



FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO

IDENTIFICACIÓN DE GENES ASOCIADOS AL DESARROLLO
DEL ENDOSPERMO EN
Paspalum notatum Flüggé

MARA BELÉN DEPETRIS
Ingeniera Agrónoma

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE MAGISTER EN GENÉTICA
VEGETAL

DIRECTORA: Dra. Silvina A. Felitti
CODIRECTOR: Dr. Carlos A. Acuña

2014

**IDENTIFICACIÓN DE GENES ASOCIADOS AL DESARROLLO DEL ENDOSPERMO EN
Paspalum notatum Flüggé**

MARA BELÉN DEPETRIS
Ingeniera Agrónoma – Universidad Nacional de Rosario

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Magister en Genética Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido previamente presentada para la obtención de otro título en ésta u otra Universidad. La misma, contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el laboratorio de Biodiversidad Vegetal y Microbiana de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Rosario ubicada en la localidad de Zavalla, Provincia de Santa Fe y en el Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE-CONICET) Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Nordeste (UNNE). El período abarcó desde el 1 de Febrero de 2013 al 15 de Julio de 2014 bajo la dirección de la Dra. Silvina Andrea Felitti y la codirección del Dr. Carlos Alberto Acuña.

Nombre y firma del Maestrando: **MARA B. DEPETRIS**.....

Nombre y firma del Director: **SILVINA A. FELITTI**.....



Nombre y firma del Codirector: **CARLOS A. ACUÑA**.....

Defendida el día 21 de Agosto de 2015

AGRADECIMIENTOS

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

A mi codirector, Dr. Carlos Acuña por el asesoramiento permanente, por todo el apoyo y el tiempo dedicado, por su gran voluntad y disposición para formarme académicamente.

A los Dres. Camilo Quarín y Mario Urbani por la valiosa contribución en la dirección de los cruzamientos realizados, junto a todo el grupo de investigación del Instituto de Botánica del Nordeste.

A la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Rosario (FCA-UNR) por permitirme disponer de sus instalaciones.

A la Fundación Nuevo Banco de Santa Fe por la beca de Innovación Tecnológica brindada y por su financiamiento para esta investigación.

A cada uno de los que pertenecen a la Sala de Becarios, porque todos han contribuido a mi formación evacuando dudas durante la realización de esta tesis, en especial a Mica y Lour por el aliento permanente y a Vicky, Fer, Nela y José Luis por su apoyo desmedido frente a las dificultades en el desarrollo de geles de acrilamida.

A mis amigas de la Maestría, Yane, Flor, Raque, Lau, Móni y Agos.

A mis abuelos Vilma y Oscar, por estar siempre.

A todos, muchas gracias!!

A mis padres Mónica y Alfredo, a mis hermanos Ignacio y M. Emilia

“When I find myself in times of trouble Mother Mary comes to me speaking words of wisdom, LET IT BE” ~ John Lennon; 1940-1980 ~

PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A CONGRESOS

XVIII Encuentro de Jóvenes Investigadores de la Universidad Nacional del Litoral (Septiembre de 2014). Identificación de genes asociados al desarrollo del endospermo en *Paspalum notatum* Flüggé. Mara Belén Depetris; Silvina Andrea Felitti.

VIII Jornada de Ciencia y Tecnología de la UNR. Fundación Nuevo Banco de Santa Fe - Rosario, Santa Fe, Argentina (Octubre de 2014). Estudio de la expresión diferencial de genes durante la formación del endospermo de *Paspalum notatum* Flüggé. Mara Belén Depetris; Silvina Andrea Felitti; Carlos Alberto Acuña; Camilo Luis Quarin.

XLIII Congreso Argentino de Genética. ALAG – San Carlos de Bariloche, Río Negro, Argentina (Octubre de 2014). Depetris M.B., C.A. Acuña, C.L. Quarin, S.A. Felitti (2014) Estudio de la expresión diferencial de genes durante la formación del endospermo de *Paspalum notatum* Flüggé. XLIII Congreso Argentino de Genética. 19 al 22 de octubre, Bariloche, Argentina.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	7
RESUMEN	9
ABSTRACT	11
1. INTRODUCCIÓN	12
1.1 La especie en estudio	13
1.2 La apomixis y el mejoramiento de las especies vegetales	15
1.3- La importancia de comprender el desarrollo del endospermo	17
2. OBJETIVOS	21
2.1- Objetivo General.....	21
2.2- Objetivos Específicos	21
3. MATERIALES Y MÉTODOS	23
3.1 Material Vegetal.....	23
3.2 Cruzamientos.....	24
3.3 Análisis del transcriptoma	25
3.4 Aislamiento de bandas de interés	29
3.5 Amplificación de bandas de interés.....	29
3.6 Análisis bioinformático de secuencias.....	29
4. RESULTADOS	30
4.1 Cruzamientos realizados.....	30
4.2 Análisis de genes de expresión diferencial en ovarios de <i>P. notatum</i>	33
4.3 Clasificación de los DETDFs.....	36
4.4 Análisis Bioinformático	38
5. DISCUSIÓN	46
6. CONCLUSIONES	51
7. CONSIDERACIONES FINALES Y PERSPECTIVAS	53
8. BIBLIOGRAFÍA	54

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

AFLP: “Amplified Fragment Length Polymorphism”. Polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados.

BLAST: “Basic Local Alignment Search Tool”. Programa de búsqueda de secuencias en bases de datos que se basa en similitud de secuencias.

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

cDNA: “DNA copy”. Ácido desoxirribonucleico copia, **ADNc** (a partir de ARN mensajero).

cDNA-AFLP: “cDNA Amplified Fragment Length Polymorphism”. Polimorfismos en el largo de los fragmentos amplificados a partir de ADN copia.

CDPK: Proteína Quinasa Dependiente de Calcio (del inglés, Calcium-dependent Protein Kinase).

DETDFs: “Differential Expression Transcript Derived Fragments”. Fragmentos derivados de transcritos de expresión diferencial.

dNTPs: Desoxinucléotidos trifosfato.

e-value: Medida de la significancia estadística de cada alineamiento obtenido al interrogar la base de datos con una secuencia aleatoria. Indica la probabilidad de que los alineamientos obtenidos sean al azar, a menor valor más significativo es el alineamiento.

EDTA: Ácido etilendiamino-tetracético.

EST: “Expressed Sequence Tag”. Etiquetas de secuencias expresadas.

H₂O_d: Agua destilada.

g: Fuerza centrífuga, medida intuitiva de aceleración.

n: Número cromosómico haploide de una especie.

2n: Número cromosómico diploide de una especie.

NBE: Número de balance endospérmico.

Nfd 1-9: “Nuclear Fusion Defective”. Fusión nuclear defectuosa.

SGR: “Seed Growth Rate”. Tasa de crecimiento de la semilla.

TAE: Tris-ácido acético-EDTA.

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

TBE: Tris-ácido bórico-EDTA.

TDF: “Transcript Derived Fragments”. Fragmentos derivados de transcritos.

x: Número cromosómico básico de una especie.

U: Unidades (del inglés, Units).

µg: Microgramos (10^{-6} g).

µl: Microlitro (10^{-6} l).

RESUMEN

IDENTIFICACIÓN DE GENES INVOLUCRADOS EN EL DESARROLLO DEL ENDOSPERMO EN *Paspalum notatum* Flüggé

Paspalum notatum es una especie utilizada como modelo en estudios de genética reproductiva vegetal. El citotipo diploide es sexual y autoincompatible; mientras que los poliploides son apomícticos, pseudógamos y autofértiles. La formación del endospermo en individuos apomícticos no depende del aporte genómico 2:1 (materno:paterno), típico de las plantas sexuales y de la mayoría de las angiospermas.

El desarrollo del endospermo es un aspecto crucial en la perspectiva de incorporar el carácter apomixis a los cereales, ya que estos cultivos no producen granos si esa relación 2m:1p se desvía. Esto haría posible la fijación, el mantenimiento y la multiplicación por semillas de genotipos de interés.

El objetivo de este trabajo fue caracterizar el transcriptoma durante la formación de semillas provenientes de plantas apomícticas y sexuales de *P. notatum*. Se realizaron cruzamientos de plantas con distintos niveles de ploidía a fin de generar un amplio rango de contribuciones genómicas materna:paterna en el endospermo, tanto en genotipos apomícticos como sexuales.

El ARN fue extraído de ovarios 24 horas después de la polinización y se analizó la expresión génica utilizando la metodología de cDNA-AFLP. Según observaciones al microscopio de los ovarios polinizados, 24 h después de la polinización ya se produjeron varias divisiones celulares, tanto en el embrión como en el endospermo y es antes del colapso por aborto post cigótico encontrado en estudios previos.

