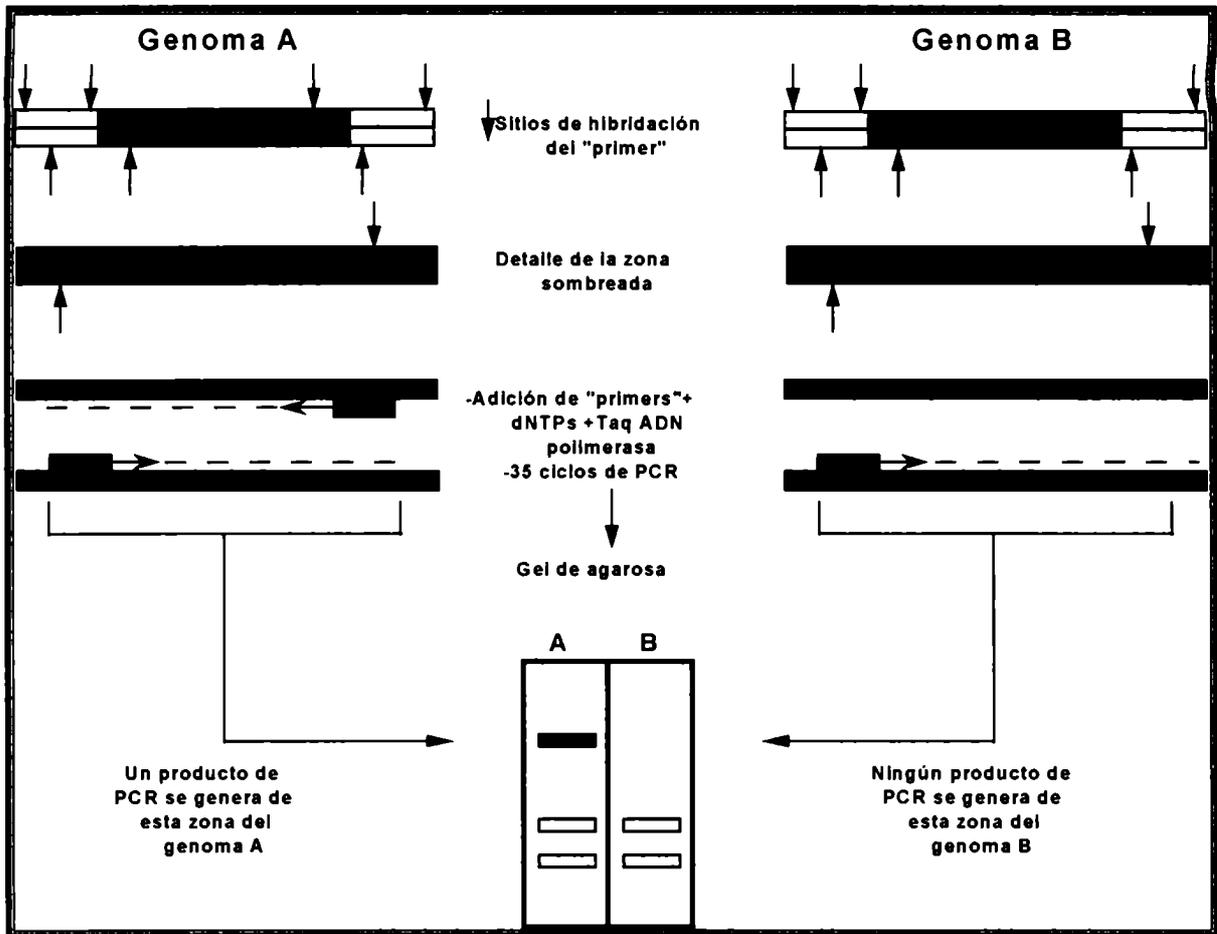


Figura 5: Detección de polimorfismos mediante la técnica de RAPD

### 1.8.3. AFLP

Recientemente, se ha desarrollado una nueva técnica que utiliza una combinación de los dos métodos descritos anteriormente (digestión y amplificación) para detectar variabilidad. Se la denomina polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFLP) y combina la presencia o ausencia de sitios de restricción y la existencia de polimorfismos de secuencia adyacente a esos sitios (Figura 6). Los AFLP fueron desarrollados por Zabeau y Vos (1993) y por Vos *et al.* (1995). Se basan en la restricción de ADN con dos enzimas de restricción, una de corte poco frecuente, como *EcoRI* (que reconoce una secuencia de 6 bases) y la otra, *MseI* (que reconoce una secuencia de 4 nucleótidos) con una frecuencia mucho más alta. Una vez generados estos fragmentos, los mismos son ligados a adaptadores de doble cadena, para cada uno de los sitios de restricción obtenidos. De esta manera se obtienen secuencias de ADN con sus extremos conocidos, como para amplificarlas por medio de la técnica de PCR. Los fragmentos que se obtienen son de tres tipos según los extremos agregados:

- ambos extremos con sitios *EcoRI*
- ambos extremos con sitios *MseI*
- con extremos distintos.

De esta manera el número de productos obtenidos es muy grande (dependiendo de la complejidad del genoma) e imposible de analizar en una sola corrida electroforética. Para disminuir la complejidad del patrón de bandas se realiza una segunda amplificación mediante PCR con oligonucleótidos selecti-

vos, los cuales poseen bases nucleotídicas adicionales en los extremos 3'. Luego de la amplificación, los fragmentos producidos se separan mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida y se tiñen con nitrato de plata o bien se utiliza marcación radiactiva y se revelan autoradiográficamente. También pueden evidenciarse en sistemas de secuenciación nucleotídica automática marcados con fluorocromos.

Según la técnica empleada para revelar el gel, pueden observarse distintos productos. Así por ejemplo, si se marca con nucleótidos radiactivos o fluorescentes el oligonucleótido *EcoRI*, sólo se verán los fragmentos que posean al menos un extremo *EcoRI* en su secuencia. En cambio, si se utiliza la tinción con plata, se verán todos los fragmentos que se hubieran amplificado, independientemente de los extremos, dependiendo entonces de la magnitud de la amplificación y del tamaño. Si bien el mayor número de fragmentos que se amplifica posee sitios *MseI* a ambos lados, como son de tamaño muy pequeño, se pierden con el frente de corrida del gel y no se visualizan. Por lo tanto, en general sólo se evidencian los fragmentos *EcoRI-EcoRI* y los *EcoRI-MseI*, independientemente del método de tinción que se emplee.

Estos marcadores moleculares (así como los RAPD) en general son de visualización dominante, ya que raras veces el alelo produce amplificación productiva o, en el caso de hacerlo, se requiere de cruzamientos para confirmar que se trata de alelos. Por otro lado, la ausencia compartida de una banda entre dos genotipos (que comparten el "alelo" nulo) no se considera como criterio de relación genética porque suele estar causada por mutaciones no relaciona-

das (causantes de este comportamiento). La falta de multialelismo y la imposibilidad de contabilizar las dos variantes alélicas reducen notablemente el contenido de información polimórfica aportado por este tipo de marcadores. Comparados con los RFLP y SSR, el número de alelos polimórficos es menor, pero el número de loci que se evalúa en una única combinación de "primers" es mucho mayor y por lo tanto son más efectivos en la cobertura y representación del genoma. Los AFLP tienen la ventaja de que no se necesita conocimiento previo de secuencia para su uso, y con una sola reacción se evalúan varias regiones del genoma simultáneamente. Asimismo, el uso de AFLP ha evidenciado gran utilidad en especies que han presentado bajo nivel de polimorfismo con RFLP y RAPD, (Maughan *et al.* 1996).

En resumen las principales **ventajas** de los AFLP son:

- 1) El gran número de loci ensayados simultáneamente.
- 2) Son muy reproducibles debido a la exigente temperatura de hibridación durante la PCR.
- 3) No se requiere información previa, y puede aplicarse a cualquier organismo

Las **desventajas** son:

- 1) Son marcadores de visualización dominante (igual que los RAPD)
- 2) Requieren una buena calidad de ADN.
- 3) Requieren de la utilización de geles de secuenciación y tinción con nitrato de plata, autoradiografía o fluorescencia (secuenciador automático).

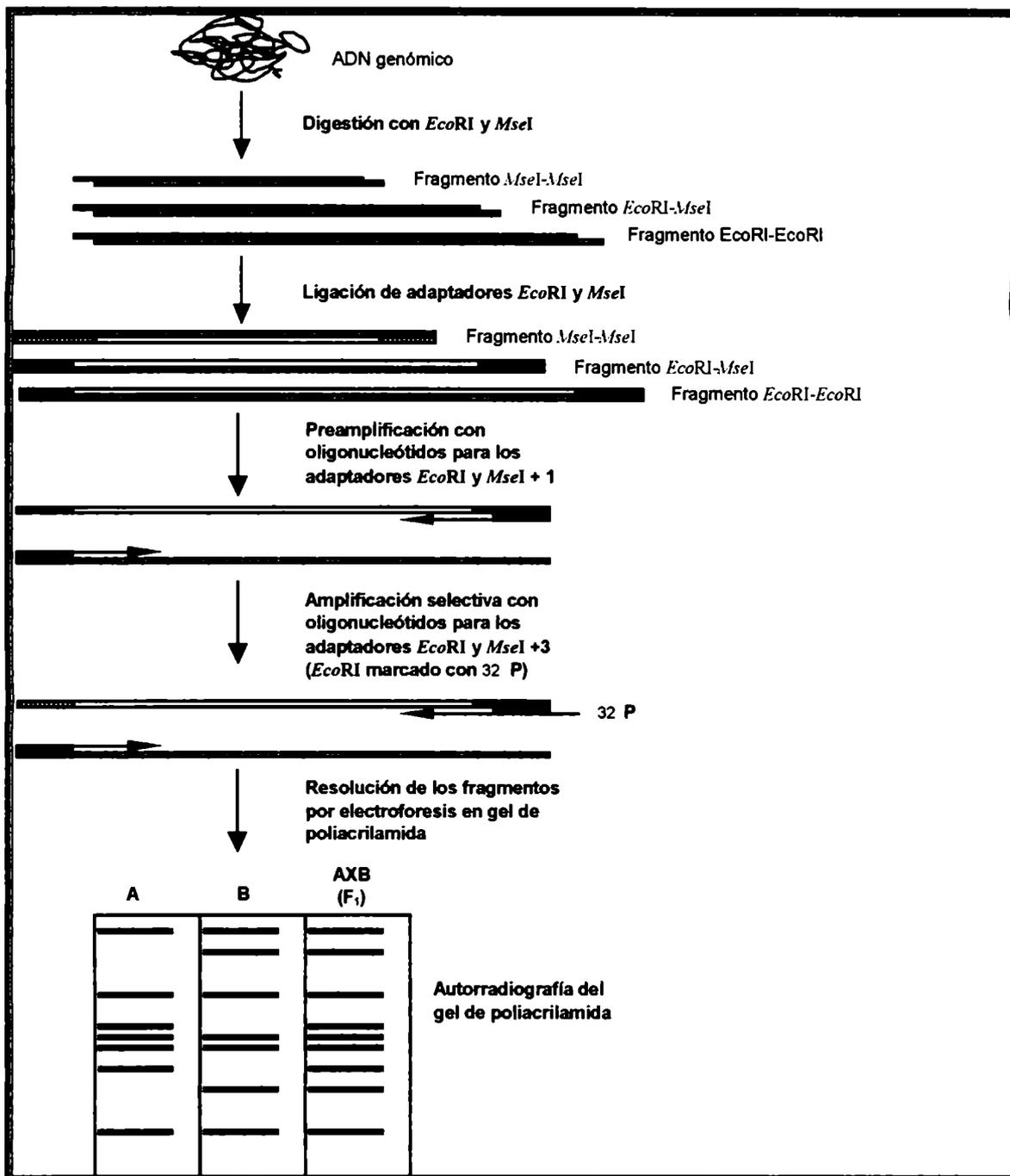


Figura 6: Representación esquemática de la obtención de polimorfismos mediante la técnica de AFLP

## 1.8.4. Microsatélites o SSR

El término microsatélite fue introducido por Litt & Luty (1989) para describir repeticiones cuyos motivos van de 1 a 6 pb. Son marcadores muy importantes debido a que son co-dominantes, multialélicos y están distribuidos en todos los genomas de los organismos vivos. Son muy utilizados en el desarrollo de mapas genéticos y como herramienta en la identificación de genotipos mediante huellas dactilares ("fingerprinting") y en la selección asistida por marcadores. Para poder utilizarlos es necesario desarrollar una biblioteca de fragmentos genómicos pequeños (300-500 pb) de la especie a estudiar. Como estas bibliotecas no están desarrolladas para la mayoría de las especies vegetales y en particular para *Paspalum*, además de ser costosas y requerir mucho trabajo, no fue posible utilizar estos marcadores para este estudio y por lo tanto no nos abocaremos a su descripción.

## 1.8.5. Criterios de elección de los marcadores más apropiados

Debido a que cada uno de los sistemas de marcadores citados cuenta con distintas clases de ventajas y desventajas, la elección de uno u otro sistema dependerá de los objetivos particulares del proyecto de mapeo u mejoramiento encarado. La introgresión de caracteres, el mapeo de caracteres cualitativos, el mapeo de caracteres cuantitativos y el análisis de germoplasma tienen cada uno diferentes desafíos técnicos, y por lo tanto diferentes requerimientos de los marcadores (Mazur y Tingey 1995).

Uno de los puntos más álgidos de diferencia entre los sistemas de marcadores es la codominancia versus dominancia. Esto es especialmente importante cuando se intenta discriminar en un locus determinado, el comportamiento de todos los alelos (i.e. AA/Aa/aa). Si por motivos económicos, técnicos o de otra índole, se decide optar por alguno de los marcadores dominantes, puede salvarse parcialmente la pérdida de información genética transformando el marcador dominante del locus de interés en un marcador codominante.

La utilización de marcadores moleculares en el mejoramiento genético vegetal está orientada a la identificación y localización de genes (o regiones genómicas) relacionados con caracteres de interés agronómico. Para lograr este objetivo es necesario desarrollar detallados mapas de ligamiento genético (Tanksley *et al.* 1989). El interés final de la mayoría de los estudios de mapeo de genes de interés, es lograr clonar (aislar) y controlar dichos genes. Es imprescindible contar con mapas de ligamiento altamente saturados (i.e. con una alta densidad de marcadores por cromosoma) para poder iniciar estrategias de clonado posicional ("positional cloning"), también llamado clonado en base a mapeo ("map-based cloning"). Estas estrategias se basan en las técnicas de caminado cromosómico ("chromosome walking") (Wicking y Williamson 1991; Giraudat *et al.* 1992; Martin *et al.* 1993) y más recientemente aterrizaje cromosómico ("chromosome landing") (Tanksley *et al.* 1995).

Usando marcadores moleculares se construyeron mapas genéticos en numerosas especies vegetales: tomate (Tanksley *et al.* 1992); maíz (Coe *et al.* 1990; Burr *et al.* 1988); papa (Gebhardt *et al.* 1991); soja (Muehlbauer *et al.*

1991); arroz (McCouch *et al.* 1988); caña de azúcar (Al-Janbi *et al.* 1993) y trigo (Hart 1994).

Para caracteres monogénicos u oligogénicos, cuyo modo de herencia puede ser determinado por métodos mendelianos clásicos, el mapeo puede ser realizado por análisis de cosegregación de los marcadores y el carácter (Tanksley *et al.* 1989, Melchinger 1990). Los marcadores moleculares ligados a esta clase de caracteres (principalmente resistencias a hongos, bacterias, virus e insectos) han sido identificados en diversas especies (Barone *et al.* 1990; Bentolila *et al.* 1991; Martin *et al.* 1991; Michelmore *et al.* 1991; Paran *et al.* 1991; Ritter *et al.* 1991; Leonards-Schippers *et al.* 1992; Martin *et al.* 1992; Ronald *et al.* 1992; Balintkurti *et al.* 1994).

#### **1.8.6. Antecedentes del uso de marcadores moleculares para la caracterización genética y genómica de la apomixis**

El estudio de la apomixis necesita de una metodología de cuantificación rápida y exacta, de tal manera de evitar la aplicación de métodos histológicos tediosos o testes de progenie (Koltunow 1995).

El reciente desarrollo de la tecnología de marcadores moleculares ofrece la posibilidad de una rápida búsqueda y determinación ("screening") del carácter, en caso de encontrar un marcador lo suficientemente ligado, y la posibilidad de una mejor caracterización del proceso apomíctico. Esto sería una herramienta esencial en los programas de mejoramiento genético (Hanna 1995). Los marcadores moleculares también posibilitarían el desarrollo de estudios compa-

rativos sobre la estructura genómica y facilitarían el aislamiento de los genes responsables, mediante clonado posicional, en caso de encontrarse lo suficientemente ligados al locus en cuestión (Pessino *et al.* 1999).

Todavía son escasas las referencias existentes sobre la utilización de la tecnología de los marcadores moleculares aplicada al estudio del proceso apomíctico.

Desde hace varios años atrás que algunos centros importantes de investigación están tratando de transferir la apomixis a las especies de importancia económica. Debido a que dicho carácter no está presente en las especies cultivadas, se recurrió a hibridaciones interespecíficas con parientes salvajes que sí poseen dicho carácter. Este es el caso de *Tripsacum*, un género emparentado con el maíz, y el cual posee apomixis del tipo diplospórica. A partir de cruza- mientos entre ambas especies (ver 1.6.1.), dos grupos independientes de in- vestigación, obtuvieron una población híbrida F<sub>1</sub>, la cual segrega 1:1 para el modo de reproducción (Leblanc *et al.* 1995, Kindiger *et al.* 1996). En los últimos años estas poblaciones fueron utilizadas para la detección de marcadores mo- leculares ligados a la región genómica de la apomixis. Para ello, se valieron de la sintenia existente entre los genomas de las gramíneas, mediante la exami- nación del genoma híbrido a partir de sondas distribuidas por todo el mapa de maíz. La técnica de análisis de segregantes combinados ("bulked segregant analysis", BSA) permitió un rápido análisis e identificación de marcadores rela- cionados con la región responsable del carácter. Leblanc *et al.* (1995) encontra- ron que todos los marcadores ligados a diplosporia pertenecen al mismo grupo de ligamiento en maíz, localizados en el extremo distal del brazo largo del cro-

mosoma 6. Por su parte, Kindinger *et al.* (1996) confirmaron estos resultados y suministraron nuevas evidencias mediante la evaluación de materiales generados de líneas apomícticas que poseen 30 cromosomas de maíz (Mz) + 9 cromosomas de *Tripsacum* (Tr). En la primera generación de plantas sexuales derivadas de padres apomícticos, se encontró por análisis cariotípico, que las mismas carecían de Tr16, lo cual indica que Tr16 posiblemente porta los genes que controlan el desarrollo apomíctico. El análisis comparativo mediante RAPD, de varias progenies híbridas, y una probable translocación Mz6L-Tr16L, la cual parece contener gran parte de la región Mz6L y haber perdido el brazo Tr16S, permitió asignar varios marcadores de RAPD al locus que controla la apomixis en Tr16L.

El mapeo de híbridos tetraploides diplospóricos de maíz-*Tripsacum* demostró una fuerte restricción a la recombinación en el área asociada con la apomixis, al compararla con el correspondiente segmento en diploides sexuales de *Tripsacum* y maíz (Grimanelli *et al.* 1998a). Estos resultados fueron interpretados como una evidencia indirecta de la existencia de un grupo de genes de función relacionada, los cuales están fuertemente ligados y actúan en el desencadenamiento y el desarrollo del proceso apomíctico.

En tres especies de gramíneas apospóricas se ha informado la identificación de marcadores moleculares ligados a apomixis. Uno de esos fue realizado en híbridos interespecíficos de *Pennisetum*, producidos por cruzamientos entre un tetraploide inducido de "mijo perla" (*Pennisetum glaucum*) ( $2n=4x=28$ ), un especie apomíctica relacionada (*Pennisetum squamulatum*) ( $2n=6x=54$ ) y una especie puente (*Pennisetum purpureum*) ( $2n=4x=28$ ) (Ozias-Akins *et al.* 1993).

Se utilizaron líneas clonales de la tercera generación de retrocruzas (BC3) y los cuatro cultivares o accesiones en su "pedigree". De todos los marcadores reportados, los más importantes fueron un fragmento de RFLP (UGT197) y un marcador RAPD (OPC-04). Ambos detectaron un marcador en BC3 que solamente fue compartido con el padre apomítico *P. squamulatum*. UGT197 no hibridó con ninguno de los genotipos no apomíticos de BC3; mientras que tanto UGT197 y OPC-04 siempre estuvieron presentes en las plantas apomíticas obligadas. En un trabajo posterior realizado en 29 accesiones de *Pennisetum*, se demostró que UGT197 fue el que más consistentemente estaba asociado con el carácter (Lubbers *et al.* 1994). Marcadores de RAPD fueron también utilizados para producir un mapa de la región.

En un trabajo publicado recientemente, Ozias-Akins *et al.* (1998) reportaron que los genes para apomixis en *Pennisetum squamulatum* ( $2n=6x=54$ ) estarían ubicados en un segmento hemizigótico, en el cual la recombinación está reprimida, y al cual denominaron ASGR (Apospory Specific Genomic Region). La falta de recombinación cerca del locus de apomixis, similar al ejemplo de *Tripsacum*, podría ser importante en el mantenimiento de la herencia del carácter, evitando de esa manera la dispersión de genes que están acoplados en su función.

### **1.9. *Paspalum*: Su importancia como género apomítico**

*Paspalum* es un género perteneciente a la familia de las Gramíneas, subfamilia *Panicoideae*, tribu *Panicæae*, el cual posee más de 400 especies distri-

buidas por todo el continente americano (Chase 1929). Muchas de estas especies son importantes forrajeras en regiones tropicales y subtropicales del nuevo mundo. Posee 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 16x (Burton 1940). Se considera que aproximadamente la mitad de éstos poliploides son tetraploides. Por otro lado, la mayoría de los tetraploides son apomícticos y la aposporia es el tipo de apomixis predominante (Quarin 1992). En el género es común que muchas especies tetraploides apomícticas posean su contraparte coespecífica diploide sexual. Estos diploides poseen una meiosis regular con un apareamiento cromosómico de 10 bivalentes y una distribución normal. En general son alógamos debido a un sistema genético de autoincompatibilidad. Por el contrario, la mayoría de los tetraploides apomícticos tienen una meiosis irregular, con asociaciones cromosómicas múltiples, prevaleciendo la formación de cuadrivalentes. Debido a ello se ha sugerido que la autopoloidía o la alopoloidía segmental han sido el principal origen de muchos tetraploides apomícticos. Sin embargo, todos los tetraploides que se reproducen sexualmente poseen una meiosis regular, con bivalentes como principal asociación cromosómica, lo cual sugiere un origen aloploide (Quarin 1992).

Existen evidencias que en el género la mayoría de las especies apomícticas se han originado por autopoloidía de diploides sexuales alógamos (Norrmann *et al.* 1989; Quarin *et al.* 1989; Quarin y Norrmann 1990). Por otro lado, en *Paspalum simplex*, el análisis mediante marcadores de RFLP de híbridos

entre tetraploides apomícticos naturales y diploides sexuales duplicados mediante colchicina, determinó una segregación de tipo tetrasómica, con lo cual constituye otra evidencia genética del origen autoploide de muchos apomícticos (Pupilli *et al.* 1997).

### **1.9.1. La especie *Paspalum notatum* Flüggé**

#### **1.9.1.1. Taxonomía**

##### **1.9.1.1.1. Descripción botánica**

Es una gramínea perenne que posee rizomas superficiales rastreros, gruesos, formado por cortos entrenudos, usualmente cubiertos por las viejas vainas foliares secas. Tiene un tallo simple ascendente, geniculado en el nudo entre el primero y segundo entrenudo elongado, de lo contrario erecto, de 10-60 cm de altura. Las hojas están usualmente comprimidas en la base con vainas estriadas superpuestas, glabras o con márgenes ciliados hacia el ápice. La lámina usualmente es plana o algo plegada hacia la base, linear-lanceolada de 3-30 cm de longitud, 3-12 mm de ancho, usualmente glabra o ciliada hacia la base, rara vez pubescente. Tiene inflorescencias sub-conjugadas con un corto y casi imperceptible eje común, con dos racimos, a veces 3, ascendentes o recurvo-divergente en algunas razas, 3-14 cm de longitud. Tiene un raquis glabro, flexuoso, verde o purpúreo. Las espiguillas son solitarias, formando dos hileras a cada lado del raquis, de forma aovado-elípticas comprimidas, brillantes, glabras, de 2,5 a 4 mm de longitud, 2 a 2,8 de ancho, con anteras y estigmas purpúreos y con cariopse oval de 1,8 mm de longitud y 1,2 mm de ancho.

### 1.9.1.1.2. Variedades botánicas

Existen descritas dos variedades botánicas de *Paspalum notatum*:

La variedad típica se conoce con el nombre en inglés "**Common Bahiagrass**" es la más ampliamente distribuida, posee hojas anchas, fuerte enraizamiento y propagación lenta por fuertes rizomas con cortos entrenudos.

"**Pensacola Bahiagrass**" pertenece a *P. notatum* var. *saurae*, la cual comparada con la anterior es más alta, se extiende más rápidamente, posee hojas más largas y angostas, espiguillas más pequeñas, y puede tener más racimos por inflorescencias.

### 1.9.1.2. Genética

#### 1.9.1.2.1. Número cromosómico

El primer recuento cromosómico fue hecho por Burton (1940) quién determinó  $2n = 40$  para "**Common Bahiagrass**". Si bien muchos estudios indican que este es el número cromosómico más común, un citotipo de 20 cromosomas fue descubierto en Pensacola, Florida (USA); donde fue introducido accidentalmente desde Entre Ríos, Argentina, su centro de origen (Burton 1946; Saura 1948). Los citotipos con  $2n = 20$  cromosomas pertenecen a la variedad botánica *P. notatum* var. *saurae* el cual usualmente es conocido como "**Pensacola Bahiagrass**". Se hicieron estudios de 150 colecciones de *P. notatum*, principalmente de origen sudamericano (Tischler y Burton 1995; Pozzobon y Valls 1997). En dichos trabajos se determinó que el 88 % poseía  $2n = 40$  cromosomas, mientras que las plantas con  $2n = 30$  y  $2n = 50$  cromosomas fueron ex-

cepcionales. Las plantas con  $2n = 20$  cromosomas fueron encontradas solamente en el noreste de Argentina, mientras que unas 12 accesiones con  $2n = 20$  coleccionadas en el sur de Brasil fueron consideradas escapes de áreas de pasturas cultivadas de "*Pensacola Bahiagrass*". Experimentalmente, se obtuvieron plantas con  $2n = 50$  y  $2n = 60$  cromosomas, mediante polinización de una planta apomíctica de 40 cromosomas con polen de otra de 20 y 40 cromosomas respectivamente (Burton 1948; Martínez *et al.* 1994). Plantas con 40 cromosomas fueron producidas a partir de citotipos de 20 cromosomas después del tratamiento con colchicina (Forbes y Burton 1961), método que ocasionalmente también puede producir plantas con 80 cromosomas (Quarin 1999).

#### 1.9.1.2.2. Niveles de ploidía

Para muchas especies de *Paspalum*, el número cromosómico básico es  $x = 10$ , aunque fueron propuestos  $x = 6$  y  $x = 9$  para el complejo *P. alnum* (Quarin 1974) y para *P. contractum* (Davidse y Pohl 1974), respectivamente. *Paspalum notatum* pertenece a las especies con  $x = 10$  y, en consecuencia, en la naturaleza existe un rango que se extiende del diploide ( $2n = 2x = 20$ ) al pentaploide ( $2n = 5x = 50$ ). Por otra parte, fueron producidos hexaploides ( $2n = 6x = 60$ ) y octoploides ( $2n = 8x = 80$ ) en condiciones experimentales (Burton 1948; Quarin 1999). Han sido observadas asociaciones cromosómicas multivalentes, principalmente cuadrivalentes, en las meiosis de todas las accesiones tetraploides evaluadas. En diferentes accesiones se observaron rangos de 2 a 10

cuadrivalentes por célula madre del polen (Forbes y Burton 1961; Magoon y Manchanda 1961; Fernandes *et al.* 1973). Los clásicos estudios citológicos 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 de las razas tetraploides apomícticas de "*Common Bahiagrass*". Además, los híbridos triploides obtenidos de cruzamientos entre el diploide "*Pensacola Bahiagrass*" y accesiones tetraploides de "*Common Bahiagrass*" mostraron hasta 10 trivalentes por microsporocito en la meiosis, 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), sosteniendo la hipótesis que *P. notatum* es un complejo agámico con varios niveles de ploidía y originados por autoploidía.

#### 1.9.1.2.3. Métodos de reproducción

*Paspalum notatum* var. *saurae*, "*Pensacola Bahiagrass*", es un citotipo diploide ( $2n = 2x = 20$ ) el cual posee un comportamiento meiótico regular, se reproduce sexualmente, y es de polinización cruzada debido a que muchas plantas son autoincompatibles (Burton 1955).

"*Common Bahiagrass*" comprende razas tetraploides que se reproducen por medio de apomixis obligada y pseudogamia (Burton 1948). Los estudios embriológicos determinaron que el tipo de apomixis es la aposporia (Bashaw *et al.*

1970). La polinización es esencial para la producción de semillas, porque el desarrollo del endosperma depende de la fertilización de los núcleos polares del saco embrionario apospórico, por parte de una de las gametas masculinas reducidas. La fertilización y el desarrollo del endosperma son independientes del nivel de ploidía del donador de polen. Además, el polen de especies estrechamente relacionadas como *P. cromyorrhizon* puede conducir a la formación de semillas fértiles portando un endosperma híbrido pero un embrión con el genotipo materno (Quarin 1999).

Plantas autotetraploides inducidas por tratamiento con colchicina de semillas diploides fueron clasificadas como totalmente sexuales y de fácil hibridación con razas tetraploides apomícticas naturales cuando se usó como madre (Forbes y Burton 1961). Análisis citológicos de autotetraploides inducidos, híbridos de plantas diploides con tetraploides apomícticas, e híbridos de plantas tetraploides inducidas con tetraploides apomícticas, demostraron que los tetraploides naturales son originados por autoploidía y que el juego cromosómico de los citotipos diploides es homólogo a los juegos cromosómicos de las citotipos tetraploides.

Plantas triploides fueron esporádicamente encontradas en la naturaleza (Gould 1966; Tischler y Burson 1995; Quarin *et al.* 1989), y también en parcelas experimentales (Burton y Hanna 1986). El nivel de ploidía de los triploides es mantenido a través de las generaciones debido a que éstos se reproducen por apomixis. Sin embargo, cuando se poliniza con polen de citotipos diploides, una proporción de la progenie se origina por la fertilización de una gameta femenina no reducida ( $2n = 30$ ) por una gameta masculina reducida ( $n = 10$ ) for-

mando nuevos tetraploides apomícticos (Burton y Hanna 1986; Quarin *et al.* 1989). Esto sugiere que la variabilidad genética encontrada en los tetraploides apomícticos naturales se origina a través de un proceso de poliploidización sexual y que las plantas triploides pueden originarse por la formación eventual de gametas no reducidas en poblaciones diploides. Estos triploides pueden ser polinizados por las plantas diploides de los alrededores, produciendo nuevos tetraploides apomícticos. Esta suposición implica que el gen o los genes para apomixis existen a nivel diploide aunque los diploides apomícticos nunca han sido encontrados. Sin embargo, Quarin y Bovo (1995) produjeron plantas autotetraploides apomícticas facultativas a partir de semilla diploide. Esto corrobora la existencia de factores que controlan la apomixis a nivel diploide, aunque su expresión requiere de la condición poliploide.

#### 1.9.1.2.4. Herencia de la apomixis en *P. notatum*: estudios previos

Burton y Forbes (1960) cruzaron plantas autotetraploides sexuales inducidas por colchicina con plantas apomícticas obligadas. El rango obtenido en F<sub>2</sub> sugiere que la apomixis fue recesiva con respecto a sexualidad y controlada por unos pocos genes recesivos. Asumiendo un mecanismo modificador, sus datos fueron muy cercanos a una herencia tetrasómica, lo cual permite la postulación de un genotipo *aaaa* para el padre apomíctico. Las diferentes progenies fueron clasificadas mediante la prueba de progenie basado en características morfológicas de unos pocos descendientes (10 a 15 plantas F<sub>2</sub> para clasificar cada progenie F<sub>1</sub> y 5 plantas F<sub>3</sub> para clasificar las progenies F<sub>2</sub>).

Las conclusiones de este estudio no fueron muy convincentes, porque no se analizó embriológicamente el sistema reproductivo de la madre (diploide sexual "tetraploidizado" con colchicina), y porque la prueba de progenie utilizada para la clasificación de las progenies puede conducir al error por cuanto una planta apomíctica facultativa no puede diferenciarse de una sexual ya que ambas pueden segregar, especialmente aquellas con baja expresión de la apomixis, lo cual produciría progenies que serían dificultosas para diferenciar de progenies de plantas sexuales. Aunque ellos afirmaron que la apomixis facultativa no ocurrió en las progenies analizadas, una planta sexual (Q3664) de los cruzamientos de sus progenies segregantes fue analizada embriológicamente varios años después. Los resultados indicaron que el 70 % de los óvulos maduros tenía un saco embrionario meiótico normal, 15 % tenía uno a varios sacos apospóricos, y el 15 % restante tenían un saco meiótico normal rodeado por uno o varios sacos apospóricos (Quarin *et al.* 1984). El análisis mediante marcadores moleculares (RFLP y RAPD) de progenies autofecundadas de la misma planta reveló que aproximadamente un 16 % de los individuos eran de origen maternal (Ortiz *et al.* 1997). Por lo tanto, el sistema genético que controla la reproducción apomíctica en *P. notatum* no está aún bien entendido y nuevos métodos de análisis serían necesarios realizar.

### **1.9.1.3. Distribución y Adaptación**

#### **1.9.1.3.1. Centro de Origen**

*Paspalum* es un género del trópico y regiones templadas cálidas del Nuevo Mundo, y es particularmente abundante en Brasil, este de Bolivia, Paraguay

y noreste de Argentina. Las pocas especies no nativas del continente americano pertenecen a *P. scrobiculatum* (Chase 1929). Aunque la especie *P. notatum* tiene una amplia distribución en América, la distribución de las primitivas razas diploides está confinada a las provincias de Corrientes, Entre Ríos, y el borde este de Santa Fe, Argentina (Burton 1967). El área entera es de alrededor de 185 millas de ancho y 435 millas de longitud, distribuidas entre los ríos Uruguay y Paraná y también unos pocos kilómetros hacia el oeste del río Paraná. El tetraploide apomíctico "*Common Bahiagrass*", es una de las más abundantes especies de los pastizales nativos de la región. Las poblaciones diploides son poco frecuentes y usualmente restringidas a los suelos arenosos a lo largo de los ríos y en las planicies arenosas de las islas del río Paraná. La búsqueda del origen del "*Pensacola Bahiagrass*" condujo a Burton (1967) a descubrir una gran población natural del citotipo diploide que cubría la isla Berduc del río Paraná. En dicha isla encontró toda la variación genética que él había observado antes en USA para "*Pensacola Bahiagrass*" cultivado o naturalizado. Otra gran población del citotipo diploide, con gran variación genética, fue encontrada en Cayastá, a 70 Km. al noreste de Santa Fe, todas alrededor de las ruinas del sitio donde la ciudad de Santa Fé fue originalmente fundada.

Como los biotipos diploides de *P. notatum* var. *saurae* son nativos de esta región y debido a que los estudios citogenéticos indican que las razas de "*Common Bahiagrass*" son autotetraploides y comparten juegos de cromosomas homólogos con los diploides, la región es considerada el centro de origen de la especie. Esta región junto con el estado de Rio Grande do Sul, Brasil, tiene la mayor diversidad de especies de *Paspalum* estrechamente relaciona-

das con *P. notatum*, los cuales han sido agrupados por Chase (1929) en el grupo taxonómico informal denominado *Notata*.

#### 1.9.1.3.2. Geográfica

Los citotipos diploides de *P. notatum* var. *saurae* han sido ampliamente distribuidos desde su área nativa en el noreste de Argentina a través del hemisferio occidental. Después de su introducción accidental en la Florida (USA) fue llevado al cultivo a todo el estado y principalmente a las regiones del sur, donde se escapó del cultivo y se convirtió en una especie naturalizada. Las variedades "*Pensacola*" y "*Tifton 9*" fueron vendidas en varios países de América del Sur como forrajeras y para césped. Aunque el éxito fue pequeño en comparación con las superficies cultivadas en USA, es una importante gramínea forrajera cultivada en el sur de Brasil, donde puede eventualmente ser encontrada escapada de cultivo (Pozzobon y Valls 1997).

Los biotipos tetraploides se distribuyen en tierras abiertas, sabanas, y pasturas hasta 2.000 metros sobre el nivel del mar, desde México central y el caribe hasta la Argentina (Chase 1929). El "*Common Bahiagrass*" es el principal constituyente de muchos pastizales nativos del sur de Brasil, Paraguay, noreste de Argentina y Uruguay. Ha sido introducido en USA y muchos otros países alrededor del mundo.

## **II. JUSTIFICACIÓN**

### 2. Justificación

*Paspalum notatum* es una de las especies del género más intensamente estudiada desde el punto de vista citogenético, reproductivo y filogenético; debido a su crecimiento perenne, su amplia distribución, la disponibilidad de importantes colecciones vivas en nuestra región como así también en Brasil, su versatilidad tanto para la propagación por semilla como vegetativamente, su fácil mantenimiento en cultivo y en condiciones de invernadero, y la posibilidad de poder manipularla de manera sencilla en programas de mejoramiento genético mediante cruzamientos controlados.

La apomixis es un sistema de reproducción ampliamente difundido en el género *Paspalum* y en particular en *P. notatum*. Sin embargo, hasta el momento fueron escasos los intentos realizados para estudiar su control genético y determinar la región genómica involucrada en dicho proceso. La única referencia existente (Burton y Forbes 1960) data de varios años atrás, y se realizó en momentos en que no se conocían las técnicas modernas para estudios embriológicos y reproductivos que nos permiten poder clasificar grandes progenies con alta efectividad y en poco tiempo. Además, con el advenimiento de las nuevas técnicas de biología molecular, se abrió un campo aún mayor para estudiar el carácter, como lo es la posibilidad de identificar los factores genéticos responsables y a partir de ello lograr en un futuro próximo la manipulación y transferencia a especies cultivadas de importancia económica.

A partir de los estudios sobre herencia de la apomixis en *P. notatum* realizados por Burton y Forbes (1960), se realizaron varios intentos posteriores

para estudiar dicho carácter mediante la utilización de plantas tetraploides sexuales, obtenidas a partir de duplicaciones cromosómicas de diploides sexuales con colchicina. Sin embargo, todos estos intentos han fallado, debido a que las plantas obtenidas fueron apomícticas facultativas (Quarin y Bovo 1995). Por ello, hace un par de años atrás se recurrió a hibridaciones interespecíficas entre una especie tetraploide y sexual, *P. ionanthum*, y otra apomíctica, *P. cromyorrhizon*, ambas perteneciente al mismo grupo taxonómico de *P. notatum* y estrechamente relacionadas desde el punto de vista genético (Martínez *et al.* 1999). Los resultados solo pudieron ser evaluados en la primera generación segregante (híbridos  $F_1$ ), debido a que las plantas obtenidas fueron apomícticas o estériles. Las plantas que se esperaba que fuesen sexuales fueron completamente o en gran medida estériles, tanto en la parte masculina como en la femenina; mientras tanto las plantas apomícticas también lo fueron en su parte masculina. Esto imposibilitó la obtención de progenies  $F_2$  y retrocruzas de tal manera de poder corroborar las proporciones obtenidas en la  $F_1$ . El rango observado en los híbridos  $F_1$  fluctuó entre 3:1 y 2:1 entre apospóricas y no apospóricas, según que criterios se tuviese en cuenta para la clasificación reproductiva. Por otro lado, en algunos individuos de la progenie de la planta madre autofecundada se observó la presencia ocasional de sacos embrionarios apospóricos. Estos resultados podrían explicarse alternativamente mediante dos modelos genéticos diferentes: los resultados pueden coincidir con la segregación esperada según el modelo de Mogie (1992) donde la apomixis estaría determinada por un alelo mutante  $a^*$  a partir

de doble dosis, pero con la presencia del alelo salvaje  $a^+$ . Esto es posible en materiales autoploides como lo es *P. cromyorrhizon*. Por otra parte, los resultados también podrían ser explicados por un modelo monogénico, con herencia tetrasómica, dominante para aposporia y letalidad de gametas portadoras de doble dosis del alelo dominante.

En los últimos años hemos encontrado una planta de *P. notatum* tetraploide ( $2n=4x=40$ ) completamente sexual originada experimentalmente en una progenie de un cruzamiento intraespecífico. Para ello, se recurrió a un cruzamiento entre una planta apomíctica facultativa con alto grado de expresión sexual, como progenitor femenino, y otra planta apomíctica obligada como padre. Debido a que las plantas apomícticas facultativas pueden poseer en algunos óvulos sacos de origen meiótico solitarios o en compañía de uno o varios apospóricos, es posible obtener progenies con plantas de origen maternal además de algunas de origen sexual que se comportan reproductivamente de la misma forma. Estas plantas solo han podido ser detectadas en progenies experimentales, ya que naturalmente nunca se encontró una planta tetraploide de reproducción 100% sexual.

A partir de la obtención de la planta sexual denominada F131 se pudieron realizar cruzamientos intraespecíficos entre plantas sexuales X apomícticas que pertenecen a la misma especie y dentro del mismo nivel de ploidía. De esta forma se originaron varias progenies que permitieron estudiar el control genético de la apomixis; como así también identificar marcadores moleculares asociados con el carácter, como punto de partida en la posterior identificación

de los factores responsables de dicho sistema reproductivo y en la utilización en programas de mejoramiento genético.