A partir de geles de poliacrilamida, fueron aisladas bandas que mostraron expresión diferencial en los distintos cruzamientos comparados. Se obtuvieron las secuencias de 91 transcriptos, pero por su buena calidad fueron 49 las que se compararon con otras de función conocida disponibles en bases de datos. De acuerdo a la identidad que presentaron, fueron clasificadas en 11 categorías funcionales. Un 15% de los transcriptos correspondieron a procesos de transducción de señales; 6% al metabolismo y procesos de obtención de energía; 4% a mantenimiento de la estructura celular, transcripción, división y crecimiento celular. Una minoría, 2% perteneció a procesos de defensa frente a enfermedades, síntesis de proteínas, transportadores y transporte intracelular. Finalmente, el 53% fue incluido en la categoría desconocido.

Los resultados alcanzados a partir del empleo de la metodología utilizada (cDNA-AFLP) permitió aislar bandas de expresión diferencial entre distintos cruzamientos y el relevamiento del transcriptoma permitió identificar genes diferencialmente expresados durante las primeras fases en el desarrollo del endospermo, en relación a la poliploidía y a la apomixis.

La mayoría de los transcritos se clasificaron como participantes de rutas de transducción de señales, lo que podría estar indicando que una o más señales extracelulares detectadas por receptores son las que desencadenan respuestas en el desarrollo del endospermo y, por consiguiente, en la producción de semillas.

Otro porcentaje importante de los transcritos pertenecieron a categorías funcionales de vías metabólicas, procesos energéticos y mantenimiento de la estructura celular. Puede predecirse así, que un número importante de los mismos intervienen en el metabolismo y transporte de aminoácidos, en la organización de la pared celular y del citoesqueleto. Estos procesos desempeñan papeles fundamentales durante la división celular activa que se produce en la fase inicial de desarrollo de la semilla. Especialmente, el citoesqueleto es un factor clave para la vía de desarrollo de endospermo en cereales. Existe la posibilidad de que los transcritos detectados en esta etapa estén involucrados en la acumulación de reservas preparando para la formación de endospermo.

Se encontraron transcritos en ovarios de madres sexuales, donde no se esperaba semilla (NBE distinto 2:1), con secuencias muy similares a genes que producían falla en la fusión de los núcleos polares durante la megagametogénesis; acumulación de CDPK en semillas inmaduras relacionado a la biosíntesis de productos de almacenamiento. Ambos procesos podrían estar involucrados en el éxito o el fracaso del desarrollo del endospermo y la producción de semillas en *P. notatum*.

Uno de los DETDFs proveniente de ovarios derivados de madres apomícticas, implicado en el metabolismo de la sacarosa (enzima SUS1) durante la fase de acumulación masiva de almidón y de hexosas en el endospermo, podría estar relacionado a la insensibilidad al NBE.

El estudio llevado a cabo permitió identificar transcritos potencialmente relacionados con el éxito o el fracaso del desarrollo del endospermo. Esto contribuirá a comprender el mecanismo por el cual este sistema genera semillas independientemente de la estricta relación genómica materna y paterna (2m:1p) presente en la mayoría de las especies de gramíneas.

ABSTRACT

IDENTIFICATION OF GENES ASSOCIATED WITH THE DEVELOPMENT OF ENDOSPERM IN *Paspalum notatum* Flüggé.

The seed developmental process involves various tissues with several ploidy levels and different genetic origins. The hypothesis of endosperm balance number (EBN) postulates that each species has an effective number that is important for normal endosperm and seed development to occur. The EBN insensitivity observed in apomictic plants might be a requirement for the spread of pseudogamous apomixis. Crosses using several cytotypes of *P. notatum* were made in order to induce the development of seeds with different maternal/paternal genomic ratios in the endosperm. A transcriptome characterization of ovaries 24 hours after pollination was performed using cDNA-AFLP methodology.

One of the 49 differentially expressed transcript-derived fragments (DETDFs) were specifically found in crosses in which apomictic plants were used as the female parent and presented a predicted m:p ratio that was different to the 2:1 requirement of the EBN. This transcript was predicted to be involved in sucrose metabolism (enzyme SUS1) during the massive accumulation of hexose and starch in the endosperm and might be related to NBE insensitivity in *P. notatum*.

No seeds were produced in crosses in which sexual plants were used as the female parent and the predicted m:p ratio was different to the 2:1. In this case, two interesting transcripts were found. One of them was similar to a gene associated to the fusion of the polar nuclei during megagametogenesis and the second DETDF presented high similarity with a Calcium-dependent Protein Kinase (CDPK) that regulates the accumulation of storage products in immature seeds of specie. Both processes might be involved in the success or failure of endosperm development and seed production in *P. notatum*.

1- INTRODUCCION

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

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

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

Nogler (1984) ha dividido los mecanismos de la apomixis, de acuerdo al origen de los embriones asexuales, en dos categorías: la ruta esporofítica y la ruta gametofítica. En la primera, los embriones se originan directamente a partir de células de la nucela o de los tegumentos del óvulo, sin que se forme un saco embrionario (Koltunow et al., 1995). Comúnmente se forman embriones somáticos (esporofitos) múltiples que comparten el ovario junto con el embrión de origen sexual y utilizan su endospermo para desarrollarse (Koltunow, 1993). La segunda ruta resulta en la formación de un gametofito femenino diploide, cromosómicamente no reducido, ya que no ocurre la meiosis (procesos agrupados bajo el término apomeiosis). En dicho mecanismo, el embrión se desarrolla a partir de la oósfera en

ausencia de fecundación, proceso llamado partenogénesis (Koltunow et al., 2013). La apomeiosis deriva en lo conocido como diplosporia y aposporia, según el tipo de célula precursora que origina el saco embrionario no reducido. En la diplosporia, la célula madre de la megáspora no reduce su contenido cromosómico y es la que da origen al saco embrionario. En cambio, en la aposporia, el desarrollo del gametofito femenino se inicia a partir de una célula de la nucela (Koltunow et al., 2013), observándose la formación de uno o varios sacos embrionarios no-reducidos, conteniendo una célula huevo, las sinérgidas, núcleos polares y pueden o no poseer antípodas.

La apomixis gametofítica ha sido más profundamente estudiada que la esporofítica, específicamente por ser el tipo presente en las gramíneas, donde muchas especies son de valor agronómico (Ozias-Akins y Van Dijk, 2007). Por otra parte, la apomixis gametofítica está casi siempre asociada a la poliploidía. Varios grupos de investigación han dejado importantes contribuciones al conocimiento de la biología y herencia de la apomixis en distintas especies (revisado en Ozias-Akins y van Dijk, 2007; Tucker y Koltunow, 2009; Pupilli y Barcaccia, 2012).

Actualmente, se considera que este tipo de reproducción ha evolucionado como un sistema alternativo a la sexualidad, a través de las vías de desarrollo del ovario (Grimanelli et al., 2001). Se especula que la vía apomítica no funciona en forma completamente independiente de la sexual, ya que los genes que la controlan podrían no ser genes distintos, sino genes que exhiben una regulación alterada con respecto a la presente en los genotipos sexuales (Ozias-Akins y Van Dijk, 2007).

1.1 La especie en estudio

Paspalum notatum Flüggé, conocido como pasto horqueta o bahiagrass (en inglés), es una gramínea rizomatosa perenne. Pertenece a la familia Poaceae, subfamilia Panicoideas, tribu Paspaleae, subtribu Paspalineae y comprende 310 especies de origen americano (Morrone et al., 2012).

Se destaca por su tolerancia a suelos infértiles, sequía, calor, resistencia a insectos y enfermedades, y por la supresión de nematodos (Zhang et al., 2007). Es una de las especies económicamente más importantes de este género, principalmente por su uso como forraje y su utilidad como césped (Blount y Acuña, 2009).

Paspalum notatum es una especie utilizada como modelo en estudios de genética reproductiva vegetal. Una de las características más importantes es su modo de reproducción, que puede ser tanto sexual como apomítico. La especie es multiploide incluyendo un citotipo

diploide y varios poliploides: triploide (3x), tetraploide (4x), pentaploide (5x), hexaploide (6x) y octoploide (8x).

Aproximadamente el 98% de los poliploides son tetraploides, siendo excepcionales los triploides y pentaploides (Tischler y Burson, 1995; Pozzobon y Valls, 1997). El citotipo tetraploide ($2n=4x=40$) (Burton, 1948; Bashaw et al., 1970) es el más frecuente y ampliamente distribuido.

Estudios filogenéticos y citogenéticos demostraron que la especie está caracterizada por un número básico de cromosomas de $x=10$, que varían desde el citotipo diploide ($2n=2x=20$) sexual y autoincompatible (Burton, 1955) a los poliploides apomícticos, pseudógamos y autofértiles (Burton, 1948).

En esta especie, la aposporia es heredada como un gen Mendeliano simple y dominante, con segregación distorsionada (Martínez et al., 2001). Este carácter se encuentra en una región genómica caracterizada por la supresión de la recombinación y el apareamiento cromosómico preferencial (Martínez et al., 2003; Stein et al., 2004; 2007).

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

La apomixis en *P. notatum* incluye la formación de sacos embrionarios no reducidos, a partir de células de la nucela (aposporia), el desarrollo partenogenético de embriones, y el desarrollo del endospermo después de la fertilización de los núcleos polares (pseudogamia) (Martínez et al., 2001; 2003). En los tetraploides, la formación del endospermo (pseudógamo) requiere de la fecundación de los núcleos polares (Burton, 1948; Quarin, 1999) no reducidos ($2n + 2n$) por un núcleo espermático reducido (n) produciendo una relación genómica 4:1 materna:paterna (m:p) diferente de la relación en las angiospermas sexuales (Grimanelli et al., 1997). Se ha demostrado experimentalmente que el desarrollo del endospermo en los tetraploides es indiferente a cambios en esa relación. La producción de semilla, con embrión y endospermo, se produjo independientemente de la variación desde 2:1 hasta 8:1 en el aporte genómico materno:paterno (Quarin, 1999).

Se han generado genotipos tetraploides sexuales, por tratamiento de semillas y tejidos cultivados de callos diploides ($2n=2x=20$), con procedimientos para duplicación cromosómica (Forbes y Burton, 1961; Quarin et al., 2001; Quesenberry et al., 2010). Los cruzamientos entre

genotipos tetraploides sexuales inducidos, utilizados como progenitores femeninos, y genotipos tetraploides apomícticos, usados como donantes de polen (normal y reducido), convergieron en una amplia variabilidad genética de los rasgos de importancia agronómica entre los híbridos resultantes (Acuña et al., 2009).

1.2 La apomixis y el mejoramiento de las especies vegetales

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

Permitiría la supervivencia y la fijación de la progenie de toda cruce que no pueda ser propagada sexualmente (Spillane et al., 2004). Es decir, híbridos interespecíficos e intergenéricos que no pueden perpetuarse por desórdenes cromosómicos vía sexualidad, serían fértiles por la vía apomíctica.

Podría ser sencillo mantener líneas puras sin necesidad de aislamiento físico, simplificando los programas de mejoramiento de híbridos, mediante la eliminación de la necesidad de líneas restauradoras y mantenedoras (Spillane et al., 2004). Esto es debido a la falta de fecundación de la oosfera, que mantiene al embrión con una constitución génica idéntica a la madre (clonación a través de semillas).

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

Permitiría reproducir por semillas algunas especies que actualmente se propagan por métodos vegetativos, proporcionando una baja en los costos y un aumento en los rendimientos. Un ejemplo, de esto estaría dado por las semillas de papa. El uso de tubérculos como mate-

riales de siembra desvía alrededor del 10% de la cosecha mundial de papa de uso alimentario que es destinado a la siembra. Aunque los sistemas de semillas de papas han encontrado algunos problemas (por ejemplo, bajas tasas de germinación, tubérculos no uniformes y aumento de las necesidades de riego), también hay ejemplos de gran éxito. Es por ello que la tecnología de la apomixis podría hacer la siembra de semillas de papas una opción más atractiva para los criadores y cultivadores de la misma. Los beneficios relacionados con la propagación de la tecnología de la apomixis podría beneficiar a los productores de papa en aproximadamente 3.2 millones de dólares al año (Vielle-Calzada et al., 1996; Spillane et al., 2004)

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

Básicamente, existirían tres tipos de procedimientos para transferir la apomixis a especies sexuales: (i) la hibridación interespecífica entre una planta sexual y un pariente silvestre apomíctico, (ii) la transformación genética de cultivares sexuales con genes considerados disparadores del carácter y (iii) la iniciación de la expresión de la apomixis por experimentos de bloqueo de genes (mutagénesis).

La primera estrategia para transferir la apomixis al maíz fue propuesta hace más de 35 años atrás por D. F. Petrov (Petrov et al., 1979), basado en cruzamientos intergenéricos entre maíces tetraploides y *Tripsacum dactiloides* L. (una especie apomíctica diplospórica).

Los híbridos apomícticos obtenidos fueron retrocruzados con el maíz a fin de recuperar el genoma completo de esta especie. Estos trabajos fueron realizados en parte por el Dr. B. Kindiger en Oklahoma, EEUU (Kindiger et al., 1996) e intentos similares estuvieron a cargo del Dr. Y. Savidan en México (en el IRD - CIMMYT) (Savidan, 2000).

El principal inconveniente de este sistema es que al recuperar el genoma de maíz, los híbridos obtenidos resultaron completamente macho estériles, asociado a híbridos con algún grado de reproducción sexual. Esto impidió avanzar con la recuperación del genoma de maíz, representando un cuello de botella importante para esta metodología (Savidan, 2000).

Una dificultad adicional consiste en la condición estricta de que se cumpla la relación genómica 2 materna: 1 paterna necesaria para desarrollar el endospermo en maíz, que impide la formación de semilla en los híbridos (Savidan, 2000) (objeto de nuestro estudio). Esto se

debe a que la mayoría de las angiospermas, tienen un número de balance efectivo que debe mantener la relación 2:1 para que ocurra el desarrollo normal del endospermo y de la semilla (Johnston *et al.*, 1980).

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

1.3 La importancia de comprender el desarrollo del endospermo

El desarrollo del endospermo es una parte esencial en la formación de la semilla. Es considerado uno de los componentes fundamentales del éxito evolutivo de las angiospermas. Desempeña un papel vital en el ciclo de transferencia de nutrientes de la planta madre a la progenie (Brown y Lemmon, 2007).

El endospermo es el tejido de acumulación de reservas y de hormonas necesarias para la regulación del crecimiento del embrión (Olsen, 1998). Otros roles, incluyen el mantenimiento de un alto potencial osmótico alrededor del embrión y brindar soporte mecánico durante las primeras etapas del desarrollo (Lopes y Larkins, 1993). También, es el tejido en donde ocurre el *imprinting* de genes y donde se detectan aberraciones cromosómicas, evitando así una inversión inútil de energía en la producción de semillas no viables (Gehring *et al.*, 2004).

Se han postulado dos hipótesis acerca del origen del endospermo. La primera postula que se originó a partir de un embrión “altruista” que asumió el rol de proveer nutrición a otro embrión localizado en la misma semilla. La segunda, plantea que el endospermo surgió como resultado del desarrollo extendido del megagametofito, el cual se supone que fue promovido como consecuencia de la fecundación de la célula central por un núcleo espermático (Friedman, 1994; 1998).

Estudios realizados en *Arabidopsis* y en cebada indicaron que las etapas básicas del desarrollo del endospermo están conservadas tanto en mono como en dicotiledóneas (Chaudhury *et al.*, 2001). Es posible diferenciar al menos cuatro fases (en este proceso) para ambas especies estudiadas: sincitio, celularización, diferenciación y muerte (Berger, 1999).

En *Arabidopsis*, las mutaciones en los genes *HAIKU* (*IKU*) provocan una disminución en el tamaño del endospermo y eventualmente, en el tamaño del embrión y de la semilla (García *et*

al., 2003). Los genes *HAIKU* (*IKU2*) y *MINISEED3* (*MINI3*) codifican para una quinasa rica en repeticiones de leucina y para un factor de transcripción del tipo WRKY, respectivamente (Luo et al., 2005). Estos genes se expresan en el endospermo inmediatamente después de producida la fecundación. El menor tamaño del endospermo observado en las mutantes *IKU* se ve acompañado de una disminución de la elongación celular de los tegumentos, indicando una comunicación entre estos dos componentes de la semilla, que son genéticamente distintos (García et al., 2005). Sin embargo, el mecanismo de la comunicación entre el endospermo y los tegumentos no ha sido aún dilucidado.