### **III. HIPÓTESIS**

#### 3. Hipótesis de trabajo

La hipótesis de este trabajo se basa en que al ser la apomixis un sistema de reproducción controlado genéticamente, que se expresa en poliploides y se comporta como una forma alternativa a la reproducción sexual, es posible realizar cruzamientos intraespecíficos en el mismo nivel de ploidía, para estudiar la segregación reproductiva y encontrar un modelo genético de herencia que explique como se encuentra regulado. Por otro lado, por tratarse de un modo de reproducción que es considerado una forma alternativa de la sexualidad, es posible encontrar diferencias a nivel de ADN que puedan ser detectadas mediante las nuevas técnicas de la biología molecular como son los marcadores moleculares.

## **IV. OBJETIVOS**

#### 4. Objetivos

##### 4.1. Objetivos generales

- Determinar el control genético de la apomixis en *Paspalum notatum*
- Identificar marcadores moleculares que co-segreden con la región genómica responsable de la aposporia en *Paspalum notatum*.
- Establecer la sintenia evolutiva con segmentos cromosómicos homólogos de otras gramíneas apomícticas y no apomícticas mediante estudios de mapeo genómico comparativo.

##### 4.2. Objetivos particulares

- Corroborar por medio de nuevos análisis embriológicos a lo largo de todo el período de floración, la pureza del carácter reproducción sexual de la planta que actuará como progenitor femenino.
- Obtener una progenie F<sub>1</sub> y clasificarla para el modo de reproducción, a partir del cruzamiento de plantas tetraploides sexuales y apomícticas de *P. notatum*.
- Obtener y clasificar reproductivamente una progenie producto de la autofecundación del progenitor femenino sexual
- Obtener y clasificar diferentes progenies F<sub>2</sub>s, por medio de autofecundaciones de genotipos F<sub>1</sub>s sexuales, cruzamientos entre distintos genotipos F<sub>1</sub>s sexuales; como así también por cruzamientos entre genotipos sexuales y apomícticos.

- Obtener y clasificar progenies originadas por retrocruzadas de genotipos F<sub>1</sub>s sexuales y apomícticos, por los respectivos progenitores.
- Determinar que modelo de herencia genética es el que regula la apomixis en *P. notatum*
- Utilizar diferentes técnicas de marcadores moleculares (RFLP, RAPD y AFLP) para identificar la región genómica responsable de la aposporia, con el propósito futuro de utilizarlos en la selección de genotipos apomícticos y en el aislamiento del gen o los genes responsables.

# **V. MATERIALES Y MÉTODOS**

## ÍNDICE

	<b>Página</b>
5.1. Especie utilizada.....	67
5.2. Genética de la aposporia en <i>Paspalum notatum</i> .....	67
5.2.1. Clasificación reproductiva mediante observación de sacos embrionarios.....	67
5.2.2. Obtención de los progenitores.....	70
5.2.3. Obtención de la progenie F <sub>1</sub> segregante.....	71
5.2.4. Obtención de las progenies F <sub>2</sub> s, retrocruzas y del progenitor femenino autofecundado.....	72
5.3. Marcadores moleculares relacionados con la aposporia en <i>P. notatum</i> .....	73
5.3.1. Extracción de ADN.....	75
5.3.2. Análisis de RAPDs.....	76
5.3.2.1. Determinación de los “primers” informativos.....	76
5.3.2.2. Aislamiento, clonado y secuenciación de los fragmentos de RAPD asociados a la apomixis....	78
5.3.2.3. Transformación de los marcadores de PCR en marcadores codominantes (RFLP) y específicos (SCAR).....	78
5.3.3. Análisis de AFLPs.....	80
5.3.3.1. Digestión-Ligación.....	80
5.3.3.2. Amplificaciones.....	82
5.3.3.2.1. Pre-amplificación.....	82
5.3.3.2.2. Amplificación selectiva.....	83
5.3.3.3. Separación y detección de AFLPs.....	85
5.3.4. Análisis de RFLPs.....	86
5.3.4.1. Obtención de las sondas.....	86
5.3.4.2. Detección de sondas informativas.....	88
5.3.4.3. Marcación no-radioactiva.....	88
5.3.4.4. Pre-hibridación, hibridación y lavados de astringencia.....	89
5.3.4.5. Detección de las sondas marcadas, exposición y revelado de los films.....	91
5.3.4.6. Reutilización de membranas.....	92

### 5.1. Especie utilizada

El material utilizado en este estudio corresponde al citotipo tetraploide ( $2n = 4x = 40$ ) “Common Bahiagrass” de *Paspalum notatum*. Se utilizaron dos plantas, una sexual y otra apomíctica, identificadas y depositadas en el herbario CTES con los números de colección Q4188 y Q4117 respectivamente. Ambas plantas se encuentran cultivadas en el banco de germoplasma de la cátedra de Genética y Fitotecnia de la FCA-UNNE en macetas bajo un invernáculo y en parcelas experimentales.

La planta Q4188 es un tetraploide de reproducción sexual obtenida en el año 1984 por cruzamientos intraespecíficos entre dos genotipos apomícticos: Uno con un alto grado de expresión sexual (Q3664) y el otro apomíctico obligado (Q3853) (Urbani, comunicación personal). Por su parte, la planta Q4117 es un tetraploide apomíctico proveniente de poblaciones naturales del estado de Rio Grande do Sul, Brasil.

### 5.2. Genética de la aposporia en *Paspalum notatum*

#### 5.2.1. Clasificación reproductiva mediante la observación de sacos embrionarios

Para la clasificación reproductiva de las plantas obtenidas en las diferentes progenies, a partir del análisis de los sacos embrionarios, se fijaron espiguillas en anthesis en una solución de FFA (etanol 70%, ácido acético glacial, formaldehído) en proporción 18:1:1 durante 24 horas y conservadas en etanol 70% a 4° C hasta su estudio. Los ovarios fueron separados de las espiguillas

correspondientes mediante la ayuda de una lupa y por intermedio de una aguja histológica y un bisturí. Luego, fueron clarificados o transparentados mediante la técnica de Herr (1971). La misma consta de dos pasos: en el primero paso se colocaron los ovarios en ácido láctico puro, durante 24 horas como mínimo, para favorecer el clarificado de aquellos ovarios de tonalidad oscura; mientras que en el segundo paso fueron transferidos a la solución clarificadora propiamente dicha, la cual consta de los siguientes componentes: ácido láctico, fenol, aceite de clavo, hidrato de coral y xilol en una proporción de 2:2:2:2:1 v/v respectivamente, permaneciendo por lo menos 24 horas y a temperatura ambiente. Posteriormente, los ovarios fueron colocados y ordenados en un portaobjetos, con una gota de solución clarificadora, y cubiertos por un portaobjetos. Finalmente, los mismos fueron observados y analizados para determinar el tipo de saco embrionario presente, mediante un microscopio con contraste de interferencia diferencial (DIC). Para cada ovario se tomó el correspondiente registro del saco embrionario observado y de acuerdo ello se clasificaron las plantas en sexuales o apomícticas. Para cada planta se analizó un promedio de 60 ovarios fijados en antesis.

Según las características de los megagametofitos observados, se establecieron cinco categorías de óvulos:

1- **Con sacos embrionarios meióticos (SEM):** estos se forman a partir de la división reduccional de la célula arqueosporial y en el cual todas sus células poseen su número cromosómico reducido a la mitad. En *Paspalum notatum* dichos sacos se caracterizan por la presencia de un aparato oos-

férico en el extremo micropilar, compuesto de una oosfera, dos sinérgidas, una célula central con dos núcleos polares, y varias antípodas en el extremo chalazal del óvulo.

2- **Con sacos embrionarios inmaduros (SEI):** son todos aquellos óvulos con sacos en formación (meiótico o apospórico) que no han completado su desarrollo normal al momento de la antesis.

3- **Con sacos embrionarios ausentes o abortados (SEa):** son clasificados de esta manera aquellos óvulos en los cuales no se observa saco embrionario desarrollado o en formación.

4- **Con sacos embrionarios apospóricos (SEA):** contienen sacos originados a partir de células nucelares ( $2n$ ) y por lo tanto no reducidas meióticamente. En *P. notatum* se caracterizan por poseer en un extremo una oosfera, dos sinérgidas y una célula central muy vacuolizada, con dos núcleos polares, aunque eventualmente pueden tener uno o tres núcleos. Una característica fundamental de estos sacos es la ausencia de antípodas, lo cual permite diferenciarlos fácilmente de los sacos de origen meiótico. Otra característica distintiva es la presencia de más de un saco apospórico por óvulo, en general se observan varios cubriendo gran parte del espacio nucelar, los cuales poseen distintos grados de desarrollo. Es muy común observar en algunos sacos la presencia de pro-embriones en el momento de la antesis.

5- **Con un saco embrionario meiótico + uno o varios apospóricos (SEM + SEA):** Se refiere a todos aquellos óvulos que poseen, además del saco meiótico, uno o varios apospóricos.

Según las características de los sacos embrionarios, las plantas fueron clasificadas en dos clases: 1- aquellas con capacidad para formar sacos embrionarios apospóricos y 2- las que no tienen dicha capacidad.

Se consideró **apomíctica** a toda aquella planta que tiene la capacidad de formar sacos embrionarios apospóricos (solitarios o mixtos), en por lo menos un óvulo, independientemente de los demás tipos de sacos embrionarios presentes.

Se consideró **sexual** a toda aquella planta que no tiene la capacidad de formar sacos embrionarios apospóricos o mixtos en ningún óvulo.

Esta clasificación se utilizó tanto para los progenitores, como así también para todas las progenies analizadas.

### **5.2.2. Obtención de los progenitores**

Previo a la realización de los cruzamientos, hubo que realizar una selección de las plantas que serían utilizadas como progenitores sexuales y apomícticas. Debido a que todos los tetraploides de *P. notatum* que crecen en forma natural son de reproducción apomíctica, fue necesario obtener una planta tetraploide y sexual, de tal manera de poder utilizarla como progenitor femenino. La planta Q3664 es una F<sub>2</sub> originada en los cruzamientos hechos entre una planta sexual tetraploide inducida con colchicina a partir de una planta diploide

sexual y un padre apomítico (Burton y Forbes 1960). La planta Q4188 fue nuevamente examinada embriológicamente, para corroborar que no presentase ningún indicio de apomixis. Para esto se analizaron ovarios en anthesis en diferentes momentos del período de floración para descartar cualquier posible influencia ambiental en la expresión de la apomixis.

Para la selección de la planta Q4117 se tuvo en cuenta el grado de expresión de la apomixis, medido este por el porcentaje de sacos embrionarios apospóricos y el número de sacos apospóricos presentes en cada óvulo analizado. Si bien los genotipos tetraploides de *P. notatum* poseen un alto grado de expresión de la apomixis, existe una sensible variación entre los diferentes genotipos, fundamentalmente en el grado de sexualidad residual y en el número de sacos apospóricos presente en cada óvulo (Altamiranda 1983). Además del tipo de reproducción y el nivel de expresión, se tuvieron en cuenta otros aspectos en la elección de los progenitores, como fueron el vigor de las plantas, el período de floración, el número de inflorescencias producidas, la producción de polen, etc.

### 5.2.3. Obtención de la población F<sub>1</sub> segregante

Una vez seleccionados ambos progenitores se realizaron cruzamientos controlados para la obtención de los híbridos siguiendo el procedimiento descrito por Burton (1948). Para ello se colectaron inflorescencias antes del comienzo de la floración adheridas a una porción de rizoma, las cuales fueron colocadas en recipientes con agua y mantenidas de esa forma durante todo el proce-

so de manipulación y hasta la obtención de las semillas. Como en *P. notatum* la antesis de las espiguillas se produce a la mañana temprano (5:00 a 8:00 AM), las inflorescencias fueron colocadas la tarde previa en una cámara provista de un humidificador con regulación automática de encendido y apagado, el cual permite eliminar las anteras sin que se produzca la apertura de las mismas, debido a la existencia de una humedad ambiente del 100%. Esto evita que ocurran contaminaciones no deseadas. Una vez castradas las espiguillas, se procedió a la polinización con polen del progenitor masculino, el cual fue recolectado el mismo día. Por último, las inflorescencias polinizadas fueron ensobradas con papel sulfito, manteniéndose de esta forma con sus respectivas porciones de rizomas sumergidos en botellas plásticas con agua hasta la cosecha de las semillas, aproximadamente a los 30 días.

Luego de la cosecha, las espiguillas fueron chequeadas una por una para determinar el porcentaje de espiguillas con cariopse. Los cariopse obtenidos fueron sembrados en tierra esterilizada y en invernáculo. Los plantines fueron cultivados en invernáculo y aproximadamente a los dos meses de la siembra fueron llevados al campo. Se plantaron a una distancia de 50 cm entre líneas y entre plantas. Durante el período de floración (diciembre-abril) se fijaron espiguillas en antesis, mediante la metodología explicada en el punto 5.2.1.

#### **5.2.4. Obtención de las progenies $F_2$ s, retrocruzas y del progenitor femenino autofecundado**

Una vez clasificada la población  $F_1$ , se seleccionaron algunas plantas sexuales y apomícticas, para la generación de las progenies  $F_2$ s y las respecti-

vas retrocruzas por el padre apomítico y la madre sexual. Por otro lado, para poder determinar la constitución genotípica de la planta sexual utilizada como progenitor femenino, se generó una progenie por autofecundación de la misma. Para ello, se seleccionaron inflorescencias antes del inicio de la floración, las cuales fueron ensobradas y mantenidas de esta forma durante aproximadamente 30 días.

Todo el proceso de generación, análisis y clasificación de las distintas progenies fue el mismo que se empleó para la población  $F_1$  y que ya fue descrito anteriormente (5.2.1.)

Una vez hecha la clasificación reproductiva de las progenies, se estableció la proporción fenotípica observada para cada una de ellas y se evaluaron distintos modelos genéticos para poder determinar cuál era el que mejor se ajustaba a los valores observados. Para ello, se analizaron diferentes alternativas genéticas de herencia tetrasómica y segregación cromatídica. Se utilizó la prueba de bondad de ajuste ( $\chi^2$ ) para ajustar los rangos de segregación observados de sexuales/apomíticos (S/A) a los rangos esperados para los modelos genéticos. Dentro de un modelo dado, todos los posibles genotipos que codifican para un fenotipo fueron testados para cada cruzamiento o autofecundación.

### **5.3. Marcadores moleculares relacionados con la aposporia en *P. notatum***

La identificación de marcadores moleculares ligados a apomixis se llevó a cabo sobre la misma población  $F_1$  de *Paspalum notatum* generada para el es-

tudio de herencia del carácter. Para ello, en un principio se seleccionaron 50 plantas sexuales y 50 apomícticas y luego se incluyeron plantas adicionales en función de la técnica de marcador utilizada. Para la selección se tuvo en cuenta el grado de expresión de ambos caracteres, sexualidad y apomixis, respectivamente. En ambos grupos de plantas se seleccionaron aquellas que poseían los valores más altos de expresión, medida ésta como el porcentaje de sacos embrionarios de origen meiótico o apospórico que poseía cada planta dentro de cada grupo (sexual y apomíctico). De esta manera se tomaron los extremos dentro de una curva de distribución normal para cada fenotipo, de tal manera de tener más chances de detectar rápidamente marcadores asociados con el carácter en estudio.

Para la identificación de marcadores moleculares ligados al gen o región genómica de interés, se recurrió a la metodología del análisis de segregantes combinados o "Bulked Segregant Analysis" (Michelmore *et al.* 1991). Para ello, se formaron dos grupos o "bulks", a partir de 10 individuos sexuales y apomícticos respectivamente. La formación de cada grupo se hizo a partir de mezclar, en partes iguales, el ADN de cada uno de los diez individuos. Luego los grupos fueron analizados, mediante la utilización de diferentes marcadores moleculares (RAPD, AFLP y RFLP), para poder detectar polimorfismos o diferencias asociadas con la región responsable de la apomixis.

Una vez detectados los marcadores polimórficos entre los dos grupos (BS y BA) se analizó la segregación de los mismos, mediante la comparación con los padres y con cada uno de los individuos de la población, para poder deter-

minar el grado de ligamiento del marcador con el locus en cuestión. Para cada marcador polimórfico se determinó el Índice de recombinación a partir de la relación entre el número de individuos recombinantes sobre el total de individuos analizados.

### 5.3.1. Extracción de ADN

Se colectaron hojas de ambos progenitores y de cada uno de los individuos de la progenie F<sub>1</sub> seleccionados para el estudio. Para ello, se seleccionaron hojas nuevas en pleno crecimiento, las cuales fueron inmediatamente colocadas en tubos de polipropileno y luego introducidas en nitrógeno líquido, de tal manera de producir un congelamiento rápido y de esa forma frenar todos los procesos metabólicos que puedan ocasionar la degradación del material genético. Para cada muestra se cosechó aproximadamente 3 gramos de hojas. Las hojas una vez congeladas fueron molidas finamente en un mortero y luego sometidas al proceso de extracción de ADN o conservadas en ultracongeladora de -70° C hasta la extracción. La extracción de ADN se realizó mediante la metodología del CTAB modificado por Saghai-Marroof *et al.* (1984) con el siguiente buffer de extracción:

Componentes	[final]
Tris pH 7,5	100 mM
NaCl	700 mM
EDTA pH 8,0	50 mM
CTAB	1%
β-mercaptoetanol	140 mM

El tejido fue incubado en el buffer durante 60-90 minutos a una temperatura de 65° C y con agitación. Luego de tratar con cloroformo:octanol (24:1 v/v) se precipitó el ADN con (2:3 v/v) de isopropanol y se lo lavó con etanol/NaOAc 76 v/v y 0,2 M y etanol/NH<sub>4</sub>OAc 76v/v y 10 mM.

La cuantificación del ADN se realizó por medio de espectrofotometría ultravioleta, asumiendo una equivalencia de 1 OD (260 nm) = 50 µg. Paralelamente, se realizó una verificación de la integridad de ADN extraído, sembrando 1-2 µl del mismo, en un gel de agarosa al 1% en TAE 1x, teñido con EtBr (Sambrook *et al.* 1989). Una vez cuantificados todos los ADNs se los llevó a una concentración de 300 ng/µl. Para el análisis de RAPDs se hicieron diluciones de trabajo a una concentración de 5 ng/µl.

### **5.3.2. Análisis de RAPDs**

#### **5.3.2.1. Determinación de los “primers” informativos**

La metodología utilizada para el análisis de los RAPDs se basó en el método propuesto por Williams *et al.* (1989). El primer paso en el análisis de marcadores RAPDs fue identificar iniciadores o “primers” que revelen polimorfismos entre los grupos. Para esto, se amplificaron los ADNs de los respectivos grupos (BS y BA) con 400 “primers” al azar de 10 pb de longitud (Serie 1, 3, 5 y 7 de “British Columbia University”, Canadá). Las reacciones se realizaron en un volumen final de 25 µl con los siguientes componentes:

COMPONENTES	VOLUMEN
ddH <sub>2</sub> O	6,20 µl
10x <i>Taq</i> Buffer	2,50 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1,50 µl
5 Mm dNTPs	0,50 µl
3 ng/µl 10-mer Primer <sup>(1)</sup>	10,00 µl
10 U/µl <i>Taq</i> ADN polimerasa <sup>(2)</sup>	0,30 µl
5 ng/µl ADN	4,00 µl

(1) British Columbia University, Canada

(2) Promega, USA

Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador marca Biometra, UNO-Thermoblock (Suiza), con el siguiente programa:

<b>1 ciclo</b>	93°C	1 min
	93°C	1 min
<b>45 ciclos</b>	36°C	1 min
	72°C	2 min
<b>1 ciclo</b>	72°C	5 min

Los productos de amplificación generados fueron analizados mediante una electroforesis en geles de agarosa (2,0%; TAE 1x; 40 V/cm; 4 hs) teñidos con bromuro de etidio (EtBr). Los geles fueron luego visualizados con luz UV y fotografiados mediante una cámara Polaroid con filtro para UV.

Una vez detectadas las bandas polimórficas se realizó el análisis estadístico de los datos y la construcción de un mapa de ligamiento, mediante la utilización del programa de mapeo JOINMAP (Stam 1993).

#### **5.3.2.2. Aislamiento, clonado y secuenciación de los fragmentos de RAPD asociados con la apomixis**

Los fragmentos de RAPD relacionados con la apomixis en *P. notatum* fueron aislados y purificado mediante el método del fenol:cloroformo (Sambrook *et al.* 1989) a partir de geles de agarosa de bajo punto de fusión. Posteriormente, se reamplificaron nuevamente los fragmentos, para poder confirmar efectivamente la presencia de los mismo y descartar cualquier tipo de contaminación con otras bandas no deseadas. Una vez purificado los fragmentos, fueron clonados mediante la utilización de un sistema comercial ("kit") de clonación (pGEM-T Easy Vector Systems-Promega. USA).

#### **5.3.2.3. Transformación de los marcadores de PCR en marcadores codominantes (RFLP) y específicos (SCAR)**

Para poder estudiar las variantes alélicas presentes en los marcadores codominantes, los fragmentos de interés fueron utilizados como sondas de RFLP. Para esto, el ADN fue marcado por el método no-radiactivo por medio de la técnica de PCR (reacción en cadena de la ADN polimerasa) según el protocolo descrito en el Manual de procedimientos del CIMMYT (Hoisington *et al.*

1994). Los procedimientos posteriores de hibridación, detección y revelado de los films se llevó a cabo de la misma forma que en los ítems 5.3.4.3; 5.3.4.4. y 5.3.4.5.

Para poder obtener marcadores genéticos específicos de la región de la apomixis basados en amplificaciones por PCR, secuenciamos uno de los fragmentos (BC243) y luego desarrollamos un par de “regiones amplificadas caracterizadas por secuencia” (SCARs). Para ello, mediante el programa Oligo 4.1 versión DOS se diseñaron y enviaron a secuenciar un par de oligonucleótidos de 20 y 22 pb de longitud, en el cual estaba incluido los 10 pb del primer BC243 y los restantes nucleótidos de los extremos de la secuencia. El ADN genómico fue amplificado de acuerdo al siguiente protocolo:

<b>COMPONENTES</b>	<b>VOLUMEN</b>
ddH <sub>2</sub> O	11,20 µl
10x <i>Taq</i> Buffer	2,50 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1,50 µl
5 Mm dNTPs	0,50 µl
5uM 24-mer Primer 1	2,50 µl
5uM 24-mer Primer 2	2,50 µl
10 U/µl <i>Taq</i> ADN polimerasa	0,30 µl
5 ng/µl ADN	4,00 µl

Las amplificaciones se llevaron a cabo con el siguiente programa:

<b>1 ciclo</b>	94°C	1 min
	93°C	1 min
<b>30 ciclos</b>	60°C (*)	1 min
	72°C	2 min
<b>1 ciclo</b>	72°C	5 min

(\*) La temperatura de anillado ("annealing") fue de 50, 55 o 60° C según el oligonucleótido

Los productos de amplificación fueron separados electroforéticamente en un gel de agarosa al 2% y luego teñidos con EtBr y visualizados con un transiluminador de luz ultravioleta.

### 5.3.3. Análisis de AFLPs

La generación de AFLP se realizó básicamente como en Milbourne *et al.* (1997) y en Vos *et al.* (1995), con las modificaciones pertinentes para la utilización de tinción con plata en lugar de utilización de radiactivo (Marcucci Poltri 1998).

#### 5.3.3.1. Digestión - ligación

Para la obtención de los fragmentos de AFLP se digirieron los ADNs de todos los individuos con dos enzimas de restricción simultáneamente: *EcoRI*, de corte poco frecuente y *MseI* con alta frecuencia de corte. La digestión se realizó a 37°C durante 4 hs en un buffer compatible para las dos enzimas y

también para la ligación que ocurre *a posteriori*. Las digestiones se realizaron en tubos de 1,5 ml y en un volumen final de 50  $\mu$ l con los siguientes reactivos:

COMPONENTES	VOLUMEN
ddH <sub>2</sub> O	28,25 $\mu$ l
5x Buffer RL <sup>(1)</sup>	10,00 $\mu$ l
10 U/ $\mu$ l <i>Eco</i> RI	0,50 $\mu$ l
10 U/ $\mu$ l <i>Mse</i> I	1,25 $\mu$ l
0,1 $\mu$ g/ $\mu$ l ADN	10,00 $\mu$ l

(1) RL: Restricción–Ligación (10 mM Tris-HAc pH 7.5, 10 mM MgAc, 50 mM KAc, 5mM DTT, 50 ng/ $\mu$ l de albúmina de suero bovino)

Se verificó la digestión sembrando 5  $\mu$ l del producto en un gel de agarosa 1% (TAE 1x) y se procedió luego a la ligación de los adaptadores para cada enzima a los fragmentos digeridos en 55  $\mu$ l de volumen de reacción conteniendo:

COMPONENTES	VOLUMEN
ddH <sub>2</sub> O	3.8 $\mu$ l
5x Buffer RL	2,0 $\mu$ l
5 $\mu$ M Adaptador <i>Eco</i> RI	1,0 $\mu$ l
5 $\mu$ M Adaptador <i>Mse</i> I	1,0 $\mu$ l
10 mM ATP	1,2 $\mu$ l
1 U/ $\mu$ l T4 ADN Ligasa	1,0 $\mu$ l
Producto de digestión	45,0 $\mu$ l

Adaptador *Eco*RI = 5' CTCGTAGACTGCGTACC 3'  
3' CTGACGCATGGTTAA 5'

Adaptador *Mse*I = 5' GACGATGAGTCCTGAG 3'  
3' TACTCAGGACTCAT 5'

### 5.3.3.2. Amplificaciones

Las amplificaciones se realizaron en dos pasos: (i) pre-amplificación usando primers con 1 nucleótido selectivo (+1), y (ii) amplificación selectiva usando primers con 3 nucleótidos selectivos (+3) En ambos casos se utilizó un termociclador Perkin Elmer TC480 (Norwalk, CT, USA).

#### 5.3.3.2.1. Pre-amplificación

Una vez producida la ligación de los adaptadores, se realizó la primera PCR no selectiva con primers +1:

**E01= 5' GACTGCGTACCAATTCA3'**

**M01= 5' GATGAGTCCTTGAGTAAA3'**

La reacción se llevó a cabo en un volumen final 25  $\mu$ l y con los siguientes componentes:

COMPONENTES	VOLUMEN
ddH <sub>2</sub> O	15,650 $\mu$ l
10x PCR Buffer	2,500 $\mu$ l
50 mM Mg Cl <sub>2</sub>	1,500 $\mu$ l
5 mM dNTPs	1,000 $\mu$ l
1 $\mu$ g/ $\mu$ l Primer <i>Eco</i> RI (+1)	0,075 $\mu$ l
1 $\mu$ g/ $\mu$ l Primer <i>Mse</i> I (+1)	0,075 $\mu$ l
5 U/ $\mu$ l Ampli <i>Taq</i> LD (Perkin Elmer, USA)	0,200 $\mu$ l
Producto de ligación	4,000 $\mu$ l

"primer" *Eco*RI (+1) = 5' GACTGCGTACCAATTCA 3'

"primer" *Mse*I (+1) = 5' GATGAGTCCTTGAGTAAA 3'

La PCR se realizó con 30 ciclos del siguiente programa:

30 s	94 °C
30 s	60 °C
60 s	72 °C

Los productos de amplificación fueron chequeados en geles de agarosa 1% (TAE 1x) y guardados a 0° C hasta su utilización

#### 5.3.3.2.2. Amplificación selectiva

Para la amplificación selectiva se utilizaron 10 combinaciones de primers *EcoRI/MseI* con tres nucleótidos selectivos (+3). Para adaptar la técnica al método de tinción con plata (en lugar de marcar con radiactivo el "primer"), fue necesario utilizar el triple de cantidad del templado (producto de pre-amplificación) que se usa habitualmente para radiactivo, ya que menores cantidades no produjeron productos visibles.

Las reacciones se realizaron en un volumen de 25  $\mu$ l, conteniendo:

COMPONENTES	VOLUMEN
ddH <sub>2</sub> O	18,640 µl
10x Buffer de PCR	2,500 µl
50 mM MgCl <sub>2</sub>	0,600 µl
10 mM dNTPs	0,400 µl
1 µg/µl "primer" <i>EcoRI</i> (+3)	0,030 µl
1 µg/µl "primer" <i>MseI</i> (+3)	0,030 µl
5 U/µl <i>Taq</i> ADN polimerasa	0,800 µl
Producto de pre-amplificación	2,000 µl

"Primers" *EcoRI* (+3):

E36: 5' GACTGCGTACCAATTCACC 3'

E38: 5' GACTGCGTACCAATTCAC 3'

E39: 5' GACTGCGTACCAATTCAGA 3'

"Primers" *MseI* (+3):

M31: 5' GATGAGTCCTGAGTAAAAA 3'

M37: 5' GATGAGTCCTGAGTAAACG 3'

M38: 5' GATGAGTCCTGAGTAAACT 3'

M39: 5' GATGAGTCCTGAGTAAAGA 3'

M40: 5' GATGAGTCCTGAGTAAAGC 3'

Las condiciones de amplificación fueron las mismas que en Vos *et al.* (1995) pero se llevaron a cabo en una máquina termocicladora Perkin Elmer 480 (USA)

94°C	30 seg	
65°C	30 seg	1 ciclo
72°C	30 seg	
94°C	30 seg	
64°C	30 seg	1 ciclo
72°C	30 seg	
Reducción de 1°C por ciclo hasta llegar a 56°C		
94°C	30 seg	
56°C	30 seg	25 ciclos
72°C	30 seg	

**5.3.3.3. Separación y detección de AFLPs**

Los productos de amplificación fueron guardados a -20°C hasta ser corridos electroforéticamente. Antes de sembrar las muestras (25 µl), se agregaron a cada una 10 µl de buffer de carga con ambos colorantes (azul de bromofenol y xileno cianol, con formamida 98%), se calentaron a ebullición durante 3 a 5 minutos e inmediatamente se enfriaron en hielo. De la mezcla correspondiente se sembraron entre 5 y 8 µl dependiendo del tamaño del peine utilizado. Luego se corrieron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 6% en buffer TBE 1x, durante 3-4 hs a 45 W constantes en el sistema de Gibco-BRL Modelo S2 (USA). Una vez finalizada la corrida electroforética se utilizó el sistema de Pro-mega Biotech (USA) "ADN staining kit" para tinción de geles de secuencia con nitrato de plata, y el cual consiste de los siguientes pasos:

- 1) fijación del gel en ácido acético al 10 % durante 20 minutos
- 2) 3 lavados en agua bidestilada durante 2 minutos cada vez
- 3) tinción con nitrato de plata al 0,1% y formaldehído 1,5 ml/litro de solución
- 4) lavado de 10 segundos en agua bidestilada fría
- 5) revelado en solución de carbonato de sodio 30 gr/l, formaldehído 1,5 ml/litro y tiosulfato de sodio 2 mg/l hasta obtener coloración en las bandas
- 6) detención de la reacción con ácido acético al 10 % durante 2 minutos
- 7) 2 lavados con agua bidestilada durante 2 minutos cada vez.
- 8) secado en horno a 65 °C hasta que no esté pegajoso.

Los patrones de bandas se analizaron directamente en los vidrios sobre un transiluminador de luz blanca o bien los geles fueron despegados de los

vidrios con hidróxido de sodio 0,2 N durante tiempos variables y levantados con papel Wattman 3MM (Inglaterra), secados al vacío a 80°C y conservados para su análisis.

#### **5.3.4. Análisis de RFLPs**

##### **5.3.4.1. Obtención de las sondas**

Se utilizaron secuencias genómicas de bajo número de copias de la biblioteca genómica de maíz de la serie UMC, como así también sondas provenientes de ADNc de arroz (RZ) y de cebada (BCD) de la serie de la Universidad de Cornell (USA) y algunas de la serie "New Landmarker Set" del Programa de Investigación Genómica en Arroz (RGP) del Japón, perteneciente al NIAR (National Institute of Agrobiological Resources) y a STAFF (Institute of the Society of Techno-Innovation in Agriculture, Forestry and Fisheries) (Nagamura *et al.* 1997)

Los plásmidos recombinantes fueron amplificados en bacterias previa transformación (Hoisington *et al.* 1994) de la cepa bacteriana DH5 $\alpha$  con 10 ng de ADN, utilizando ampicilina como agente selectivo (Sambrook *et al.* 1989). Una vez obtenidas colonias aisladas, se puso a crecer una de ellas en un medio de crecimiento de bacterias líquido, para posteriormente obtener el plásmido con el inserto correspondiente. Para ello se utilizó el protocolo de minipreparación (Miniprep) de ADN de Sambrook *et al.* (1989)

Para evaluar el tamaño de los fragmentos que se utilizaron como sondas se amplificaron por PCR los productos de las Miniprep. Como iniciadores se

utilizaron oligonucleótidos que poseen homología con las regiones de los sitios múltiples de clonado en los plásmidos con las siguientes secuencias:

pUC/M13 "Forward Primer": 5' ACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGT 3'

pUC/M13 "Reverse Primer": 5' AACAGCTATGACCATGATTACGCC 3'

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

COMPONENTES	[FINAL]
ddH <sub>2</sub> O	-
Buffer de PCR libre de Mg <sup>++</sup>	1x
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM
Glicerol	10-15 %
dNTPs (c/u)	50 μM
Primer M13 Fw	0,2 μM
Primer M13 Rv	0,2 μM
Taq polimerasa	0,5 u
Plásmido	10 ng
<b>Volumen Final</b>	<b>25 μl</b>

Se cubrieron mezclas con 1 gota de aceite mineral.

Los ciclos de amplificación se ejecutaron en un termociclador MJ Research PTC-100 (USA) y fueron los siguientes:

94°C	1 min	1 ciclo
94°C	1 min	
55°C	2 min	25 ciclos
72°C	2 min	
72°C	1 min	1 ciclo

#### 5.3.4.2. Detección de sondas informativas

Inicialmente se debe determinar qué sondas son informativas (i.e. sondas que revelen polimorfismos entre los grupos) y con cual enzima de restricción. Para ello realizó la digestión de 30 µg de ADN durante 12 hs, de cada progenitor y de los respectivos grupos (BS y BA), con cinco enzimas de restricción (*EcoRI*, *HindIII*, *BamHI*, *EcoRV* y *PstI*) utilizando 2,5 U enzima/µg ADN. Los productos de digestión fueron separados mediante electroforesis (30 V durante 12 hs) en un gel de agarosa (1,5% en buffer TAE 1x). Posteriormente, se realizó una transferencia o "Southern Blotting" basada en el método de T. Helentjaris, NPI y descrita en la segunda edición de los Protocolos de Laboratorio del CIMMYT (Hoisington *et. al.* 1994). Para ello, se desnaturalizaron los geles con 0,4 N NaOH; 0,6 M NaCl (1 litro/gel), luego se neutralizaron con 0,5 M Tris-7,5; 1,5 M NaCl (1 litro/gel), y se transfirió a una membrana de nylon (Hybond-N y Hybond N<sup>+</sup>) durante 24 hs, con 10 X SSC como buffer de transferencia. Finalmente, para inmovilizar el ADN a la membrana se sometió a luz UV (120.000 µjoules/cm<sup>2</sup>) y luego se hornearon a 80°C durante 2 hs.

#### 5.3.4.3. Marcación no radiactiva

Las sondas fueron marcadas no-radiactivamente incorporándoles un nucleótido con digoxigenina (Dig-dUTP) por medio de la técnica de PCR (reacción en cadena de la ADN polimerasa) en un volumen de 100 µl según el siguiente protocolo (Hoisington *et al.* 1994):

COMPONENTES	[FINAL]
ddH <sub>2</sub> O	-
10x <i>Taq</i> Buffer	1x
50 mM MgCl <sub>2</sub>	2 mM
Glicerol	15%
10 mM dNTPs ( <sup>s</sup> /dTTP)	50 μM
10 mM dTTP	47,5 μM
1 mM Dig-dUTP	2,5 μM
5U/μl <i>Taq</i> ADN Polimerasa	2 U
2μM "primer" <sup>a</sup>	0,2 μM
2μM "primer" <sup>b</sup>	0,2 μM
1 ng/μl Plásmido	10 ng

<sup>a</sup>pUC/M13 Forward Primer: 5' ACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGT 3'

<sup>b</sup>pUC/M13 Reverse Primer: 5' AACAGCTATGACCATGATTACGCC 3'

Los ciclos de amplificación fueron los mismos que se describieron en 5.3.4.1

Para controlar la incorporación y el tamaño de los fragmentos amplificados, se realizó una amplificación conjunta de la sonda sin digoxigenina y con digoxigenina. Luego, se corrió electroforéticamente 5 μl de c/u de las reacciones de PCR en un gel de agarosa al 1% en TAE 1X. Posteriormente, el gel fue teñido con EtBr y fotografiado, para luego estimar los pesos moleculares de los fragmentos. Por diferencia de tamaño entre la sonda sin marca y la sonda con Dig-dUTP, se determinó la incorporación de la misma.

#### 5.3.4.4. Pre-hibridación, hibridación y lavados de astringencia

Las membranas nuevas fueron pre-hibridadas en un volumen de 20 ml/100 cm<sup>2</sup> durante 2 hs, en tubos de borosilicato, con rotación continua y a la

misma temperatura de la hibridización. La solución de pre-hibridización fue la siguiente:

COMPONENTES	[FINAL]
20x SSC	5x
10% SDS	0,02%
10% Lauril-sarcosina	0,1%
10x reactivo bloqueante	1%

La hibridización se realizó a una temperatura de 63° C para las sondas heterólogas y 68° C para las sondas homólogas. La incubación se llevó a cabo en tubos de borosilicato con rotación continua, en un volumen de buffer de 5 ml/100 cm<sup>2</sup>, y durante 18 hs (DIG Luminescent Detection Kit, Boehringer Mannheim, Alemania). Los componentes del buffer de hibridización fueron los mismos que para la pre-hibridización.

Luego de la hibridización las membranas fueron lavadas, para remover la sonda pegada inespecíficamente, de la siguiente forma:

- 1- Dos lavados de 5 min. c/u con 2x SSC; 0,1% SDS a temperatura ambiente.
- 2- Dos lavados de 15 min. c/u con 0.1x SSC; 0,1% SDS a 68 °C y con agitación.

**5.3.4.5. Detección de las sondas marcadas, exposición y revelado de los films.**

La detección se realizó siguiendo los pasos descritos en el manual de detección luminescente para sondas marcadas con DIG-dUTP (DIG Luminescent Detection Kit, Boehringer Mannheim, Alemania). Las membranas fueron incubadas con un anticuerpo (i.e. anti-digoxigenina) conjugado con fosfatasa alcalina (AP) y luego con un sustrato quimioluminiscente (i.e. CSPD). El sustrato reacciona ante la presencia de la AP (fosfatasa alcalina) liberando fotones que imprimen una placa autorradiográfica (mejor llamada "luminografía"). Previo a la exposición de las membranas, las mismas fueron colocadas en estufas a 37° C, temperatura óptima de la enzima, para aumentar la eficiencia de la reacción luminescente. La exposición se realizó sobre un film del tipo X-OMAT AR (Kodak). Las membranas permanecieron expuestas por períodos de tiempos variables de acuerdo al tipo de sonda utilizada. En el caso de sondas homólogas fueron expuestas durante 1-2 horas; mientras que para las heterólogas se prolongó hasta 24 hs.

Luego de la exposición, los films fueron revelados en un cuarto oscuro con revelador Kodak HC-110 (dilución 1:16) hasta la aparición de las bandas, luego colocados en fijador Kodak durante 10 minutos y finalmente lavados con agua. La observación y el análisis de las bandas se realizaron mediante la exposición de los films a un transiluminador de luz blanca.

**5.3.4.6. Reutilización de membranas**

Las sondas fueron despegadas de las membranas mediante dos lavados de 15 min. a 37°C en 0,2 M NaOH, 0,1% SDS y un lavado final en 2x SSC. De esta forma se realizaron hasta 4 reusos por membrana.

Para disminuir el arrastre de sonda pegada en forma definitiva, fue necesario evitar que las membranas se sequen y para ello fueron conservadas en una solución de TE-8.0 (10 mM Tris-8.0, 1 mM EDTA-8.0) y a 4° C hasta la próxima hibridización.

## **VI. RESULTADOS**

## ÍNDICE

	<b>Página</b>
6.1. Genética de la aposporia en <i>Paspalum notatum</i> .....	93
6.1.1. Obtención de los progenitores.....	93
6.1.2. Obtención de la población F <sub>1</sub> segregante.....	103
6.1.3. Obtención de las progenies F <sub>2</sub> s, retrocruzas y del progenitor femenino autofecundado.....	106
6.2. Marcadores Moleculares.....	114
6.2.1. Análisis de RAPDs.....	114
6.2.2. Análisis de AFLPs.....	123
6.2.3. Análisis de RFLPs.....	127
6.2.4. Transformación de marcadores de PCR en marcadores codominantes (RFLP) y específicos (SCAR).....	137

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Genética de la aposporia en *Paspalum notatum*

#### 6.1.1. Obtención de los progenitores

Con el objeto de obtener una población segregante apta para el análisis genético y genómico de la aposporia, en la primera etapa se caracterizaron y seleccionaron los parentales para el diseño de los cruzamientos correspondientes. En este tipo de trabajo se suele tratar de cruzar individuos con fenotipos altamente contrastantes para el carácter estudiado, en este caso plantas apomícticas versus plantas con un alto índice de expresión sexual.

Como *progenitores femeninos* se seleccionaron dos plantas de *P. notatum* 4x originadas por cruzamiento entre una planta apomíctica facultativa (Q3664) con alto grado de expresión sexual, por otra planta apomíctica con un alto porcentaje de sacos embrionarios apospóricos (Q3853). Ambas plantas fueron identificadas originalmente como F124 y F131 y fueron seleccionadas no solo por su potencial sexual, sino también por sus características fenotípicas: porte erecto, vigor, número de inflorescencias, uniformidad en la floración, etc. (Urbani, comunicación personal). Las mismas fueron reanalizadas en este trabajo para evaluar su potencial como progenitor femenino aportante de las variantes alélicas relacionadas o ligadas con el cruzamiento sexual.