Estudios realizados en zanahoria y en maíz indican que el endospermo es una fuente de señales involucradas en la embriogénesis (Opsahl-Ferstad et al., 1997; Van Hengel et al., 1998) y que hay interacciones entre el embrión y el endospermo. El mecanismo por el cual el embrión ajusta su grado de proliferación celular al espacio disponible (como lo que se observó en las mutantes *IKU*) no se ha comprendido hasta el presente. Esta observación brindó evidencias de la existencia de una comunicación desde el endospermo hacia el embrión. La existencia de señales desde el embrión hacia el endospermo fue revelada mediante el análisis de una mutante de una quinasa dependiente de ciclinas, *cdc2a* (Nowack et al., 2006). En las mutantes heterocigotas *cdka1*, el 50% de los granos de polen contienen un único núcleo espermático que fecunda exclusivamente a la ovocélula. Se observó un efecto dramático como consecuencia del desarrollo del embrión, ya que el mismo disparó divisiones nucleares de la célula central iniciando el desarrollo del endospermo (Nowack et al., 2006). Este proceso en semillas *cdka1*, se detiene luego de unos pocos ciclos de división celular, mientras que se vio que el embrión evoluciona hasta el estadio globular de desarrollo. Las semillas obtenidas son pequeñas por no producirse la expansión de los tegumentos. Estas observaciones brindan evidencias del rol esencial que tiene el endospermo comparado con el efecto relativamente limitado que ejerce el embrión sobre el control del tamaño de la semilla.

Es actualmente aceptado que la mayoría de las angiospermas requieren un determinado balance de las contribuciones genómicas maternas y paternas para el éxito en el desarrollo del endospermo. La teoría del número de balance endospermico (NBE) postula que cada especie tiene un número de contribuciones efectiva que debe mantener la relación 2:1 (genoma materno: genoma paterno) para que se origine el endospermo y la semilla (Johnston et al., 1980).

La forma más común de desarrollo del endospermo en especies apomíticas de las familias Rosaceae y Poaceae es la pseudogamia. Se han descrito dos casos, en el primero la

polinización y la fecundación actúan como un disparador del desarrollo del embrión por partenogénesis (Asker y Jerling, 1992). En el segundo, el origen del embrión comienza previamente, independiente a la polinización y fertilización de la célula central, pero la fecundación es necesaria para el desarrollo del endospermo y la viabilidad de las semillas (Chaudhury et al., 2001).

Poca atención consiguió el estudio del desarrollo del endospermo en plantas apomícticas pseudógamas como *P. notatum*. La formación del endospermo requiere de la fecundación de dos núcleos polares no reducidos ($2n+2n$) por un núcleo espermático reducido (n) produciendo una relación genómica diferente de 2:1 (observada en angiospermas sexuales) (Grimanelli et al., 1997). Se cree que debe haber ocurrido una adaptación en la relación óptima de genomas parentales para la formación del endospermo en plantas apomícticas (Nogler, 1984).

En algunos casos, esta no es necesaria porque la conformación del saco apospórico contiene ya una adaptación que le permite a una planta apomíctica conservar esa relación 2:1. Es el caso de *Panicum maximum* Jacq, donde el saco embrionario apospórico tiene un solo núcleo polar no reducido ($2n$) en su célula central. El embrión evoluciona por partenogénesis a partir de la ovocélula no reducida ($2n$) y el endospermo por fecundación del único núcleo polar ($2n$) con un núcleo espermático reducido (n). De esta manera, se mantiene la relación 2:1 del aporte materno/paterno en la formación del endospermo, al igual que en un proceso sexual (Chen et al., 2002).

En general, en las especies de *Paspalum* debe existir otro tipo de adecuación puesto que los sacos embrionarios apospóricos son binucleados y los dos núcleos polares son no-reducidos ($2n$), en ellas la producción de semilla con embrión y endospermo, se produce independientemente de la variación en la relación genómica 2:1 (Quarin, 1999). En efecto, las plantas 4x apomícticas producen semillas independientemente del nivel de ploidía del gameto masculino. Sin embargo, si la madre es tetraploide y de reproducción sexual, la relación $2m:1p$ parece ser indispensable para el desarrollo del endospermo, y por ende de la semilla. Esto hace suponer que la adaptación proviene de la parte femenina y no por parte de un tipo de *imprinting* relacionado a genes portados por el gameto masculino (Quarin, 1999).

La caracterización a nivel molecular del proceso de formación de la semilla representa un desafío, dado que involucra el estudio de la expresión génica en tejidos con distintos niveles de ploidía y con orígenes genéticos diferentes (Chaudhury et al., 2001). La comprensión del proceso de formación del endospermo es un aspecto crucial en la perspectiva de incorporar la

apomixis a otras especies. Se ha invertido una enorme cantidad de recursos para identificar los genes involucrados en la formación del embrión clonal en distintas especies apomícticas. Sin embargo, fueron realizados muy pocos estudios tendientes a entender el desarrollo del endospermo en estos sistemas y no se dispone de información acerca de la expresión diferencial de genes relacionados al desarrollo del endospermo en plantas apomícticas naturales.

En esta investigación, la metodología utilizada fue cDNA-AFLP debido a que se ajusta a los objetivos planteados, es una técnica eficiente y confiable para identificar ARNm expresados diferencialmente. El desarrollo del endospermo en apomícticas pseudogamas de *Paspalum* es aún desconocido. La característica más ventajosa de esta técnica es que no requiere previamente ninguna información de la secuencia, caracterizando la tecnología como un sistema abierto en comparación con sistemas de expresión cerrados, tales como los chips de ADN o Microarrays. La etapa de amplificación selectiva usando combinaciones de cebadores con un número variable de nucleótidos selectivos, produce patrones de bandas reproducibles, nítidas y discretas. Otras ventajas significativas son los costos de inicio relativamente bajos y su alta especificidad (Vuylsteke et al., 2007), ajustándose a los recursos y equipamiento con que disponíamos para la realización de este trabajo. Entre sus limitaciones principales encontramos que es una técnica laboriosa y requiere mucho tiempo, pero se ha logrado llevar a cabo dentro de los plazos de la Maestría.

2- OBJETIVOS

2.1 Objetivo General:

Caracterizar el transcriptoma durante la formación de semillas provenientes de plantas apomícticas y sexuales de *Paspalum notatum*, con particular énfasis en la identificación de genes de expresión diferencial asociados al desarrollo del endospermo en genotipos sexuales y apomícticos. Los resultados que se obtengan aportarán conocimientos para comprender el mecanismo por el cual este sistema genera semillas independientemente de la estricta relación genómica materna y paterna (2m:1p) presente en la mayoría de las especies de gramíneas.

2.2 Objetivos Específicos:

2.2.1) Realizar cruzamientos entre genotipos de *P. notatum* tetraploides sexuales de origen experimental, tetraploides apomícticos naturales y diploides naturales, a fin de generar diferentes relaciones genómicas esperadas en el endospermo por vías sexual y apomíctica.

2.2.2) Efectuar un análisis del transcriptoma 24 horas luego de producida la polinización, en ovarios provenientes de plantas apomícticas y sexuales, para identificar genes de expresión diferencial.

2.2.3) Comparar los patrones de expresión génica del endospermo para las diferentes contribuciones genómicas maternas:paternas esperadas (NBE) y determinar la secuencia de los genes diferencialmente expresados.

Hipótesis:

Existen diferencias de expresión en el transcriptoma de ovarios de plantas apomícticas y sexuales, en el momento de la polinización y luego de las primeras horas, etapa en la que se observa el inicio del desarrollo del endospermo en sacos embrionarios.

Predicción:

La aplicación de técnicas de relevamiento del transcriptoma permitirá identificar genes diferencialmente expresados en las primeras fases de formación y desarrollo de semillas; como así también, a la elucidación de las bases moleculares involucradas en el desarrollo del endospermo, en relación a la poliploidía y a la apomixis.

3- MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Material Vegetal

Tabla 1. Se utilizaron los genotipos que se detallan, con el fin de generar diferentes relaciones esperadas en el endospermo por las vías sexual y apomítica.

Accesión	Germoplasma	Modo de reproducción	Origen
H398	2x=20	Sexual	Empedrado, Corrientes, Argentina
Tifton 9	2x=20	Sexual	Ann Blount, University of Florida, North Florida Research and Education Center, Marianna FL, USA.
Q4084-8	2x=20	Sexual	Población diploide sexual, Cayastá, Santa Fe, Argentina.
C4-2x	2x=20	Sexual	Sexual de origen experimental proveniente de una población diploide sexual de la localidad de Cayastá, Santa Fe (Quarin et al., 2001).
Q4117	4x=40	Apomítico	Río Grande do Sul, Brasil (Martínez et al., 2001).
Q3775	4x=40	Apomítico	Tamaulipas, México (Martínez et al., 2001).
Q4188	4x=40	Sexual	Híbrido proveniente del cruzamiento entre Q3664 (4x sexual, Tifton, USA) x Q3853 (Capivarí, Río Grande do Sul, Brasil) (Quarin et al., 2003).
C4-4x	4x=40	Sexual	Sexual inducido mediante el tratamiento con colchicina de una planta proveniente de una población diploide sexual, Cayastá, Santa Fe, Argentina (Quarin et al., 2001).
Q4308	6x=60	Apomítico	Híbrido BIII obtenido por fertilización 2n+n de Q4023 (4x apomítico).

3.2 Cruzamientos

Los cruzamientos (Tabla 2) fueron llevados a cabo en el Instituto de Botánica del Noreste, IBONE-CONICET-UNNE Corrientes, en donde se dispone de una de las colecciones de germoplasma más importantes del mundo para el género *Paspalum*.

En la fase de floración (Figura 1a), se realizó la emasculación de las plantas madres eliminando las anteras en cámara húmeda (Burton, 1948). Por otro lado, insertando la inflorescencia en un sobre de papel sulfito (específicamente diseñado para polinización) y dando golpecitos suaves se juntó el polen de la planta macho. Luego, se introdujo la inflorescencia de la planta madre en el sobre, previamente emasculada, y se procedió a la polinización con el polen recolectado del progenitor masculino (Figura 1b).

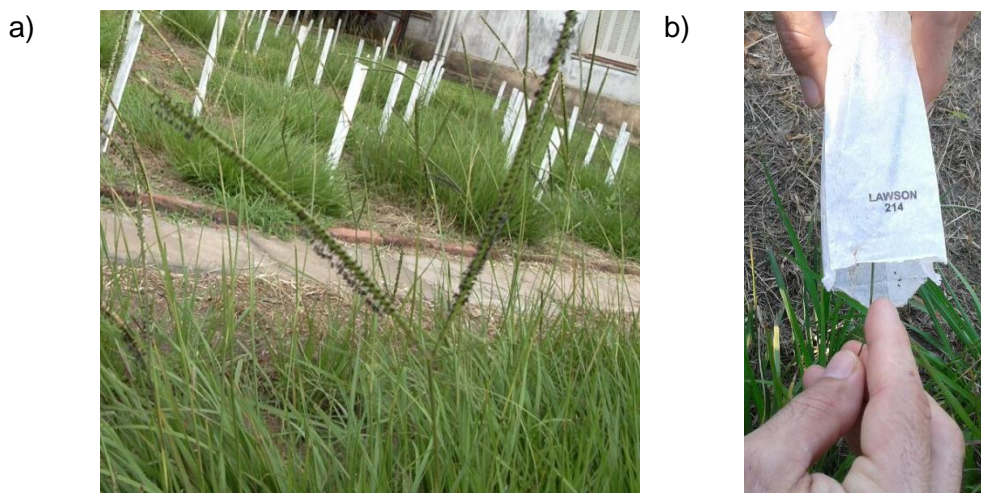


Figura 1. Cruzamientos en *P. notatum*. **a)** Planta que se utilizará como hembra previo a la emasculación. **b)** Polinización de la madre previamente emasculada con polen del progenitor masculino.

Disecciones bajo lupa, permitieron aislar un mínimo de 20 ovarios por cada cruzamiento, 24 h después de producida la polinización, y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido. Se extrajo el ARN total a partir de los ovarios polinizados de los cruzamientos indicados en la Tabla 1 utilizando el kit “SV Total RNA Isolation Kit” (Promega), según las instrucciones del fabricante. La calidad y cantidad del ARN extraído fue medido espectrofotométricamente en un equipo Perkin-Elmer Lambda Bio+, midiendo absorbancia (Abs) a 260 nm. La pureza de las muestras se controló evaluando la relación de Abs260nm/Abs280nm. La integridad del ARN se

estimó mediante electroforesis en geles de agarosa al 2 % (m/v) corridos a 60 mA, en TBE 0,5%.

3.3 Análisis del transcriptoma

Fue empleada la técnica de cDNA-AFLP (Vuylsteke et al., 2007; Xiao et al., 2009).

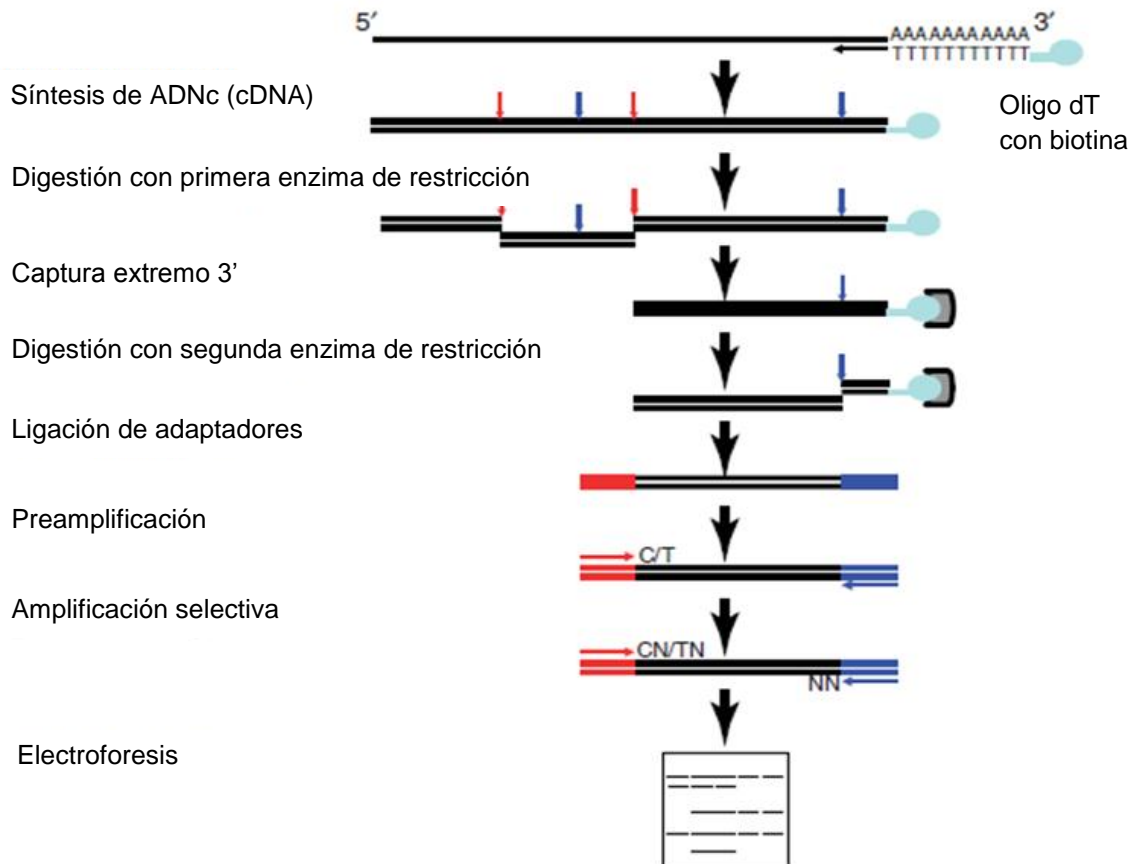


Figura 2. Esquema de la técnica de cDNA-AFLP.

Síntesis de la primera hebra de ADNc, reacción de retro transcripción:

Se realizó la transcripción reversa del ARNm de *P. notatum* con la enzima Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 20 μ l en donde se incorporaron 10 ng de oligo (dT) 12-18 (1 μ l),

80 ng de ARN total, 1 μ l de dNTP (10 mM). Fue incubado a 65°C durante 5 min y llevado rápidamente a una conservadora con hielo (cambio brusco de temperatura).

A continuación, se agregaron 4 μ l de solución reguladora 5X First-Strand (Invitrogen) y 2 μ l de DTT (0,1 M), luego de homogeneizar la mezcla fue llevado a 42°C durante 2 min. Se adicionaron 200 U de Superscript II RT (Invitrogen), mezclando suavemente con pipeta e incubado a 42°C durante 2 h.

La enzima se inactivó calentando a 70°C durante 15 min. El ADN copia sintetizado fue conservado a -20°C.

Síntesis de la segunda hebra de ADNc:

Fue preparada la mezcla para la síntesis de la segunda hebra, con 16 μ l de solución reguladora; 3 μ l de dNTPs 10 mM; 2,5 μ l de la enzima DNA polimerasa I (10 U μ l⁻¹, Invitrogen); 0,16 μ l de ribonucleasa H (10 U μ l⁻¹, Ambion); 118 μ l de agua destilada por cada muestra a procesar. Se agregó a la solución de síntesis de la primera hebra (20 μ l), dando un total de 160 μ l, llevado a termociclador por 1 h a 12°C y luego a 22°C por 1 h.