De los dos genotipos seleccionados originalmente por su comportamiento sexual, F131 fue el único que no presentó ningún indicio de apomixis en los 390 óvulos analizados a lo largo de todo el periodo de floración (enero a abril). La plan-

ta F124, si bien había sido seleccionada previamente por su condición sexual, fue descartada como progenitor femenino, debido a la presencia residual de un saco embrionario apospórico en los 169 óvulos analizados (Tabla 2). Por otro lado, el genotipo F131 posee un mayor porcentaje de sacos meióticos bien desarrollados (74,4%) con respecto al genotipo F124 (51,5). Esta característica es deseable desde el punto de vista de la capacidad de cruzamiento ya que nos aseguraría una buena producción de semillas en los cruzamientos.

*Progenitor masculino:* Para seleccionarlo se tuvo en cuenta el nivel de expresión del carácter apomixis, medido a través del porcentaje de óvulos con sacos embrionarios apospóricos. También se tuvieron en cuenta las características fenotípicas (vigor, producción de polen, etc.). Para ello, se recurrió a un trabajo previo, en el cual se evaluó el comportamiento reproductivo de varios genotipos apomícticos naturales de *P. notatum* 4x (Altamiranda, 1983). Por otro lado, en este trabajo se analizaron cinco genotipos adicionales (Q4010, Q4016, Q4023, Q4117 y IB229) que no habían sido incluidos en aquel estudio.

**Tabla 2.** Determinación del tipo de saco embrionario en diferentes genotipos tetraploides de *Paspalum notatum*.

Genotipo	N° ovarios analizados	Porcentaje de ovarios con				
		S.E.M	S.E.I	S.E.a	S.E.M + S.E.A	S.E.A
F124	169	51,5	26,6	21,3	0	0,6
F131	390	74,4	11,3	14,3	0	0
Q4010	56	3,6	0	0	0	96,4
Q4016	55	3,6	0	0	0	96,4
Q4023	42	35,7	2,4	0	59,5	2,4
Q4117	162	3,7	0	0	4,3	92,0
IB229	137	13,9	0	3,6	12,4	70,1

S.E.M = Saco embrionario meiótico

S.E.A = Saco embrionario apospórico

S.E.I = Saco embrionario inmaduro o poco desarrollado

S.E.a = Saco embrionario ausente

S.E.M + S.E.A = Saco embrionario meiótico + saco embrionario apospórico

Los genotipos Q.4010, Q4016 y Q.4117 presentaron los porcentajes más alto de óvulos con sacos embrionarios apospóricos (SEA) y además el nivel más bajo de expresión de sacos embrionarios meióticos (3,7%) (Tabla 2). La diferencia entre los tres genotipos estuvo dada en el número de SEA por óvulo. El genotipo Q4117 tuvo un elevado número de SEA por óvulo, contabilizándose en algunos óvulos hasta 12 sacos, de los cuales muchos de ellos no alcanzaron a desarrollarse por completo, debido a una falta de disponibilidad de espacio físico dentro del

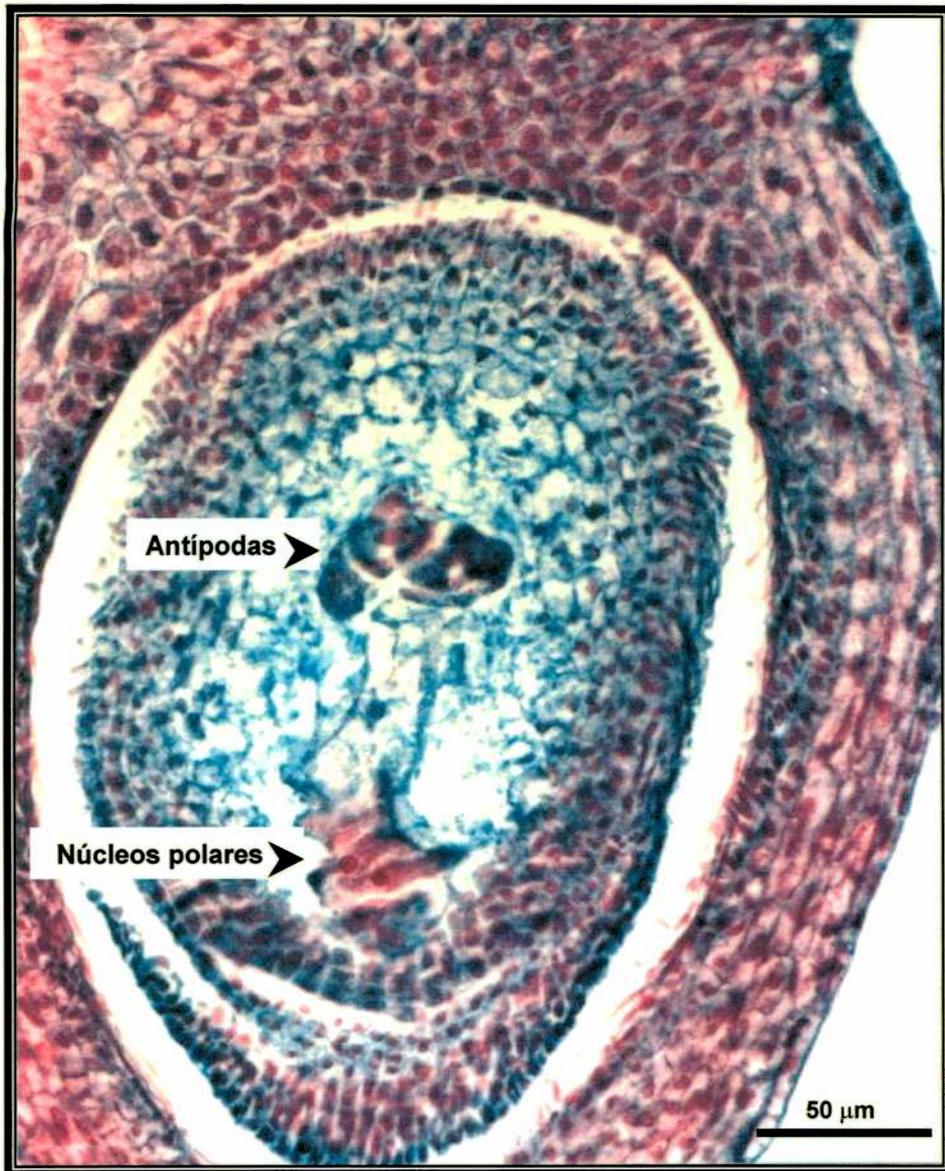
mismo. Esta característica es muy importante para poder discriminar sacos embrionarios meióticos versus apospóricos por la técnica de clarificado de ovarios, ya que permite con rapidez determinar el origen de los mismos. Las plantas de reproducción sexual forman un solo saco meiótico por óvulo; mientras que en general las plantas de reproducción apomíctica forman más de un saco embrionario apospórico por óvulo. Los genotipos Q4010 y Q4016 fueron descartados porque en muchos óvulos analizados se observó la presencia de un solo SEA. Esta característica al transmitirse a la progenie puede complicar la clasificación de la progenie mediante el análisis de sacos embrionarios por la técnica de clarificado de ovarios.

Por otro lado, los resultados obtenidos mediante técnicas embriológicas, fueron corroborados en estudios de progenies usando marcadores moleculares (Ortiz *et al.* 1997). Se demostró mediante marcadores de RAPD y RFLP, que el genotipo F131 se comporta como una planta completamente sexual, ya que toda su descendencia se originó a partir de un proceso de singamia entre gametas haploides ( $n$ ). Sin embargo, el genotipo Q4117 posee un alto grado de expresión de la apomixis, debido a que más del 90% de sus descendientes fueron de origen materno (Ortiz *et al.* 1997).

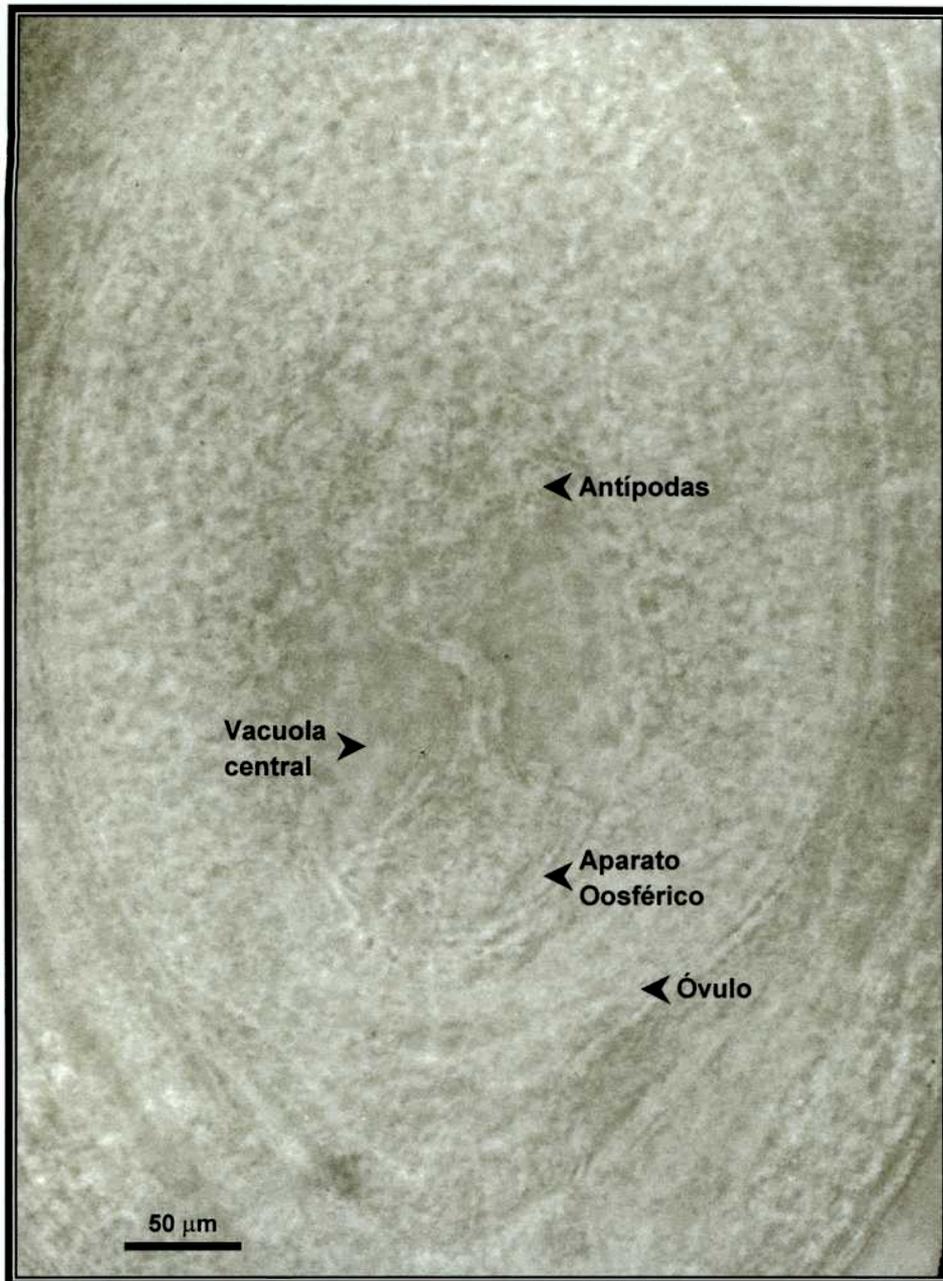
De acuerdo a los resultados embriológicos y moleculares observados se seleccionó como progenitor femenino al genotipo F131 y como progenitor masculino al genotipo Q4117.

En las Figuras 7 y 8 se puede observar un ovario de una planta sexual con un saco embrionario meiótico típico de *P. notatum*. En la Figura 7 se observa co-

mo son visualizados los sacos meióticos mediante la técnica de corte histológico y coloración. Se puede apreciar claramente los núcleos polares de la célula central, ubicados hacia el extremo micropilar del óvulo, y en el extremo opuesto se observan varias antípodas. En esta sección del corte no se alcanza a visualizar el nucleolo de la oosfera debido a que está presente en otras secciones del corte histológico. En la Figura 8 se observa un saco meiótico obtenido mediante clarificado de ovarios y posterior visualización con un microscopio con DIC. Como podemos apreciar la forma del saco meiótico es la misma que en la anterior figura, aunque el nivel de detalle que se obtiene no es el mismo. Sin embargo, se puede apreciar la zona micropilar donde se ubica el aparato oosférico, el citoplasma contraído de la célula central por la presión que ejerce la enorme vacuola, y en el extremo chalazal se ubican las antípodas. Si se observa con detenimiento se puede apreciar que estos sacos tienen una forma muy parecida a un árbol, donde la base sería la zona del aparato oosférico, el tronco estaría representado por el citoplasma contraído de la célula central y por último las antípodas se asemejan a la copa del mismo.

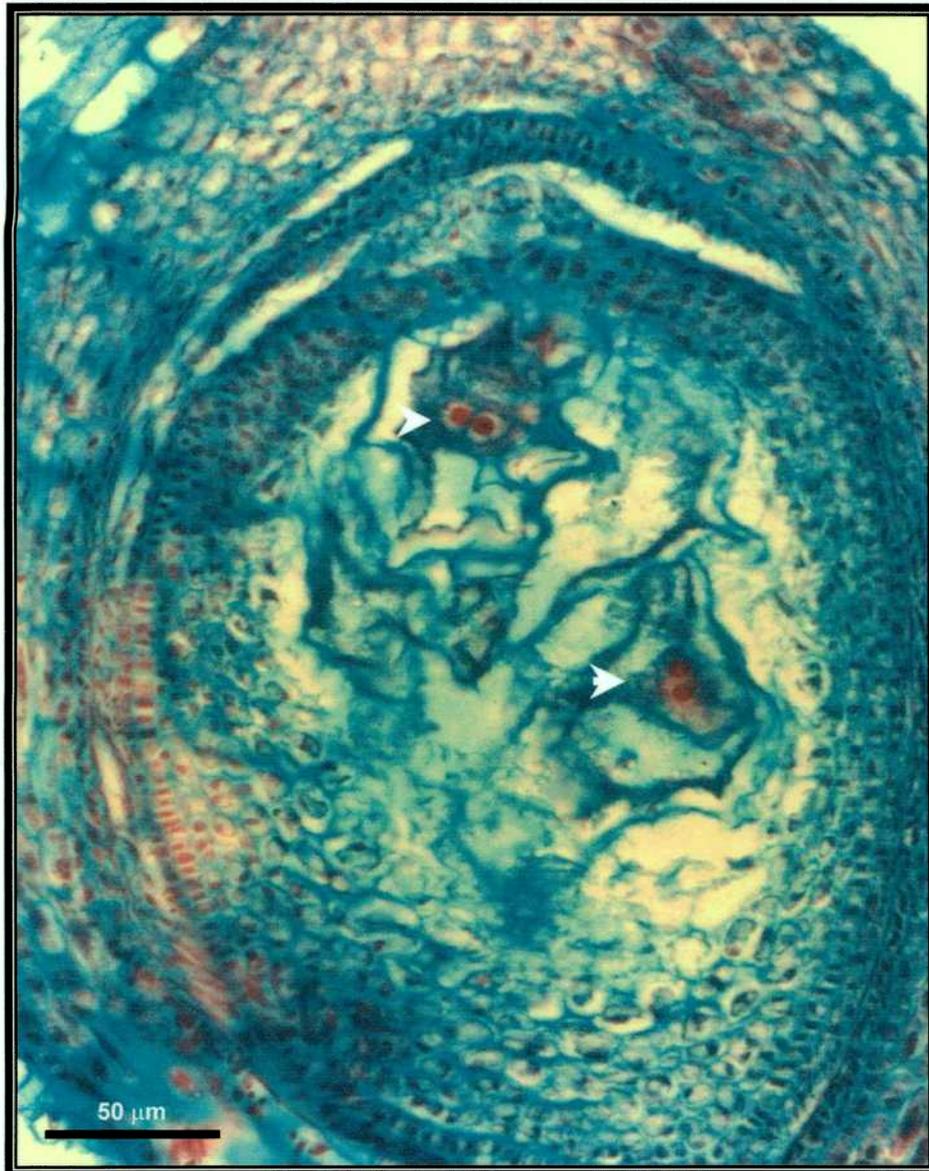


**Figura 7.** Ovario mostrando un óvulo con un saco embrionario meiótico en *P. notatum* obtenido por corte histológico y coloración. Hacia el extremo micropilar se encuentra el aparato oosférico y en el extremo chalazal varias antípodas. En la figura solamente se observan los nucleolos de los núcleos polares de la célula central y varias antípodas. (x 464)

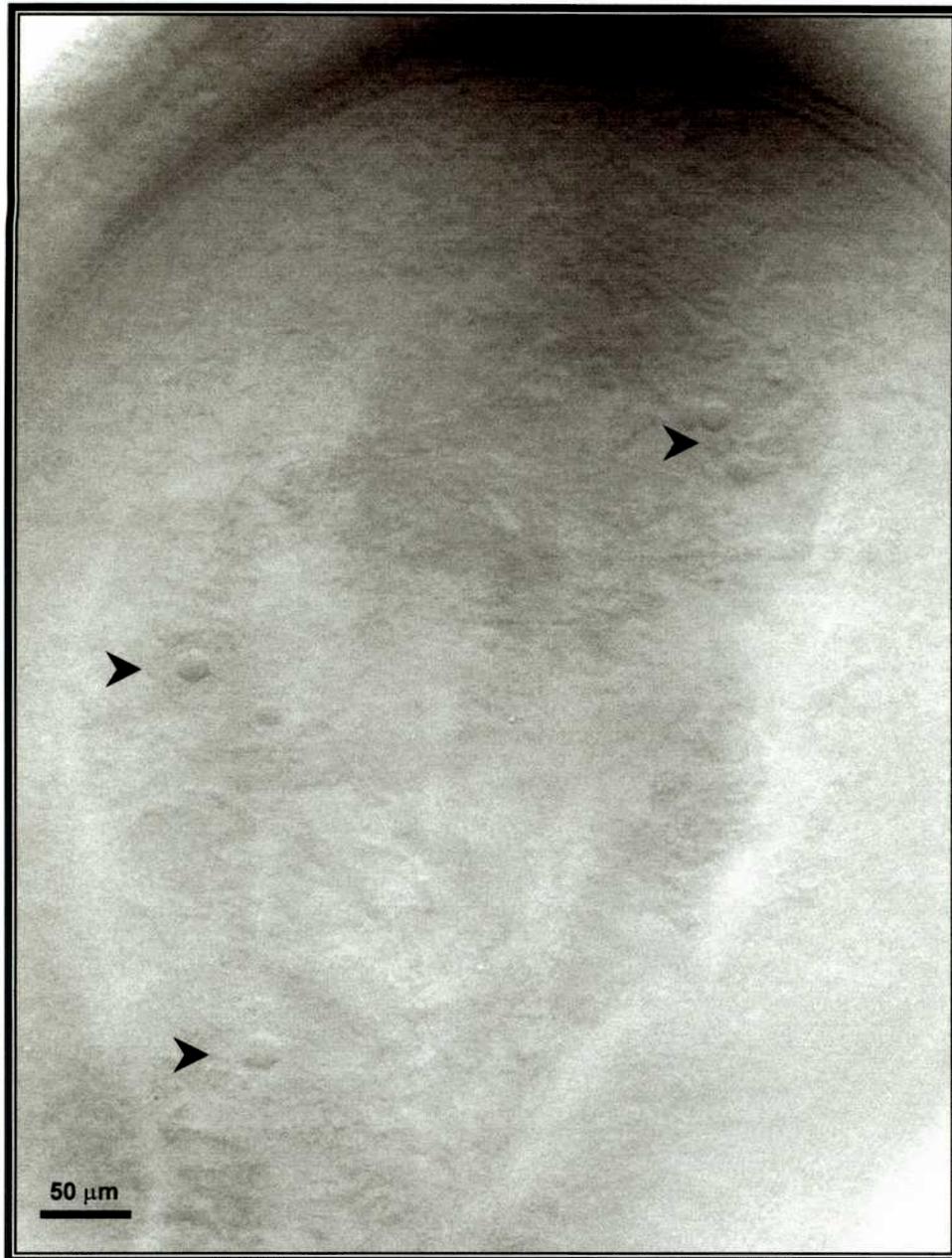


**Figura 8.** Óvulo con un saco embrionario meiótico de *Paspalum notatum*. Visualización mediante microscopio con dispositivo DIC de un ovario clarificado mediante la técnica de Herr (1971). En la figura se observa el aparato oosférico hacia el extremo micropilar, la vacuola central y las antípodas hacia el extremo chalazal. En esta figura no se llega a visualizar los nucleolos de la oosfera y de los núcleos polares. (x 306)

En las figuras 9 y 10 están representados los sacos embrionarios apospóricos característicos de *P. notatum*. En este caso también tenemos la observación hecha mediante corte histológico y coloración (Figura 9) donde podemos apreciar la presencia de dos pares de nucleolos que pertenecen a los núcleos polares de dos sacos apospóricos. Al igual que lo explicado en la Figura 7 para el saco meiótico obtenido por corte y coloración, en esta sección no se alcanzan a visualizar los nucleolos de las respectivas oosferas. La figura 10 representa a un ovario de una planta apomíctica obtenido mediante la técnica de clarificado de Herr (1971) y observación mediante microscopio con DIC. Se observa claramente tres grupos de nucleolos separados, los cuales pertenecen a los núcleos polares de tres sacos apospóricos diferentes. En otros planos de la visualización se encuentran los nucleolos de las respectivas oosferas (en la figura no se puede apreciar). Puede notarse que en estos sacos no hay presencia de antípodas como en los meióticos y además que poseen una forma más esférica y generalmente cubren prácticamente todo el espacio nucelar.



**Figura 9.** Ovario mostrando un óvulo con dos sacos embrionarios apospóricos en *P. notatum*. Obtenido por corte histológico y coloración. Las flechas indican dos pares de nucleolos (coloreados de rojo) pertenecientes a los núcleos polares de dos sacos apospóricos. En esta posición no se observa los nucleolos de las respectivas oosferas. (x 464)



**Figura 10.** Óvulo con tres sacos embrionarios apospóricos en *Paspalum notatum*. Visualización mediante microscopio con dispositivo DIC de un ovario clarificado mediante la técnica de Herr (1971). Las flechas indican los nucleolos pertenecientes a los núcleos polares de tres sacos apospóricos. (x 240)

### 6.1.2. Obtención de la población F<sub>1</sub> segregante

Se castraron y polinizaron un total de 8.767 espiguillas, obteniéndose un total de 1.430 cariopses (16,3%). Se sembraron 497 y se obtuvieron 237 plantas, de las cuales 212 fueron estudiadas. De las restantes, la mayoría murió antes de florecer e incluso algunas nunca florecieron en los tres años de cultivo que llevan. La progenie completa presentó una gran variación en cuanto al tamaño de las plantas, vigor, hábito de crecimiento, tamaños de inflorescencias, longitud de vara floral etc. Esta variación, típica de una población híbrida cuando se usan padres con muchas diferencias genotípicas, indicó que la población obtenida era efectivamente híbrida. No obstante, ante la posibilidad de algún error eventual en el momento de la castración que haya podido producir algunos individuos a través de autofecundación, se hizo un muestreo para confirmar por medio de marcadores moleculares (RFLP) el origen híbrido de la población. Esto se realizó en un trabajo paralelo donde diez plantas de la población, tomadas al azar, demostraron compartir una banda de RFLP que es específica del progenitor masculino (Ortiz, comunicación personal). Este trabajo paralelo se vio facilitado porque anteriormente tanto la planta madre F131 como el padre Q4117 habían sido utilizadas en un trabajo de análisis de progenies autofecundadas hecho con marcadores moleculares (Ortiz *et al.* 1997).

Las plantas comenzaron a florecer a principios de enero y la floración se extendió hasta el mes de abril. En dicho período y durante dos años consecutivos de floración, se fijaron espiguillas en antesis de 212 plantas.

La segregación en la F<sub>1</sub> fue de 156 plantas sexuales contra 56 plantas apomícticas. Esto representó una proporción fenotípica de **2,8:1** entre sexuales y apomícticas (Tabla 3).

Los híbridos sexuales mostraron en promedio un alto porcentaje de sacos embrionarios meióticos (65%), a pesar de que la variación fue muy amplia (4.5-100%). Si consideramos individualmente cada genotipo sexual, solamente 26 plantas tuvieron valores inferiores al 50% de sacos embrionarios meióticos (SEM), lo cual demuestra que en general la mayoría de las plantas de este grupo poseen valores normales de fertilidad para la especie y muy similares a los de su progenitor femenino. En ninguna de estas plantas se observó la presencia de SEA o mixtos en los 60 ovarios promedio analizados por planta. Esto demuestra que dichas plantas se reproducen exclusivamente por sexualidad.

Entre los genotipos apomícticos se observa un muy alto porcentaje de óvulos con SEA (80.1%) y muy bajo porcentaje con SEM (7,0%). Además, si consideramos en conjunto los óvulos con SEA y mixtos (SEM + SEA) se obtiene un nivel muy alto de expresión de la apomixis (87.2 %) comparable al del padre (Tabla 3). Si bien es cierto que existe un amplio rango en los porcentajes de SEA (29.4% al 100%) entre los individuos de este grupo, dicha variación no se debió a un número importante de plantas. Solo 4 plantas tuvieron valores inferiores al 50% de óvulos con SEA; mientras que más de la mitad de las plantas superaron el valor promedio de 80.1%. Por otro lado, si analizamos la presencia de SEM presentes en plantas apomícticas, podemos ver que los valores promedios son muy bajos e inclusive en

15 individuos no se observaron óvulos con SEM. De las 56 plantas apomícticas estudiadas, solo 12 tenían valores superiores al 10% de óvulos con SEM, lo cual demuestra una baja expresión de la sexualidad en todos los individuos F<sub>1</sub> apomícticos. Estos valores son muy semejantes a los observados en el padre apomíctico Q4117.

**Tabla 3.** Clasificación de una progenie F<sub>1</sub> producto de un cruzamiento entre una planta sexual (F131) y otra apomíctica (Q4117) de *Paspalum notatum*.

Progenie	Porcentaje de óvulos con				
	SEM	SEI	SEa	SEM + SEA	SEA
<b>F<sub>1</sub> Sexual (156)</b>					
Promedio	64,8	15,6	19,6	0	0
rango	4,5-100	0-42,9	1,6-74,6	0	0
<b>F<sub>1</sub> Apomíctica (56)</b>					
Promedio	7,0	1,8	4,0	7,1	80,1
rango	0-39,6	0-21,6	0-19,3	0-22,2	29,4-100

### 6.1.3. Obtención de las progenies F<sub>2</sub>s, retrocruzas y del progenitor femenino autofecundado

En la Tabla 4 se encuentran todos los cruzamientos realizados y las plantas obtenidas para las diferentes progenies.

En general, en casi todos los cruzamientos se produjeron plantas para el análisis. Solo en tres cruzamientos, entre distintos genotipos F<sub>1</sub> sexuales, no se obtuvieron plantas suficientes debido a una gran mortandad de plantines provocada por hongos (dumping off) (Tabla 4).

*Progenie de la madre F131 autofecundada:* En la progenie originada por autofecundación del progenitor femenino F131 se obtuvieron 60 individuos, de los cuales ocho murieron en el campo antes de florecer y 14 no florecieron nunca. Las 38 plantas restantes fueron clasificadas como de reproducción sexual debido a la ausencia de sacos de origen apospórico (Tabla 5). El promedio general de óvulos con SEM fue 47,4% y consecuentemente se detectó un alto porcentaje de ovarios con sacos abortados, inmaduros o poco desarrollados (52,6%)(Tabla 6). Esta disminución en la fertilidad de la parte femenina podría deberse a lo que se conoce como efecto de depresión por consanguinidad o "*inbreeding*", típica de las plantas alógamas, ya que la planta F131 parece mantener en parte la autoincompatibilidad característica de su antecesor diploide.

**Tabla 4.** Cruzamientos realizados y plantas obtenidas en progenies del progenitor femenino autofecundado (F131), F<sub>2</sub>s y retrocruzas.

Progenies	Número de espigullas			Plantas obtenidas
	polinizadas	llenas	sembradas	
<b>Progenitor femenino autofecundado</b>				
F131	2934	326	326	60
<b>F<sub>1</sub>s (S) autofecundadas</b>				
41	5968	931	199	49
48	6375	851	197	45
87	3354	286	280	63
100	3236	466	194	44
106	2917	875	185	59
114	2482	274	270	89
126	3485	906	202	93
162	4800	264	198	26
<b>F<sub>1</sub> (S) X F<sub>1</sub> (S)</b>				
114 X 154	1108	409	409	84
154 X 114	1046	414	414	
126 X 154	177	93	93	
154 X 126	155	71	71	
<b>F<sub>1</sub> (S) X F<sub>1</sub> (A)</b>				
114 X 168	645	141	141	32
<b>Retrocruzas</b>				
F <sub>1</sub> 114(S) X F131(M)	920	135	135	47
F <sub>1</sub> 114(S) X Q4117(P)	1407	272	272	97
F131(M) X F <sub>1</sub> 168(A)	992	47	47	21

(S) sexual; (A) apomíctica; (M) progenitor femenino sexual; (P) progenitor masculino apomíctico

*Progenies F<sub>2</sub>s (F<sub>1</sub> sexual autofecundada)*: En todas las progenies generadas por autofecundación de genotipos sexuales hubo que realizar un mayor número de autopolinizaciones de tal manera de poder obtener un número suficiente de individuos para el análisis. Esto se debió al hecho que en general los genotipos sexuales de *P. notatum* conservan un grado importante de autoincompatibilidad y por lo tanto son en gran medida autoestériles (Quarin 1992). Por otro lado, si bien es factible obtener plantas por autofecundación, las pocas que se obtienen son en general poco vigorosas y tienen problemas para sobrevivir o florecer. Esto se observó en la mayoría de las F<sub>1</sub> autofecundadas donde se obtuvieron pocos cariopos y se observó una gran diferencia entre el número de plantas obtenidas (Tabla 4) y el número de plantas que pudieron ser luego analizadas (Tabla 5). Al igual que en la planta madre, se supone que en estos híbridos F<sub>1</sub> sexuales la depresión por consanguinidad es la que causa estos inconvenientes para producir progenies.

De las 8 progenies obtenidas por autofecundación de genotipos F<sub>1</sub> sexuales, solo 4 de ellas pudieron ser analizadas casi en su totalidad: plantas F<sub>1</sub> 48, 87, 114 y 126 (Tabla 5). En total se analizaron 239 individuos, y en todos ellos solamente se observaron óvulos con sacos embrionarios meióticos, inmaduros o abortados. Si bien en algunas plantas se observaron óvulos que poseían, además del saco meiótico típico, estructuras que se asemejaban a sacos posiblemente apospóricos, nunca se pudo comprobar que efectivamente se tratara de sacos de origen nucelar. Por ello todas las plantas fueron clasificadas como sexuales y la segregación fenotípica entre sexuales y apomícticas fue de 1:0 (Tabla 6).

*Progenies F<sub>2s</sub> (F<sub>1</sub> sexual X F<sub>1</sub> sexual):* Se realizaron cuatro combinaciones diferentes entre individuos F<sub>1</sub> sexuales. En una sola combinación (114 X 154) se obtuvieron plantas para el análisis. Se analizaron en total 77 individuos sobre un total de 84 plantas obtenidas. Todas las plantas analizadas fueron clasificadas como sexuales debido a que solamente se observaron sacos embrionarios meióticos (relación S:A = 1:0) (Tabla 5). El análisis de los sacos embrionarios mostró valores promedios de óvulos con SEM superiores al 70%, con una variación menor que la observada en plantas sexuales producto de autofecundación (Tabla 6).

*Progenie F<sub>2</sub> (F<sub>1</sub> sexual X F<sub>1</sub> apomíctica):* Se realizó un solo cruzamiento entre un híbrido F<sub>1</sub> sexual (114) y otro apomíctico (168). Se obtuvieron solo 32 plantas de las 645 espiguillas cruzadas. Solo 29 plantas pudieron ser analizadas y las restantes murieron antes de florecer. El análisis embriológico determinó que 22 eran sexuales y 7 apomícticas. Esto representa una proporción fenotípica S:A de 3,1:1 (Tabla 5). Las plantas apomícticas mostraron un alto grado de expresión del carácter, con un valor promedio superior al 90% de óvulos con presencia de SEA, incluyendo los mixtos. La sexualidad residual medida como el porcentaje de SEM fue muy baja (1,6%) (Tabla 6).

**Tabla 5.** Número de plantas estudiadas, clasificación reproductiva y proporción fenotípica observada en diferentes progenies de *Paspalum notatum*.

Progenie	Número de Plantas			Proporción Fenotípica (S:A)
	Estudiadas	Sexuales	Apomíticas	
<b>Progenitor femenino autofecundado</b>				
F131	38	38	0	1:0
<b>F<sub>1</sub>s (S) autofecunda-</b>				
48	30	30	0	1:0
87	52	52	0	1:0
114	83	83	0	1:0
126	72	72	0	1:0
<b>F<sub>1</sub> (S) X F<sub>1</sub> (S)</b>				
114 X 154	77	77	0	1:0
<b>F<sub>1</sub> (S) X F<sub>1</sub> (A)</b>				
114 X 168	29	22	7	3,1:1
<b>Retrocruzas</b>				
F <sub>1</sub> 114(S) X F131(M)	46	46	0	1:0
F <sub>1</sub> 114(S) X Q4117(P)	95	72	23	3,1:1
F131(M) X F <sub>1</sub> 168(A)	17	13	4	3,2:1

(S) sexual; (A) apomítica; (M) progenitor femenino sexual; (P) progenitor masculino apomítico

*Retrocruzas:* Las retrocruzas fueron realizadas tanto por la madre sexual F131 como por el padre apomítico Q4117. En el caso de la madre, ésta fue cruzada por un genotipo sexual y por otro apomítico. Por su parte, el padre apomítico solamente fue cruzado (polinizador) por una F<sub>1</sub> sexual, ya que no es posible

cruzar dos individuos apomícticos entre sí, porque la descendencia que se obtiene es en general de origen materno y no híbrida, y además es muy común obtener híbridos  $B_{III}$  ( $2n + n$ ) producto de la unión de una gameta femenina no reducida ( $2n$ ) por otra reducida ( $n$ ).

**Tabla 6.** Tipos de sacos embrionarios en una progenie del progenitor femenino (F131) autofecundado y en progenies  $F_2s$  de *Paspalum notatum*.

Progenie	Porcentaje de ovarios con					
	SEM	SEI	SEa	SEM + SEA	SEA	
<b>F131 (M) autofecundado</b>						
<b>38 (S)</b>	Promedio	47,4	20,2	32,4	0	0
	rango	21,0-79,0	7,0-67,2	4,8-59,0	0	0
-----						
<b>F<sub>1s</sub> (S) autofecundadas</b>						
<b>239 F<sub>2s</sub> (S)</b>	Promedio	58,3	19,2	22,4	0	0
	rango	6,9-90,6	0-65,5	1,6-70,8	0	0
-----						
<b>F<sub>1</sub> (S) X F<sub>1</sub> (S)</b>						
<b>77 F<sub>2s</sub> (S)</b>	Promedio	73,3	11,5	15,3	0	0
	rango	35,5-94,6	0-29,0	1,6-41,9	0	0
-----						
<b>F<sub>1</sub> (S) X F<sub>1</sub> (A)</b>						
<b>22 F<sub>2s</sub> (S)</b>	Promedio	57,4	12,6	26,1	0	0
	rango	32,8-95,2	0-31,7	1,6-53,2	0	0
<b>7 F<sub>2s</sub> (A)</b>	Promedio	1,6	1,9	6,8	14,1	76,3
	rango	0-3,6	0-10,3	0-41,4	1,7-42,3	44,8-94,6

(S) sexual; (A) apomíctico

*Retrocruzas por la madre sexual:* En la retrocruza del genotipo sexual F<sub>1</sub> 114 por la madre F131 se obtuvieron 47 individuos, de los cuales 46 pudieron ser analizados. Todas ellas resultaron ser de reproducción sexual, por lo tanto no hubo segregación para el método de reproducción (relación S:A = 1:0).

En la retrocruza del genotipo apomíctico F<sub>1</sub>168 por la madre F131 se analizaron 17 plantas de las 21 obtenidas. Entre estas plantas, 13 resultaron ser de reproducción sexual y 4 apomícticas. Esto representa una proporción fenotípica de 3,2:1 entre sexuales y apomícticas (Tabla 5).

*Retrocruza por el padre apomíctico:* Se realizó una retrocruza entre un genotipo F<sub>1</sub> sexual (114) por el padre apomíctico Q4117. Se analizaron reproductivamente 95 plantas sobre un total de 97 obtenidas. Se observó una segregación de 72 sexuales y 23 apomícticas. Esto representa una proporción fenotípica S:A de 3,1:1 (Tabla 5). Entre los individuos clasificados como apomícticos se observó un amplio rango de variación en el porcentaje de ovarios con SEA (1,5–95,1%). Esta variación es mayor que la observada entre las plantas apomícticas de las progenes F<sub>2</sub> (sexual x apomíctico) y las obtenidas por retrocruza por la madre sexual (F131 x F<sub>1</sub> 168) (Tabla 6 y 7). La variación observada en el grado de apomixis pudo deberse a la influencia que tiene el período de floración en el cual se fijaron los ovarios en anthesis para su evaluación. Aunque esto no se ha estudiado en *P. notatum*, se ha demostrado que existe una sensible variación en el nivel de expresión de los SEA durante el período de floración en *P. cromyorrhizon*, una especie afín a *P. notatum*. Al inicio y al final de dicho período los valores son menores que

en plena floración (Quarin 1986). Por otro lado, debemos considerar que en el caso de la F<sub>2</sub> (sexual X apomíctico) se analizó un número superior de plantas.

**Tabla 7.** Tipos de sacos embrionarios en progenies de *Paspalum notatum* originadas por retrocruzas por los padres (F131 y Q.4117).

Progenie	Porcentaje de ovarios con				
	SEM	SEI	SEa	SEM + SEA	SEA
<b>F<sub>1</sub> 114 (S) X F131 (M)</b>					
Promedio	66,2	14,8	19,0	0	0
<b>46 plantas (S)</b>					
rango	24,1-94,8	2,0-56,9	1,7-47,0	0	0
-----					
<b>F<sub>1</sub> 114 (S) X Q4117 (P)</b>					
Promedio	72,6	7,6	19,8	0	0
<b>72 plantas (S)</b>					
rango	25,0-98,1	0-27,6	1,7-69,4	0	0
Promedio	17,3	3,1	6,3	13,7	59,7
<b>23 plantas (A)</b>					
rango	1,3-76,9	0-24,6	1,6-41,9	4,9-35,6	1,5-95,1
-----					
<b>F131 (M) X F<sub>1</sub> 168 (A)</b>					
Promedio	48,9	18,2	32,9	0	0
<b>13 plantas (S)</b>					
rango	22,8-82,8	3,4-39,2	4,7-52,6	0	0
Promedio	6,4	0	4,4	15,2	74,0
<b>4 plantas (A)</b>					
rango	0-12,5	0	0-11,9	12,5-27,6	55,2-100

(S) sexual; (A) apomíctica; (M) progenitor femenino sexual; (P) progenitor masculino apomíctico

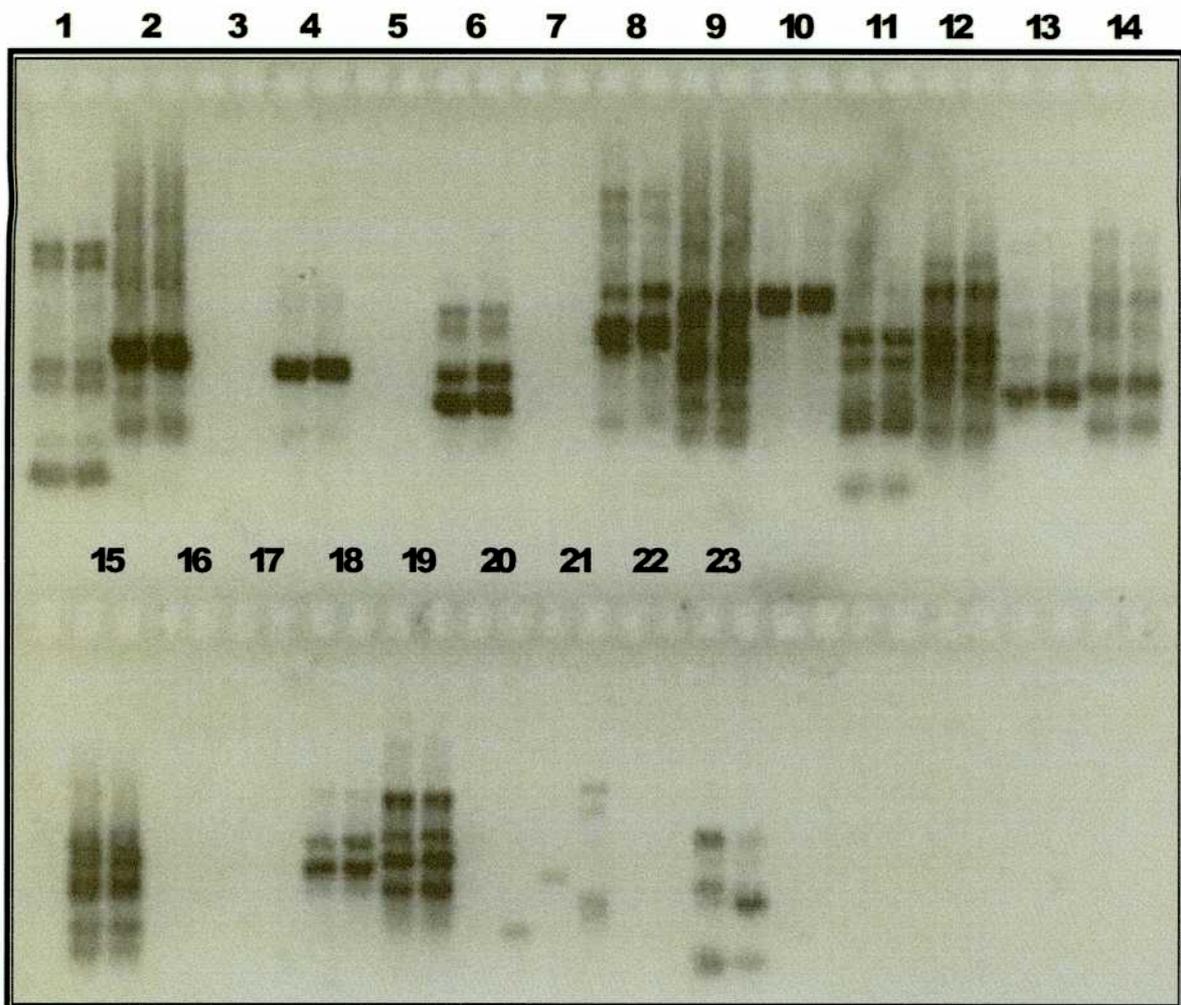
**6.2. Marcadores Moleculares**

Con el objetivo de localizar marcadores moleculares ligados al locus determinante de las diferencias entre plantas apomícticas y sexuales entre los parentales estudiados y que segrega en su progenie, se ensayaron 3 tipos de marcadores moleculares: los RAPDs, los AFLPs y los RFLPs.