Posteriormente, se utilizó el kit "Núcleo Spin Extract II" (Macherey_Nagel) para purificar el ADNc. Se agregaron 320 μ l del buffer NT a los 160 μ l de la solución de la segunda hebra con la pipeta en la columna del kit y se centrifugó a 11000 g durante 1 min. Descartando lo que pasó a través del filtro, la columna fue transferida a un tubo limpio y se agregaron 600 μ l de NT3, centrifugando a 11000 g por 1 min, descartando nuevamente lo que pasó por el filtro de la columna. Finalmente, fue centrifugado a 10000 g durante 2 min. Transferida la columna a un tubo limpio, se agregaron 30 μ l buffer NE (elución), esto fue incubado a temperatura ambiente durante 1 min y centrifugado a 11000 g por 1 min.

Corte con la primera enzima de restricción:

A 20 μ l de la solución de ADNc purificada agregamos 1 μ l de la enzima de restricción CviA II (5 U μ l⁻¹, New England Biolabs) y 4 μ l de solución reguladora 4 NEB 10X, incubado a 25 °C durante 2 h.

Continuó la purificación de los fragmentos digeridos con el kit "Streptavidin MagneSphere Paramagnetic Particles" (Promega). Se preparó la solución reguladora para el lavado de las perlitas magnéticas: 40 ml NaCl 5 M; 2 ml 1 M Tris-HCl pH=8; 400 μ l EDTA 0,5 M pH=8; 2 ml Triton x-100; para producir 100 ml de buffer 2X STEX. Fueron usados 100 μ g de

perlitas magnéticas por cada muestra a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y efectuados 3 lavados con 200 μl del buffer 2X STEX cada uno. Finalmente, se resuspendieron las perlitas magnéticas en 40 μl del buffer 2X STEX y se agregó a cada muestra de ADNc, incubando 30 minutos con agitación. Dado que para la síntesis del ADNc utilizamos un cebador oligo dT biotilado, la biotina se unió a la estreptavidina de las perlitas magnéticas, recuperando los fragmentos que contenían el oligo dT.

Colocados los tubos en el separador magnético, el sobrenadante del corte con la primera enzima de restricción fue descartado con micropipeta. Luego, retirados de la estructura magnética, se agregaron 100 μl de buffer 1X STEX transfiriéndose cada solución a un tubo limpio. Puestos nuevamente en el separador, se descartó el sobrenadante y se continuó hasta llegar a cuatro lavados. Por último, fueron agregados 30 μl de TE a cada muestra y se colocaron en tubos estériles.

Corte con la segunda enzima de restricción:

Se agregaron 10 μl de la mezcla de segunda digestión [4 μl de buffer 10X; 4 μl de *TaqI* (20 $\text{U}\mu\text{l}^{-1}$, New England Biolabs); 2 μl de agua destilada] a los 30 μl anteriores y se incubó a 65°C durante 2 h. Luego, fueron colectadas las perlitas usando el separador magnético. El sobrenadante, conteniendo los fragmentos de ADNc digeridos con ambas enzimas de restricción, fue llevado a un tubo limpio.

Ligación de adaptadores:

Continuó la ligación de los adaptadores *TaqI* y *CviAII* según Vuylsteke et al. (2007). A los 40 μl se le agregaron 5 μl de buffer ligasa 10X; 1 μl de adaptador *TaqI* (50 $\text{pmol}\mu\text{l}^{-1}$); 3 μl de adaptador *CviAII* (5 $\text{pmol}\mu\text{l}^{-1}$) y 1 μl de T4 DNA ligasa, dando un volumen final de 50 μl . Se incubó toda la noche a 4°C.

Preamplificación:

Fue usado como molde 1 μl de solución de ADNc ligado a los adaptadores de cada muestra. La reacción de pre-amplificación se llevó a cabo en 20 μl de volumen final conteniendo: 4 μl de buffer 5X; 0,4 μl de cebador para preamplificación *TaqI* (10 μM); 0,4 μl de cebador para preamplificación *CviAII* (10 μM); 0,4 μl de dNTPs (10 mM cada uno), 13,6 μl de agua destilada y 0,2 μl de la enzima GoTaq ADN polimerasa (5 $\text{U}\mu\text{l}^{-1}$, Promega). Las

condiciones de amplificación fueron: 5 min a 95°C; 30 seg a 94°C, 30 seg a 55°C y 1 min a 72°C (30 ciclos) y 10 min a 72°C.

Amplificación Selectiva:

Los productos de la pre-amplificación se diluyeron 1/3, usándose 1 µl como molde en cada una de las reacciones de amplificación selectiva con 16 combinaciones de cebadores (un nucleótido selectivo cada uno). La amplificación fue hecha en 10 µl de volumen final, conteniendo: 2 µl de buffer 5X; 6,2 µl de agua destilada; 0,2 µl de cebador para amplificación selectiva TaqI (10µM); 0,2 µl de cebador para amplificación selectiva CviAI (10µM); 0,2 µl de dNTPs (10mM cada uno) y 0,2 µl de la enzima GoTaq ADN polimerasa (5 Uµl⁻¹, Promega). Las condiciones de amplificación fueron: 5 min a 95°C; 30 seg a 94°C, 30 seg a 65°C (bajando 0,7°C cada ciclo) ,1 min a 72°C (12 ciclos); 30 seg a 94°C; 30 seg a 55°C y 1 min a 72°C (30 ciclos) y 10 min a 72°C.

Electroforesis:

Se compararon los perfiles de amplificación de ovarios polinizados derivados de genotipos apomícticos y sexuales en geles de poliacrilamida, buscando identificar transcritos de expresión diferencial en endospermos con distintas combinaciones genómicas materna/paterna (Tabla 2).

Los productos de las amplificaciones selectivas fueron analizados en geles de secuencia de poliacrilamida 6 % m/v en condiciones desnaturizantes (acrilamida/bisacrilamida 19:1, urea 7,5 M). La electroforesis se realizó en una cuba vertical utilizando TBE 0,5X y 1X en los reservorios superior e inferior, respectivamente, pre-corriendo durante 1 h a 60 W de potencia, sembrando las muestras previamente desnaturizadas a 94°C por 5 min. La separación de las bandas se produjo corriendo a 60 W de potencia, durante aproximadamente 2 h, procediendo a la detección de las bandas mediante tinción con AgNO₃. Brevemente, en la primera fase de la detección, se fijó el gel en ácido acético 10 % v/v. Luego de realizar tres lavados de 3 min con H₂O_d se sumergió el gel en nitrato de plata 0,1 % m/v y formaldehído 0,055 % v/v durante 30 min. Posteriormente, un lavado de 10 seg en H₂O_d, incubando en la solución de revelado fría (carbonato de sodio 3 % m/v; formaldehído 0,055 % v/v y tiosulfato de sodio 0,002 % m/v) hasta la aparición de bandas (aproximadamente 5 min, dependiendo de la temperatura de la solución de revelado). La reacción de revelado fue detenida por la adición de 1 l de solución de fijación

(ácido acético 10 % v/v). Finalmente, se lavó el gel en H₂O_d durante al menos 20 minutos para eliminar los restos de las soluciones utilizadas en la detección.

3.4 Aislamiento de bandas de interés

Las bandas que en geles de acrilamida mostraron los polimorfismos deseados fueron aisladas, re-amplificadas y enviadas a secuenciar a MacroGen Inc. (Corea). Las seleccionadas para ser secuenciadas, se cortaron con un bisturí, a partir del gel de poli(acrilamida) previamente humedecido con H₂O_d e incubadas en 30 µl de solución reguladora de elución (acetato de amonio 0,5 M y EDTA 1 mM, pH=8) a 37°C durante 16 h. Extraído el sobrenadante, fueron conservadas a -20°C.

3.5 Amplificación de bandas de interés

Un total de 107 bandas, incluidos los controles (bandas que mostraron patrones de expresión monomórficos en los cruzamientos analizados), fueron amplificadas en un volumen de 50 µl, utilizando 1 µl como molde y las mismas condiciones descritas para la amplificación selectiva.

Para evaluar la calidad de las muestras re-amplificadas, se corrieron en geles de agarosa (1% m/v en TBE 0,5X) teñidos con SYBR SAFE (Invitrogen), sembrando un marcador de peso molecular (100 bp Quick-load, New England Biolabs) para corroborar el tamaño.

3.6 Análisis bioinformático de secuencias

Las secuencias y cromatogramas provistos por MacroGen Inc. (Corea) fueron analizados con el programa Sequencher versión 4.1.4 (demo). Las correspondientes a los cebadores específicos fueron detectadas y eliminadas. Las secuencias de longitud menor a 50 pb no fueron incluidas. Los análisis de similitud se realizaron utilizando el programa BLAST 2.2.25 del sitio del NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Las búsquedas fueron confinadas a las especies de plantas (plants taxid: 3193) indagando en las siguientes bases de datos: Expressed Sequence Tags (EST) BLASTn y secuencias proteicas no redundantes (nr) BLASTx. Se comparó la similitud con el genoma de *Arabidopsis thaliana* (Linnaeus) Heynhold, mediante la herramienta TAIR BLASTp 2.2.8 del sitio Arabidopsis Information Resource (<http://www.arabidopsis.org/Blast/>).

4- RESULTADOS

4.1 Cruzamientos Realizados:

Tabla 2. Cruzamientos entre genotipos sexuales y apomícticos de *P. notatum* para obtener distintas contribuciones maternas:paternas en el endospermo.

Progenitor femenino	Polinizador	Embrión*	Endospermo*	m:p*	Semilla	Código ¹
Q4117 (4x A)	H398 (2x S)	4x (2n+0)	9x (2n+2n+n)	8:1	Si	4
	Q3775 (4x A)	4x (2n+0)	10x (2n+2n+n)	4:1	Si	3
	C4-4x (4x S)	4x (2n+0)	10x (2n+2n+n)	4:1	Si	7
	Q4308 (6x A)	4x (2n+0)	11x (2n+2n+n)	8:3	Si	8
Q4188 (4x S)	H398 (2x S)	3x (n+n)	5x (n+n+n)	4:1	No	1
	Q3775 (4x A)	4x (n+n)	6x (n+n+n)	2:1	Si	2
C4-4x (4x S)	Q4084-8(2x S)	3x (n+n)	5x (n+n+n)	4:1	No	6
C4-2x (2x S)	Tifton 9 (2x S)	2x (n+n)	3x (n+n+n)	2:1	Si	9
Q3775 (4x A)	Q4117 (4x A)	4x (2n+0)	10x (2n+2n+n)	4:1	Si	5

*Relación materna:paterna esperada

¹Nombre simple para hacer referencia al tipo de cruzamiento realizado, fue utilizado durante el proceso de investigación, sobre todo en la rotulación de tubos de cada muestra.

Con el fin de caracterizar el transcriptoma al inicio de la embriogénesis y la formación de semillas, se realizaron cruzamientos de varias razas de *P. notatum*, obteniendo una gran diversidad de relaciones genómicas (m;p) en el endospermo por vía sexual y apomíctica. Los genotipos utilizados difieren en niveles de ploidía y modos de reproducción (Tabla 2).

Resultados de las contribuciones maternas:paternas en embrión y endospermo

Código 1: **Q4188** (4x S) x **H398** (2x S)

El embrión se desarrolla a partir de una ovocélula reducida (n) con una constitución 2x (reducción meiótica), más el aporte del gametofito masculino (n). El resultado es un embrión 3x, debido a un aporte materno 2x: paterno x (n + n).

El endospermo se desarrolla a partir de una célula central binucleada reducida (n + n) con una constitución 4x (2x + 2x) más la contribución del gametofito masculino reducido de un diploide, 1x. El resultado es un endospermo 5x (n + n + n), debido a un aporte materno 4x: paterno 1x. Por lo tanto la relación m:p en el endospermo es 4:1.

En este caso, no es esperable la producción de semillas ya que el ovario proviene de una hembra sexual y el NBE es diferente a 2m:1p.

Código 2: **Q4188** (4x S) x **Q3775** (4x S)

El embrión se desarrolla a partir de una ovocélula reducida (n) con una constitución $2x$ (reducción meiótica), más el aporte del gametofito masculino (n) $2x$. El resultado es un embrión $4x$, debido a un aporte materno $2x$: paterno $2x$ ($n + n$).

El endospermo se desarrolla a partir de una célula central binucleada reducida ($n + n$) con una constitución $4x$ ($2x + 2x$) más la contribución del gametofito masculino reducido (n) de un tetraploide, $2x$. El resultado es un endospermo $6x$ ($n + n + n$), debido a un aporte materno $4x$: paterno $2x$. Por lo tanto la relación m:p en el endospermo es 4:2, es decir 2:1.

En este caso, es esperable la producción de semillas ya que el ovario proviene de una hembra sexual y el NBE es $2m:1p$.

Código 3: **Q4117** (4x A) x **Q3775** (4x A)

El embrión se desarrolla por partenogénesis a partir de una ovocélula no reducida ($2n$) con una constitución $4x$ (idéntica a la madre, ausencia de reducción meiótica), sin aporte del gametofito masculino (ausencia de fecundación). El resultado es un embrión $4x$, debido a un aporte materno $2n$: paterno 0 ($2n + 0$).

El endospermo se desarrolla por pseudogamia a partir de una célula central binucleada no reducida ($2n + 2n$) con una constitución $8x$ ($4x + 4x$) más la contribución del gametofito masculino $2x$ (n , normal y reducido). El endospermo es $10x$ ($2n + 2n + n$), aporte materno $8x$: paterno $2x$. Por tanto la relación m:p en el endospermo es (8:2) 4:1.

Se espera producción de semillas, ya que la hembra es apomictica y producen semillas independientemente de variaciones en la relación m:p 2:1.

Código 4: **Q4117** (4x A) x **H398** (2x S)

El embrión se desarrolla a partir de una ovocélula no reducida ($2n$) con una constitución $4x$ (idéntica a la madre, ausencia de reducción meiótica), sin aporte del gametofito masculino (ausencia de fecundación). El resultado es un embrión por partenogénesis $4x$, consecuencia de un aporte materno $2n$: paterno 0 ($2n + 0$).

El endospermo se desarrolla por pseudogamia a partir de una célula central binucleada no reducida ($2n + 2n$) con una constitución $8x$ ($4x + 4x$) más la contribución del gametofito masculino $1x$ (n , normal y reducido). El resultado es un endospermo $9x$ ($2n + 2n + n$), por un aporte materno $8x$: paterno $1x$. Por lo tanto la relación m:p en el endospermo es 8:1.

En este caso existe producción esperada de semillas, ya que la hembra es apomictica y producen semillas independientemente de variaciones en la relación m:p 2:1.

Código 5: **Q3775** (4x A) x **Q4117** (4x A). Ídem código 3.

Código 6: **C4-4x** (4x S) x **Q4084-8** (2x S). Ídem código 1.

Código 7: **Q4117** (4x A) x **C4-4x** (4x S)

El embrión se desarrolla por partenogénesis a partir de una ovocélula no reducida ($2n$) con una constitución $4x$ (idéntica a la madre, ausencia de reducción meiótica), sin aporte del gametofito masculino (ausencia de fecundación). El resultado es un embrión $4x$, debido a un aporte materno $2n$: paterno 0 ($2n + 0$).

El endospermo se desarrolla por pseudogamia donde la célula central binucleada no reducida ($2n + 2n$) con una constitución $8x$ ($4x + 4x$), es fecundada por un gametofito masculino $2x$ (n , normal y reducido). Por tanto el endospermo es $10x$ ($2n + 2n + n$), consecuencia del aporte materno $8x$: paterno $2x$. Siendo la relación m:p en el endospermo (8:2) 4:1.

Se espera producción de semillas, por provenir de una hembra apomictica insensible al NBE.

Código 8: **Q4117** (4x A) x **Q4308** (6x A)

El embrión se desarrolla por partenogénesis, una ovocélula no reducida ($2n$) con una constitución $4x$ (idéntica a la madre, ausencia de reducción meiótica), sin aporte del gametofito masculino (ausencia de fecundación). El resultado es un embrión $4x$, debido a un aporte materno $2n$: paterno 0 ($2n + 0$).

El endospermo se desarrolla por pseudogamia a partir de una célula central binucleada no reducida ($2n + 2n$) con una constitución $8x$ ($4x + 4x$) más la contribución del gametofito masculino $3x$ (n , normal y reducido). El resultado es un endospermo $11x$ ($2n + 2n + n$), ya que el aporte materno es $8x$: paterno $3x$. Por lo tanto la relación m:p en el endospermo es 8:3.

En este caso también existe producción esperada de semillas.