**6.2.1. Análisis de RAPDs**

El ensayo para encontrar iniciadores (primers) con una secuencia complementaria a regiones genómicas (loci) que permitan la amplificación de bandas diferenciales entre el grupo sexual (BS) y el apomíctico (BA), produjo los siguientes resultados: de los 400 "primers" analizados, 343 generaron productos de amplificación detectables (86%) y 57 (14%) no amplificaron el ADN genómico u originaron un patrón difuso sin bandas claramente identificables. En total se evaluaron aproximadamente 1700 loci, es decir un promedio de 5 loci/primer. En la Figura 11 se observa el ensayo realizado con algunos de los primers al azar. Las amplificaciones con los primers que mostraban algún polimorfismo entre los grupos, se repetían una vez más para confirmar que se tratase efectivamente de una diferencia entre ambos, y no una falla en la amplificación de alguna de las dos muestras de ADN. Este es el caso del primer 21 donde se puede apreciar una banda en BS que no está presente en BA y a su vez éste último posee tres bandas diferenciales con respecto a BS (Figura 11). La repetición de la amplificación con ambas muestras y el mismo primer determinó que no existía polimorfismo entre los

grupos y que la primera observación fue erróneamente registrada como polimórfica debido a una falla en la amplificación de BS. El mismo criterio se mantuvo para aquellos casos donde solamente amplificaba una de las dos muestras, como se observa para el primer 20, donde BS no amplificó (Figura 11). Estos inconvenientes son propios de la técnica por PCR que es muy sensible a cambios a veces sutiles en las condiciones de reacción, en general debidos al grado de purificación del templado donde problemas de contaminación por impurezas alteran el producto final.



**Figura 11.** Ensayo de oligonucleótidos (decámeros) al azar de RAPD mediante amplificación por PCR, utilizando la técnica de análisis de segregantes en grupos (BSA) en *Paspalum notatum*. Los números representan los diferentes iniciadores ("primers") ensayados y las muestras corresponden a la mezcla de ADN de 10 individuos sexuales (BS) y 10 apomícticos (BA) respectivamente.

Del total de loci evaluados, solo dos resultaron ser realmente diferenciales entre los grupos. Ambos fueron detectados por separado con dos decámeros de la serie número 3 de "University British Columbia-Canadá". Los primers pertenecen a los números 243 y 259 de dicha serie y de ahora en más serán mencionados en este trabajo como UBC243 y UBC259. Los fragmentos diferenciales fueron específicos del grupo de plantas apomícticas (BA). La secuencia de los primers es la siguiente:

**UBC243: GGG TGA ACC G**

**UBC259: GGT ACG TAC T**

En la Tabla 8 se indican los "primers" utilizados con el respectivo resultado obtenido con cada uno de ellos.

Tabla 8. Resultados de las amplificaciones de los "primers" ensayados.

Primer	Resultado	Primer	Resultado	Primer	Resultado	Primer	Resultado
UBC 01	Monomórfico	UBC 51	Monomórfico	UBC 201	No amplificó	UBC 251	Monomórfico
UBC 02	Monomórfico	UBC 52	Monomórfico	UBC 202	Monomórfico	UBC 252	Monomórfico
UBC 03	Monomórfico	UBC 53	Monomórfico	UBC 203	Monomórfico	UBC 253	Monomórfico
UBC 04	Monomórfico	UBC 54	Monomórfico	UBC 204	Monomórfico	UBC 254	Monomórfico
UBC 05	Monomórfico	UBC 55	Monomórfico	UBC 205	Monomórfico	UBC 255	No amplificó
UBC 06	Monomórfico	UBC 56	Monomórfico	UBC 206	Monomórfico	UBC 256	Monomórfico
UBC 07	No amplificó	UBC 57	No amplificó	UBC 207	No amplificó	UBC 257	Monomórfico
UBC 08	Monomórfico	UBC 58	No amplificó	UBC 208	Monomórfico	UBC 258	Monomórfico
UBC 09	Monomórfico	UBC 59	Monomórfico	UBC 209	Monomórfico	<b>UBC 259</b>	<b>Polimórfico</b>
UBC 10	No amplificó	UBC 60	Monomórfico	UBC 210	Monomórfico	UBC 260	Monomórfico
UBC 11	No amplificó	UBC 61	Monomórfico	UBC 211	Monomórfico	UBC 261	Monomórfico
UBC 12	Monomórfico	UBC 62	Monomórfico	UBC 212	Monomórfico	UBC 262	Monomórfico
UBC 13	Monomórfico	UBC 63	Monomórfico	UBC 213	Monomórfico	UBC 263	Monomórfico
UBC 14	No amplificó	UBC 64	Monomórfico	UBC 214	Monomórfico	UBC 264	Monomórfico
UBC 15	Monomórfico	UBC 65	Monomórfico	UBC 215	Monomórfico	UBC 265	Monomórfico
UBC 16	Monomórfico	UBC 66	Monomórfico	UBC 216	Monomórfico	UBC 266	Monomórfico
UBC 17	Monomórfico	UBC 67	Monomórfico	UBC 217	Monomórfico	UBC 267	No amplificó
UBC 18	Monomórfico	UBC 68	No amplificó	UBC 218	Monomórfico	UBC 268	Monomórfico
UBC 19	Monomórfico	UBC 69	Monomórfico	UBC 219	Monomórfico	UBC 269	Monomórfico
UBC 20	Monomórfico	UBC 70	Monomórfico	UBC 220	Monomórfico	UBC 270	Monomórfico
UBC 21	Monomórfico	UBC 71	Monomórfico	UBC 221	Monomórfico	UBC 271	Monomórfico
UBC 22	No amplificó	UBC 72	Monomórfico	UBC 222	Monomórfico	UBC 272	Monomórfico
UBC 23	Monomórfico	UBC 73	Monomórfico	UBC 223	Monomórfico	UBC 273	Monomórfico
UBC 24	Monomórfico	UBC 74	Monomórfico	UBC 224	No amplificó	UBC 274	Monomórfico
UBC 25	Monomórfico	UBC 75	Monomórfico	UBC 225	Monomórfico	UBC 275	Monomórfico
UBC 26	No amplificó	UBC 76	Monomórfico	UBC 226	Monomórfico	UBC 276	Monomórfico
UBC 27	No amplificó	UBC 77	Monomórfico	UBC 227	Monomórfico	UBC 277	Monomórfico
UBC 28	Monomórfico	UBC 78	Monomórfico	UBC 228	Monomórfico	UBC 278	Monomórfico
UBC 29	Monomórfico	UBC 79	Monomórfico	UBC 229	Monomórfico	UBC 279	No amplificó
UBC 30	Monomórfico	UBC 80	Monomórfico	UBC 230	No amplificó	UBC 280	Monomórfico
UBC 31	Monomórfico	UBC 81	Monomórfico	UBC 231	Monomórfico	UBC 281	Monomórfico
UBC 32	Monomórfico	UBC 82	Monomórfico	UBC 232	Monomórfico	UBC 282	No amplificó
UBC 33	Monomórfico	UBC 83	Monomórfico	UBC 233	No amplificó	UBC 283	Monomórfico
UBC 34	Monomórfico	UBC 84	Monomórfico	UBC 234	Monomórfico	UBC 284	Monomórfico
UBC 35	Monomórfico	UBC 85	Monomórfico	UBC 235	Monomórfico	UBC 285	Monomórfico
UBC 36	Monomórfico	UBC 86	Monomórfico	UBC 236	Monomórfico	UBC 286	Monomórfico
UBC 37	Monomórfico	UBC 87	Monomórfico	UBC 237	Monomórfico	UBC 287	Monomórfico
UBC 38	Monomórfico	UBC 88	Monomórfico	UBC 238	Monomórfico	UBC 288	No amplificó
UBC 39	Monomórfico	UBC 89	Monomórfico	UBC 239	Monomórfico	UBC 289	Monomórfico
UBC 40	Monomórfico	UBC 90	Monomórfico	UBC 240	Monomórfico	UBC 290	Monomórfico
UBC 41	Monomórfico	UBC 91	Monomórfico	UBC 241	Monomórfico	UBC 291	Monomórfico
UBC 42	Monomórfico	UBC 92	Monomórfico	UBC 242	No amplificó	UBC 292	Monomórfico
UBC 43	Monomórfico	UBC 93	Monomórfico	<b>UBC 243</b>	<b>Polimórfico</b>	UBC 293	Monomórfico
UBC 44	Monomórfico	UBC 94	Monomórfico	UBC 244	Monomórfico	UBC 294	Monomórfico
UBC 45	Monomórfico	UBC 95	Monomórfico	UBC 245	Monomórfico	UBC 295	Monomórfico
UBC 46	No amplificó	UBC 96	Monomórfico	UBC 246	Monomórfico	UBC 296	Monomórfico
UBC 47	Monomórfico	UBC 97	Monomórfico	UBC 247	No amplificó	UBC 297	Monomórfico
UBC 48	No amplificó	UBC 98	Monomórfico	UBC 248	Monomórfico	UBC 298	No amplificó
UBC 49	Monomórfico	UBC 99	No amplificó	UBC 249	Monomórfico	UBC 299	Monomórfico
UBC 50	No amplificó	UBC 100	Monomórfico	UBC 250	Monomórfico	UBC 300	No amplificó

UBC 301	Monomórfico	UBC 351	Monomórfico	UBC 401	Monomórfico	UBC 451	Monomórfico
UBC 302	Monomórfico	UBC 352	Monomórfico	UBC 402	Monomórfico	UBC 452	Monomórfico
UBC 303	Monomórfico	UBC 353	Monomórfico	UBC 403	Monomórfico	UBC 453	Monomórfico
UBC 304	Monomórfico	UBC 354	Monomórfico	UBC 404	Monomórfico	UBC 454	Monomórfico
UBC 305	Monomórfico	UBC 355	Monomórfico	UBC 405	Monomórfico	UBC 455	Monomórfico
UBC 306	Monomórfico	UBC 356	Monomórfico	UBC 406	Monomórfico	UBC 456	Monomórfico
UBC 307	Monomórfico	UBC 357	Monomórfico	UBC 407	Monomórfico	UBC 457	Monomórfico
UBC 308	Monomórfico	UBC 358	Monomórfico	UBC 408	No amplificó	UBC 458	No amplificó
UBC 309	Monomórfico	UBC 359	Monomórfico	UBC 409	Monomórfico	UBC 459	Monomórfico
UBC 310	Monomórfico	UBC 360	Monomórfico	UBC 410	Monomórfico	UBC 460	Monomórfico
UBC 311	Monomórfico	UBC 361	Monomórfico	UBC 411	Monomórfico	UBC 461	No amplificó
UBC 312	Monomórfico	UBC 362	Monomórfico	UBC 412	Monomórfico	UBC 462	Monomórfico
UBC 313	Monomórfico	UBC 363	Monomórfico	UBC 413	Monomórfico	UBC 463	Monomórfico
UBC 314	Monomórfico	UBC 364	Monomórfico	UBC 414	Monomórfico	UBC 464	Monomórfico
UBC 315	Monomórfico	UBC 365	Monomórfico	UBC 415	Monomórfico	UBC 465	No amplificó
UBC 316	Monomórfico	UBC 366	Monomórfico	UBC 416	Monomórfico	UBC 466	Monomórfico
UBC 317	Monomórfico	UBC 367	Monomórfico	UBC 417	Monomórfico	UBC 467	Monomórfico
UBC 318	Monomórfico	UBC 368	Monomórfico	UBC 418	Monomórfico	UBC 468	Monomórfico
UBC 319	Monomórfico	UBC 369	No amplificó	UBC 419	Monomórfico	UBC 469	Monomórfico
UBC 320	Monomórfico	UBC 370	Monomórfico	UBC 420	Monomórfico	UBC 470	Monomórfico
UBC 321	Monomórfico	UBC 371	Monomórfico	UBC 421	Monomórfico	UBC 471	Monomórfico
UBC 322	Monomórfico	UBC 372	Monomórfico	UBC 422	Monomórfico	UBC 472	Monomórfico
UBC 323	Monomórfico	UBC 373	Monomórfico	UBC 423	Monomórfico	UBC 473	No amplificó
UBC 324	Monomórfico	UBC 374	Monomórfico	UBC 424	Monomórfico	UBC 474	Monomórfico
UBC 325	No amplificó	UBC 375	Monomórfico	UBC 425	Monomórfico	UBC 475	No amplificó
UBC 326	No amplificó	UBC 376	Monomórfico	UBC 426	Monomórfico	UBC 476	No amplificó
UBC 327	Monomórfico	UBC 377	Monomórfico	UBC 427	Monomórfico	UBC 477	Monomórfico
UBC 328	Monomórfico	UBC 378	Monomórfico	UBC 428	Monomórfico	UBC 478	Monomórfico
UBC 329	Monomórfico	UBC 379	Monomórfico	UBC 429	Monomórfico	UBC 479	Monomórfico
UBC 330	Monomórfico	UBC 380	Monomórfico	UBC 430	Monomórfico	UBC 480	Monomórfico
UBC 331	Monomórfico	UBC 381	Monomórfico	UBC 431	Monomórfico	UBC 481	No amplificó
UBC 332	No amplificó	UBC 382	Monomórfico	UBC 432	Monomórfico	UBC 482	Monomórfico
UBC 333	Monomórfico	UBC 383	Monomórfico	UBC 433	Monomórfico	UBC 483	No amplificó
UBC 334	No amplificó	UBC 384	Monomórfico	UBC 434	No amplificó	UBC 484	Monomórfico
UBC 335	Monomórfico	UBC 385	Monomórfico	UBC 435	No amplificó	UBC 485	Monomórfico
UBC 336	Monomórfico	UBC 386	Monomórfico	UBC 436	Monomórfico	UBC 486	Monomórfico
UBC 337	Monomórfico	UBC 387	Monomórfico	UBC 437	Monomórfico	UBC 487	Monomórfico
UBC 338	Monomórfico	UBC 388	Monomórfico	UBC 438	Monomórfico	UBC 488	Monomórfico
UBC 339	Monomórfico	UBC 389	Monomórfico	UBC 439	Monomórfico	UBC 489	Monomórfico
UBC 340	Monomórfico	UBC 390	No amplificó	UBC 440	Monomórfico	UBC 490	Monomórfico
UBC 341	Monomórfico	UBC 391	Monomórfico	UBC 441	Monomórfico	UBC 491	No amplificó
UBC 342	Monomórfico	UBC 392	Monomórfico	UBC 442	Monomórfico	UBC 492	Monomórfico
UBC 343	No amplificó	UBC 393	Monomórfico	UBC 443	Monomórfico	UBC 493	Monomórfico
UBC 344	No amplificó	UBC 394	No amplificó	UBC 444	Monomórfico	UBC 494	Monomórfico
UBC 345	Monomórfico	UBC 395	No amplificó	UBC 445	Monomórfico	UBC 495	No amplificó
UBC 346	Monomórfico	UBC 396	Monomórfico	UBC 446	Monomórfico	UBC 496	No amplificó
UBC 347	No amplificó	UBC 397	No amplificó	UBC 447	Monomórfico	UBC 497	Monomórfico
UBC 348	No amplificó	UBC 398	Monomórfico	UBC 448	Monomórfico	UBC 498	No amplificó
UBC 349	Monomórfico	UBC 399	Monomórfico	UBC 449	Monomórfico	UBC 499	Monomórfico
UBC 350	No amplificó	UBC 400	Monomórfico	UBC 450	Monomórfico	UBC 500	Monomórfico

La sigla UBC corresponde al proveedor de los "primers" (Brithish Columbia University, Canadá) Los números corresponden a los distintos primers al azar. Del 01-100 corresponde a la serie 1, del 201-300 a la serie 3, del 301-400 a la serie 4 y del 401-500 a la serie 5. Todos los "primers" son de 10 pares de bases (pb) de longitud.

Para confirmar el ligamiento de estos marcadores (UBC243 y UBC259) con el locus de la apomixis, se realizó el análisis de segregación con cada uno de los individuos de la población  $F_1$  seleccionada previamente para el estudio (50 sexuales y 50 apomícticos) y los respectivos padres (F131 y Q4117). Ambos fragmentos se encontraban presentes en el padre apomíctico Q4117, BA y en los 50 individuos apomícticos ensayados. Sin embargo, los dos marcadores estuvieron ausentes en la madre sexual F131, BS y los 50 individuos sexuales analizados. Para confirmar el ligamiento completo de ambos marcadores con el locus de la apomixis, se evaluaron otras 75 plantas adicionales (69 sexuales y 6 apomícticas). El resultado fue el mismo, ambos fragmentos presentes en las 6 plantas apomícticas y ausentes en las 69 sexuales. Es decir, que no existe recombinación entre el locus de la apomixis y los dos marcadores ligados. En las Figuras 12 y 13 se observa la cosegregación de los marcadores UBC243 y UBC259 con el sistema de reproducción apomíctico. El orden de siembra de las primeras 5 calles de los respectivos geles de las figuras 12 y 13 fue el siguiente: En la primera calle se encuentra el marcador de peso molecular (ADN del fago lambda digerido con la enzima de restricción *HindIII*), luego la madre sexual F131, el padre apomíctico Q4117, la mezcla de ADN de 10 individuos sexuales (BS) y la mezcla de ADN de 10 individuos apomícticos (BA). Luego entre corchetes figura la amplificación del ADN de los respectivos individuos sexuales y apomícticos.

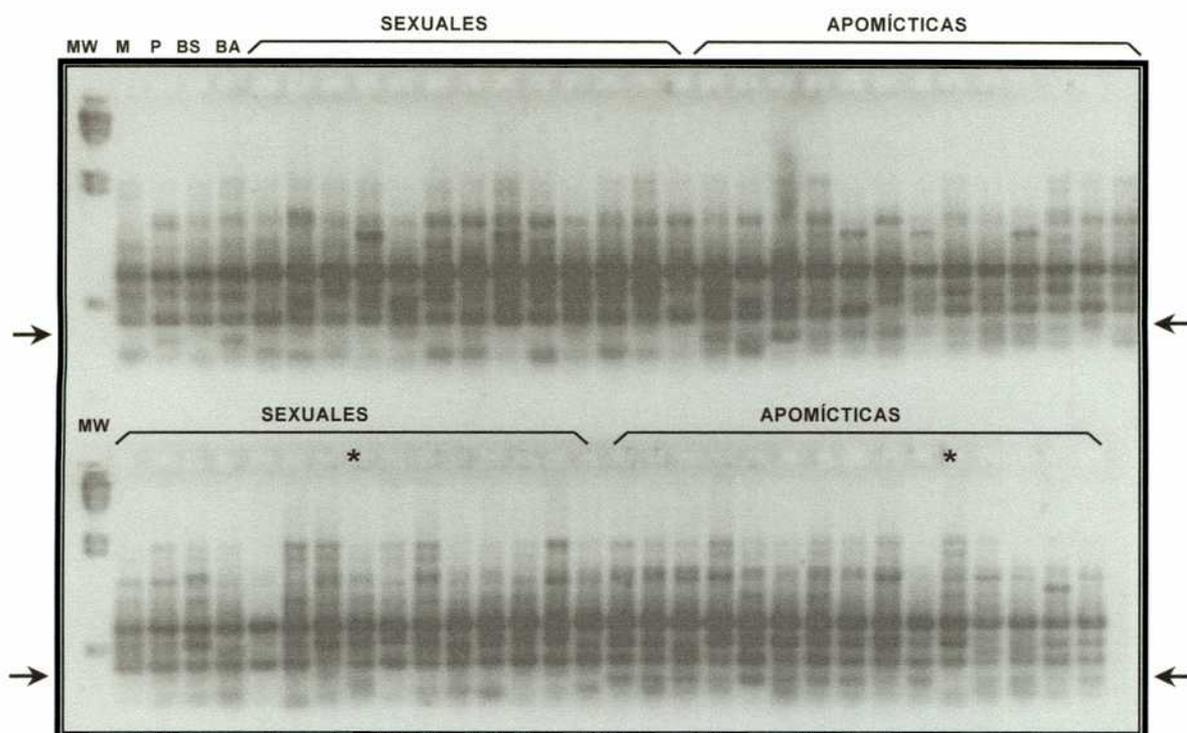


Figura 12. Análisis de ligamiento del marcador UBC243 con el sistema de reproducción en *Paspalum notatum*, mediante amplificación por PCR y electroforesis en gel de agarosa al 2 % teñido con bromuro de etidio. Las flechas indican la posición del fragmento que cosegrega con la reproducción apomíctica. MW = marcador de peso molecular Lambda *Hind*III (Promega); M = progenitor femenino; P = progenitor masculino; BS = grupo sexual; BA = grupo apomíctico; (\*) = falsos recombinantes (ver Resultados).

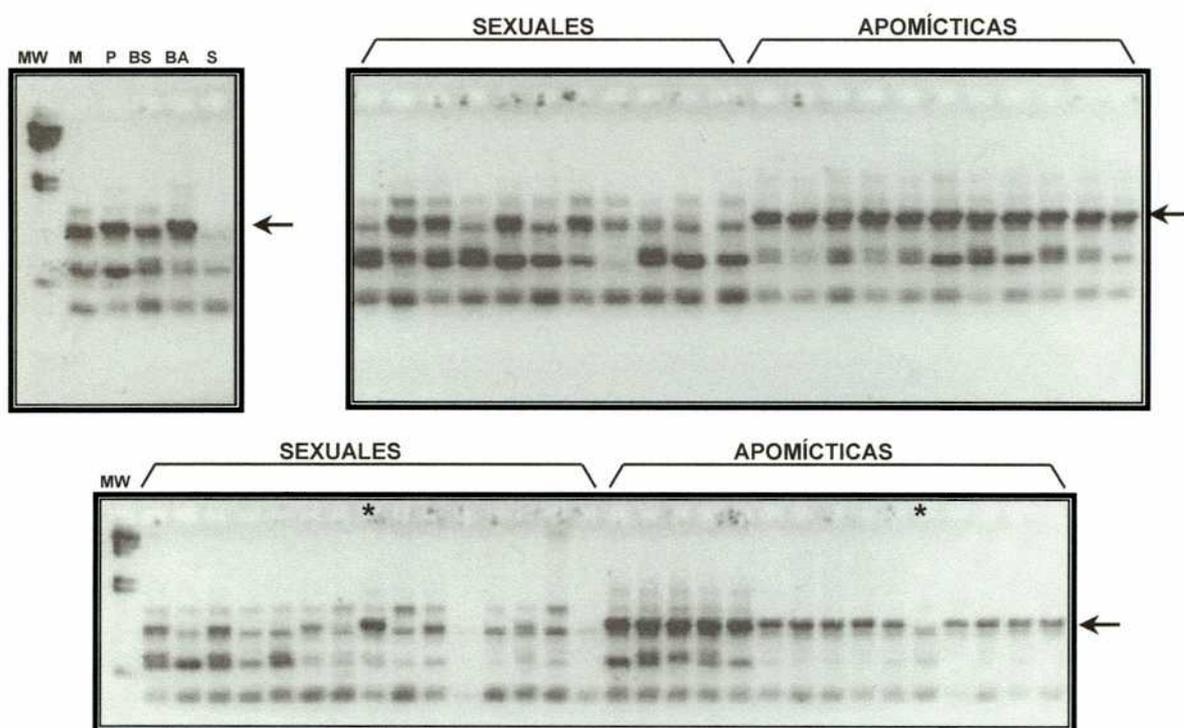


Figura 11. Análisis de ligamiento del marcador UBC259 con el sistema de reproducción en *Paspalum notatum*, mediante amplificación por PCR y electroforesis en gel de agarosa al 2 % teñido con bromuro de etidio. Las flechas indican la posición del fragmento que cosegrega con la reproducción apomíctica. MW = marcador de peso molecular Lambda *Hind*III (Promega); M = progenitor femenino; P = progenitor masculino; BS = grupo sexual; BA = grupo apomíctico; (\*) = falsos recombinantes (ver Resultados).

Los asteriscos (\*) sobre el gel inferior de las figuras 12 y 13 simbolizan a dos plantas (las mismas para ambos marcadores) recombinantes, una sexual con presencia de la banda que cosegrega con la reproducción apomíctica y una planta apomíctica que no posee dicha banda. Sin embargo, un nuevo análisis del sistema reproductivo de ambas plantas determinó que hubo un error en la clasificación. La planta clasificada originalmente como sexual, es en verdad de reproducción apomíctica, ya que en todos los óvulos reexaminados se observó la presencia de varios sacos embrionarios apospóricos; mientras que la planta que fue incluida dentro de las apomícticas, posee únicamente sacos embrionarios de origen meiótico y por lo tanto es de reproducción sexual. Esto demostró que los dos marcadores diferenciales cosegregaban con la totalidad de las plantas apomícticas obtenidas en nuestra población F<sub>1</sub> (56 plantas) y por otro lado estaban ausentes en las 119 plantas sexuales ensayadas.

El fragmento UBC243 posee un peso molecular de 377 pb; mientras que UBC259 es de aproximadamente 1157 pb. El fragmento UBC259 ligado a la apomixis es de un tamaño levemente mayor a otro fragmento que es común para todas las plantas (sexuales y apomícticas) (Figura 13). Por ello, para poder diferenciar ambos fragmentos hubo que separarlos electroforéticamente en geles de agarosa al 2,5 %. A pesar de ello fue imposible poder aislar únicamente dicho fragmento para poder transformarlo en una sonda de RFLP y a su vez para secuenciarlo y desarrollar marcadores específicos tipo SCAR.

### 6.2.2. Análisis de AFLPs

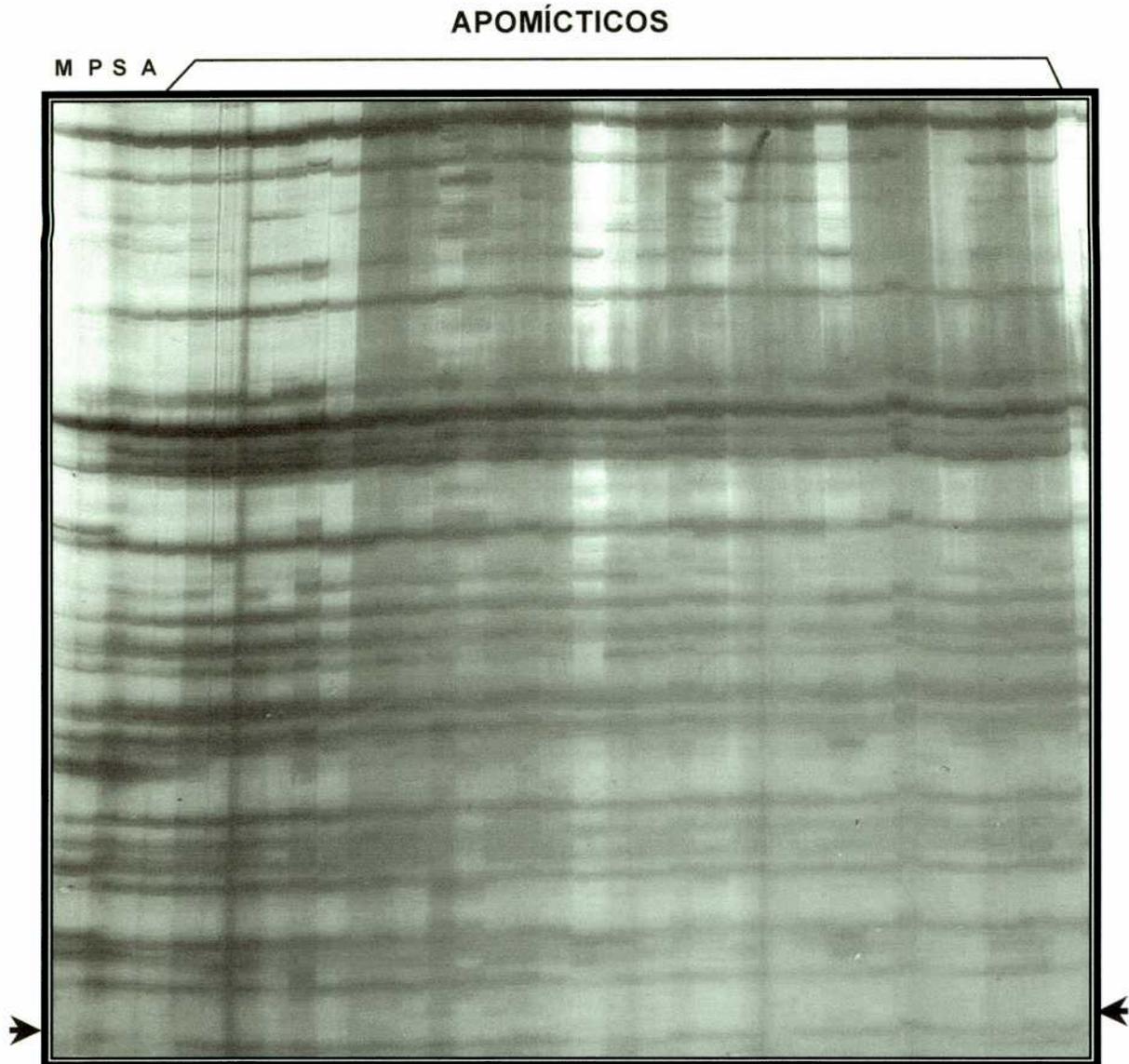
En total se evaluaron 10 combinaciones de iniciadores (primers) con tres nucleótidos selectivos(+3). Las respectivas combinaciones de primers *EcoRI* (E) y *MseI* (M) utilizadas fueron las siguientes:

<b>E36/M37</b>	<b>E38/M38</b>
<b>E36/M38</b>	<b>E38/M39</b>
<b>E36/M39</b>	<b>E38/M40</b>
<b>E36/M40</b>	<b>E39/M31</b>
<b>E38/M31</b>	<b>E39/M37</b>

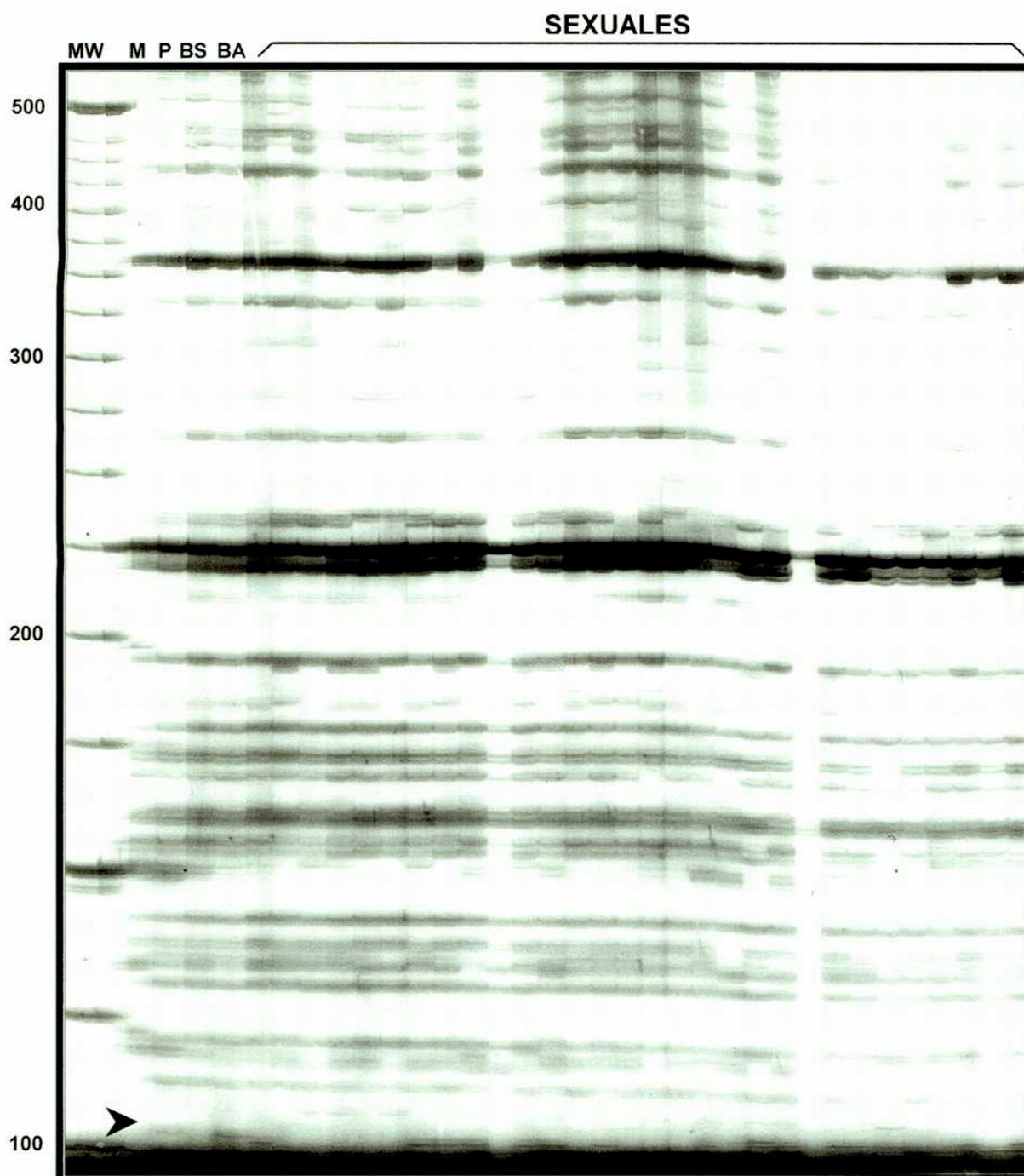
Las 10 combinaciones de "primers" produjeron productos de amplificación en un número variable de bandas entre 50 y 100. En total se evaluaron 690 loci, es decir, un promedio de 69 loci/combinación. Los padres resultaron ser polimórficos para todas las combinaciones ensayadas, con un promedio de 6,5 loci diferenciales por primers. Por su parte, se encontraron 12 loci polimórficos entre BS y BA que también lo eran entre los respectivos padres (1,2 loci/combinación). De los loci diferenciales entre los padres, BS y BA, solo dos fueron encontrados relacionados con la reproducción apomíctica. Los restantes segregaban en la población en un rango cercano a 1:1. Los dos marcadores diferenciales fueron detectados, en forma separada, con dos combinaciones de "primers", uno con *E36/M37* y el otro con *E36/M38*. En ambos casos se trató de fragmentos presentes en el padre apomíctico Q4117 y BA y ausentes en la madre sexual F131 y BS. El análisis de la segregación de los mismos con 100 individuos de la población (50 sexuales y 50 apomícticos) determinó que se

trataba de dos marcadores completamente ligados a la apomixis, ya que no se observó ningún recombinante entre los individuos ensayados. En la Figura 14 se observa la cosegregación del fragmento *E36/M38* con algunos de los individuos apomícticos; mientras que en la Figura 15 se puede apreciar la ausencia del mismo en los individuos sexuales. En ambos geles se sembraron en las primeras cuatro calles los padres y los BS y BA. Se trata de un fragmento muy pequeño de aproximadamente 104 pb

El marcador *E36/M37* posee un peso molecular de aproximadamente 173 pb.



**Figura 14.** Análisis de segregación de un marcador de AFLP (E36/M38) ligado a la reproducción apomíctica en *P. notatum*, mediante amplificación por PCR del ADN genómico digerido con dos enzimas de restricción (*EcoRI* y *MseI*) y electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% teñido con nitrato de plata. La flecha indica la posición de la banda presente en el padre apomíctico (P), grupo apomíctico (BA) y en todos los individuos apomícticos. M = madre sexual; BS = grupo sexual; MW = marcador de peso molecular 25pb (Gibco)



**Figura 15.** Análisis de segregación de un marcador de AFLP (E36/M38) ligado a la reproducción apomíctica en *P. notatum*, mediante amplificación por PCR del ADN genómico digerido con dos enzimas de restricción (*EcoRI* y *MseI*) y electroforésis en gel de poliacrilamida al 6% teñido con nitrato de plata. La flecha indica la posición de la banda presente en el padre apomíctico (P) y grupo apomíctico (BA) y ausente en la madre sexual (M) grupo sexual (BS) y en todas las plantas sexuales. MW = marcador de peso molecular 25pb (Gibco)

**6.2.3. Análisis de RFLPs**

En total se ensayaron 73 sondas, de los cuales 37 son de maíz (34 de la serie UMC y 3 de BNL), 26 ADNc de arroz (RZ), uno ADNc de cebada (BCD) y otro de avena (CDO), pertenecientes a la serie de sondas anclas (anchor probes) de la Universidad de Cornell (USA) y 8 clones de arroz (6 ADNc derivados de callos y 2 de raíz) de la serie "New Landmarker Set" del Programa de Investigación Genómica en Arroz (RGP) Japón (Nagamura *et al.* 1997). Por otra parte, un fragmento de PCR relacionado con la apomixis en *P. notatum*, fue aislado, clonado y utilizado como sonda. Se trata del fragmento de RAPD UBC243 el cual fue encontrado totalmente ligado a la reproducción apomíctica en esta población (ver 6.2.1).

La lista de los clones utilizados en el análisis de los RFLPs es la siguiente:

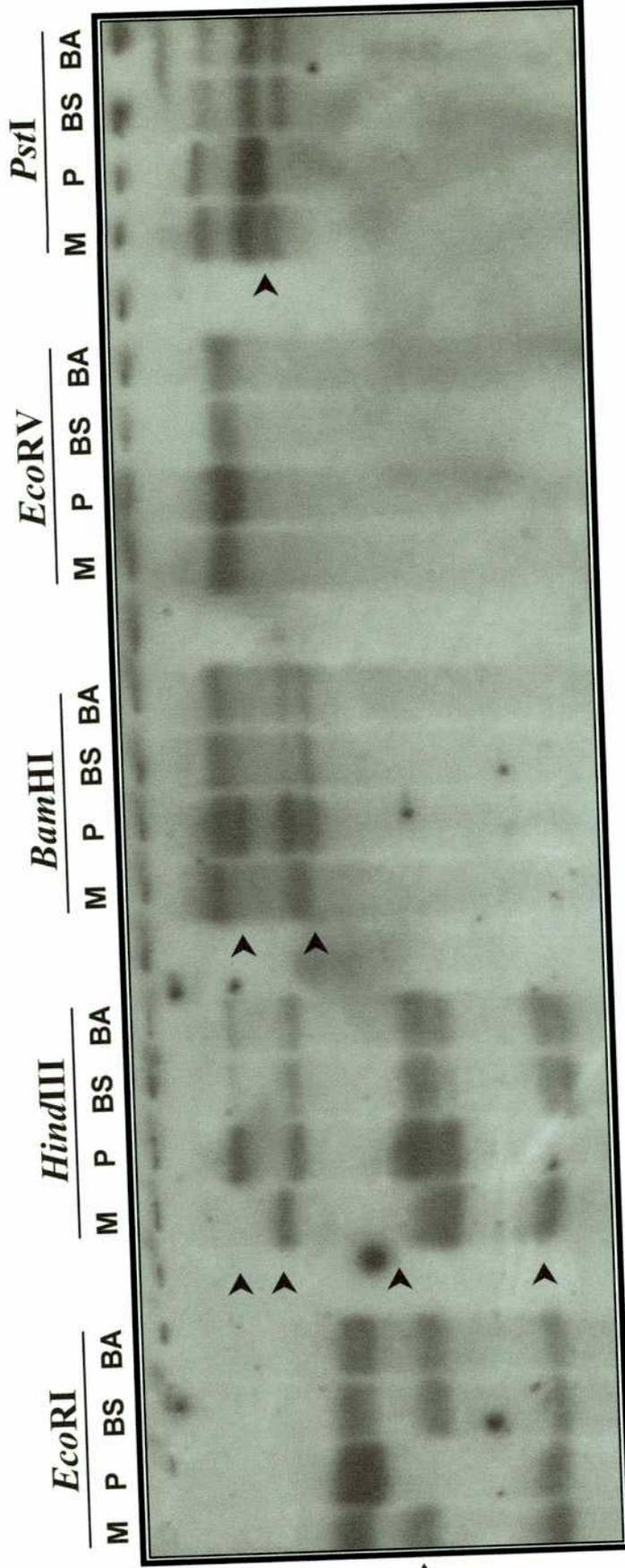
**Tabla 9.** Sondas utilizadas en la identificación de marcadores moleculares ligados a la apomixis en *P. notatum*. Clones de maíz (UMC, BNL), arroz (RZ) y "New Lanmarker Set" (Nagamura *et al.* 1997), cebada (BCD) y avena (CDO).

Chr. Maíz	UMC	BNL	Chr. Arroz	Clones de Cornell			New Lanmarker Set
				RZ	BCD	CDO	
1	67-76-128-107		1	413-543			
2	6-49-131		2	166-273-446			
3	32-102-63	5.37	3	574-630			
4	31-52-156		4	69-590	135		
5	72-90-147-372 374-382		5	244-455			
6	21-38-59-132		6	242-516			
7	168-245-254	7.08-9.11	7	753-395			
8	103-124		8	143-323			
9	95-109-113		9	206-596			
10	44-64-130		10	400-421			
			11	525-537		127	
			12	261-670-816			C901-R1684 C1069-R1709 C449-C443 C1336-C732

Las sondas del cromosoma 5 de maíz fueron ensayadas en particular debido a que las mismas fueron encontradas asociados a la apomixis en *Brachiana*, un género de gramínea apospórica perteneciente a la misma tribu que *Paspalum* (Pessino *et al.* 1997). Por su parte, las sondas C901 y C1069 del cromosoma 12 de arroz fueron encontradas ligadas a la apomixis en *P. simplex* (Pupilli, comunicación personal). Las restantes sondas fueron seleccionadas al azar y se encuentran distribuidas en todos los grupos de ligamiento de maíz y arroz

Del total de sondas ensayadas, 14 no hibridaron con el ADN de los padres F131 y Q4117 y de los grupos BS y BA, con ninguna de las cinco enzimas con las cuales fueron digeridos los ADNs (*EcoRI*, *HindIII*, *BamHI*, *EcoRV* y *PstI*). Las sondas restantes sí lo hicieron con todas las enzimas ensayadas, produciendo un número variable de bandas con cada combinación sonda/enzima. Los padres F131 y Q4117 mostraron un alto grado de polimorfismo para la mayoría de los loci evaluados (Figura 16). Sin embargo, del total de loci polimórficos observados, solamente dos fueron encontrados diferenciales entre los respectivos grupos de ADN mezcla (BS y BA). Ambos fragmentos fueron identificados con la sonda de arroz C1069 y los ADNs digeridos con las enzimas *EcoRI* y *HindIII*.

V. RESULTADOS



**Figura 16.** Luminografía mostrando el patrón de hibridación de la sonda de arroz RZ166 con el ADN de los progenitores (M y P) y grupos de reproducción (BS y BA) de *P. notatum*, digeridos con 5 enzimas de restricción. Las flechas indican las bandas polimórficas entre los respectivos progenitores pero monomórficas entre los dos grupos. M = progenitor sexual; P = progenitor apomictico; BS = grupo sexual; BA = grupo apomictico.

En la tabla 10 se encuentra la lista del resultado obtenido con cada una de las sondas utilizadas con los BS y BA.

**Tabla 10.** Resultados de las hibridaciones de las sondas de maíz, arroz, cebada (BCD) y avena (CDO), utilizadas con el ADN de los grupos sexual (BS) y apomítico (BA), digeridos con cinco enzimas de restricción, en la identificación de polimorfismos relacionados con el sistema de reproducción en *P. notatum*.

Clon de maíz	Cromosoma	Resultado	Clon de arroz	Cromosoma	Resultado
UMC 6	2	Monomórfico	RZ 69	4	Monomórfico
UMC 21	6	Monomórfico	RZ 143	8	Monomórfico
UMC 31	4	No hibridó	RZ 166	2	Monomórfico
UMC 32	3	Monomórfico	RZ 206	9	Monomórfico
UMC 38	6	No hibridó	RZ 242	6	Monomórfico
UMC 44	10	No hibridó	RZ 244	5	Monomórfico
UMC 49	2	Monomórfico	RZ 261	12	Monomórfico
UMC 52	4	Monomórfico	RZ 273	2	Monomórfico
UMC 59	6	Monomórfico	RZ 323	8	Monomórfico
UMC 63	3	Monomórfico	RZ 395	7	Monomórfico
UMC 64	10	No hibridó	RZ 400	10	Monomórfico
UMC 67	1	Monomórfico	RZ 413	1	Monomórfico
UMC 72	5	Monomórfico	RZ 421	10	Monomórfico
UMC 76	1	Monomórfico	RZ 446	2	Monomórfico
UMC 90	5	Monomórfico	RZ 455	5	No hibridó
UMC 95	9	Monomórfico	RZ 516	6	Monomórfico
UMC 102	3	Monomórfico	RZ 525	11	Monomórfico
UMC 103	8	No hibridó	RZ 537	11	Monomórfico
UMC 107	1	Monomórfico	RZ 543	1	Monomórfico
UMC 109	9	Monomórfico	RZ 574	3	No hibridó
UMC 113	9	No hibridó	RZ 590	4	Monomórfico
UMC 124	8	No hibridó	RZ 596	9	Monomórfico
UMC 128	1	Monomórfico	RZ 630	3	Monomórfico
UMC 130	10	Monomórfico	RZ 670	12	Monomórfico
UMC 131	2	No hibridó	RZ 753	7	Monomórfico
UMC 132	6	Monomórfico	RZ 816	12	Monomórfico
UMC 147	5	Monomórfico	C443	12	Monomórfico
UMC 156	4	No hibridó	C449	12	No hibridó
UMC 168	7	Monomórfico	C732	12	Monomórfico
UMC 245	7	No hibridó	C901	12	Monomórfico
UMC 254	7	No hibridó	C1069	12	<b>Polimórfico</b>
UMC 372	5	Monomórfico	C1336	12	Monomórfico
UMC 374	5	Monomórfico	R1684	12	Monomórfico
UMC 382	5	Monomórfico	R1709	12	Monomórfico
BNL 5.37	3	Monomórfico	BCD 135	4	Monomórfico
BNL 7.08	7	Monomórfico	CDO 127	11	Monomórfico
BNL 9.11	7	Monomórfico			

El análisis de segregación para determinar el ligamiento de los dos fragmentos diferenciales obtenidos con la sonda C1069 fue llevada a cabo sobre 132 individuos de la población  $F_1$  segregante (56 apomícticos y 76 sexuales). La sonda C1069 digerida tanto con *EcoRI* y *HindIII* reveló dos fragmentos en ambos casos. Los ADNs digeridos con *EcoRI* revelaron un fragmento de menor peso molecular presente en todos los individuos analizados (sexuales y apomícticos) y otro mayor, presente únicamente en los individuos apomícticos, el cual se correspondía con el mismo fragmento del padre apomíctico y el grupo BA (Figura 17). Por su parte, la hibridación de la sonda C1069 con los ADNs de todos los individuos digeridos con la enzima *HindIII* también reveló dos fragmentos, el de mayor tamaño, presente en todos los individuos y el otro, solamente cosegrega con los individuos apomícticos (Figura 18). No se detectó ningún recombinante en los 132 individuos ensayados. Si bien en un principio se habían detectado 4 posibles recombinantes (1 apomíctico y 3 sexuales) estos fueron descartados, debido a que se realizó un re-análisis posterior para determinar si hubo errores en el muestreo o las plantas estaban mal clasificadas. La observación de nuevamente 60 ovarios en anthesis para determinar el sistema reproductivo de tales plantas supuestamente recombinantes despejó nuestra sospecha. La planta utilizada primeramente en el análisis como apomíctica en verdad no lo era, debido a que únicamente presentaba sacos embrionarios de tipo meiótico y por lo tanto es de reproducción sexual (por eso la ausencia de la banda). Por su parte, las tres plantas sexuales recombinantes tampoco lo eran, porque

presentaban un alto grado de expresión de sacos embrionarios de origen apospórico (por eso la presencia de la banda). Por lo tanto, una vez reclasificadas nuevamente dichas plantas, encontramos que los dos fragmentos co-segregaban con la totalidad de los individuos apomícticos (56) y estaba ausente en todos los sexuales (76). Esto demostró que los dos fragmentos de C1069 están ligados 100% en fase de acoplamiento con el locus para la apomixis y que segregan distorsionados de un rango de 1:1 para un fragmento de restricción de dosis simple (SDRFs). El fragmento C1069 *Hind*III posee un peso molecular aproximado de 6230 pb, mientras que C1069 *Eco*RI es de 4900 pb.

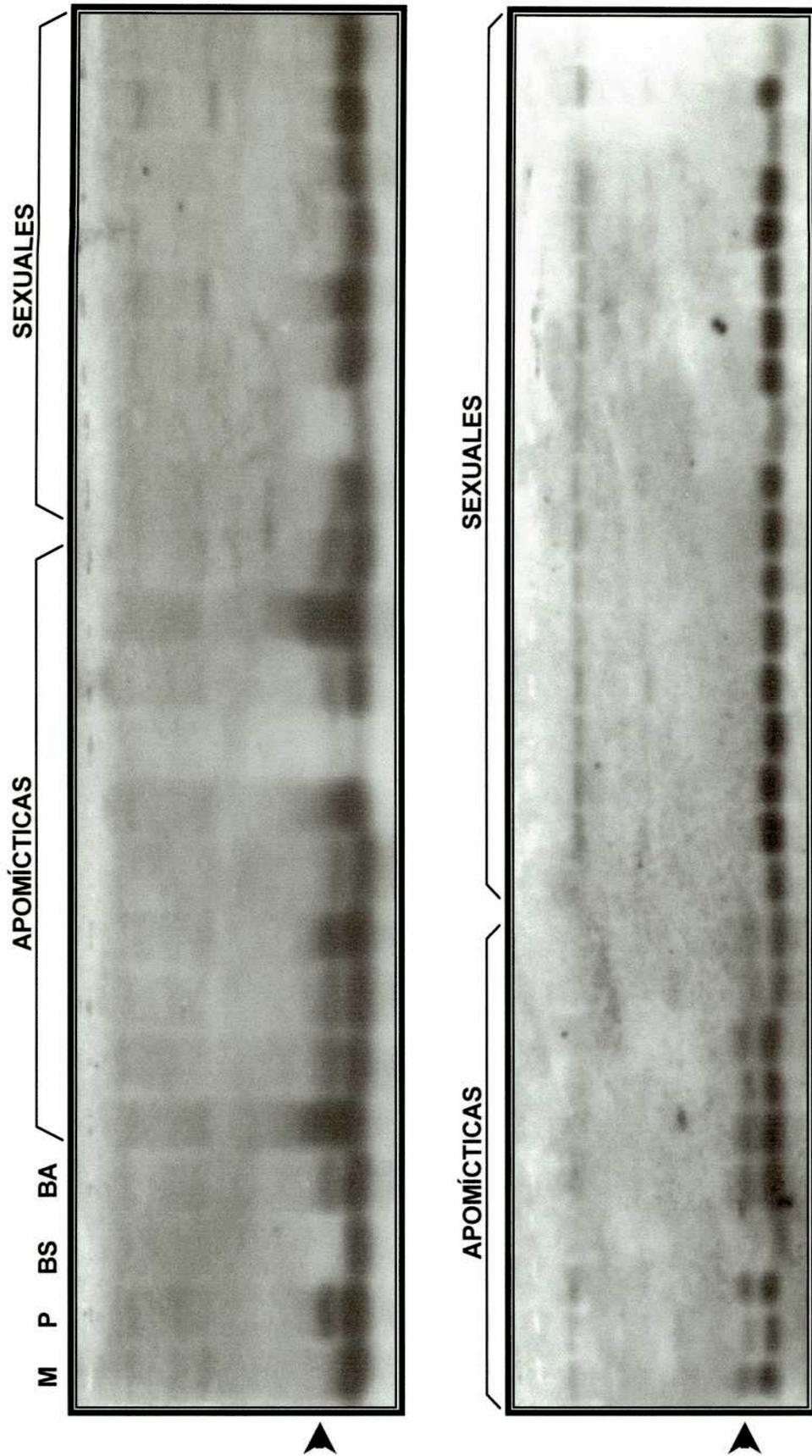


Figura 17. Luminografía de detección de la segregación de la sonda C1069 marcada con digoxigenina en una población segregante para apomixis en *P. notatum*. El ADN de todos los individuos fue digerido con la enzima *EcoRI*. Las flechas indican el fragmento de restricción de dosis simple (SDRF) co-segregando con el sistema de reproducción del progenitor apomictico (P), grupo apomictico (BA) y todas las plantas  $F_1$  apomicticas. M = progenitor sexual; BS = grupo sexual.

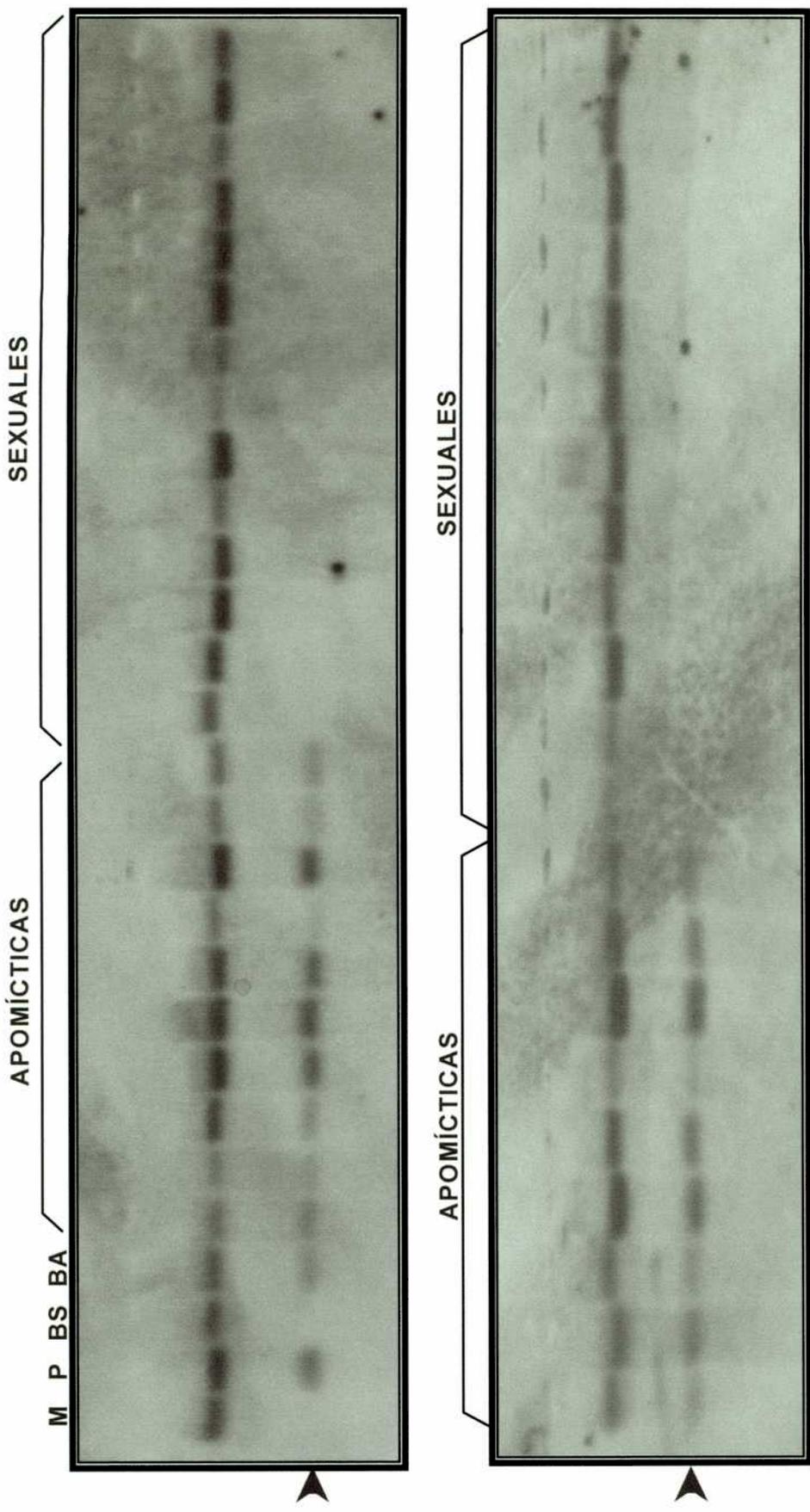


Figura 18. Luminografía mostrando la segregación de un fragmento ligado a la apomixis, obtenido mediante hibridación con la sonda C1069 marcada con digoxigenina en una población segregante para apomixis de *P. notatum*. El ADN de todos los individuos fue digerido con la enzima *Hind*III. Las flechas indican el fragmento de restricción de dosis simple (SDRF) co-segregando con el progenitor apomictico (P), grupo apomictico (BA) y todas las plantas F<sub>1</sub> apomicticas. M = progenitor sexual; BS = grupo sexual.

Para tratar de encontrar otras sondas relacionadas con la apomixis, se recurrió al mapa del cromosoma 12 de arroz para seleccionar aquellas que mapean junto a C1069. Para ello se seleccionaron 7 sondas, R1709, R1684, C901, C449, C443, C1336 y C732, las que cubren un área total de 104.9 cM (Horushima 1998). Las sondas C1709 y C901 mapean en el extremo distal del brazo largo del cromosoma 12 de arroz a 5,9 y 12,2 cM de C1069 respectivamente; mientras que R1684, C449, C443, C1336 y C732 mapean a 9,3, 24,3; 45,8; 71,3 y 89,4 cM de C1069 respectivamente y hacia el extremo proximal del centrómero. Las sondas C1709 y C901 fueron monomórficas para las 5 enzimas ensayadas, tanto para los padres F131 y Q4117 como para BS y BA. Ambas sondas revelaron un fragmento con *EcoRI*, *HindIII*, *BamHI*, *EcoRV* y dos con *PstI*, todos presentes en las cuatro muestras. Las sondas R1684 y C449 no hibridaron con el ADN de las cuatro muestras con ninguna de las enzimas ensayadas, con lo cual resultaron ser no homólogas. C443 fue homóloga y reveló un fragmento con *EcoRI* y dos con las restantes cuatro enzimas. Todos resultaron ser monomórficos entre los padres y los grupos. La sonda C1336 reveló un fragmento con *EcoRI*, dos con *HindIII* y *BamHI*, tres con *EcoRV* y cuatro con *PstI*, todos monomórficos entre las muestras. Por su parte, la sonda C732 reveló tres fragmentos con *EcoRI*, *HindIII* y *PstI*, y dos con *BamHI* y *EcoRV*, también todos monomórficos entre las cuatro muestras.

#### 6.2.4. Transformación de marcadores de PCR en marcadores codominantes (RFLP) y específicos (SCAR)

El fragmento de RAPD (UBC243) 100% ligado a la apomixis en este estudio, fue aislado, clonado, y utilizado como sonda para poder determinar las posibles variantes alélicas del mismo. El resultado de la hibridación con el ADN de los padres y los grupos BS y BA mostró un patrón de "chorreado" continuo sin poder identificar claramente bandas específicas. Si bien se repitió la hibridación en más de una oportunidad, en ningún caso se pudo visualizar bandas que pudieran ser evaluadas. Esto estaría indicando que se podría tratar de un fragmento de ADN repetitivo y no de copia simple.

El fragmento UBC243 fue secuenciado y a partir de ello se diseñaron pares de "primers" específicos de tipo SCARs. La evaluación de dos pares de "primers" arrojó resultados negativos, sin poder observar la amplificación de ninguna banda, en todas las variantes de temperatura de anillado ("annealing") utilizadas.

La secuencia del fragmento UBC243 es la siguiente:

```
5'...1-GAATTCGATTGGGTGAACCGCGTTAAATCGCCGTGTCTCCTCAAGAGTTT-50
51-GTATCCCCCTACCCTTCTCTTTACTCACCACATTTACATTTCTGCATT100
101-TACTTTCTTGTCCTTTAGCTTTTCTAGTTAATTTGATTAGGTTTGGCT-150
151-CTAGGTTGCAAGTCTTTTGGGTAAGTTAGAGAGTGCATAGATAAACATTA-200
201-GAGTTAATTGGCATGTGTAGTATATAATAGGTTTATCTTATGCATTAGAT-250
251-AGCCCTAGGTTTTAGAAGAGCGAATTAGCGACCCAATTCACCCCATCCTC-300
301-CTCTTGGGTCGGATACTCCGACACGGTCCTTACACCACCCTCCTCCTAGA-350
351-CCGGTTCACCCAATCACTAGTGAATTC-377 ...3'
```

Por su parte, la secuencia de los dos pares de iniciadores diseñados es la siguiente:

Par 1:

5' TTG GGT GAA CCG CGT TAA AT 3' (20-mero)

5' TGA TTG GGT GAA CCG GTC TAG G 3' (22-mero)

Par 2:

5' TGC ATT TAC TTT CTT GTG TC 3' (20-mero)

5' GTG AAC CGG TCT AGG AGG AG 3' (20-mero)

El otro fragmento (UBC259) encontrado completamente ligado a la apomixis en la población como así también los dos fragmentos de AFLP, no pudieron ser aún aislados para poder utilizarlos como sondas y evaluar su comportamiento.

## VII. DISCUSIÓN

## ÍNDICE

	<b>Página</b>
7.1. Genética de la aposporia en <i>Paspalum notatum</i> .....	139
7.1.1. Análisis de las progenies F <sub>1</sub> , F <sub>2</sub> s y retrocruzas.....	139
7.1.2. Modelos genéticos de herencia de la apomixis.....	143
7.2. Marcadores moleculares ligados a la aposporia en <i>Paspalum notatum</i> .....	163
7.2.1. La elección del material y la metodología empleada.....	163
7.2.2. Análisis de RAPD.....	167
7.2.2. Análisis de AFLP.....	174
7.1.4 Análisis de RFLP.....	177

### 7.1. Genética de la aposporia en *Paspalum notatum*

#### 7.1.1. Análisis de las progenies F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>s y retrocruzas

En un análisis general de los resultados obtenidos a partir de las diferentes progenies, se observó lo siguiente:

- 1) En la progenie obtenida a partir de autofecundación del progenitor femenino F131 sexual y en las progenies de varias F<sub>1</sub> sexuales autofecundadas, no se observó segregación para apomixis.
- 2) En todos los cruzamientos entre dos genotipos sexuales F<sub>1</sub> (S) X F<sub>1</sub> (S) y retrocruzas de F<sub>1</sub> (S) X progenitor sexual tampoco hubo segregación para apomixis.
- 3) En todos los cruzamientos entre genotipos sexuales (S) X apomícticos (A) [progenitores S x A; F<sub>1</sub> (S) X F<sub>1</sub> (A) y retrocruzas] se observó segregación para el sistema de reproducción.
- 4) En todas las progenies segregantes se observó una mayor proporción de plantas sexuales que apomícticas.
- 5) En todas las progenies segregantes para apomixis siempre se obtuvieron proporciones similares entre sí, variando entre 2,8(S):1(A) a 3,2(S):1(A)

Si analizamos en forma detalla las generalidades enunciadas precedentemente podemos concluir lo siguiente: La madre al no segregar para apomixis, tanto en autofecundación como en retrocruzas por genotipos sexuales, se comportaría como homocigota para dicho locus. Lo mismo puede deducirse del hecho que

todas las plantas sexuales ( $F_1$ ) al autofecundarse o cruzarse entre sí, no segregan para apomixis. Ahora bien, queda determinar si la madre y todas las plantas sexuales son homocigotas dominantes o recesivas. A juzgar por el hecho de que siempre se obtuvo segregación en los cruzamientos donde intervino la madre u otra planta sexual con algún genotipo apomíctico, se descarta la posibilidad de homocigosis dominante. Con lo cual, la constitución genotípica para dicho locus debería ser *aaaa*, siempre y cuando dicho carácter se encuentre regulado por un solo gen y que ambas formas alternativas de reproducción sean alelos de ese mismo gen. En la mayoría de las especies apospóricas donde recientemente se estudió la herencia de la apomixis, después del análisis de un número importante de progenies, se determinó que el control genético es monogénico siendo la apomixis dominante (Savidan, 1982a, 1983; Valle *et. al.* 1994; Valle y Savidan 1996; Sherwood *et. al.* 1994).

La segregación para apomixis en todos los cruzamientos entre genotipos sexuales y apomícticos demuestra que tanto el progenitor apomíctico como todas las plantas apomícticas obtenidas son heterocigotas para este carácter. El hecho que en todos los cruzamientos entre sexuales X apomícticos se obtuviese proporciones fenotípicas muy similares entre sí, demuestra que al menos los dos genotipos apomícticos empleados en todos los cruzamientos (Q4117 y  $F_1$ 168) además de ser heterocigotas para el carácter, tienen la misma constitución genotípica. En la  $F_1$  ( $F_1$ 131 x Q4117) se obtuvo una proporción fenotípica de 2,8:1 entre sexuales y apomícticos; en  $F_2$  ( $F_1$  sexual X  $F_1$  apomíctico) fue de 3,1:1 y en retrocruzadas por

el padre ( $F_1$  sexual X Q4117) y por la madre (F131 X  $F_1$ 168 apomíctico) fue de 3,2:1. Esta pequeña oscilación puede deberse al número de individuos analizados en cada una de las progenies. En la progenie  $F_1$  se analizaron 212 individuos, mientras que en la  $F_2$  solamente se estudiaron 29 plantas. En cambio, en las retrocruzas por el padre apomíctico se analizaron 95 plantas y 17 por la madre sexual (Tabla 5).

La obtención de una mayor proporción de plantas sexuales en progenies segregantes ya fue observada en un trabajo previo de *P. notatum* (Burton y Forbes 1960). En dicho trabajo se propuso que la apomixis estaría controlada 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 se realizó mediante pruebas de progenies basadas en observaciones visuales de características morfológicas, fenotípicas o de hábitat, sin estudios embriológicos. El problema de esta metodología, es que no permite diferenciar entre una planta sexual y otra apomíctica facultativa, porque ambas pueden generar descendientes segregantes, y por lo tanto ser consideradas como sexuales. Es por ello que si analizamos detenidamente los resultados obtenidos en dicho trabajo, nos encontramos que en prácticamente todas las progenies  $F_1$  (clasificadas a partir de la obtención de las  $F_2$ ) las plantas sexuales exceden con creces a las plantas apomícticas. Solamente en una progenie (PT-10 x MHB) se obtuvo una proporción de 3,8:1, muy similar a los valores obtenidos en este trabajo. Esta

desviación en las proporciones pudieron deberse simplemente a que Burton y Forbes (1960) consideraron como sexuales a muchas plantas que en verdad eran apomícticas facultativas con un nivel bajo de expresión del carácter. Por otro lado, observaron segregación en las progenies  $F_2$ s obtenidas a partir de individuos  $F_1$ s sexuales, lo cual pudo deberse a la utilización de algunos genotipos apomícticos facultativos para la obtención de las  $F_2$ s. Los autores aducen que no observó apomixis facultativa en su material, pero con pruebas de progenies basadas en observaciones visuales no pudieron diferenciar una planta sexual de una apomíctica con alta expresión de sexualidad.

Estas dudas respecto a la clasificación reproductiva de las progenies estudiadas por Burton y Forbes (1960) están actualmente fundamentadas en el análisis embriológico de una planta clasificada como sexual en aquel trabajo (Quarin *et al.* 1984). Los resultados arrojaron que un 70% de los óvulos maduros tenía un saco embrionario de origen meiótico, 15% tenía uno a varios sacos apospóricos, y el 15% restante poseía un saco meiótico normal rodeado por uno a varios sacos apospóricos en el mismo óvulo.

Si tenemos en cuenta el hecho que las diferencias existentes entre aquel trabajo y éste pudieron deberse simplemente a la metodología utilizada para la clasificación de las progenies y al número de individuos analizados, los resultados obtenidos en ambos casos pueden llegar a ser muy similares entre sí.

El aspecto en común más interesante en ambos trabajos fue el hecho de que en todos los cruzamientos entre genotipos sexuales x apomícticos de *P. notatum*,

siempre se obtuvo una mayor proporción de plantas sexuales. Estos resultados contrastan fuertemente con los obtenidos precedentemente en la mayoría de las plantas apomícticas estudiadas. En gramíneas apospóricas como *Panicum maximum* (Savidan 1982a, 1983), *Brachiaria* (Valle *et al.* 1994; Valle y Savidan 1996) y *Pennisetum* (Sherwood *et al.* 1994) como así también en *Ranunculus*, un género apospórico de la familia de las *Ranunculáceas* (Nogler 1984b), siempre se obtuvieron proporciones cercanas a 1:1 o 3:1 entre apomícticas y sexuales. Resultados similares se obtuvieron en *Tripsacum*, una gramínea diplospórica emparentada con el maíz (Leblanc *et al.* 1995; Grimanelli *et al.* 1998a) y en híbridos interespecíficos *Paspalum ionanthum* X *P. cromyorrhizon* (Martínez *et al.* 1999).

### 7.1.2. Modelos genéticos de herencia de la apomixis

Antes de poder analizar los diferentes modelos genéticos en los cuales podrían incluirse las proporciones fenotípicas observadas, debemos considerar los fundamentos teóricos de la herencia genética en los poliploides, y en particular la de los autotetraploides. Esto es de importancia crucial puesto que *P. notatum* tetraploide es de origen autoploide como lo demostraron Forbes y Burton (1961) con cruzamientos y análisis citológico de los híbridos.

En los autotetraploides, cinco genotipos pueden formarse para cada locus: **AAAA** (cuadriplejo); **AAAa** (triplexo); **AAaa** (duplexo); **Aaaa** (simplejo) y **aaaa** (nuplexo). Estas constituciones genotípicas se originan por la combinación de tres tipos diferentes de gametas, **AA**, **Aa** y **aa**, cuyas frecuencias relativas para un

genotipo dado, dependen de los eventos citológicos de la meiosis (Allard 1960). Por otra parte, el cálculo de las segregaciones gaméticas esperadas en herencia tetrasómica, depende de cómo se distribuyen las 8 cromátidas a cada una de las cuatro células de la tétrade formada por cada microsporocito. Existen dos tipos de segregaciones gaméticas, las cuales son consideradas extremos, pudiendo existir casos intermedios entre ambos. En la denominada *distribución al azar de los cromosomas* (Allard 1960) o también denominada *segregación cromosómica* (Lacadena 1988), se tiene en cuenta que nunca se forman cuadrivalentes y que el locus en cuestión se encuentra lo suficientemente cerca del centrómero de tal manera que nunca se produce recombinación entre ambos. Las cromátidas hermanas, portando el mismo alelo, están siempre unidas por el mismo centrómero, de tal manera que en la primera anafase van juntas al mismo polo y siempre se separan en la segunda anafase. Por lo tanto, si tenemos un genotipo  $Aaaa$ , los dos alelos dominantes nunca podrán aparecer en la misma gameta. El mismo comportamiento es para los tres alelos recesivos. De esta manera la frecuencia gamética para el genotipo simplexo es de  $1Aa:1aa$ ; para el duplexo  $1AA:4Aa:1aa$  y para el triplexo  $1AA:1Aa$ ; mientras que los genotipos nuliplexo y cuadriplexo producirían un solo tipo de gametas,  $aa$  y  $AA$  respectivamente. Los rangos genotípicos esperados dependerán de las combinaciones gaméticas que se den.

En la denominada *distribución al azar de las cromátidas* o *segregación cromatídica* se considera que siempre se forman cuadrivalentes y que el locus en cuestión se encuentra lo suficientemente alejado del centrómero, de tal manera

que se produce recombinación entre ambos, con lo cual cromátidas hermanas, portando el mismo alelo, terminan adheridas a diferentes centrómeros y por ello pueden ser incluidas dentro de la misma gameta o no, dependiendo de la distribución de las cromátidas en las dos anafases meióticas. Si tenemos en cuenta que la formación de cuadrivalentes es completa y se produce el 50 % de recombinación entre el locus y el centrómero, la distribución de las cromátidas a las gametas será al azar. Por lo tanto, la segregación gamética de un individuo simplexo ( $Aaaa$ ) será de  $1AA:12Aa:15aa$ , de un duplexo  $3AA:8Aa:3aa$  y de un triplexo  $15AA:12Aa:1aa$ . Nuevamente los nuliplexos y cuadriplexos producirán un solo tipo de gameta  $aa$  y  $AA$  respectivamente. Al igual que en la segregación cromosómica, el rango genotípico esperado dependerá de las combinaciones gaméticas.

En la Tabla 11 se resume las segregaciones fenotípicas esperadas para un autotetraploide de acuerdo al tipo de segregación gamética y para los diferentes cruzamientos. Se considera que existe dominancia y que el fenotipo dominante es el mismo cualquiera sea el número de alelos presente.

**Tabla 11.** Segregaciones fenotípicas esperadas para diferentes cruzamientos de un autotetraploide, considerando los dos tipos extremos de segregación gaméticas (Lacadena 1988).

CRUZAMIENTO	SEGREGACIÓN FENOTÍPICA			
	Segregación cromosómica		Segregación cromatídica	
	A	a	A	a
AAAA x AAAA	1		1	
AAAA x AAAa	1		1	
AAAA x AAaa	1		1	
AAAA x Aaaa	1		1	
AAAA x aaaa	1		1	
AAAa x AAAa	1		783	1
AAAa x AAaa	1		389	3
AAAa x Aaaa	1		769	15
AAAa x aaaa	1		27	1
AAaa x AAaa	35	1	187	9
AAaa x Aaaa	11	1	347	45
AAaa x aaaa	5	1	11	3
Aaaa x Aaaa	3	1	559	225
Aaaa x aaaa	1	1	13	15
aaaa x aaaa	-	1	-	1

A partir de las evidencias citogenéticas que demostraron que los tetraploides de *P. notatum* forman un número elevado de cuadrivalentes en la meiosis y que, por lo tanto, la autoploidía sería su origen (Forbes y Burton 1961; Quarin *et al.* 1984), en este trabajo decidimos considerar durante la evaluación, aquellos mode-

los de herencia tetrasómica y segregación gamética de tipo cromatídica (Tabla 12).

**Modelo 1: Sexualidad dominante:** El primer modelo asume que la sexualidad es dominante sobre la apomixis, y por lo tanto existen cuatro posibilidades genotípicas para las plantas sexuales (SSSS, SSSs, SSss y Ssss) y una para las apomícticas (ssss) (para una mejor comprensión se utiliza la letra mayúscula **S** en lugar de **A** para indicar la dominancia de la sexualidad sobre la apomixis). La madre no podría tener el genotipo cuadriplejo (SSSS) debido a que no se obtendría segregación para apomixis en la progenie  $F_1$ . De las otras tres posibilidades genotípicas, solamente el genotipo duplexo (SSss) produciría una proporción fenotípica esperada de 11:3 entre sexuales y apomícticos ( $\chi^2 = 3,0$ ,  $P = 0,09$ ), la cual no difiere significativamente de la proporción fenotípica observada de 2,8(S):1(A) en la  $F_1$ . Sin embargo, este modelo no se ajustaría a los resultados observados en las proporciones fenotípicas de las progenies de la madre autofecundada 1(S):0(A) y de las  $F_2$ s sexuales autofecundadas y cruzadas entre sí 1(S):0(A) (Tabla 5). Para que dicho modelo sea aceptado como válido, las plantas sexuales portadoras de alguno de los tres genotipos heterocigotas (SSSs, SSss y Ssss) deberían segregar para apomixis, tanto en autofecundación como en cruzamientos entre sí mismas. Esto nunca fue observado en ninguno de los 239 individuos  $F_2$  obtenidos a partir de autofecundaciones de cuatro genotipos  $F_1$  diferente, y de los 77 individuos  $F_2$  obtenidos por cruzamientos entre dos genotipos sexuales (Tabla 5). Por otra par-

te, en la retrocruza de la madre F<sub>131</sub> con un genotipo F<sub>1</sub> sexual, tampoco se observó segregación para apomixis, por lo cual este modelo fue rechazado.

Burton y Forbes (1960) propusieron este modelo para explicar sus resultados en *P. notatum*. Consideraron que las plantas sexuales utilizadas como madre en sus cruzamientos eran de genotipo duplexo (AAaa) y los progenitores masculinos apomícticos nuliplexos (aaaa) (si bien la simbología difiere a la utilizada en este trabajo, el análisis es el mismo). Mediante la aplicación de la prueba de progenie en F<sub>2</sub>, obtuvieron las proporciones fenotípicas en F<sub>1</sub>. Los rangos observados fueron variables, de acuerdo a los genotipos involucrados, entre 3.8:1 y 25:1 entre sexuales y apomícticas. Estas proporciones se alejan de las esperables de 5:1 para un cruzamiento de tipo AAaa X aaaa con segregación gamética de tipo cromosómica y más aún si consideramos una segregación de tipo cromatídica donde las proporciones esperables serían de 11:3. Por su parte, Burton y Forbes (1960) encontraron que las progenies F<sub>3s</sub>, obtenidas de plantas F<sub>2s</sub> sexuales, las cuales fueron clasificadas mediante análisis de progenie de 5 plantas, segregaban para apomixis en un rango variable de acuerdo al genotipo de entre 30.4:1 a 228:1 (S:A). Estas proporciones deberían concordar con la segregación 35:1, esperable para un genotipo AAaa autofecundado con segregación cromosómica. Sin embargo, debido a que las proporciones observadas en F<sub>1</sub> y F<sub>2</sub> se desviaron de las esperadas para un modelo monogénico, con herencia tetrasómica y apomixis recesiva, los autores consideraron que esas desviaciones se debieron a factores modifica-

dores que actuaban sobre ese material y por lo tanto sugirieron que la apomixis estaría controlada por unos pocos genes recesivos.

**Modelo 2: Apomixis dominante:** El segundo modelo evaluado considera que la apomixis es dominante sobre la sexualidad a partir de simple dosis. Este modelo fue propuesto para la mayoría de las especies de plantas apomícticas, apospóricas y diplospóricas, estudiadas recientemente ((Savidan, 1982, 1983; Nogler 1984b; Valle *et al.* 1994; Sherwood *et al.* 1994; Leblanc *et al.* 1995; Grimaneli *et al.* 1998a).

Las proporciones esperables para las cuatro combinaciones posibles difieren significativamente de los rangos observados ( $P = <0.001$ ) en las diferentes progeñies analizadas a partir de cruzamientos entre genotipos sexuales y apomícticos. Si tenemos en cuenta el hecho que en este estudio, se obtuvieron proporciones cercanas a 3:1 (S:A) para todos los cruzamientos entre plantas sexuales y apomícticas ( $F_1$ ,  $F_2$  y retrocruza), las posibilidades de colocarlos dentro de este modelo son poco probables. Solamente en la combinación  $aaaa \times Aaaa$  es esperable obtener una leve supremacía (15:13) de plantas sexuales sobre las apomícticas. Sin embargo, esta proporción difiere significativamente ( $P = <0.001$ ) de la observada en este estudio de 3:1. Más adelante se discutirá nuevamente este modelo.

**Modelo 3: Apomixis dominante con letalidad gamética:** Este modelo es equivalente al anterior pero con la diferencia que asume que las gametas portadoras del alelo dominante *A* son letales en doble dosis. Nogler (1984b) sostuvo que

el alelo *A*, el cual confiere aposporia en *Ranunculus*, actúa en forma dominante para condicionar la aposporia, pero actúa recesivamente como un factor letal en la gametogénesis, con lo cual las gametas *A* o *AA* no son viables. A partir del cruzamiento entre una planta diploide sexual de *R. cassubicifolius* y otra tetraploide apomíctica de *R. megacarpus*, Nogler (1894b) analizó varias progenies de retrocruzas por la madre sexual y sus resultados se ajustan a este modelo.

Las proporciones obtenidas por Sherwood *et al.* (1994) para un cruzamiento entre un cultivar comercial apomíctico de *Pennisetum ciliare* (Higgins) por otro sexual, pudieron ser colocados en un modelo monogénico con apomixis dominante y letalidad gamética. Ellos consideraron que la planta sexual tenía el genotipo *aaaa* y el cultivar apomíctico *AAaa*. Las proporciones observadas en  $F_1$  de 140 apomícticos y 49 sexuales se desvían de las esperadas para el modelo 2 ( $\chi^2 = 2,27$ ,  $P = 0,13$ ) mientras que se ajustan mejor a un modelo con letalidad gamética ( $\chi^2 = 0,17$ ,  $P = 0,68$ ).

Las proporciones observadas aquí en *P. notatum* de 2,8:1 no pueden ser colocadas bajo este modelo para ninguna de las alternativas genotípicas posibles ( $P = <0.001$ ) quedando este modelo descartado del análisis.

**Modelo 4: Sexualidad dominante con efecto de dosaje:** En este modelo se considera que si bien la sexualidad es dominante sobre la apomixis, los genotipos sexuales necesitan por lo menos una doble dosis del alelo *S* para que el carácter se exprese. Significa que los individuos sexuales podrán tener tres constitu-

ciones genotípicas para ese locus, SSSS, SSSs y SSss, mientras que los individuos apomícticos podrán ser ssss o Ssss. Si observamos en la Tabla 12, seis combinaciones genotípicas diferentes son posibles. De todas las combinaciones, sólo en una, las proporciones observadas no difieren significativamente de las esperadas. La misma asume que la madre sexual tendría un genotipo triplexo (SSSs) y el padre apomíctico sería simplexo (Ssss). Si bien el análisis de la prueba de bondad de ajuste nos da un valor bajo ( $\chi^2 = 0,001$ ) con lo cual la probabilidad es superior al 95% de aceptación, este modelo no puede explicar la falta de segregación observada en todos los genotipos sexuales utilizados en el análisis. Si asumimos que la madre es SSSs, la misma debería segregar para apomixis en autofecundación en una proporción de 15:13 (S:A). Por otro lado, los genotipos F<sub>1</sub> sexuales que se originan a partir de este cruzamiento, tendrían solamente el genotipo SSss, con lo cual también deberían segregar para apomixis en F<sub>2</sub>. Sin embargo, las proporciones observadas para la progenie de la madre autofecundada, como para todas las F<sub>2</sub>s obtenidas por autofecundación de plantas F<sub>1</sub> sexuales o cruzamientos entre ellas, fueron de 1:0 (S:A). Estas razones llevan a descartar este modelo.

Este modelo no fue considerado en ninguna de las especies apomícticas estudiadas, y en este trabajo sólo se lo tuvo en cuenta como posibilidad de explicar la mayor proporción de plantas sexuales observadas en todos los cruzamientos entre sexuales y apomícticos.

**Modelo 5: Apomixis dominante con efecto de dosaje:** Este modelo es el mismo que el anterior pero en este caso se asume que la apomixis es dominante sobre la sexualidad, pero a partir de la presencia del alelo **A** en doble dosis. Los genotipos posibles para los individuos apomícticos son **AAAA**, **AAAa** y **AAaa** y para los sexuales **Aaaa** y **aaaa** (Tabla 12). De las 6 combinaciones posibles, solo en una: **aaaa X AAaa** las proporciones observadas (2,8:1) no difieren significativamente de las esperadas (11:3) para un nivel de probabilidad del 5%. Si esto fuera así, las plantas de constitución genotípica **Aaaa**, consideradas sexuales, deberían segregar para apomixis en autofecundación o cruzadas por otra planta del mismo genotipo en una proporción de 585:199 (S:A). Además, de acuerdo a este modelo las plantas sexuales de genotipo **Aaaa** estarían presentes en la  $F_1$  en proporción mucho mayor que las del otro genotipo sexual (8 **Aaaa** : 3 **aaaa**). Si esto fuese así, no se debería esperar encontrar diferencias a escala molecular entre plantas sexuales y apomícticas, mediante la metodología del análisis de segregantes en grupos (BSA), ya que el alelo **A** estaría presente en la mayoría de las plantas sexuales de la progenie (ver 6.2.1; 6.2.2 y 6.2.3).

**Modelo 6: Apomixis dominante con efecto de dosaje y letalidad gamética:** Este modelo considera juntas las dos variantes analizadas por separado en los modelos 3 y 5. Es decir, que la apomixis es dominante a partir de doble dosis del alelo **A** y las gametas portadoras de dicho alelo en doble dosis son letales. Los genotipos posibles para las plantas sexuales y apomícticas son los mismos que para el modelo anterior. Las combinaciones que involucran al genotipo cuadru-

plexo (AAAA) en los cruzamientos, no pueden generar progenies debido a que la única gameta que se formaría sería AA y la misma es considerada letal. De las cuatro combinaciones posibles, Aaaa X AAaa, es la única en las cuales los resultados observados (2,8:1) no difieren significativamente con los esperados (201:96) a un nivel de probabilidad del 5%. Sin embargo, este modelo presenta los mismos inconvenientes que el modelo anterior, donde en primer lugar algunas plantas sexuales de genotipos Aaaa deberían segregar para apomixis y segundo que no hubiese sido posible encontrar diferencias a escala molecular entre ambos grupos de acuerdo a la metodología empleada.

**Modelo 7: Modelo de Mogie:** Este modelo fue propuesto por Mogie (1992) en su libro sobre: "La evolución de la reproducción asexual en plantas" para explicar el control genético de la apomixis en los poliploides. El mismo considera que la expresión de la apomixis en una planta sexual con tendencia innata a la apomixis, dependerá de una simple mutación en el gen salvaje  $a^+$ , donde el alelo mutante  $a^-$  generará un fenotipo apomíctico viable. Es necesario que el locus afectado contenga por lo menos una copia del alelo salvaje  $a^+$  en el cual la dominancia puede ser revertida por un efecto de dosaje del alelo mutante. Este efecto de dosaje puede ser fácilmente alcanzado en los poliploides. De acuerdo con ello, los genotipos posibles para las plantas sexuales serían  $a^+a^+a^+a^+$  y  $a^+a^+a^+a^-$ , mientras que los apomícticos serían  $a^+a^+a^-a^-$  y  $a^+a^-a^-a^-$ . Como el modelo asume la premisa que por lo menos una copia del alelo salvaje  $a^+$  debe estar presente en los genotipos

apomícticos, restringe la posibilidad de la existencia de individuos homocigotas para el alelo mutante. El genotipo homocigota mutante  $a^-a^-a^-a^-$  sería letal.

Este modelo fue propuesto para explicar las proporciones obtenidas en híbridos interespecíficos de *Paspalum ionanthum* sexual X *P. cromyorrhizon* apomíctico facultativo (Martínez *et al.* 1999). Las proporciones observadas en F<sub>1</sub> fueron de 2:1 o 3:1 entre apospóricos y no apospóricos, según fuese el criterio que se tuviese en cuenta para considerar a una planta apospórica o no apospórica. Esto se debió al hecho que muchas plantas poseían un alto grado de esterilidad femenina, con ausencia de sacos embrionarios y esporádica aparición de sacos apospóricos, muchas veces no del todo desarrollados. Esta esterilidad fue observada en las plantas que debieron haber sido sexuales y por lo tanto impidió obtener progenies F<sub>2</sub>s y retrocruzas, para poder corroborar el modelo propuesto. Martínez *et al.* (1999) consideraron, además, que las proporciones observadas en F<sub>1</sub> pueden ser colocadas bajo un modelo de control monogénico, con herencia tetrasómica y segregación cromatídica.

Las proporciones obtenidas en *P. notatum* no podrían ser colocadas en el modelo de Mogie, debido por un lado a la falta de segregación para apomixis observada en los genotipos sexuales heterocigotas ( $a^+a^+a^-a^-$ ) autofecundados, y a los resultados obtenidos en la identificación de marcadores moleculares (ver 6.2)

Las proporciones aquí observadas en *P. notatum* no se ajustan exactamente a ninguno de los modelos genéticos analizados. Esto nos lleva a pensar que pueden estar operando otros genes en la expresión del carácter o que el mismo puede ser influido por factores modificadores que produzcan una distorsión en la segregación. El primer modelo hipotético propuesto por Powers (1945) planteó que la apomixis estaría controlada por tres genes homocigotas recesivos, cada uno de los cuales controlaría uno de los tres componentes del proceso apomíctico: falla o supresión de la meiosis femenina (**aa**), falla en la fertilización de la ovocélula (**bb**) y desarrollo partenogenético de la misma (**cc**). De acuerdo con este modelo, la apomixis se originaría a escala diploide. Este modelo ha recibido muchas críticas debido a que en primer lugar es hipotético y nunca fue confirmado. Gustafsson (1947a) señaló que la falla en la fertilización probablemente no tenga un control genético simple. Otro punto controversial del modelo de Powers (1945) es el hecho de que considera la homocigosidad para los genes de apomixis, cuando es bien sabido que las plantas apomícticas son altamente heterocigotas para muchos de sus genes (Asker y Jerling 1992). En los primeros estudios realizados en la gramínea apospórica *Pennisetum ciliare* (Taliaferro y Bashaw 1966) ya se planteó que la apomixis estaría controlada por dos loci. El gen **B** que condiciona para sexualidad y es epistático con el gen **A**, el cual controla la apomixis. De acuerdo con este modelo, la planta sexual utilizada en sus experimentos fue heterocigota para ambos locus **AaBb**, y la apomíctica homocigota para el locus de sexualidad y heterocigota para el de apomixis **Aabb**.

En *Panicum maximum*, Hanna *et al.* (1973) estudiaron la segregación de progenies sexuales autofecundadas y propusieron un control genético a partir de dos loci, siendo la sexualidad dominante sobre la apomixis y condicionada a un efecto de dosaje de dos o más alelos dominantes. Los genotipos sexuales serían *AABB*, *AABb*, *AaBB*, *AaBB*, *AAbb* y *aaBB*; mientras los apomícticos *aabb*, *Aabb* y *aaBb*. El alto número de genotipos sexuales heterocigotos que se producirían, generaría segregación para apomixis en autofecundaciones o cruzamientos entre plantas sexuales.

Los resultados observados en *P. notatum* en este estudio no podrían ser colocados en los modelos propuestos por Powers (1945), Taliaferro y Bashaw (1966) y Hanna *et al.* (1973) debido a que no explicarían la falta de segregación observada en todos los genotipos sexuales autofecundados o cruzados entre sí. Todas las plantas sexuales se comportan como homocigotas recesivas en cruzamientos con plantas apomícticas y además, es bien sabido que todas las especies apomícticas son altamente heterocigotas. Los recientes estudios embriológicos y moleculares realizados en el género diplospórico *Erigeron*, mediante cruzamientos interespecíficos entre una especie diploide sexual *E. strigosus* y otra triploide apomíctica *E. annuus*, aportaron nuevas evidencias sobre un control genético a partir de más de un gen (Noyes 2000; Noyes y Rieseberg 2000 ). Los autores analizaron por separado el control genético de dos componentes del proceso apomíctico como son, la formación de los sacos embrionario y la partenogénesis. A partir de la segregación obtenida en  $F_1$  de 64:57 entre plantas diplospóricas y sexuales, se propuso

que la herencia de la diplosporia tendría un control genético monogénico con dos alelos y selección sobre las gametas homocigotas para diplosporia (Noyes 2000). Sin embargo, Noyes (2000) observó ausencia de partenogénesis en muchos de los híbridos altamente diplospóricos, lo que lo llevó a proponer que este componente del proceso apomíctico, no estaría estrictamente asociado con la formación de los sacos embrionarios no reducidos. Por su parte, encontraron que el ligamiento de cuatro marcadores moleculares con herencia polisómica, están significativamente asociados a la partenogénesis; mientras que 11 marcadores que cosegregan con una herencia univalente, están completamente asociados con la diplosporia (Noyes y Rieseberg 2000). Estos resultados contrastan fuertemente con la idea general propuesta por muchos investigadores para distintas especies apomícticas sobre el control genético de la apomixis a partir de un solo gen (Savidan 1982, 1983; Nogler 1984; Sherwood *et al.* 1994; Valle y Savidan 1996). Savidan (2000) sugiere que la aposporia es transmitida como un todo y que, aunque la falla en la fertilización parece ser un efecto pleiotrópico de la apomeiosis, un supergen o "linkat", definido por Demarly (1979) como un grupo de genes ligados comportándose en una forma coordinada para completar una función, está probablemente involucrada en el proceso, es decir, más que un simple gen. Un "linkat" es un segmento de cromosoma en el cual el ligamiento de genes que contribuyen a una función se encuentren colocados juntos por medio de una inversión. Esto parece especialmente necesario para explicar la transmisión en las plantas facultativas y la aparente regulación dependiente del nivel de ploidía del gen. Esta ex-

plicación podría tener relación alguna con los resultados obtenidos mediante marcadores moleculares en algunas especies apomícticas y en particular en este trabajo con *P. notatum* (ver 6.2). Por su parte, Carman (1997, 1999) en un estudio hecho sobre el origen híbrido de la apomixis, sugirió que la apomixis puede ser el resultado de genes duplicados que son expresados en forma coordinada en el desarrollo femenino y no de genes específicos o alelos para apomixis. El estudio hecho por Carman (1997, 1999) se basó en dos suposiciones: La primera fue que los apomícticos son poliploides formados a partir de la contribución de diferentes genomas y cuyas especies ancestrales mostraban diferencias principales en la oportunidad del desarrollo de la megasporogénesis y del saco embrionario. La segunda suposición fue que hay una serie de observaciones en cruzamientos inter-específicos e intergenéricos que producían anomalías en la reproducción de las plantas, las cuales se parecían a las de un desarrollo apomíctico. Esto puede ser factible para aquellas especies apomícticas alopoliploides, pero no para muchas, entre ellas la mayoría de las especies de *Paspalum*, las cuales se han originado por autoploidía.

Las desviaciones observadas por Burton y Forbes (1960) en las proporciones fenotípicas esperadas para un modelo monogénico, los llevó a proponer que la apomixis estaría controlada por unos pocos genes recesivos influidos por "factores modificadores". Sin embargo, de acuerdo a la interpretación que hicimos anteriormente sobre los mismos, dichos resultados pueden compararse con los obtenidos en este trabajo y por lo tanto ser incluidos bajo un modelo en común.

*Todo este análisis nos lleva a proponer que, en principio, P. notatum tendría una regulación genética más compleja, la cual difiere en algunos aspectos de un modelo de herencia mendeliano clásico. La explicación más probable sería la existencia de algún mecanismo de letalidad genética asociado al locus de la apomixis, el cual provocaría la muerte de gametas y/o genotipos apomícticos portadores de dicho factor letal. Esto provocaría una distorsión en la segregación fenotípica, de tal manera que las proporciones se desviarían de las mendelianas típicas para herencia tetrasómica, control monogénico, apomixis dominante y segregación cromatídica (Modelo 2 de la Tabla 12). Además, esta variación podría modificarse de acuerdo al grado de penetrancia del gen letal asociado con el carácter. La letalidad podría ser un efecto pleiotrópico con penetrancia incompleta. Sin embargo, más probablemente la letalidad podría deberse a uno o más genes ligados al carácter apomixis.*

Esta influencia de genes letales distorsionando la segregación del carácter apomixis sería concordante con la idea generalmente aceptada de altos niveles de heterocigocis en plantas apomícticas. Muchas especies apomícticas tendrían normalmente una importante carga genética ya que la ausencia de reproducción sexual no les permitiría "limpiar" dicha carga por medio de la recombinación. Algunos de esos letales podrían estar ligados a un gen dominante para apomixis, como lo propuso Richards (1996). Esta distorsión también fue observada en la segunda generación de retrocruzas de híbridos de Maíz-*Tripsacum* donde la sexualidad y la

apomixis segregaban en un rango de 16:1 (Grimanelli *et al.* 1998b); mientras que en F<sub>1</sub> la segregación fue de 1:1 (Leblanc *et al.* 1995). Para explicar esta distorsión, Grimanelli *et al.* (1998b) propusieron la existencia de un mecanismo similar al propuesto por Nogler (1984). Las existencias de raros eventos de entrecruzamiento del gen(s) responsable de la apomixis y un posible sistema letal, podrían ser la explicación a tal distorsión. Alternativamente estos autores proponen la existencia de una penetrancia incompleta de dicho sistema, resultando en una pequeña proporción de alelos que son transmitidos. Las dos posibles hipótesis de sistemas letales consideran por un lado la posibilidad que el factor letal actúe en *cis* o en *trans*, ambos con la posibilidad de que exista entrecruzamiento entre ambos loci o la existencia de penetrancia incompleta. Si el sistema actúa en *cis* y es incompletamente penetrante, solamente se obtendrían plantas sexuales; mientras que si actúa en *trans* con penetrancia incompleta se produciría la autoeliminación del factor letal, por lo tanto el segmento que controla la apomixis segregaría al azar. Este último sistema fue propuesto como más probable explicación de la distorsión de la segregación, a favor de las plantas sexuales, observada en las retrocruzas de Maíz-*Tripsacum*. Esta distorsión pudo ser corroborada por análisis molecular mediante RFLP en dicha población. (Grimanelli *et al.* 1998b). Estos sistemas de distorsión de la segregación han sido descritos en muchos organismos (Lyttle 1991) y en particular están muy difundidos entre las plantas (Rick 1965; Sano 1990).

El hecho fundamental es que los resultados obtenidos, tanto en este trabajo como los de Burton y Forbes (1960) en *P. notatum*, no pueden ser explicados por los modelos evaluados precedentemente para un control Mendeliano clásico, como se propuso para la mayoría de las especies estudiadas. La letalidad asociada al carácter apomixis, tal como fue evaluada recientemente, podría ser la causa más probable de la distorsión en la segregación observada en las progenies de cruzamientos entre genotipos sexuales y apomícticos. De acuerdo a esta interpretación los genotipos apomícticos que se utilizaron en los cruzamientos con plantas sexuales tendrían una constitución genotípica simplexa (*Aaaa*) mientras las plantas sexuales siempre serían nuliplexas (*aaaa*). En el cruzamiento entre ambos genotipos, el genotipo simplexo produciría tres clases de gametas en una proporción de 1AA:12Aa:15aa para una segregación gamética de tipo cromatídica; mientras que el genotipo sexual produciría un solo tipo de gameta (*aa*). En este tipo de cruzamiento se debería esperar una proporción fenotípica de 15:13 entre plantas sexuales y apomícticas, los cuales difieren significativamente con las proporciones observadas de 2,8:1 ( $\chi^2 = 34.7$ ,  $P = <0.001$ ). Sin embargo, si consideramos que el alelo para apomixis está asociado a un sistema letal similar al propuesto por Grimanielli *et al.* (1998b) las proporciones se modificarían hacia una supremacía de plantas sexuales, tal cual lo observado. Los resultados obtenidos mediante marcadores moleculares, los cuales son discutidos más adelante, apoyan esta teoría (ver 6.2.1; 6.2.2 y 6.2.3)



## 7.2. Marcadores moleculares ligados a la aposporia en *Paspalum notatum*

### 7.2.1. La elección del material y la metodología empleada

El objetivo en este punto fue identificar marcadores moleculares que co-segrieguen con la reproducción apomíctica en *Paspalum notatum*. Para ello se recurrió a una progenie segregante de un cruzamiento intraespecífico entre un genotipo tetraploide 100% sexual y otro apomíctico obligado. Primeramente, hubo que establecer si la apomixis posee una herencia cualitativa o está bajo la influencia de dos o más genes. Los resultados observados en el análisis genético hecho precedentemente demostraron que en principio la apomixis en *P. notatum* posee un control monogénico y que se comporta como una variante alélica de la sexualidad con influencia de factores modificadores. El estudio de caracteres cualitativos requiere la generación de poblaciones segregantes para el carácter a ser evaluado. En la mayoría de las especies homocigotas dichas progenies recién se obtiene a partir de la segunda generación ( $F_2$ ). Esto se debe a que en general las especies son autógamas y por lo tanto homocigotas para la mayoría de los loci. Sin embargo, las especies alógamas poseen un alto grado de heterocigosis en la mayoría de sus loci, con lo cual en cruzamientos con especies homocigotas o heterocigotas se obtiene segregación a partir de la primera generación ( $F_1$ ). Por otro lado, al estar la apomixis estrechamente vinculada con la poliploidía, la posibilidad de contar con genotipos heterocigotas para un locus determinado, es mucho mayor que en un individuo diploide. De los cinco genotipos posibles para un locus determinado en una especie tetraploide, cuatro son heterocigotas y el número se incrementa aún más en el

caso de poliploides superiores. Este es el caso de la apomixis en *P. notatum* y en todas las especies apomícticas estudiadas. Las plantas apomícticas son, en general, altamente heterocigotas, debido a que se generaron por alopoliploidía o por autopoliploidía a partir de citotipos diploides alógamos. La relación estrecha entre el carácter y la poliploidía es ampliamente conocida (Asker y Jerling 1992). Todas las especies apomícticas tetraploides estudiadas recientemente fueron consideradas heterocigotas para el locus en cuestión con constituciones genóticas de tipo *Aaaa* o *AAaa*. El análisis genético de la herencia de la apomixis hecho en *P. notatum* determinó que el carácter se comporta como un carácter heterocigota y genotípicamente similar a un simplexo (*Aaaa*), mientras que las plantas sexuales son homocigotas y por lo tanto nulíplexas (*aaaa*). Por ello, en todos los cruzamientos que involucraron genotipos apomícticos se obtuvo segregación para dicho locus como si se tratase de una verdadera retrocruza, tal cual sucede con las especies diploides homocigotas para un locus cualquiera.

Una vez obtenida la población segregante, el próximo paso fue establecer perfectamente las clases fenotípicas a ser evaluadas. Los resultados de las observaciones embriológicas permitieron diferenciar claramente dos fenotipos para el sistema de reproducción: plantas sexuales y plantas apomícticas, sin detectar variaciones continuas entre ambas clases que hagan pensar en la influencia de más de un gen. Todas las plantas clasificadas como sexuales lo fueron en su totalidad, ya que únicamente poseían sacos embrionarios de origen meiótico; mientras que todas las apomícticas fueron consideradas prácti-

camente obligadas debido al alto porcentaje de sacos embrionarios apospóricos presente en cada una de ellas. A pesar de que unas pocas plantas mostraron niveles levemente inferiores de expresión de sacos embrionarios apospóricos, éstos fueron variables en función del momento de la floración en el cual se realizó el análisis (ver 6.1.2.)

Para la identificación de marcadores moleculares relacionados con la región responsable del carácter, se recurrió a la metodología del análisis de segregantes combinados (BSA) desarrollada por Michelmore *et al.* (1991). Esta metodología es una importante herramienta para encontrar marcadores polimórficos relacionados con determinados caracteres. En los últimos años esta metodología ha sido empleada en numerosos trabajos de detección de marcadores moleculares ligados a caracteres cualitativos, como los son muchas enfermedades (Michelmore *et al.* 1991; Paran y Michelmore 1993; Penner *et al.* 1993; Barua *et al.* 1993; van der Beek *et al.* 1994; Devey *et al.* 1995; Chagué *et al.* 1996) y también a algunos cuantitativos (Wang y Paterson 1994; Hill 1998; Mackay y Caligari 2000). El BSA también fue utilizado exitosamente en la identificación de marcadores moleculares ligados a la reproducción apomíctica en géneros de gramíneas como *Tripsacum* (Leblanc *et al.* 1995), *Bracharia* (Pessino *et al.* 1997, 1998) *Pennisetum* (Gustine *et al.* 1997; Ozias-Akins *et al.* 1998) y *Poa* (Barcaccia *et al.* 1998).

Esta metodología fue desarrollada como alternativa a otras, como el uso de líneas isogénicas (NILs), para identificar rápidamente marcadores moleculares ligados a genes o regiones genómicas de interés, en especies donde no se

cuenta con NILs. Para ello, el único prerrequisito que se requiere es contar con una población segregante para el carácter en estudio. De acuerdo a Michelmore *et al.* (1991) el éxito del método depende de la divergencia entre los padres en la región genómica a ser evaluada. El método se basa en la combinación o mezcla de ADN de un número determinado de individuos para cada clase fenotípica, de tal manera que todos los loci ligados a la región de interés queden juntos en un grupo y que los loci no ligados se distribuyan al azar entre ambos grupos. El tamaño mínimo de los grupos será determinado por la frecuencia con la cual los loci no ligados deben ser detectados como polimórficos entre ambos grupos. Esto dependerá del tipo de marcador utilizado (dominante o co-dominante) y el tipo de población usada para generar los grupos ( $F_2$ , retrocruza, etc.). Las probabilidades de que un grupo de " $n$ " individuos porte una banda y un segundo grupo de igual tamaño no la tenga (falsos positivos) será la siguiente en función del tipo de la población y el tipo de marcador:

1)  $F_2$ , marcador dominante:  $2(1-[1/4]^n)(1/4)^n$  (Michelmore *et al.* 1991)

2)  $F_2$ , marcador co-dominante:  $4(1-[1/4]^n)(1/4)^n$  (Mackay y Caligari 2000)

3) Retrocruza, todos los marcadores:  $2(1-[1/2]^n)(1/2)^n$  (Mackay y Caligari 2000)

Si se utilizan 10 individuos para formar cada grupo, la probabilidad de que un locus no ligado sea polimórfico (falso positivo) entre ambos grupos es la siguiente: 1)  $2 \times 10^{-6}$ , 2)  $4 \times 10^{-6}$ , 3)  $2 \times 10^{-3}$ . Esto demuestra que aún cuando sean ensayados muchos loci, la probabilidad de encontrar un locus diferencial no ligado es muy pequeña. A menor tamaño del grupo, más chances de encon-

trar falsos positivos; sin embargo, como el ligamiento de todos los polimorfismos es confirmado por análisis de la población segregante, el BSA con un número pequeño de individuos en uno o ambos grupos, suministrará un mayor enriquecimiento de marcadores ligados al locus de interés. El método permite identificar marcadores moleculares dentro de una ventana del 20 % de recombinación a cada lado del locus de interés. Los marcadores que están dentro de una ventana del 30 % de recombinación, también son detectados pero como bandas de diferente intensidad (Michelmore *et al.* 1991).

La utilización de la metodología del BSA en este estudio, permitió detectar, mediante tres técnicas distintas de marcadores moleculares: RAPD, AFLP y RFLP, seis marcadores completamente ligados a la reproducción apomíctica en *P. notatum*. La inclusión de 10 individuos en cada grupo fue efectiva en la localización de fragmentos polimórficos relacionados únicamente con el sistema de reproducción. Si bien, los progenitores utilizados son altamente heterocigotas para la mayoría de los loci evaluados, el agrupamiento utilizando 10 individuos por grupo, transformó en monomórficos a todos los loci que no estaban asociados al sistema de reproducción y solamente quedaron como polimórficos aquellos 6 loci ligados a la apomixis.

### **7.2.2. Análisis de RAPD**

La técnica de RAPD fue la primera entre las tres utilizadas en este trabajo para la identificación de marcadores moleculares ligados a la apomixis. Los RAPDs son marcadores dominantes que utilizan la amplificación enzimática

diferencial de pequeños fragmentos de ADN, usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con oligonucleótidos arbitrarios ("primers") de pocas pares de bases (generalmente 10 pb) (Williams *et al.* 1990). Los polimorfismos observados resultan tanto de cambios cromosomales en las regiones amplificadas o cambios de bases que alteran el sitio de pegado ("annealing") del primer. El procedimiento de obtención de marcadores de RAPD es rápido y requiere de poca cantidad de ADN (ng), el cual no necesita ser de alta calidad y no involucra el uso de radioactividad. Los polimorfismos pueden ser detectados en fragmentos conteniendo secuencias altamente repetitivas, lo cual suministra marcadores ubicados en regiones que no podrían ser detectadas por métodos de hibridización como los RFLP. La técnica de RAPD es considerada por muchos como poco reproducible entre laboratorios diferentes debido a la influencia de algunos de los componentes de la reacción como al uso de diferentes máquinas termocicladoras (Penner *et al.* 1993; Meunier y Grimont 1993; MacPherson *et al.* 1993; He *et al.* 1994; Jones *et al.* 1997). En un trabajo se determinó un 75 % de reproducibilidad, medido en función del porcentaje de bandas reproducibles, a partir de la utilización de 50 primers de RAPD (Skroch y Nienhuis 1995). Esta falta de reproducibilidad señalada por varios autores, no fue observada en este estudio a pesar de haber utilizado máquinas termocicladoras distintas y haber realizado las amplificaciones en dos laboratorios diferentes. Manteniendo las mismas condiciones de la reacción, como la concentración de ADN, concentración de  $MgCl_2$ , concentración de *Taq* polimerasa y concentración de los primers los resultados fueron totalmente reproducibles entre

los dos laboratorios y utilizando máquinas termocicladoras de diferentes marcas. El análisis de segregación realizado con los dos marcadores ligados a la apomixis en *P. notatum*, y utilizando los mismos individuos en los dos ensayos realizados en diferentes laboratorios, produjo exactamente los mismos resultados

La utilización de 400 "primers" de RAPD permitió evaluar alrededor de 1700 loci diferentes, con lo cual se cubrió una amplia región del genoma de *P. notatum*. Se encontraron solamente dos fragmentos polimórficos entre los respectivos grupos (BS y BA) y entre los progenitores (F131 y Q4117), lo que da un porcentaje de polimorfismo relacionado con el carácter de 0,5 %. Este porcentaje fue el mismo que se encontró en *Brachiaria* utilizando 184 "primers" pertenecientes a la serie Operon (Operon Technologies, Alameda, CA, USA) sobre una población segregante de 43 individuos. En dicho trabajo, dos "primers" fueron seleccionados para el análisis de ligamiento, pero solo uno (OPC4) presentó una banda significativamente ligada a la apomixis ( $\chi^2 = 11,08$ ,  $P < 0,001$ ,  $r = 0,24$ ) (Pessino *et al.* 1997).

El análisis de segregación realizado con los dos fragmentos polimórficos entre los padres y BS y BA en 175 individuos de la progenie  $F_1$  de *P. notatum*, demostró que ambos fragmentos estaban completamente ligados al locus de la apomixis. Ambos fragmentos solamente fueron amplificados por los individuos apomícticos. No se encontró ninguna planta recombinante, tanto en el grupo apomíctico como en el sexual. Los fragmentos diferenciales fueron amplificados por separado por dos oligonucleótidos de 10 pb.

En la Tabla 13 se realizó la prueba de bondad de ajuste ( $\chi^2$ ) para tres modelos de herencia de la apomixis y para los dos marcadores de RAPD 100 % ligados al carácter. Además del modelo de herencia Mendeliana clásico, con herencia tetrasómica, apomixis dominante y segregación cromatídica, se consideraron dos variantes de dicho modelo, en los cuales se considera que las distorsiones en las proporciones observadas son debidas a factores modificadores como pueden ser genes letales asociados al alelo para apomixis. En uno de esos modelos se asume una letalidad gamética del 100 % para las gametas portadoras del alelo para apomixis en condición de homocigosis (AA), tal cual fue propuesto por Nogler (1984) para *Ranunculus*. El otro modelo, fue propuesto en este trabajo para *P. notatum*, asumiendo que la alta distorsión provocada en las proporciones observadas en favor de las plantas sexuales, pudo deberse a que, además de la muerte de las gametas portadoras del alelo A en doble dosis, también se mueren algunas gametas heterocigotas (Aa), o combinaciones genotípicas apomícticas portadoras del alelo letal, en por lo menos un 50%. Este porcentaje es puramente hipotético ya que no es posible determinarlo por medio de los estudios realizados en este trabajo. Sin embargo, las observaciones hechas mediante análisis de fertilidad del polen no parecen correlacionarse con la letalidad, por lo que puede ser muy factible que la misma se produzca en estado embrionario.

La distorsión en la segregación fenotípica observada en la progenie F<sub>1</sub> del cruzamiento entre F131 sexual y Q4117 apomíctica de 2,8:1 entre sexuales y apomícticas, fue la misma que la encontrada con los dos loci de RAPD ligados

a la región responsable. Las bandas diferenciales únicamente estuvieron presentes en las 56 plantas apomícticas y ausentes en las 119 sexuales ensayadas. De acuerdo a la prueba de bondad de ajuste ( $\chi^2$ ) el único modelo posible que explica dicha distorsión en la segregación es el modelo que considera la existencia de letalidad gamética del 100 % en AA y por lo menos un 50 % en las gametas Aa.

El ligamiento completo observado en este estudio mediante la utilización de marcadores de RAPD, también fue encontrado en *Pennisetum*, una gramínea apospórica perteneciente a la misma tribu que *Paspalum*. Empleando una progenie de 397 individuos que segregaban fenotípicamente para apomixis en una proporción cercana a 1:1, encontraron 12 marcadores moleculares (11 SCARs y 1 STS) completamente ligados al locus de la apomixis (Ozias-Akins *et al.* 1998). Los SCARs fueron generados a partir de primers específicos obtenidos a partir de fragmentos de RAPD polimórficos entre los progenitores sexuales y apomícticos. La estrategia realizada para la generación de un número alto de fragmentos de RAPD ligados al locus de la apomixis fue mediante la digestión del ADN genómico con distintas enzimas de restricción y posterior amplificación de los fragmentos generados, utilizando los mismos primers que dieron polimorfismo con el ADN genómico entero de las muestras. Esto le permitió obtener 22 marcadores polimórficos, de los cuales 11 fueron transformados en SCARs. Los 12 marcadores estuvieron siempre presentes en las 162 plantas apomícticas y ausentes en las 235 sexuales, por lo tanto pertenecen al mismo grupo de ligamiento y están ligados en acoplamiento con el carácter. Cuando

utilizaron seis de esos fragmentos como sondas, cuatro hibridaron como ADN de bajo número de copias y revelaron bandas solamente en las plantas apomícticas y no en las sexuales. Esta hemicingosis parcial observada cerca del locus de la apomixis, los llevó a proponer la idea que se trata de una región específica de la aposporia (ASGR) (Ozias-Akins *et al.* 1998).

La posible causa de falta de recombinación en esa región fue discutida por Ozias-Akins *et al.* (1998) a partir de diferentes mecanismos hipotéticos: Uno podría ser que el locus de la apomixis estuviese ubicado en una región centromérica o heterocromática, o inclusive en un minicromosoma que no se aparee en la meiosis. No existen evidencias al respecto e inclusive en otras especies como *Brachiaria*, mediante mapeo comparativo con maíz, se sugirió que el locus de la apomixis estaría ubicado en una región telomérica (Pessino *et al.* 1997). Otra posible explicación podría ser la localización en una inversión heterocigota o en una región de ADN introducida de otra especie. Un entrecruzamiento (*crossing over*) en una inversión paracéntrica puede resultar en cromátidas dicéntricas y acéntricas, que portan duplicaciones cromosómicas y deficiencias respectivamente, con lo cual serían no viables. La tercera posibilidad sería que la región específica de la aposporia sea un locus complejo controlado por dos o más genes, los cuales son mantenidos como una unidad intacta, y donde la recombinación está suprimida por algunos de los mecanismos mencionados anteriormente.

Uno de los marcadores de RAPD (OPC-04) que fue encontrado completamente ligado a la apomixis en *Pennisetum* (Ozias-Akins *et al.* 1993), también

lo fue en una población de 43 individuos segregantes de *Brachiaria*. El mismo fue ubicado en un mapa de la región a una distancia de 19 cM del locus de la apomixis (Pessino *et al.* 1998). Por otro lado, el "primer" OPC-04 fue ensayado sobre los progenitores y los BS y BA de una población segregante de la especie apomíctica cultivada *Pennisetum ciliare* ("buffelgrass"). En esta especie no se detectó ninguna banda diferencial entre los progenitores sexuales y apomícticos y por lo tanto no fue evaluada sobre la progenie.

**Tabla 13.** Análisis de la prueba de bondad de ajuste ( $\chi^2$ ) para tres modelos posibles de herencia de la apomixis en una población de 212 individuos segregantes, y para la segregación de dos marcadores de RAPD ligados al carácter, en una población de 175 individuos.

Locus	Modelo de herencia	Esperado		Observado		$\chi^2$	P (df =1)	
		Rango (Apo:Sex)	N <sub>i</sub> +	N <sub>i</sub> -	N <sub>i</sub> +			N <sub>i</sub> -
<b>Apomixis</b>	Tetrasómico, segregación cromatídica	13:15	98	114	56	156	34,7	< 0,001
	Tetrasómico, segregación cromatídica, letalidad gamética (100% AA)	12:15	94	118	56	156	27,9	< 0,001
	Tetrasómico, segregación cromatídica, letalidad gamética (100% AA y 50% Aa)	6:15	61	151	56	156	0,49	0,49
<b>UBC243 UBC259</b>	Tetrasómico, segregación cromatídica	13:15	70	81	56	119	14,7	< 0,001
	Tetrasómico, segregación cromatídica, letalidad gamética (100% AA)	12:15	67	84	56	119	11,0	< 0,001
	Tetrasómico, segregación cromatídica, letalidad gamética (100% AA y 50% Aa)	6:15	43	108	56	119	1,0	> 0,30

N<sub>i</sub> = número de individuos; + y -, presencia y ausencia del carácter respectivamente

### 7.2.2. Análisis de AFLP

La técnica de AFLP fue utilizada con el propósito de encontrar un mayor número de marcadores asociados a la apomixis en *P. notatum* que nos permitiese mapearlos en la población de tal manera de determinar si alrededor del locus de la apomixis efectivamente hay una restricción a la recombinación como fue observado con los marcadores de RAPD. Los AFLP son marcadores dominantes al igual que los RAPD y por lo tanto el nivel de información es limitado. Sin embargo, su principal ventaja es la de ser altamente polimórficos y reproducibles. Los polimorfismos que se obtienen son generalmente a nivel nucleotídico y los mismos son detectados ya sea por un cambio de un nucleótido en el sitio de reconocimiento de la enzima o en el sitio adyacente a la misma. Por otro lado, cambios estructurales tales como deleciones o inserciones también afectan la presencia o el tamaño de los fragmentos de restricción, los cuales son detectados por los AFLP como polimorfismos (Vos *et al.* 1995; Bleas *et al.* 1998) 1. Desde que fueron descritos por Zabeau y Vos (1993), su utilización fue aumentando año tras año, ya que es una herramienta importante en el estudio de caracteres de importancia agronómica, en plantas y animales, como así también en el desarrollo de mapas moleculares y la saturación de regiones genómicas poco pobladas de marcadores.

En *P. notatum* se ensayaron 10 combinaciones de "primers" al azar EcoRI/MseI +3, con lo cual se logró evaluar alrededor de 690 loci diferentes. El empleo de la técnica resultó ser eficaz y rápida para detectar polimorfismos asociado al carácter. En primer lugar se observó un alto grado de polimorfismo

entre los genomas de los progenitores (11,5 %). Esto era esperable de obtener debido al origen de ambos. La madre sexual F131 es un híbrido, obtenido experimentalmente en un cruzamiento entre dos genotipos apomícticos con fondos (*background*) genéticos muy diferentes; mientras que el padre apomíctico Q4117 es una planta que crece naturalmente en poblaciones del sur de Brasil.

Del total de loci ensayados utilizando los padres y BS y BA, 12 loci resultaron ser polimórficos entre los grupos BS y BA. Solamente dos loci estuvieron relacionados con la apomixis; mientras que los restantes segregaron en la población como independientes o no relacionados con el carácter. El análisis de ligamiento con 100 individuos de la progenie (50 sexuales y 50 apomícticos) determinó que ambos loci únicamente estaban presentes en las plantas apomícticas. Ningún recombinante fue encontrado en el total de la población ensayada al igual que lo obtenido con los dos marcadores de RAPD. Esto confirma que los mismos están ligados en un 100 % al locus en fase de acoplamiento.

Los AFLP también fueron utilizados en *Brachiaria*, para identificar nuevos marcadores ligados a la región responsable de la apomixis (Pessino *et al.* 1998), y en la determinación del control genético de la partenogénesis en *Poa pratensis* (Barcaccia *et al.* 1998). En *Brachiaria*, los AFLP fueron utilizados para encontrar marcadores adicionales más cercanos al locus de la apomixis que los obtenidos previamente mediante el empleo de sondas de RFLP de maíz (Pessino *et al.* 1997). El empleo de siete combinaciones de "primers" *Pst*I/*Mse*I con tres nucleótidos selectivos (+3), les permitió identificar dos fragmentos fuertemente ligados al locus de la apomixis. Los dos marcadores fueron ubicados en

un mapa de la región a una distancia de 1 y 5 cM respectivamente a cada lado del locus de la apomixis. Todos los marcadores que fueron encontrados asociadas a la apomixis en la población de 43 individuos segregantes de *Brachiaria* fueron mapeados a un lado u otro del locus, demostrando que en dicha región la recombinación se produce.

En *Poa* se detectaron 8 marcadores de AFLP asociados a la partenogénesis mediante el empleo de 36 combinaciones de primers *EcoRI/MseI* con tres nucleótidos selectivos. Todos los marcadores de AFLP, como así también uno de RAPD, fueron ubicados en un mapa de la región a cada lado del locus de la partenogénesis (Barcaccia *et al.* 1998). Si bien en dicho trabajo se argumenta que por observaciones citoembriológicas la apomeiosis, el otro componente del proceso apomíctico, está estrictamente ligado a la partenogénesis y por lo tanto bajo el mismo control genético, esto no ha podido ser demostrado a nivel molecular.

Los resultados obtenidos en *P. notatum*, tanto con RAPD como con AFLP, contrastan fuertemente con los obtenidos en *Brachiaria* (Pessino *et al.* 1997, 1998). En *P. notatum* no se observó recombinación para los dos marcadores de RAPD, ni para los dos de AFLP ligados a la apomixis en poblaciones de 175 y 100 individuos respectivamente. Sin embargo, los resultados obtenidos son concordantes con las observaciones hechas en *Pennisetum* (Ozias-Akins *et al.* 1998).

#### 7.1.4 Análisis de RFLP

Los marcadores de RFLP fueron utilizados con el propósito de encontrar nuevos marcadores moleculares asociados a la apomixis en *P. notatum* que nos permitan obtener una mayor información del locus responsable del carácter y a su vez establecer la sintenia evolutiva con segmentos cromosómicos homólogos de otras gramíneas apomícticas y no apomícticas mediante estudios de mapeo genómico comparativo.

En la actualidad, existen mapas genéticos de arroz y maíz altamente saturados de marcadores de diferentes tipos: Morfológicos, Isoenzimáticos, RAPD, AFLP, RFLP, STS, microsatélites, para todos los grupos de ligamiento.

El análisis a partir de marcadores de RFLP requiere, como primera medida, poder contar con una biblioteca de clones o sondas para la especie en estudio. En general, estas sondas solamente están disponibles para las especies de importancia económica como el arroz, maíz, tomate, trigo, soja, etc. Las sondas pueden ser obtenidas de diferentes fuentes: 1) a través de fragmentos de ADN genómico clonados al azar (genoteca o librería genómica); 2) a través de la transcripción revertida de los ARN mensajeros (ARNm) del organismo en estudio, generando una biblioteca de moléculas de ADN complementario (clonoteca o librería de ADNc); 3) a través de la amplificación por PCR de secuencias conocidas utilizando "primers" específicos y 4) a través de la conversión en sondas de bandas de RAPD o AFLP seleccionadas y obtenidas en geles de electroforesis por medio de amplificaciones por PCR. Un punto importante en la selección y utilización de las sondas, es que sean de copia única o de bajo nú-

mero de copia. Las sondas que poseen ADN repetitivo hibridan con varios fragmentos en la membrana, lo cual impide poder analizarlas porque se obtiene un patrón de "chorreado". Esto impide el análisis de los loci y sus alelos, como así también el análisis mendeliano. Los clones de ADNc en general son de copia única y, por lo tanto, son más adecuados para el análisis. Existen genotecas enriquecidas con clones de copia única, lo cual favorecen su utilización. Como en la actualidad aún no existen sondas homólogas para la mayoría de las especies y en particular para *Paspalum* u otra gramínea apomíctica, se recurrió a la utilización de sondas heterólogas, aprovechando el alto grado de homología de las secuencias nucleotídicas de los genes y el alto grado de conservación de los mapas genéticos de estos genes en especies taxonómicamente relacionadas. Esta sintenia evolutiva existe también entre los genomas de las especies de gramíneas. Este fenómeno fue descubierto primero en tomate y papa, dos especies pertenecientes a la misma familia, mediante mapeo comparativo de ambos genomas. Se encontraron que ambas especies solamente diferían en cinco inversiones de brazos cromosómicos (Bonierable *et al.* 1988; Tanksley *et al.* 1992). Posteriormente, también a partir de mapeo comparativo entre diferentes especies de gramíneas, principalmente los cereales, se determinó la gran similitud que existe en la constitución de los cromosomas y en el ordenamiento lineal de los genes o marcadores dentro de los mismos. Varias son las citas existentes que hacen referencias a esta particularidad en la similitud entre los genomas de las gramíneas (Ahn y Tanksley 1993; Ahn *et al.* 1993; Bennetzen y Freeling 1993; Moore *et al.* 1993, 1995a y b; Moore 1995; Devos *et al.* 1995; Devos y Gale 1997; Glaszmann *et*

Devos *et al.* 1995; Devos y Gale 1997; Glaszmann *et al.* 1997). Estos trabajos determinaron que las gramíneas poseen aproximadamente los mismos genes ordenados casi en el mismo orden. Las diferencias existentes entre las especies en los caracteres morfológicos y del comportamiento, se deben a variaciones alélicas para un mismo gen o la adquisición de nuevas funciones codificadas por nuevos genes (Bennetzen y Freeling 1993). Este descubrimiento permitió la utilización de sondas heterólogas entre las distintas especies de gramíneas y la comparación entre los genomas de las mismas.

La utilización de 73 clones de RFLP pertenecientes a tres genotecas diferentes, una de maíz y dos de arroz, permitió realizar una amplia prospección de todo el genoma de *P. notatum*. Para la elección de las genotecas se tuvieron en cuenta los antecedentes previos existentes en el uso de las mismas en otras especies apomícticas. Esto permite poder comparar los resultados obtenidos con cada una de las especies. La genoteca de maíz utilizada en este estudio es la misma que la utilizada exitosamente en la identificación de marcadores moleculares para apomixis en híbridos de Maíz-*Tripsacum* (Leblanc *et al.* 1995) y en *Bracharia* (Pessino *et al.* 1997). La genoteca de arroz de la Universidad de Cornell fue utilizada en el mapeo de nuevos marcadores de RFLP asociados a la apomixis en *Bracharia* (Pessino *et al.* 1998). La genoteca perteneciente al RGP (Japón) fue utilizada recientemente en la obtención de marcadores moleculares para apomixis en *Paspalum simplex* (Pupilli, comunicación personal). De ésta última, solamente se utilizaron las sondas pertenecientes al grupo de

ligamiento 12 de arroz, debido a que algunas de las mismas fueron encontradas completamente ligadas a la apomixis en dicha especie.

Entre las sondas de maíz y arroz utilizadas en este estudio, las de arroz resultaron ser más informativas que las de maíz. Las sondas de arroz hibridaron con el ADN de *P. notatum* en la mayoría de los casos (92%), revelando un mayor número promedio de loci por sonda. Por otro lado, con las sondas de arroz se obtuvo un mayor número de sondas polimórficas entre los padres (54%) que con las de maíz (24%). A su vez, las sondas de arroz revelaron en promedio un mayor número de loci para cada combinación sonda/enzima que las de maíz, lo cual demuestra un mayor grado de homología con el genoma de *P. notatum*. Los polimorfismos que se obtuvieron con las sondas de arroz fueron observados con las 5 enzimas de corte frecuente utilizadas; mientras que con las de maíz solo fueron observados con algunas de las mismas. En general, las enzimas *EcoRI* y *HindIII* fueron las más informativas con prácticamente todas las sondas ensayadas, generando un mayor número de loci que las demás; como así también la mayor parte de los polimorfismos obtenidos.

De todos los polimorfismos observados con los padres, solamente dos loci lo fueron también con los grupos sexual y apomítico. Los mismos fueron revelados por la misma sonda (C1069) pero cada uno por separado con una enzima distinta (*EcoRI* y *HindIII*). El análisis de segregación realizado sobre 132 individuos de la población (56 apomíticos y 76 sexuales) determinó que se trataba de dos loci completamente ligados al locus de la apomixis. Ningún recombinante fue encontrado entre los individuos de los dos grupos. La totalidad

de las plantas apomícticas obtenidas en la progenie  $F_1$  fueron ensayadas con ambos loci. Ambos siempre estuvieron presentes en todos los individuos apomícticos y ausentes en los sexuales. Las bandas segregaban como fragmentos de restricción de dosis simple (SDRFs).

La detección y el análisis del ligamiento en los poliploides es compleja y requiere de un análisis preliminar para poder comprender el análisis de los resultados obtenidos en *P. notatum*. Existen dos motivos principales que hacen que el estudio del ligamiento en los poliploides sea complicado: 1) Hay un número grande de posibles genotipos para cada locus segregando en la población y estos genotipos no siempre pueden ser identificados fácilmente por su patrón de bandas. En el caso de un tetraploide como *P. notatum*, existen cinco genotipos diferentes (nuliplexo, simplexo, duplexo, triplexo y cuadruplexo); 2) La constitución genómica (alopoliploidía versus autopoliploidía) en muchos poliploides no está determinada fehacientemente. Como ya se mencionó, en *P. notatum* las referencias existentes, sobre la base de evidencias citoembriológicas, determinaron que se trata de un autotetraploide (Forbes y Burton 1961; Quarin *et al.* 1984).

Para resolver estos problemas, Wu *et al.* (1992) propusieron un método general de mapeo en los poliploides basado en la segregación de fragmentos de restricción de dosis simple (SDRFs). El análisis de los mismos requiere determinar el tipo de poliploide del cual se trata (alopoliploide o autopoliploide), el tamaño de la población y la probabilidad de ligamiento. Ellos determinaron que un tamaño promedio de 75 individuos es requerido para identificar un SDRFs

con un 98 % de nivel de confianza. Este tamaño de la población también es adecuado para detectar y estimar ligamiento en fase de acoplamiento, tanto para aloploidía como autopoliploidía; pero sin embargo, en fase de repulsión solamente puede ser detectado en los aloploides. Para determinar el ligamiento en fase de repulsión en los autopolloides, se requiere una población de más de 750 individuos. Para la detección de una alta frecuencia de SDRFs en una población se requiere un padre con alto nivel de heterocigosidad y otro con bajo nivel, de tal manera de incrementar la probabilidad de detectar fragmentos polimórficos.

Un SDRF es un fragmento que segrega en las gametas de plantas heterocigotas con una proporción de 1:1 (presencia:ausencia). La autofecundación de la misma planta producirá una progenie, en la cual una  $\frac{3}{4}$  parte mostrará el fragmento y  $\frac{1}{4}$ , no; mientras que al cruzar dos plantas, una que posee el fragmento y otra que no, solamente la mitad tendrá el fragmento. Un SDRF es considerado equivalente a un alelo simplejo en los autopolloides (herencia polisómica) o a un alelo en un locus heterocigoto en un genoma diploide de un aloploide (herencia disómica). El fenotipo de un marcador SDRF en una progenie segregante representa los tipos de gametas de uno de los padres más que los genotipos producto de la combinación de gametas de ambos padres, como es el caso de varios análisis de ligamiento de RFLP en diploides (Sorrells 1992).

Aplicando los conceptos teóricos del análisis de ligamiento en plantas poliploides a los resultados observados con los RFLP en *P. notatum*, podemos

hacer las siguientes consideraciones: Los dos loci ligados completamente al locus de la apomixis segregan en la población como fragmentos de restricción de dosis simple (SDRFs) para una constitución genotípica de los progenitores de **aaaa** para la planta sexual F131 y **Aaaa** para la planta apomíctica Q4117, considerando un control monogénico, con herencia tetrasómica y apomixis dominante. De acuerdo al concepto de SDRF los dos fragmentos presentes en el padre apomíctico deberían segregarse en la progenie en una proporción de 1aa:1Aa. Es decir, que de los 132 individuos que fueron ensayados para ambos fragmentos, la mitad aproximadamente debería recibir el fragmento con el alelo para apomixis y la otra mitad, no. Esto es visualizado en un film de una membrana hibridada, como  $\frac{1}{2}$  de los individuos con la banda presente y  $\frac{1}{2}$  sin la banda. Sin embargo, esta segregación no fue observada, ya que solamente 56 individuos recibieron la banda y 76 no la recibieron. Esta distorsión en las proporciones esperadas puede ser explicada por la existencia de algún mecanismo modificador, como puede ser un sistema letal asociado al alelo dominante **A** para apomixis, que provoque la existencia de una mayor proporción de individuos sin el fragmento. Si esto fuera cierto, y suponiendo que la letalidad se produjese a nivel gamético, tanto en gametas homocigotas (AA) como heterocigotas (Aa), se debería obtener una mayor proporción de gametas de tipo aa que no portarían el alelo para apomixis. Si tenemos en cuenta estas consideraciones y sobre la base del análisis hecho precedentemente con la segregación fenotípica observada en el cruzamiento sexual X apomíctico y la segregación de los otros marcadores ligados al carácter (RAPD y AFLP), podemos asumir

que el genotipo de la madre sexual F131 debería ser **aaaa**; mientras que el padre apomíctico Q4117 debería ser **Aaaa**. Si la letalidad se produjese en gametas portadoras del alelo para apomixis o en determinadas combinaciones genotípicas apomícticas, las proporciones deberían desviarse de la esperada para un cruzamiento de **aaaa** X **Aaaa**. Esto puede ser visualizado en la segregación de las Figuras 17 y 18. La sonda C1069 revela dos fragmentos tanto para *Eco*RI (Figura 17) como para *Hind*III (Figura 18). Un fragmento, el de menor tamaño en la Figura 17 y el de mayor tamaño en la Figura 18, está presente en todos los individuos de la población (sexuales y apomícticos); mientras que el otro fragmento solamente está presente en las plantas apomícticas. La interpretación de estos resultados es que, si la apomixis y la sexualidad son formas alélicas de un mismo gen, la banda que observamos que está presente en todos los individuos, podría ser el alelo **a**, el cual es portado tanto por los genotipos sexuales (**aaaa**) como por los apomícticos heterocigotas (**Aaaa**, **AAaa**, **AAAa**); mientras que la banda que está presente únicamente en los individuos apomícticos, sería el alelo respectivo **A** específico de las plantas apomícticas (Figura 17 y 18). Si consideramos que la madre posee un genotipo **aaaa**, solamente producirá un tipo de gametas (**aa**). Por su parte, si el padre posee el genotipo **Aaaa**, producirá dos clases de gametas (**Aa** y **aa**), en una proporción de  $\frac{1}{2}$  y  $\frac{1}{2}$  respectivamente, para una segregación cromosómica, y de 1**AA**:12**Aa**:15**aa** para una segregación cromatídica. Si el último caso fuera el considerado, teniendo en cuenta que *P. notatum* es un autotetraploide con un alto grado de formación de cuadrivalentes, las proporciones fenotípicas espe-

rables serían aproximadamente de 13 apomícticos y 15 sexuales; mientras que a nivel molecular sería de 13 individuos portadores de la banda (A<sub>-</sub>) y 15 sin la banda. Sin embargo, en la segregación fenotípica hemos observado una proporción de 2,8:1 entre sexuales y apomícticas y en la parte molecular 56 individuos apomícticos fueron portadores de la banda y 76 sexuales no. Por lo tanto, esta distorsión observada en la segregación tanto en la parte fenotípica como molecular solamente puede ser explicada por un sistema letal asociado al alelo de la apomixis.

La distorsión en la segregación ya fue observada en otras especies de gramíneas apomícticas, tales como en retrocruzas diplospóricas de Maíz-*Tripsacum* (Grimanelli *et al.* 1998), en retrocruzas de *Pennisetum* (Ozias-Akins *et al.* 1993, 1998) y en un trabajo reciente en híbridos F<sub>1</sub> de *Paspalum simplex* (Pupilli, comunicación personal). En la primera especie se realizaron varias generaciones de retrocruzas a partir de un cruzamiento entre maíz diploide ( $2n = 2x = 20$ ) y *Tripsacum dactyloides* tetraploide ( $2n = 4x = 72$ ). En una progenie F<sub>1</sub> de 42 individuos se obtuvo una segregación de 23 plantas diplospóricas y 29 sexuales. Esta segregación no difiere de 1:1 para un modelo monogénico y con apomixis dominante (Leblanc *et al.* 1995). Sin embargo, el análisis de la segregación observado en dos generaciones de retrocruzas (BC<sub>2</sub> y BC<sub>4</sub>), obtenidas a partir de la anterior población híbrida, difiere de un modelo herencia Mendeliana simple con segregación 1:1 (Grimanelli *et al.* 1998). Las distintas generaciones de retrocruzas fueron obtenidas a partir del cruzamiento de híbridos F<sub>1</sub> apomícticos macho estériles como madre y plantas de maíz como dador de

polen. En la segunda generación de retrocruzas (BC<sub>2</sub>) obtuvieron una segregación de 16:1 entre plantas sexuales y apomícticas. Grimanelli *et al.* (1998) explicaron que la fuerte distorsión observada en favor de las plantas sexuales, se podría deber a la eliminación del segmento responsable de la apomixis en dichas generaciones. Para explicar como funciona este mecanismo, propusieron la existencia de un sistema letal parecido al propuesto por Nogler (1984b) para *Ranunculus*, con dos variantes de acuerdo a que el factor letal actúe en configuración *cis* (esté en el mismo cromosoma que el alelo para apomixis) o en *trans* (sobre el cromosoma homólogo). A su vez consideraron la posibilidad de que exista entrecruzamiento (*crossing over*) entre el alelo para apomixis y el gen letal o que la penetrancia del mismo sea incompleta. De acuerdo con este modelo, si el factor letal actúa en *cis* y es incompletamente penetrante, solamente se obtendrían plantas sexuales; mientras que si el mismo actúa en *trans* y también existe penetrancia incompleta, se produciría una autoeliminación del factor letal, por lo tanto el segmento que controla la apomixis segregaría al azar en la próxima generación. Esta última posibilidad fue considerada como la más probable explicación de la distorsión de la segregación observada en la población BC<sub>2</sub>. La distorsión observada en segregación fenotípica también fue encontrada en los marcadores moleculares ligados a la diplosporia en las retrocruzas apomícticas. Los fragmentos obtenidos con los clones de maíz *csu68* y *umc28* ligados a la apomixis en BC<sub>2</sub> demostró que los mismos co-segregan con las plantas apomícticas y están ausentes en las sexuales.

En la gramínea apospórica *Pennisetum*, Ozias-Akins *et al.* (1998) también observaron una distorsión en las proporciones fenotípicas en favor de las plantas sexuales. A partir de cruzamientos interespecíficos entre un tetraploide inducido de *P. glaucum* ( $2n = 4x = 40$ ) por un hexaploide apomítico de *P. squamulatum* ( $2n = 6x = 54$ ) se obtuvo una  $F_1$  de 397 individuos, de los cuales 235 resultaron ser de reproducción sexual y 162 apomíticos. Esta proporción se aleja de la esperada 1:1 para un modelo de herencia monogénico y segregación cromosómica ( $\chi^2 = 13,42$ ,  $P = <0,001$ ) y de 15:13 (S:A) para una segregación cromatídica ( $\chi^2 = 4,90$ ,  $P = 0,03$ ). Sin embargo, pudo ser colocada bajo un modelo de segregación cromatídica y con letalidad gamética ( $\chi^2 = 2,00$ ,  $P = 0,16$ ). La falta de recombinación alrededor del locus de la apomixis y la parcial hemicingosis que fue detectada con algunas sondas obtenidas a partir de los fragmentos específicos de la apomixis, los llevó a designar a dicha región, como específica de las plantas apospóricas. Las posibles causas de la falta de recombinación ya fueron discutidas en el punto 7.2.2 donde se analizó los resultados obtenidos con RAPD.

Los dos fragmentos ligados 100 % a la apomixis en *P. notatum* fueron obtenidos con la sonda C1069 la cual mapea en la región telomérica del brazo largo del cromosoma 12 de arroz. No se encontró ningún otro polimorfismo entre BS y BA que pudiese estar relacionado con la región responsable de la aposporia. Todas las demás bandas que fueron polimórficas entre los padres fueron monomórficas entre BS y BA. Algunos polimorfismos entre los padres fueron ensayados con 30 individuos de la población para determinar su patrón

de segregación. Dos loci segregaron como SDRFs en una proporción cercana a 1:1 y fueron independientes del sistema de reproducción. Un locus segregó en una proporción cercana a 5:1 tal cual es la característica de los fragmentos de restricción de dosis doble (DDRFs). Este tipo de segregación es esperable para plantas autotetraploides como es el caso de *P. notatum*. Por último, un locus polimórfico entre los padres segregó en forma distorsionada en los 30 individuos ensayados, sin poder atribuírsele a un SDRF o DDRF. Si bien la muestra que se utilizó para determinar el patrón de segregación es pequeña, esta misma observación fue obtenida en *P. simplex* mediante análisis de segregación de 30 fragmentos presentes en el padre apomítico y ausentes en la madre sexual (Pupilli, comunicación personal). En ese trabajo se observó que 21 fragmentos segregaban como SDRFs, 3 como DDRFs y 6 fragmentos tuvieron una segregación distorsionada. Estos resultados son coincidentes con los obtenidos en este estudio y demuestran que aproximadamente un 20 % de los fragmentos en ambas especies segregan en forma distorsionada, con lo cual estaría demostrando que la distorsión en la segregación observada en los marcadores ligados al locus de la apomixis, también es producida en otras regiones del genoma que no necesariamente están relacionadas con dicho carácter.

El hecho que ninguna otra sonda de arroz y maíz fuera encontrada asociada a la apomixis en *P. notatum* indica que el carácter está ubicado en un locus simple y que un área bien definida de un cromosoma es la responsable de la expresión de la aposporia. Para determinar el área específica del cromosoma 12 de arroz que está relacionado con la aposporia, se ensayaron sondas

adicionales de la serie RGP, algunas de las cuales como C901, fueron encontradas completamente ligadas a la aposporia en *P. simplex*, mientras que las restantes fueron tomadas al azar a lo largo de todo el grupo de ligamiento. Con ninguna de tales sondas pudo observarse fragmentos que estuviesen relacionados con la aposporia o inclusive que fuesen polimórficos entre los padres. Inclusive con algunas sondas, como R1684 y C449 que mapean a 9.3 y 24.3 cM de C1069, no se pudo detectar ningún fragmento homeólogo a *P. notatum*. De todas las sondas del cromosoma 12 ensayadas, C1709 es la que mapea más cerca (5,9 cM) de C1069 y tampoco está relacionada con el locus de la apomixis. Esto demuestra que probablemente la región relacionada con la apomixis en arroz es mucho más específica que la que fue encontrada en *P. simplex*. En dicha especie, con la sonda C901 se encontraron dos fragmentos que estaban ligados 100 % en fase de acoplamiento con el locus de la apomixis. También las sondas C1069 y C454 detectaron fragmentos ligados completamente al carácter. Estas dos últimas sondas mapean en la misma posición del cromosoma 12 de arroz (Horushima 1998). Por otro lado, las sondas C885 y C995 que mapean sobre el cromosoma 1 de arroz, fueron ubicadas en la misma región del locus de la apomixis en *P. simplex*, a una distancia de 1,6 cM. Por su parte, la sonda R202, que mapea en los cromosomas 2 y 8 de arroz, fue ubicada dentro de la misma región del locus de la apomixis a una distancia de 11,4 cM (Pupilli, comunicación personal). La utilización de una nueva serie de sondas del grupo 12 de arroz le permitió a Pupilli encontrar otras dos sondas (R1759 y C996A) completamente ligadas a la apomixis y que mapean entre

C1069 y C901. El área total del cromosoma 12 de arroz que está relacionada a la apomixis en *P. simplex* abarca 12,2 cM. En los 5 marcadores que fueron encontrados ligados a la apomixis en *P. simplex* no se observó ningún evento de recombinación en las 87 plantas utilizadas en el análisis. Estos resultados son coincidentes con los obtenidos en este estudio con *P. notatum*, como así también lo observado en *Pennisetum* (Ozias-Akins *et al.* 1998) y en híbridos de Maíz-*Tripsacum dactyloides* (Grimanelli *et al.* 1998b). La falta de recombinación puede ser atribuida a la localización del locus de la apomixis en regiones centroméricas o en otras regiones heterocromáticas dentro del cromosoma donde se sabe que la recombinación es baja (Wu y Tanksley 1993). Sin embargo, el mapeo comparativo hecho mediante sondas de maíz en *Brachiaria* y *Tripsacum*, y de maíz y arroz en *P. simplex* y *P. notatum*, revelaron que el locus de la apomixis posee una localización telomérica en los respectivos segmentos homeólogos de maíz y arroz. En *Brachiaria* las sondas relacionadas a la apomixis mapean en el extremo distal del brazo largo del cromosoma 5 de maíz, en *Tripsacum* por su parte lo hacen en el extremo distal del brazo largo del cromosoma 6; mientras que en *P. simplex* y *P. notatum* se ubican en el extremo distal del brazo largo del cromosoma 12 de arroz. La falta de recombinación en estas especies puede deberse al hecho que los segmentos teloméricos homólogos de maíz y arroz hayan sido introducidos durante la especiación de las respectivas especies mediante una traslocación y se hayan ubicados en regiones centroméricas u otras heterocromáticas. Moore *et al.* (1995a) planteó la hipótesis de que la relación de sintenia que existe entre las especies de gramíneas en la composición y ordenamiento de los genes, se debe a que

míneas en la composición y ordenamiento de los genes, se debe a que todas evolucionaron a partir de un ancestro común, cuyo genoma estaba formado por segmentos ligados, los cuales al ser rotos y reorganizados como bloques nuevos, interpuestos por secuencias repetitivas y no codificantes, dieron origen a los cromosomas de las especies actuales. Si todos los bloques están relacionados a los de arroz, observamos que la parte telomérica del brazo largo del cromosoma 12 de arroz, designada como 12a por Moore *et al.* (1997), ha sido reorganizada e integrada a otros bloques, para dar origen al segmento del cromosoma de *Paspalum* que porta el locus para la apomixis.

Los resultados obtenidos en diferentes especies de gramíneas apospóricas y diplospóricas mediante análisis molecular, sugieren que la apomixis podría estar controlada por un grupo (*cluster*) de loci ligados. La falta de recombinación alrededor del locus de la apomixis sería importante para mantener la herencia del carácter y evitar la dispersión de un grupo de genes que están acoplados en su función (Grimanelli *et al.* 1998a). El mapeo comparativo, realizado mediante los loci asociados a la diplosporia en la población segregante de Maíz-*Tripsacum* tetraploide, entre el citotipo diploide y tetraploide de *Tripsacum* y el segmento de maíz relacionado con la diplosporia, reveló que las mismas sondas detectaron los mismos grupos de ligamiento en ambos niveles de ploidía de *Tripsacum*. Sin embargo, a nivel diploide se observó que la recombinación se produce dentro del grupo de ligamiento, a diferencia del nivel tetraploide (Grimanelli *et al.* 1998a).

Las diferencias encontradas entre los resultados coincidentes de *Pennisetum squamulatum*, *Tripsacum*, *P. simplex* y *P. notatum* con los de *Brachiaria* y *Pennisetum ciliare* pudieron deberse a errores operacionales que condujeron a una mala clasificación del sistema reproductivo, como así también al tamaño de las poblaciones utilizadas en el análisis. El mapeo comparativo realizado entre algunas especies apomícticas y gramíneas sexuales como maíz y arroz, demostró que la aposporia y la diplosporia involucran regiones genómicas distintas. La diplosporia en *Tripsacum* fue vinculada con marcadores que mapean en el cromosoma 6 de maíz, mientras que la aposporia en *Brachiaria* está relacionada con marcadores ubicados en el cromosoma 5 de maíz y segmentos genómicos de los cromosomas 2 y 3 de arroz. Por otro lado, en *Paspalum* los datos obtenidos en este estudio y los aportados por Pupilli (comunicación personal) en otra especie del género, coinciden en que los marcadores del grupo 12 de arroz son los que están relacionados con la aposporia. Esta es una nueva región que no había sido anteriormente relacionada a la aposporia con ninguna otra especie. Si bien a simple vista se podría pensar que se trata de regiones diferentes involucradas en ambos procesos apomícticos, es muy prematuro afirmarlo ya que se necesitan mayores evidencias. De acuerdo a Savidan (2000) la utilización de una serie de sondas en común entre todas las especies apomícticas que están siendo estudiadas permitirá obtener información que nos permita poder comparar los dos principales procesos como son la aposporia y la diplosporia. Todavía son pocos los estudios realizados a nivel molecular

para poder determinar fehacientemente las diferencias o similitudes entre los distintos tipos de apomixis para cada una de las especies.

## **VIII. CONCLUSIONES**

El análisis en conjunto de los resultados obtenidos mediante el análisis genético y molecular de la apomixis en *P. notatum* permite sacar las siguientes conclusiones:

1) La apomixis en esta especie posee un control genético complejo donde a priori se comporta como un carácter monogénico, con herencia tetrasómica y dominancia sobre la sexualidad, pero bajo la influencia de algún factor o factores que modifican la segregación en progenies originadas de cruzamientos sexuales X apomícticos.

2) La identificación de 6 marcadores moleculares completamente ligados a la reproducción apomíctica sin la presencia de ningún individuo recombinante, indica que se trata de una región genómica donde probablemente la recombinación está reprimida por algún mecanismo aún no determinado.

3) El análisis mediante marcadores de RFLP, a partir de sondas heterólogas, permitió detectar una homología entre el locus de la apomixis y la región telomérica del brazo largo del cromosoma 12 de arroz. Esta región nunca había sido relacionada con la apomixis en otra especie.

Los aportes realizados en este estudio contribuyen al conocimiento sobre el sistema de reproducción apomíctica en las gramíneas en general y en particular en *Paspalum*, donde hasta ahora no se había realizado ningún otro trabajo similar. Este estudio fue el primer paso de un objetivo mayor, que es la identificación de los factores responsables del carácter, para luego poder ser aislados, caracterizados molecularmente y finalmente ser transferido a aquellos

cultivos de importancia económica. Por otro lado, los marcadores moleculares detectados en *P. notatum*, podrán ser utilizados inmediatamente en la selección de individuos apomícticos superiores en programas de mejoramiento de la especie, como así también en otros estudios como puede ser la determinación del grado de conservación de tales regiones genómicas en las distintas especies apomícticas dentro del género.



.....  
Ing. Agr. Eric J. Martínez



.....  
Dr. H. Esteban Hopp  
Director de Tesis



.....  
Ing. Agr. Camilo L. Quarín  
Co-director de Tesis

## **IX. ANEXO**

A partir de la secuenciación de uno de los fragmentos de RAPD (UBC243) ligado completamente a la apomixis en *P. notatum* se realizó una búsqueda de homología con secuencias nucleotídicas y secuencias proteicas existentes en la siguiente base de datos de Internet: [www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi) Las secuencias encontradas dieron valores muy bajos de homología con el fragmento UBC243 por lo tanto no pudo ser relacionado a ninguna secuencia nucleotídica ni proteica conocida.

Por otra parte, a partir de la detección de la sonda de arroz C1069 que mapea en el cromosoma 12 de arroz, se realizó una busca de genes de función conocida y proteínas que pudiesen tener algún tipo de relación con el proceso apomíctico y que estén ubicadas en el cromosoma 12. En la base de datos de arroz ubicada en el sitio: <http://shigen.lab.nig.ac.jp/rice/oryzabase> se encontraron algunas isoenzimas como Acp1, Acp2, Acp3 y Sdh1, genes relacionado con la esterilidad en los híbridos S15(S10) y S17(t), peroxidasas como Pox2, y algunos otros genes relacionados con características morfológicas y enfermedades del arroz. También se encontró un gen relacionado con el desarrollo del gametofito (ga13) que podría ser de particular interés. Por su parte, en el sitio :

<http://rgp.dna.affrc.go.jp/publicdata/geneticmap98/chr12pre.html>

se encontraron varias proteínas de diferentes organismos que tienen homología con secuencias de los marcadores de arroz que mapean en el cromosoma 12. De particular interés es un transposón de maíz (transposon MuDR) que tiene homología con la secuencia del marcador C1069 y un factor

de la iniciación de la transducción de la subunidad 2 gamma de *Saccharum* que tiene homología con marcadores de arroz que mapean a 3.6 cM de C1069.

En un futuro trabajo se podrá establecer si algunos de estos genes o proteínas pueden ser potenciales candidatos a cumplir algún rol en el proceso apomíctico.

## **X. REFERENCIAS**

- Åkerberg, E. y A. Nygren (1959). *Poa pratensis, trivalis, palustris, compressa* undverwandte Arten. In: H. Kappert & W. Rudorf (eds), *Züchtung der Futterpflanzen*, Paul Parey, Berlin, p. 392-418.
- Al-Janabi, S.M., Honeycutt, R.J., McClelland, M. y B.W.S. Sobral (1993). A genetic Linkage Map of *Saccharum spontaneum* L. 'SES 208'. *Genetics* 134:1249-1260.
- Allard, R.W. (1960). *Principles of plant breeding*. John Wiley & Sons, Inc.
- Altamiranda, V. J. (1983) "Pasto Horqueta: Método de reproducción y distribución geográfica". Trabajo Final de Graduación FCA-UNNE.
- Ahn, S., Etersson, J.A., Sorrells, M.E. y S.D. Tanksley (1993). Homoeologous relationships of rice, wheat and maize chromosomes. *Mol. Gen. Genet.* 241:483-490.
- Ahn, S. y S.D. Tanksley (1993). Comparative linkage maps of the rice and maize genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* 90:7980-7984.
- Asker, S.E. (1970a). Apomixis and sexuality in the *Potentilla argentea* complex. I. Crosses with other species. *Hereditas* 66:127-144.
- Asker, S.E. (1970a). Apomixis and sexuality in the *Potentilla argentea* complex. II. Crosses within the complex. *Hereditas* 66:189-204.
- Asker, S.E. (1971). Apomixis and sexuality in the *Potentilla argentea* complex. III. euploid and aneuploid derivatives (including trisomics) of some apomictic biotypes. *Hereditas* 67:111-142)
- Asker, S.E. (1977). Pseudogamy, hybridization, and evolution in *Potentilla*. *Hereditas* 87:179-184.

- Asker, S.E. (1979) Progress in apomixis research. *Hereditas*. 91 231-240.
- Asker, S.E. (1980) Gametophytic apomixis: elements and genetic regulation. *Hereditas*. 93 277-293.
- Asker, S.E. y L. Jerling (1992). Apomixis in plants. CRC Press, Boca Raton.
- Balintkurti, P.J., Dixon, M.S., Jones, D.A., Narkott, D.A. y J.D.G. Jones (1994). RFLP linkage analysis of the *CF-4* and *CF-9* genes for resistance to *Cladosporium fulvum* in tomato. *Theor. Appl. Genet.* 88:691-700.
- Barcaccia, G, A. Mazzucato, E., Albertini, J., Zethof, A., Gerats, M., Pezzotti, M. y M. Falcinelli. (1998). Inheritance of pathenogenesis in *Poa pratensis* L.: auxin test and AFLP linkage analyses support monogenic control. *Theor. Appl. Genet.* 97:74-82.
- Barone, A., Ritter, E., Schachtschabel, U., Debener, T., Salamini, F. y C. Gebhardt (1990). Localization by restriction fragment length polymorphisms mapping in potato of a mayor dominant gene conferring resistance to the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Mol. Gen. Genet.* 224:177-182.
- Barua, U.M., Chalmers, K.J., Hacket, C.A., Thomas, W.T.B., Powell, W. y R. Waugh (1993). Identification of RAPD markers linked to a *Rhynchosporium secalis* resistance locus in barley using near-isogenic lines and bulked segregant analysis. *Heredity* 71:177-184.
- Bashaw, E.C., Hovin A.W. y E.C. Holt (1970). Apomixis, its evolutionary significance and utilization in plant breeding. Pages 245-248 in M. J. T. Nor-

- man, ed. Proc. Eleventh Int. Grasslands Congr. University of Queensland Press, St. Lucia.
- Bashaw, E.C. (1980). Apomixis and its implication in crop improvement. p. 45-68. In W. R. Fehr and H. H. Hadley (eds.), Hybridization of crop plants. *Am. Soc. Agron.*, Madison, WI.
- Battaglia, E. (1948). Ricerche sulla parameiosi restituzionale nel genere *Taraxacum*. *Caryologia* 1:1-47.
- Battaglia, E. (1963). Apomixis. p. 221-264. In: P. Maheshwari (ed.), Recent advances in the embryology of angiosperms. *Indian Soc. Plant Morphologists*, New Delhi, India.
- Battaglia, E. (1991). Embryological questions: 16. Unreduced embryo sacs and related problems in angiosperms (apomixis, cyclosis, cellularization) *Atti Soc. Tosc. Sci. Nat., Mem., Serie B*, 98:1-134.
- Beek, J.G. van der., Verkerk, R., Zabel, P. y P. Linhout (1994). Mapping strategy for resistance genes in tomato based on RFLPs between cultivars: *Cf-9* (resistance to *Cladosporium fulvum*) on chromosome 1. *Theor. Appl. Genet.* 84:106-112.
- Bennetzen, J.L. y M. Freeling (1993). Grasses as a single genetic system: genome composition, collinearity and compatibility. *Trends Genet.* 9:259-261.
- Bentolila, S.; Guitton, C.; Bouvet, N.; Sailland, A.; Nykaza, S. y G. Freyssinet (1991). Identification of an RFLP marker tightly linked to the *Htl* gene in maize. *Theor. Appl. Genet.* 82:393-398.

- Bergman, B. (1941). Studies on the embryo sac mother cell and its development in *Hieracium*, subg. *Archieracium*. *Svensk Bot Tidskr.* 35:1-42.
- Bergman, B. (1950). Meiosis in two different clones of the apomictic *Chondrilla juncea*. *Hereditas* 36:297-320.
- Bergman, B. (1951). On the formation of reduced and unreduced gametophytes in the females of *Antenaria carpatica*. *Hereditas* 37:501-518.
- Berthaud, J. y Y. Savidan (1989). Genetic resources of *Tripsacum* and gene transfer to maize. p. 121-131. In A. Mujeeb-Kazi and L. A. Stich (eds.), *Review of advances in plant biotechnology*, 1985-88. CIMMYT, Mexico; IRRI, Manila.
- Bicknell, R.A., Borst, N.K. y A.M. Koltunow (2000). Monogenic inheritance of apomixis in two *Hieracium* species with distinct developmental mechanisms. *Heredity* 84:228-237.
- Bleas, M.J., De Grandis, S.A., Lee, H. y J.T. Trevors (1998). Amplified fragment length polymorphism (AFLP): a review of the procedure and its applications. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 21:99-114.
- Bonierbale, M.W., Plaisted, R.L. y S.D. Tanksley (1988). RFLP maps on a common set of clones reveal modes of chromosomal evolution in potato and tomato. *Genetics* 120:1095-1103.
- Bonilla, J.R. y C.L. Quarín (1997). Diplosporous and aposporous apomixis in a pentaploid race of *Paspalum minus*. *Plant Sci.* 127:97-104.

- Botstein, D., White, R.L., Scolnick, M. y R.W. Davis (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum.* 32:314-331.
- Bremer, G. (1963). Problems in breeding and cytology of sugar cane. VI. Additional contemplations on fertilization and parthenogenesis in *Saccharum*. *Euphytica* 12:178-188.
- Brix, K. (1977). The influence of the daylength on the relationship of sexual and asexual embryo sacs in *Eragrostis curvula* (Shrad.) Nees., *Proc. 6th Congr. South African Gen. Soc.*, Pretoria, p. 170-177.
- Burr, B., Burr, F.A., Thompson, K.H., Albertson, M.C. y C.W. Stuber (1988). Gene Mapping with Recombinant Inbreds in Maize. *Genetics* 118:519-526.
- Burton, G.W. (1940). A cytological study of some species in the genus *Paspalum*. *J. Agric. Res.* 60:193-197.
- Burton, G.W. (1946). Bahia grass types. *Jour. Amer. Soc. Agron.* 38:273:281.
- Burton, G.W. (1948). Artificial fog facilitates *Paspalum* emasculation. *J. Americ. Soc. Agron.* 40:281-282.
- Burton, G.W. (1948). The method of reproduction in common Bahia Grass, *Paspalum notatum*. *J. Americ. Soc. Agron.* 40:443-452.
- Burton, G.W. (1955). Breeding Pensacola bahiagrass. *Paspalum notatum*: I. Method of reproduction. *Agron. J.* 47:311-314.

- Burton, G.W. y I. Forbes (1960). The genetics and manipulation of obligate apomixis in common Bahia Grass (*Paspalum notatum* Flugge). *Proceed. 8th Internatl. Grassl. Congress*, pp 66-71.
- Burton, G.W. (1967). A search for the origin of Pensacola bahiagrass. *Econ. Bot.* 21:379-382.
- Burton, G.W. y W.W. Hanna (1986). Bahiagrass tetraploids produced by making (apomictic tetraploid x di ploid) x diploid hybrids. *Crop Sci.* 26:1254-1256.
- Caponio, I. y C.L. Quarín (1987). El sistema genético de *Paspalum simplex* y de un híbrido interespecífico con *P. dilatatum*. *Kurtziana.* 19:35-45.
- Carman, J.G. (1997). Asynchronous expressin of duplicate genes in angiosperms may cause apomixis, bispory, tetraspory, and polyembryony (review). *Biol. J. Linn. Soc.* 61:51-94.
- Crane, C.F. (1999). Clasification of apomictic mechanisms. In: Y. Savidan, J.G. Carman, and T. Dresselhaus (eds.), *Advances in apomixis research*. CIMMYT & IRD, Mexico (in press).
- Czapik, R. (2000). Apomixis in Monocotyledons. *Grasses: Systematics and Evolution*. Eds S. W. L. Jacobs and J. Everett, (CSIRO: Melbourne).
- Chagué, V., Mercier, J.C., Guénard, M., de Courcel, A. y F. Vedel (1996). Identification and mapping on chromosome 9 of RAPD markers linked to *Sw-5* in tomato by bulked segregant analysis. *Theor. Appl. Genet.* 92:1045-1051.

- Chao, C-Y. (1980). Autonomous development of embryo in *Paspalum conjugatum* Berg. *Bot. Not.* 133:215-222.
- Chase, A. (1929). The North American species of *Paspalum*. *Contr. U. S. Natl. Herb.* 28:1-310.
- Christoff, M. (1942). Die genetische Grundlage der apomiktischen Fortpflanzung bei *Hieracium aurantiacum* L. *Z. Indukt. Abstamm. Vererb.-L.* 80-103-125.
- Christoff, M. y G. Papasova (1943). Die genetischen Grundlagen der apomiktischen Fortpflanzung in der Gattung *Potentilla*. *Z. Indukt. Abstamm. Vererbungslehre* 81:1-27.
- Cleij, G., Bock T.S.M. y B. Lekkerkerker (1976). Crosses between *Beta vulgaris* L. and *Beta lomatogona* F. et M. *Euphytica* 25:539-547.
- Coe, E.H.; Hoisington, D.A y M.G. Neuffer (1990). Linkage map of corn (maize) (*Zea mays* L.) (2n=20). En O'Brien, S.J. (ed) *Genetic Maps*, 5<sup>th</sup> edn. Cold Spring harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, pp. 6.39-6.67.
- Darlington, C.D. (1939). *The evolution of genetic systems*. Cambridge University Press, London.
- Davidse, G. y R.W. Pohl (1974). Chromosome numbers, meiotic behavior, and notes on tropical American grasses (Gramineae). *Can.J.Bot.* 52: 317-328.
- d' Cruz, R. y P.S. Reddy (1971). Inheritance of apomixis in *Dichanthium* species. *Indian J. Genet. Plant Breed.* 31:451-460.

- Demarly, Y. (1979). The concept of linkat. *Proc. Conf. on Broadening Genet. Base of Crops*, Wageningen, 1978. Pudoc, Wageningen, The Netherlands. p. 257-265.
- Den Nijs, A.P.M. y G.E. van Dijk (1993). Apomixis. In: *Plant Breeding, principles and prospects*. Hayward M.D., Bosemark N.O. and Romagosa Y. (eds), Chapman & Hall, London, p. 229-245.
- Devey, M.E., Delfinomix, A., Kinloch, B.B. y D.B. Neale (1995). Random amplified polymorphic DNA markers tightly linked to a gene for resistance to white pine blister rust in sugar pine. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 92:2066-2070.
- Devos, K., Moore G. y M.D. Gale (1995). Conservation of marker synteny during evolution. *Euphytica* 85:367-372.
- Devos, K. y M.D. Gale (1997). Comparative genetics in the grasses. *Plant Molecular Biology* 35:3-15.
- van Deynze, A.E., Sorrells, M.E. y S.R. McCouch (1997). Anchor probes for comparative mapping of grass species. [<http://greengenes.cit.cornell.edu/anchors/>]
- Dujardin, M., y W.W. Hanna (1986). An apomictic polyhaploid obtained from a pearl millet x *Pennisetum squamulatum* apomictic interspecific hybrid. *Theor. Appl. Genet.* 72:33-36.
- Dujardin, M., y W.W. Hanna (1989a). Crossability of pearl millet with wild *Pennisetum* species. *Crop Sci.* 29:77-80.
- Dujardin, M. y W.W. Hanna (1989b). Developing apomictic pearl millet characterization of a BC<sub>3</sub> plant. *J. Genet. Breed.* 43:145-151.

- Ellerström, S. y L. Zagorcheva (1977). Sterility and apomictic embryo-sac formation in *Raphanobrassica*. *Hereditas* 87:107-120.
- Ernst, A. (1918). Bastardierung als Ursache der Apogamie im Pflanzenreich. Fischer, jena.
- Esau, K. (1946). Morphology of reproduction in guayule and certain other species of *Parthenium*. *Hilgardia* 17:61-101.
- Fagerlind, F. (1940). Die Terminologie der Apomixis-Prozesse. *Hereditas*. 26:1-22.
- Fagerlind, F. (1944). Die Samenbildung und die Zytologie bei agamospermischen und sexuellen Arten von *Elatostema* und einigen nahestehenden Gattungen nebst Beleuchtung einiger damit zusammenhängender Probleme. *K Sven Vetenskapsakad Handl* 21(4):1-130.
- Fagerlind, F. (1947). Makrosporogenese und Embryosackbildung bei agamospermischen *Taraxacum* Biotypen. *Svensk Bot Tidskr* 41:365-390.
- Fernandes, M.I.B., Barreto, I.L. y F.M. Salzano (1973). Cytogenetic, ecologic and morphologic studies in brazilian forms of *Paspalum notatum*. *Can. J. Genet. Cytol.* 15:523-531.
- Forbes, I. Jr. y G.W. Burton (1961). Cytology of diploids, natural and induced tetraploids, and intraspecies hybrids of bahiagrass, *Paspalum notatum* Flugge. *Crop. Sci.* 1:402-406.
- Ford, H. y A. J. Richards (1985). Isozyme variation within and between *Taraxacum* agamospecies in a single locality. *Heredity* 55:289-291.

- Funk, C.R. y S.J. Han (1967). Recurrent intraspecific hybridisation: a proposed method of breeding Kentucky bluegrass, *Poa pratensis*. *N. J. Agric. Exp. Sta. Bull.* 818, p.3-14.
- Gebhardt, C., Ritter, E., Barone, A., Debener, T., Walkemeier, B., Schanchtschabel, U, Kaufmann, H., Thompson, R.D., Bonierbale M.W., Ganal, M.W., Tanksley, S.D. y F. Salamini (1991). RFLP maps of potato and their alignment with the homeologous tomato genome. *Theor. Appl. Genet.* 83:49-57.
- Giraudat, J., Hauge, B., Valon, C., Smalle, J., Parcy, F. y H. Goodman (1992). Isolation of the Arabidopsis *ABI3* Gene by Positional Cloning. *Plant Cell.* 4:1251-1261.
- Glaszmann, J.C., Dufour, P., Grivet, L., D'Hont, A., Deu, M., Paulet, F. y P. Hamon (1997). Comparative genome analysis between several tropical grasses. *Euphytica* 96:13-21.
- Gould, F.W. (1966). Chromosome numbers of some Mexican grasses. *Canad. J. Bot.* 44:1683-1696.
- Grimanelli, D., Leblanc O., Espinosa E., Perotti E., González de León D. y Y. Savidan (1998a). Mapping diplosporous apomixis in tetraploid *Tripsacum*: one gene or several genes? *Heredity* 80:33-39.
- Grimanelli, D., Leblanc, O., Espinosa, E., Perotti, E., Gonzalez De Leon, D. y Y. Savidan (1998b). Non-Mendelian transmission of apomixis in maize-*Tripsacum* híbridos caused by a transmission ratio distortion. *Heredity* 80: 40-47.

- Gustafsson, Å. (1946). Apomixis in higher plants. Part I. The mechanisms of apomixis. *Lunds Univ. årsskr. N. F. Avd. 2*, 42:1-66.
- Gustafsson, Å. (1947a). Apomixis in higher plants. Part II. The causal aspect of apomixis. *Lunds Univ. årsskr. N. F. Avd. 2*, 43:71-178.
- Gustafsson, Å. (1947b). Apomixis in higher plants. Part III. Biotype and species formation. *Lunds Univ. årsskr. N. F. Avd. 2*, 43:183-370.
- Gustine, D.L., Sherwood R.T. y D.R. Huff (1997). Apospory-linked molecular markers in buffelgrass. *Crop Sci.* 37:947-951.
- Haacke, W. (1893a). Gestaltung und Vererbung. Eine Entwicklungsmechanik der Organismen. *Leipzig*.
- Haacke, W. (1893b). Die Träger der Vererbung. *Biol. Centralblatt*, 13:525-542.
- Hair, J. B. (1956). Subsexual reproduction in *Agropyron*. *Hereditas* 10:129-160.
- Håkansson, A. (1943). Die Entwicklung des Embryosacks und die Befruchtung bei *Poa alpina*. *Hereditas*. 29:25-61.
- Hanna, W.W., Powell J.B., Millot J.C. y G.W. Burton (1973). Cytology of obligate sexual plants in *Panicum maximun* Jacq. And their use in controlled hybrids. *Crop. Sci.* 13:695-697.
- Hanna, W.W. y M. Dujardin (1986). Interspecific transfer of apomixis in *Pennisetum*. In: *Proceed. 15<sup>th</sup> Internat. Grassl. Congress, Kyoto. Japan.* p. 249-250.
- Hanna, W.W. y E.C. Bashaw (1987). Apomixis: its identification and use in plant breeding. *Crop Sci.* 27:1136-1139.

- Hanna, W.W. (1992). Induced sexual tetraploids for breeding Guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.) . *Journal of Japanese Society of Grassland Science* 38:152-159.
- Hanna, W.W., Dujardin, M., Ozias-Akins, P., Lubbers, E. y L. Arthur (1993). Reproduction, cytology, and fertility of pearl millet x *Pennisetum squamulatum* BC<sub>4</sub> plants. *J. Hered.* 84:213-216.
- Hanna, W.W. (1995). Use of apomixis in cultivar development. *Adv. Agron.* 54:333-350.
- Harlan, J.R., Brooks M.H., Borgaonkar D.S. y J.M.J. deWet (1964). Nature and inheritance of apomixis in bothriochloa and Dichanthium. *Bot. Gaz.* 125:41-46.
- Harlan, J.R. y J.M.J. de Wet (1975). On Ö. Winge and a prayer: The origins of polyploidy. *Bot Rev.* 41:361-390.
- Hart, G.E. (1994). RFLP maps of bread wheat. R.L. Phillips and Vasil I.K. (eds.) Kluwer Academic Publishers. The Netherlands. 327-358.
- Harushima Y. (1998). A high-density rice genetic linkage map with 2275 markers using a single F<sub>2</sub> population. *Genetics* 148:479-494
- Hashemi, A., Estilai, A. y J. Waines (1989). Cytogenetics and reproductive behavior of induced and natural tetraploid guayule (*Parthenium argentatum* Gray). *Genome* 32:1100-1104.
- Hayward, M.D. (1998). The Genetics of Apomixis. In: *Proceedings VIIth International Symposium Plant Evolution in Man-made Habitats*, Universiteit van Amsterdam, The Netherlands, p. 1-14.

- He, Q., Viljanen, M.K. y J. Mertsola (1994). Effects of thermocyclers and primers on the reproducibility of banding patterns in randomly amplified polymorphic DNA analysis. *Mol. Cell Probes*. 8:155-160.
- Herr, J.M. (1971). A new clearing-squash technique for the study of ovule development in angiosperms. *Amer. J. Bot.* 58:785-790.
- Hill, W.G. (1998). A note on the theory of artificial selection in finite populations and application to QTL detection by bulk segregant analysis. *Genet. Res.* 72:55-58.
- Hoisington, D., Khairallah, M. y D. González de León (1994). Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory. CIMMYT. Segunda edición, México, D.F.
- Holm, S. y L. Ghatnekar (1996). Sexuality and no apomixis found in crossing experiments with diploid *Potentilla argentea*. *Hereditas* 125:77-82.
- Holm, S., Ghatnekar, L. y B.O. Bengtsson (1997). Selfing and outcrossing but no apomixis in two natural populations of diploid *Potentilla argentea*. *J. Evol. Biol.* 10:343-352.
- Holmgren, I. (1919). Zytologische Studien über die Fortpflanzung bei den Gattungen *Erigeron* und *Eupatorium*. *K Sven Vetenskapsakad Handl.* 59:1-118.
- Huff, D.R. y J.M. Bara (1993). Determining genetic origins of aberrant progeny from facultative apomictic Kentucky bluegrass using a combination of flow cytometry and silver-stained RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 87:201-208.

- Izmailow, R. (1965). Megasporogenesis in the apomictic species *Ranunculus cassubicus*. *Acta Biol Cracov Ser Bot* 8:183-195.
- Izmailow, R. (1976). Problem of apomixis in the *Ranunculus auricomus* group. *Acta Biol Cracov Ser Bot* 19:15-28.
- Jassem, B. (1976). Embryology and genetics of apomixis in the section *Corollinae* of the genus *Beta*. *Acta Biol Cracov Ser Bot*. 19:149-172.
- Jefferson, R.A. (1994). Apomixis: a social revolution for agriculture? *The Monitor* 19:14-16.
- Jones, C.J., Edwards, K.J., Castaglione, S., Winfield, M.O., Sala, F., van de Wiel, C. G., Bredemeijer, B., Vosman, M., Matthes, A., Daly, R., Bretschneider, P., Bettini, M., Buiatti, E., Maestri, A., Malcevski, N., Marmioli, R., Aert, G., Volckaert, J., Rueda, R., Linacero, A., Vazquez R. y A. Karp. (1997). Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Molecular Breeding* 3:381-390.
- Kindiger, B., Bai D. y V. Sokolov (1996). Assignment of a gene(s) conferring apomixis in *Tripsacum* to a chromosome arm: cytological and molecular evidence. *Genome* 39:1133-1141.
- Kindiger, B. y C.L. Dewald (1996a). A system for genetic change in apomictic eastern gamagrass. *Crop Sci.* 36:250-255.
- Kindiger, B. y C.L. Dewald (1996b). The reproductive versatility of Eastern Gamagrass. *Crop Sci.* 37:1351-1360.

- Knox, R.B. y J. Heslop-Harrison (1963). Experimental control of aposporous apomixis in a grass of the Andropogoneae. *Bot. Not.* 116:127-141.
- Kojima, A., Kozono, T., Nagato, Y. y K. Hinata (1994). Non-parthenogenetic plants detected in Chinese chive, a facultative apomictic. *Japan J. Breeding (Japan)* 44:143-149.
- Koltunow, A.M. (1993). Apomixis: embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. *Plant Cell* 5:1425-1437.
- Koltunow, A.M., Bicknell R.A. y A.M. Chaudhury (1995). Apomixis: Molecular strategies for the generation of genetically identical seeds without fertilization. *Plant Physiol.* 108:1345-1352.
- Lacadena, J.R. (1988). Genética. 4º Edición. Madrid
- Leblanc, O., Grimanelli D., González-de-León D. y Y. Savidan (1995). Detection of the apomictic mode of reproduction in maize-Tripsacum hybrids using maize RFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* 90:1198-1203.
- Leblanc, O., Grimanelli D., Islam Faridi, N., Berthaud, J. y Y. Savidan (1996). Reproductive behavior in maize-Tripsacum polyhaploid plants: implications for the transfer of apomixis into maize. *J. Hered.* 87:108-111.
- Leonards-Schippers, C., Gieffers, W., Salamini, F. y C. Gebhardt (1992). The R1 gene conferring race-specific resistance to *Phytophthora infestans* in potato is located on potato chromosome V. *Mol. Gen. Genet.* 223:278-283.
- Liljefors, A. (1955). Cytological studies in Sorbus. *Acta Horti. Bergiani.* 16:47-113.

- Litt, M. y J.A. Luty (1989). A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Genet.* 44:398-401.
- Liu, Z. W., Wang, R.C.C. y J.G. Carman. (1994). Hybrids and backcross progenies between wheat (*Triticum aestivum* L.) and apomictic Australian wheatgrass (*Elymus rectisetus* (Nees in Lehm) A Love and Connor): Karyotypic and genome analyses. *Theor. Appl. Genet.* 89:599-605.
- Lubbers E.L., Arthur L., Hanna W.W. y P. Ozias-Akins (1994). Molecular markers shared by diverse apomictic *Pennisetum* species. *Theor. Appl. Genet.* 89:636-642.
- Lyttle, T.W. (1991). Segregation distorters. *Ann. Rev. Genet.* 25:511-557.
- Maass, B.L. (1996). Identifying and naming *Brachiaria* Species. p. ix-xiii. In: J. W. Miles, B. L. Maass, and C. B. do Valle (eds.), *Brachiaria: Biology, agronomy, and improvement*. CIAT-EMBRAPA, CIAT, Cali, Colombia.
- Mackay, I.J. y P.D.S. Caligari (2000). Efficiencies of F<sub>2</sub> and backcross generations for bulked segregant analysis using dominant markers. *Crop Sci.* 40:626-630.
- MacPherson, J.M., Eckstein, P.E., Scoles G.J. y A.A. Gajadhar (1993). Variability of the random amplified polymorphic DNA assay among thermal cyclers, and effects of primer and DNA concentration. *Mol. Cell Probes.* 7:293-299.

- Magoon, M.L. y P.L. Manchanda (1961). A Cytological study of some specie in the genus *Paspalum*. *Division of Botany, Indian Agriculture Research Institute, New.*
- Maire, R. (1900a). L'evolution nucleaire chez les Endophyllum. *Journ. Bot.* 14:80-97,369-382.
- Maire, R. (1900b). L'evolution nucleaire chez les Uredinées. *Compt. Rendus Congrès intern. Botanique Expos. Univ. Paris, 135-150 (1901).*
- Malecka, J. (1971). Cyto-taxonomical and embryological investigations on a natural hybrid between *Taraxacum kok-saghyz* Rodin and *T. officinale* Web. and their putative parent species. *Acta Biol. Cracov. Ser. Bot.* 14:179-197.
- Marcucci Poltri S. (1998). Caracterización Molecular y Cariotípica de la variabilidad genética de germoplasma argentino de *Solanum* L. Tesis doctoral. UBA.
- Martin, G.B., Williams, J.G.K. y S.D. Tanksley (1991). Rapid identification of markers linked to a *Pseudomonas* resistance gene in tomato by using random primers and isogenic lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:2336-2340.
- Martin, G.B.; de Vicente, M.C. y S.D. Tanksley (1992). High-resolution linkage analysis and physical characterization of the *Pto* bacterial resistance locus in tomato. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 6:26-34.
- Martin, G.B., Brommonschenkel, S.H., Chunwongse, J., Frary, A., Ganai, M., Spivey, R., Wu, T., Earle, E. y S. Tanksley (1993). Map-based cloning

- of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science*. 262:1432-1436.
- Martinez E.J, Espinoza, F. y C.L. Quarín (1994). B<sub>III</sub> progeny (2n+n) from apomictic *Paspalum notatum* obtained through early pollination. *Jour. Hered.* 85:295-297.
- Martínez, E.J., Quarín, C.L. y M.D. Hayward (1999). Genetic control of apospory in apomictic *Paspalum* species. *Cytologia* 64:425-433.
- Matzk, F. (1991). New efforts to overcome apomixis in *Poa pratensis* L. *Euphytica* 55:65-72.
- Maughan, P., Saghai Maroof, M., Buss, G. y G. Huestis (1996). Amplified fragment length polymorphism (AFLP) in soybean: species diversity, inheritance, and near isogenic line analysis. *Theor. Appl. Genet.* 93:392-401.
- Mazur, B. y S. Tingey (1995). Genetic mapping and introgression of genes of agronomic importance. *Curr. Opin. in Biotech.* 6:175-182.
- McCouch, S.R. Kochert, G. Yu, Z.H. Khush, G.S. Cofman, W.R. y S.D. Tanksley (1988). Molecular mapping of rice chromosomes. *Theor. Appl. Genet.* 76:815-829.
- Melchinger, A.E. (1990). Use of Molecular Markers in Breeding for Oligogenic Disease Resistance. *Plant Breeding* 104:1-19.
- Meunier, J.R. y P.A. Grimont (1993). Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Res. Microbiol.* 144:373-379.
- Michelmore, R.W., Paran I. y V. Kesselli (1991). Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid

- method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:9828-9832.
- Milbourne D, Meyer, R., Bradshaw J.E., Baird, E., Bonar, N., Provan, J., Powell, W. y R. Waugh (1997). Comparison of PCR-based marker systems for the analysis of genetic relationships in cultivated potato. *Molecular Breeding* 3: 127-136.
- Miles, J.W. y M.L. Escandon (1997) Further evidence on the inheritance of reproductive mode in *Brachiaria*. *Canad. J. Plant Sci.* 77 105-107.
- Mogie, M. (1988a). A model for the evolution and control of generative apomixis. *Biol. J. Linn. Soc.* 35:127-153.
- Mogie, M. y H. Ford (1988b). Sexual and asexual *Taraxacum* species. *Biol. J. Linn. Soc.* 35:155-168.
- Mogie, M. (1992). The Evolution of Asexual Reproduction in Plants. Chapman & Hall, London.
- Moore, G. (1995). Cereal genome evolution: pastoral pursuits with 'lego' genomes. *Curr. Biol.* 5:717-724.
- Moore, G., Gale, M.D., Kurata, N. y R.B. Flavell (1993). Molecular analysis of small cereal genomes: current status and prospects. *Bio/Technology* 11:584-589.
- Moore, G., Devos, K.M., Wang, Z. y M.D. Gale (1995a). Grasses, line up and form a circle. *Curr. Biol.* 5:737-739.

- Moore, G., Foote, T., Helentjaris, T., Devos, K.M., Kurata N. y M.D. Gale (1995b). Was there a single ancestral cereal chromosome? *Trends Genet.* 11:81-82.
- Moore, G., Aragon-Alcaide, L., Roberts, M., Reader, S., Miller, T. y T. Foote (1997). Are rice chromosomes components of holocentric chromosome ancestor? *Plant Mol. Biol.* 35: 17-23.
- Morgan, R.N., Ozias-Akins, P. y W.W. Hanna. (1998). Seed set in an apomictic BC<sub>3</sub> pearl millet. *Int. J. Plant Sci.* 159:89-97.
- Muehlbauer, G.J., Staswick, P.E., Specht, J.E., Graef, G.L., Shoemaker, R.C. y P. Keim (1991). RFLP mapping using near-isogenic lines in the soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. *Theor. Appl. Genet.* 81:189-198.
- Müntzing, A. (1940). Further studies on apomixis and sexuality in *Poa*. *Hereditas* 26:115-190.
- Müntzing, A. (1958b). Heteroploidy and polymorphism in some apomictic species of *Potentilla*. *Hereditas* 44:280-329.
- Naumova, T.N. (1993). Apomixis in Angiosperms: nucellar and integumentary embryony. CRC Press, Boca Raton, Fl.
- Noack, L. (1939). Über *Hypericum*-Kreuzungen. VI. Fortpflanzungsverhältnisse und Bastarde von *Hypericum perforatum* L. *Z. Indukt. Abstamm. Vererb.-L.* 76-569-601.
- Nogler, G. A. (1971). Genetik der Aposporie bei *Ranunculus auricomus* s.l.W.Koch. I. Embryologie. *Ber Schweiz Bot Ges* 81:139-179.

- Nogler, G.A. (1975). Genetics of apospory in *Ranunculus auricomus*. IV. Embryology of F<sub>3</sub> and F<sub>4</sub> backcross offspring. *Phytomorphology* 25:485-490.
- Nogler, G.A. (1982). How to obtain diploid apomictic *Ranunculus auricomus* plants not found in the wild state. *Botanica Helvetica* 92:13-22.
- Nogler, G.A. (1984a). Gametophytic apomixis. In: Johri BM (ed). *Embryology of angiosperms*. Springer-Verlag, Berlin, pages 475-518.
- Nogler, G.A. (1984b). Genetics of apospory in apomictic *Ranunculus auricomus*. V. Conclusion. *Botanica Helvetica* 94:411-422.
- Norrman, G.A., Quarin, C. y B.L. Burson (1989). Cytogenetics and reproductive behavior of different chromosome races in six *Paspalum* species. *Jour. Hered.* 80:24-28.
- Noyes, R.D. (2000). Segregation for diplospory and seed production in sexual X agamospermous *Erigeron* hybrids. *Int. J. Plant Sci.* 161:1-12.
- Noyes, R.D. y L.H. Rieseberg (2000). Two independent loci control agamospermy (apomixis) in the triploid flowering plant *Erigeron annuus*. *Genetics* 155:379-390.
- Nygren, A. (1946). The genesis of some Scandinavian species of *Calamagrostis*. *Hereditas* 32:131-262.
- Nygren, A. (1948). Further studies in spontaneous and synthetic *Calamagrostis purpurea*. *Hereditas* 34:113-116.
- Nygren, A. (1951). Form and biotype formation in *Calamagrostis purpurea*. *Hereditas* 37:519-532.

- Nygren, A. (1954). Apomixis in the angiosperms II. *Bot. Rev.* 20:577-649.
- Ortíz, J.P.A., Pessino S.C., Leblanc O., Hayward M.D. y C.L. Quarín (1997). Genetic fingerprinting for determining the mode of reproduction in *Paspalum notatum*, a subtropical apomictic forage grass. *Theor. Appl. Genet.* 95:850-856.
- Osawa, J. (1913). Studies on the cytology of some species of *Taraxacum*. *Arch. Zellforsch.* 10:450-469.
- Ostenfeld, C.H. (1910). Further studies on the apogamy and hybridisation of the Hieracia. *Z. Indukt Abstamm Vererbungslehre* 3:241-285.
- Ozias-Akins, P., Lubbers E.L., Hanna W.W. y J.W. McNay (1993). Transmission of the apomictic mode of reproduction in *Pennisetum*: co-inheritance of the trait and molecular markers. *Theor. Appl. Genet.* 85:632-638
- Ozias-Akins, P., Roche D. y W.W. Hanna (1998). Tight clustering and hemizygosity of apomixis-linked molecular markers in *Pennisetum squamulatum* implies genetic control of apospory by a divergent locus that may have no allelic form in sexual genotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:5127-5132.
- Paran, I., Kesseli, R. y R. Michelmore (1991). Identification of restriction fragment length polymorphism and random amplified polymorphic DNA markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce, using near-isogenic lines. *Genome* 34:1021-1027.

- Paran, I. y R.W. Michelmore (1993). Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor. Appl. Genet.* 85:985-993.
- Parodi, L.R. (1937). Contribución al estudio de las gramíneas del género *Paspalum* de la Flora Uruguaya. *Rev. Del Museo de la Plata* (Nueva serie). 1, Sec. Bot. 211-250.
- Peel, M.D., Carman, J.G., Liu, Z.W. y R.R.C. Wang (1997). Meiotic anomalies in hybrids between wheat and apomictic *Elymus rectisetus* (Nees in Lehm) A Love & Connor. *Crop Sci.* 37:717-723.
- Penner, G.A., Bush, A., Wise, R., Kim, W., Domier, L., Kasha, K., Laroche, A. Scoles, G., Molner, S.J. y G. Fedak (1993). Reproducibility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratories. *PCR Meth. Appl.* 3:341-345.
- Penner, G.A., Chong, J. Levesque-Lemay, M., Molnar, S.J. y G. Fedak (1993). Identification of a RAPD marker linked to the oat stem rust gene *Pg3*. *Theor. Appl. Genet.* 85:702-705.
- Pessino, S.C., Ortiz J.P., Leblanc O., do Valle C.B. y M.D. Hayward (1997). Identification of a maize linkage group related to apomixis in *Brachiaria*. *Theor. Appl. Genet.* 94:439-444.
- Pessino, S.C., Evans, C., Ortíz, J.P.A., Armstead, I., do Valle, C.B. y M.D. Hayward. (1998) A genetic map of the apospory-region in *Brachiaria* hybrids: identification of two markers closely associated with the trait. *Hereditas.* 128:153-158.

- Pessino, S.C., Ortiz J.P.A., Hayward M.D. y C.L. Quarín (1999). The molecular genetics of gametophytic apomixis. *Hereditas*. 130:1-11.
- Pessino, S.C., Espinoza, F., Ortiz, J.P.A., Martínez, E.J., Valle, E.M. y C.L. Quarín (2000). Characterisation of mRNA transcripts differentially expressed in apomictic flowers of *Paspalum notatum*. *Second International Symposium Molecular Breeding of Forage Crops 2000*. Lorne and Hamilton, Victoria, AUSTRALIA. page 11.
- Petrov, D.F., Belousova N.I. y E.S. Fokina (1979). Inheritance of apomixis and its elements in corn-*Tripsacum* hybrids. *Genetika* 15:1827-1836.
- Pozzobon, M.T. y J.F.M. Valls (1997). Chromosome number in germoplasma accessions of *Paspalum notatum* (Gramineae). *Brazilian Journal of Genetics* 20:29.34.
- Powers, L. (1945). Fertilization without reduction in guayule (*Parthenium argentatum* L.) and a hypothesis as to the evolution of apomixis and polyploidy. *Genetics* 30:323-346.
- Pupilli, F., Caceres, M.E., Quarín, C.L. y S. Arcioni (1997). Segregation analysis of RFLP markers reveals a tetrasomic inheritance in apomictic *Paspalum simplex*. *Genome* 40:822-828.
- Quarin C.L. y W.W. Hanna (1980). Effect of three ploidy levels on meiosis and mode of reproduction in *Paspalum hexastachyum*. *Crop Sci.* 20:69-75.
- Quarín, C.L., Burson B.L. y G.W. Burton (1984). Cytology of intra- and inter-specific hybrids between two cytotypes of *Paspalum notatum* and *P. cromyorrhizon*. *Bot. Gaz.* 145:420-426.

- Quarín, C.L. y E.P. Lombardo (1986). Niveles de ploidía y distribución geográfica de *Paspalum quadrifarium* (Gramineae). *Mendeliana* 7:101-107.
- Quarín, C.L. (1986). Seasonal changes in the incidence of apomixis of diploid, triploid, and tetraploid plants of *Paspalum cromyorrhizon*. *Euphytica* 35:515-522.
- Quarín, C.L. y G.A. Norrmann (1987). Relaciones entre el número de cromosomas, su comportamiento en la meiosis y el sistema reproductivo del género *Paspalum*. En: *Anales del IV Congreso Latinoamericano de Botánica*, Bogotá, Colombia. 3:25-35.
- Quarín, C.L., Norrmann, G.A. y M.H. Urbani (1989). Polyploidization in aposporous *Paspalum* species. *Apomixis Newsl.* 2:44-46.
- Quarín C.L. y G.A. Norrmann 1990. Interspecific hybrids between five *Paspalum* species. *Bot. Gaz. (USA)* 15:366-369.
- Quarín, C.L. (1992). The nature of apomixis and its origin in panicoid grasses. *Apomixis Newsletter* 5, 8-15.
- Quarín, C.L. y O.A. Bovo (1995). Apomictic colchicine-induced tetraploid *Paspalum notatum*, *Abstracts of International Conference on Harnessing Apomixis*, College Station, Texas. page 71.
- Quarín, C.L. (1999). Effect of pollen source and pollen ploidy on endosperm formation and seed set in pseudogamous apomictic *Paspalum notatum*. *Sex Plant Reprod.* 11:331-335.

- Richards, A.J. (1986). Plant Breeding systems. George, Allen and Unwin, London. pages 403-456.
- Richards, A.J. (1996). Why is gametophytic apomixis almost restricted to polyploids? The gametophyte-expressed lethal model. *Apomixis News* 9:1-3.
- Rick, C.M. (1965). Abortion of male and female gametes in the tomato determined by allelic interaction. *Genetics* 53:85-96.
- Ritter, E., Debener, T., Barone, A., Salamini, F. y C. Gebhardt (1991). RFLP mapping on potato chromosomes of two genes controlling extreme resistance to potato virus X (PVX). *Mol. Gen. Genet.* 227:81-85.
- Ronald, P.C., Albano, B., Tabien, R., Abenes, L., Wu, K.S., McCouch, S. y S.D. Tanksley (1992). Genetic and physical analysis of the rice bacterial blight disease resistance locus, *Xa21*. *Mol. Gen. Genet.* 236:113-120.
- Rosenberg, O. (1908). Cytological studies on the apogamy in *Hieracium*. *Bot Tidsskr* 28:143-170.
- Rosenberg, O. (1930). Apogamie und Parthenogenesis bei Pflanzen. In: Baur E, Hartmann M (eds) Handbuch Vererbungswiss II (12). Borntraeger, Berlin.
- Saghai-Maroo, M.A., Soliman K.M., Jorgensen R.A. y R.W. Allard (1984). Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81:8014-8018.

- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y T. Maniatis (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2nd. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sano, Y. (1982). The genic nature of gamete eliminator in rice. *Genetics*. 125:183:191.
- Saura, F. (1948). Cariología de gramíneas en Argentina. *Rev. Facultad de Agron. y Vet.* (Univ. de Buenos Aires) 12:51-67.
- Savidan, Y. (1978). Genetic control of facultative apomixis and application in breeding *Panicum maximum*. *Comm. to the XIV Int. Congr. of Genetics*, Moscow, 1978, ORSTOM, Abidjan, Ivory Coast.
- Savidan, Y. (1980). Chromosomal and embryological analyses in sexual X apomictic hybrids of *Panicum maximum* Jacq. *Theor. Appl. Genet.* 57:153-156.
- Savidan, Y. (1982). Nature et hérédité de l'apomixie chez *Panicum maximum* Jacq. *Travaux et Documents OSTROM*, Paris, 153:1-159.
- Savidan, Y. (1983) Genetics and utilization of apomixis for the improvement of guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.) p. 182-184. In: J. A. Smith and V. W. Hayes (eds.), *Proc. Int. Grassl. Congr., 14th*, Lexington, KY. 15-24 June, 1981. Westview Press, Boulder, CO.
- Savidan, Y. (1986). Apomixis as a new tool to increase grain crop productions in semi-arid tropics. A research project. *Agric. Ecosystems Environ.* 16:285-290.

- Savidan, Y., Berthaud, J. y O. Leblanc (1992). Apomixis transfer from *Tripsacum* to maize: production of the first BC<sub>2</sub>s. *Apomixis Newsletter* 6:20-22.
- Savidan, Y. y M. Dujardin (1992). Apomixie: la prochaine révolution verte? *La Recherche* 241:326-334.
- Savidan, Y. y J. Berthaud (1994). Maize x *Tripsacum* hybridization and the potential for apomixis transfer for maize improvement. p. 69-83. In: Y. P. S. Bajaj (ed.), *Biotechnology in agriculture and forestry*, vol. 25, Maize. Springer-Verlag, Berlin.
- Savidan, Y., Leblanc, O. y J. Berthaud (1994). Transferring apomixis to maize. In: *Apomixis: Exploiting hybrid vigor in rice*. IRRI, Los Baños, Philippines.
- Savidan, Y. (2000). Apomixis: Genetics and breeding. *Plant Breeding Reviews* 18:13-86.
- Sax, K. (1959). The cytogenetics of facultative apomixis in *Malus* species. *J. Arnold Arbor* (Harv Univ) 40:289-297.
- Skroch, P. y J. Nienhuis (1995). Impact of scoring error and reproducibility of RAPD data on RAPD based estimates of genetic distance. *Theor. Appl. Genet.* 91:1086-1091.
- Sherwood, R.T., Berg C.C. y B.A. Young (1994). Inheritance of apospory in Buffalo grass. *Crop Sci.* 34:1490-1494.

- Skalińska, M. (1959). Embryological studies in *Poa granitica* Br.Bl., an apomictic species of the Carpathian range. *Acta Biol. Cracov. Ser. Bot.* 2:91-112.
- Sorrells, M.E. (1992). Development and application of RFLPs in polyploids. *Crop Sci.* 32:1086-1091.
- Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98:503-517.
- Sparvoli, E. (1960). Osservazioni cito-embriologiche in *Eupatorium riparium* Reg. II. Megasporogenesi esviluppo del gametofito femminile. *Ann di Bot (rome)* 26:481-504.
- Stam, P. (1993). Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package: JoinMap. *The Plant Jour.* 5:739-744.
- Stebbins, G.L. (1932). Cytology of *Antennaria* II. Parthenogenetic species. *Bot Gaz.* 94:322-344.
- Stebbins, G.L. (1941). Apomixis in the angiosperms. *Bot. Rev.* 7:507-542.
- Stebbins, G.L. (1950). Variation and evolution in plants. Columbia Univ Press, New York.
- Taliaferro, C.M. y E.C. Bashaw (1966). Inheritance and control of obligate apomixis in breeding buffelgrass, *Pennisetum ciliare*. *Crop. Sci.* 6:473-476.
- Tanksley, S.D., Young, N.D., Paterson, A.H. y M.W. Bonierbale (1989). RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science. *Biotechnology.* 7: 257-264.

- Tanksley, S.D, Ganal, M.W., Prince, J.P., de Vicente, M.C., Bonierbale, M.W., Broun, P., Fulton, T.M., Giovannoni, J.J., Grandillo, S., Martin, G.B., Messeguer, R., Miller, J.C., Miller, L., Paterson, A.H., Pineda, O., Röder, M.S., Wing, R.A., Wu, W. y N.D. Young (1992). High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. *Genetics* 132:1141-1160.
- Tanksley, S.D., Ganal, M.W. y G.B. Martin (1995). Chromosome landing: a paradigm for map-based gene cloning in plants with large genomes. *Trends Genet.* 11:63-68.
- Tinney, F.W. (1940). Cytology of parthenogenesis in *Poa pratensis*. *J. Agric. Res.* 60:351-360.
- Tischler, C.R. y B.L. Burson (1995). Evaluating different bahiagrass cytotypes for heat tolerance and leaf epicuticular wax content. *Euphytica* 84:229-235.
- do Valle, C.B., Glienke C. y G.O.C. Leguizamon (1994). Inheritance of apomixis in Brachiaria, a tropical forage grass. *Apomixis Newslett.* 7:42-43.
- do Valle, C.B. y Y. Savidan (1996). Genetics, cytogenetics, and reproductive biology of Brachiaria. p. 147-163. In: J. W. Miles, B. L. Maass, and C. B. do Valle (eds.) *Brachiaria: Biology, agronomy, and improvement*. CIAT-EMBRAPA, Cali, Colombia.
- van Dijk, P. y J. van Damme (2000). Apomixis technology and the paradox of sex. *Trends in Plant Science.* 5:81-84.

- van Oostrum, H., Sterk, A.A. y H.J.W. Wijsman (1985). Genetic variation in agamospermous microspecies of *Taraxacum* sect. *Erythrosperma* and sect. *Obliqua*. *Heredity*. 55:223-228.
- Vielle Calzada, J.P., Crane, C.F. y D.M. Stelly. (1996). Apomixis: The asexual revolution. *Science* 274:1322-1323.
- Vos, P.R., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., y M. Zabeau (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids Res.* 23:4407-4414.
- Warmke, H.E. (1954). Apomixis in *Panicum maximum*. *Am. J. Bot.* 41:5-11
- Weimarck, G. (1967). Apomixis and sexuality in *Hierochloë australis* and in Swedish *H. odorata* on different polyploid levels. *Bot. Not.* 120:209-235.
- Weimarck, G. (1970). Apomixis and sexuality in *Hierochloë alpina* (Gramineae) from Finland and Greenland and in *H. monticola* from Greenland. *Bot Not.* 123:495-504.
- Welsh, J. y M. McClelland (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl. Acids Res.* 18:7213-7218.
- de Wet, J.M.J. (1968). Diploid-tetraploid-haploid cycles and the origin of variability in *Dichanthium* agamospecies. *Evolution* 22:394-397.
- de Wet, J.M.J. y J.R. Harlan (1970). Apomixis, polyploidy and speciation in *Dichanthium*. *Evolution* 24:270-277.
- de Wet, J.M.J. (1971). Reversible tetraploidy as an evolutionary mechanism. *Evolution* 25:545-548.

- Wang, G.L. y A.H. Paterson (1994). Assessment of DNA pooling strategies for mapping of QTLs. *Theor. Appl. Genet.* 88:355-361.
- Wicking, C. y B. Williamsom (1991). From the linked marker to gene. *Trends in Genet.* 7:288-293.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, D.L., Rafalski, J.A. y S.V. Tingey (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* 18:6531-6536.
- Winkler, H. (1908). Über Parthenogenesis und Apogamie in Pflanzenreich. *Prog. Rei. Bot. Jena.* 2:293-454.
- Wu, K.K., Burnquist, W., Sorrells, M.E., Tew, T.L., Moore, P.H. y S.D. Tanksley (1992). The detection and estimation of linkage in polyploids using single-dose restriction fragments. *Theor. Appl. Genet.* 83:294-300.
- Zabeau, M. y P. Vos (1993) Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. *European Patent Application*, publication no.: EP 0534858-A1, No. 92402629.7

# **XI. AGRADECIMIENTOS**

Todos dicen que esta es la parte más difícil de una tesis, y yo no voy a ser la excepción. Se corre el riesgo de que al querer nombrar a todos los que han contribuido de una manera u otra con el desarrollo de la misma, uno se olvide de muchos que también ha sido participe de este logro tan importante. Desde ya pido disculpas a los que no llegue a nombrar, pero fueron tantos, que difícilmente en este momento me acuerde de todos. A pesar de ello, siempre estará presente en mí el reconocimiento permanente.

En primer lugar quiero agradecer a Dios por darme la fuerza necesaria y estar siempre a mi lado en los momentos más difíciles de la vida.

A mis padres, Roberto y Gloria, quienes siempre creyeron en mi y me alentaron permanentemente, para que pudiese lograr todas las metas que me he propuesto.

A Eli, mi esposa, quien ha tenido que soportar durante estos largos cuatro años el hecho que nos hayamos separado. A vos que permanentemente me apoyaste, confiaste en mí, me sostuviste en los momentos más duros y siempre confiaste en mí, gracias por todo.

A mis hermanos, Luis, Roberto y Diego, quienes a pesar de no haber compartido mucho de estos momentos, siempre confiaron en mis metas y objetivos.

A mis suegros, Victorio y Lemi, y a todo el resto de los parientes cercanos (no los nombro porque son muchos)

A Dr. H. Esteban Hopp, quien me recibió en su laboratorio y aceptó ser mi director de tesis, sin conocerme, y con un tema de mi interés, brindándome su apoyo y colaboración incondicional desde el primer día en que empecé a trabajar en el INTA-Castelar.

Al Ing. Agr. Camilo Quarin, mi codirector de tesis y mi director de beca, la persona con quien me formé desde que era estudiante universitario y actualmente continuo haciéndolo.

Al Ing. Antonio Krapovikas, director del IBONE.

Al Ing. Luis Mroginski, decano y jefe de Fisiología Vegetal de la FCA-UNNE, quien me facilitó parte del equipamiento para trabajar con marcadores moleculares en Ctes.

Al Dr. Palma, director del CICV-INTA Castelar, quien me permitió trabajar en dicho lugar.

Al Dr. Osvaldo Rosetti, director del Instituto de Biotecnología

Al Ing. Agr. Enrique Suárez, Director del Instituto de recursos Biológicos CIRN-INTA Castelar, lugar donde realicé parte de mis experimentos.

Al Ing. Eligio Morandi, jefe de la Cátedra de Fisiología Vegetal, FCA-UNR, que me abrió las puertas de su laboratorio desinteresadamente para que pudiese hacer mis primeras experiencias con RAPD y RFLP.

Al Dr. Juan Pablo Ortiz, persona con la cual trabajé durante el último período de mi tesis en la FCA-UNR y quien me enseñó los RAPD y RFLP.

A Maritza, una amiga salteña con la cual compartí mis primeros años en Bs. As.

A Fernando ("Fer"), quien fue mi primer maestro en el laboratorio de Biotecnología, cuando yo no sabía ni siquiera como usar una pipeta automática y menos aún que era un gel. Gracias por tu amistad, permanente buena onda, optimismo y buena voluntad para ayudarme en los primeros momentos en los cuales me sentía perdido y no sabía que hacer.

A Carolina y Susana Marcucci quienes fueron mis segundas maestras en el laboratorio, enseñándome todo sobre los AFLPs.

A Daniela, mi compañera de mesada, quien con mucha docencia me enseñó los "Southern" y me ayudó en las primeras cuantificaciones de ADN.

A Norma, mi otra compañera de mesada, quien me consiguió los "papers" que necesitaba.

A Andrea Puebla, quien fue mi consultora por mail de la redacción de la tesis y los trámites para defender la tesis.

A los compañeros de plantas: Alejandro Tossini, Mariana, Marianne, Ana, Luis, Eduardo, Sebastián, Verónica, Ana Julia, Ceci Vazquez, Andrea Dengis,

Tere. También a Diego, Ruth y Paula, quienes conocí en estos últimos años y también colaboraron conmigo.

A los del grupo de Girasoles: Alejandro Escandón, Marisa, Corina, Valeria, Nora y Marcela.

Al grupo de Aftosa: Oscar, Cecilia, Gaby, Lela, Analía, Flavia, María Elisa, Guido y Silvina

A los de Tuberculosis: Martín, Andrea, Alicia Alito, Karina, Marisa Farber y Romano, Ángel, Paz, Fabiana.

A los de Brucelosis: Silvio, Laura, Alicia Arese, Lorena, Eleonora, Haydee

Al personal de limpieza y cocina: Fabián, Isabel, Berta, Jorge.

A las telefonistas del CICV-INTA Castelar, Eva y Ana

A las secretarias del CICV-INTA Castelar, Marta y Any

A las bibliotecarias del CICV-INTA y de Genética de Castelar

A las chicas del grupo del Ing. Suárez: Ana Rosa Schlatter, Marcela Manifesto, Susana Torales, Silvina Lewis, Gabriela Tranquilli, Laura Bulrich, Noga Zelener, Laura Appendino, Laura Muzupapa, "Colo" Ornela.

A Cacho, un amigo de ley de la FCA-UNR, quien me ayudó durante toda mi estadía en Zavalla (Santa Fe), brindándome su amistad y con quien compartí momentos inolvidables. También a su esposa, Silvia.

A todo el grupo de Zavalla, Cachito, Lucrecia, Luciana, Juliana, Jorge, Héctor, Quique, Raquel, y algunos otros nombres que en este momento no recuerdo.

A todo el grupo de la cátedra de genética FCA-UNNE de Ctes. Guillermo, Mario, Francisco, Flopi, Irene, Edmundo, Carlos, Esteban, Fernando, Hugo, Ríos.

A los integrantes del grupo de Fisiología Vegetal de la FCA-UNNE

A los alumnos de agronomía de la FCA-UNNE, que ingresaron en 1996 y colaboraron con el análisis genético durante el verano de 1998: Mariela Fogar, José L. Rosseti, Juan M. Markus, Vanesa Bohle, Mauricio Cardozo, Rodolfo Sandoval, Edgardo Maurenzi, Carlos Toledo, Elina y Marcela Fleitas, Jorge Kisor, Emilio Rey.

A los alumnos de agronomía de la FCA-UNNE, que ingresaron en 1997 y colaboraron con el análisis genético durante el verano de 1999: Sergio Barreda, Rubén D. Gonzalez, María L. Bianchi, Hector D. Rolin, Rita Rigonatto, Luis Gandara, Roque Casaro, Claudia Landrier.

A Martín, alumno de la FCA-UNNE, quien colaboró durante el último año en el laboratorio de genética de Ctes.

A Guillermo Seijo del IBONE, quien me ayudó los últimos días con el cálculo de los aumentos de las fotos

A Maximiliano Demateis del IBONE, quien en el último verano me alentó con la finalización de la tesis y las becas postdoctorales del Conicet.

A muchos más que seguramente en este momento no recuerdo sus nombres pero que también compartieron conmigo estos años.

A todos los que nombré y a muchos que seguramente no recuerdo en este momento, muchas gracias, y me reconocimiento permanente.