Código 9: **C4-2x** (2x S) x **Tifton 9** (2x S)

A través del evento de doble fecundación, el embrión desarrolla a partir de una ovocélula reducida (n) con una constitución x , más el aporte del gametofito masculino x (n). El resultado es un embrión $2x$, debido a un aporte materno $1x$: paterno $1x$ ($n + n$).

El endospermo desarrolla desde una célula central binucleada reducida ($n + n$) con una constitución $2x$ ($1x + 1x$) por fecundación del gametofito masculino reducido, $1x$. El endospermo es $3x$ ($n + n + n$), consecuencia de un aporte materno $2x$: paterno $1x$. Por lo tanto la relación m:p en el endospermo es 2:1, esperándose así la producción de semillas.

4.2 Análisis de genes de expresión diferencial en ovarios de *P. notatum*

Para el análisis mediante la técnica de cDNA-AFLP se utilizaron 16 combinaciones de cebadores. Cada una produjo en promedio 30 fragmentos (100-800 pb). Los perfiles de expresión fueron altamente reproducibles. Una sección de un perfil típico en gel de poliacrilamida de cDNA-AFLP se muestra en la Figura 3.

Además se realizaron réplicas técnicas, para determinar similitud en las amplificaciones (Figura 4).

Se detectaron aproximadamente 3780 TDFs como resultado del producto de 9 cruzamientos, 30 fragmentos detectados por calle sembrada y 14 combinaciones de cebadores que en promedio de las 16 utilizadas funcionaron bien. Fueron aislados 107 por tener un polimorfismo de interés, entre cruzamientos que producían o no semilla. Estos TDFs diferían en presencia/ausencia o en la intensidad entre los diferentes 9 cruzamientos, por lo que fueron considerados como fragmentos expresados diferencialmente (DETDFs).

Una vez aisladas las bandas a partir del gel, se amplificaron por PCR y los tamaños de los fragmentos fueron confirmados en geles de agarosa (Figura 5). Se enviaron a secuenciar 91 sobre un total de 107 fragmentos por presentar la masa necesaria para la secuenciación. Quedaron seleccionados 49 de los 91 DETDFs que mostraron buena calidad en los cromatogramas. Presentaron un rango de 57 a 380 pb con longitud media de 219 pb.

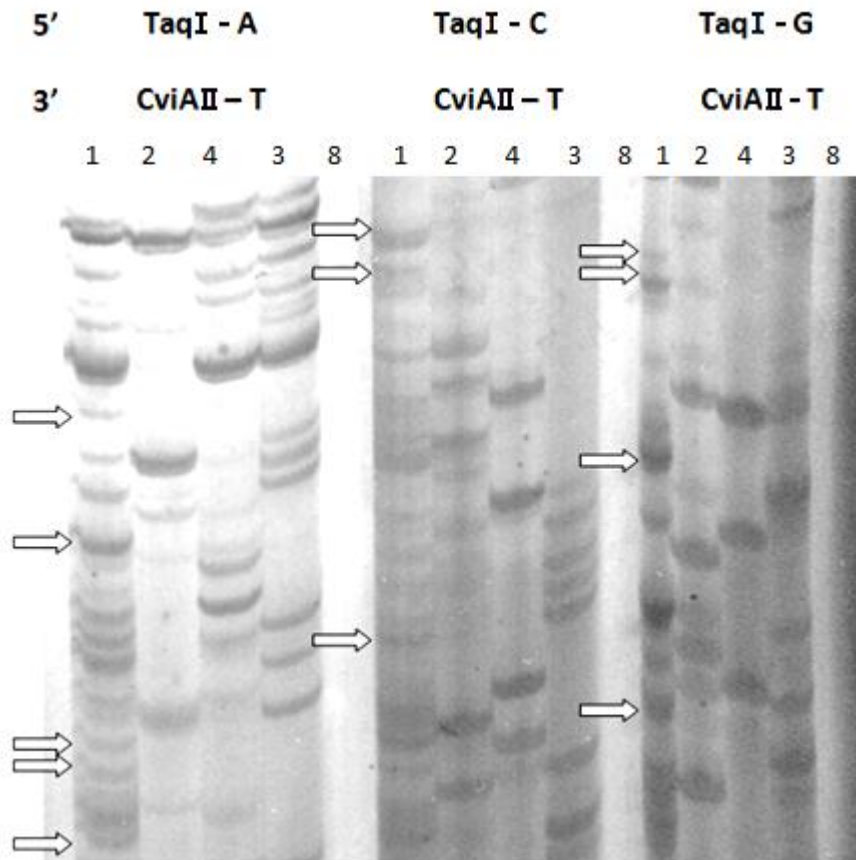


Figura 3. Análisis mediante cDNA-AFLP de cinco cruzamientos distintos (1, 2, 4, 3 y 8) utilizando 3 combinaciones de cebadores selectivos. Se muestra un gel de acrilamida teñido con AgNO_3 . Las flechas indican bandas de expresión diferencial, sólo presentes en el cruzamiento 1 [Q4188 (4x S) x H398 (2x S)] que no se espera producción semilla. La hembra es un tetraploide sexual y las plantas de *P. notatum* sexuales tienen un número de balance endospermico efectivo en las que sólo se producen semillas cuando la proporción m:p es 2:1.

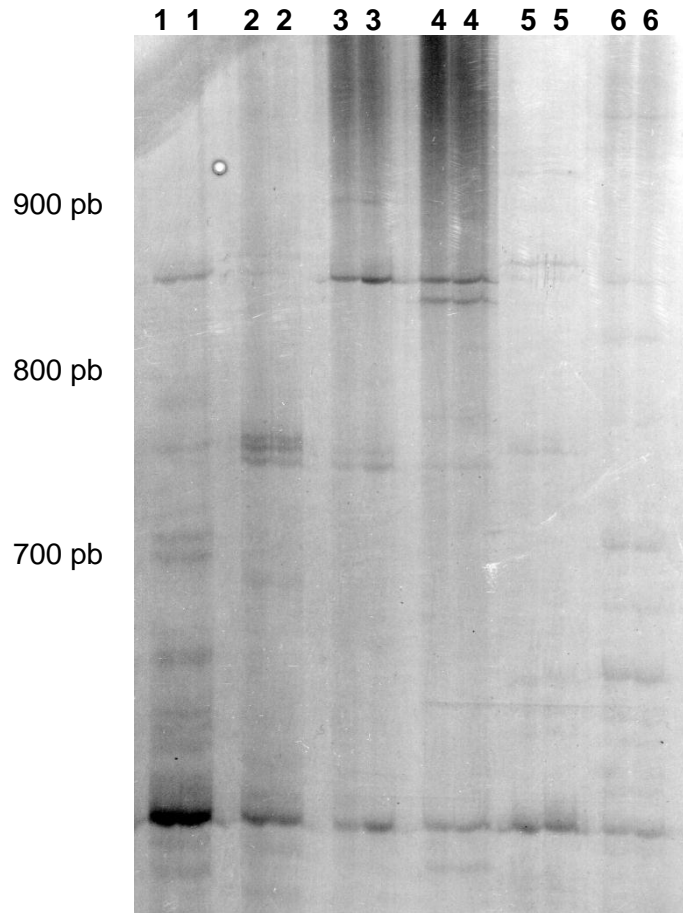


Figura 4. Análisis mediante cDNA-AFLP en donde se analizaron réplicas de los cruzamientos 1 al 6 para la combinación de cebadores Taq I G / CviA II A, demostrando similitud en las amplificaciones.

Análisis de calidad de las bandas de interés:

De las 107 bandas analizadas, 91 confirmaron tener la calidad necesaria para enviar a secuenciara MacroGen Inc. (Figura 5).



Figura 5. Análisis de calidad de las bandas de cDNA-AFLP, aisladas de geles de poliacrilamida, mediante separación electroforética en geles de agarosa teñidos con Sybr Safe. Esto se realizó para verificar la calidad de las muestras previo a la secuenciación.

La mayoría de las muestras presentaron una banda única con tamaños entre 200-600 pb. Las que presentaron baja intensidad y/o más de una banda no fueron enviadas a secuenciar.

4.3 Clasificación de los DETDFs

Se agruparon los DETDFs de acuerdo al patrón de expresión, si provenían de cruzamientos con hembras sexuales (NBE sensible), hembras apomícticas (NBE insensible) o de ambos. Fueron clasificados por su producción de semilla en diferentes clases, teniendo en cuenta el modo de reproducción de la planta utilizada como hembra^(a), su relación m:p esperada en el endospermo^(b) y el total en cada clase.

Tabla 3. Clases de DETDFs basado en patrones de expresión génica en diversos escenarios reproductivos

Patrón de expresión	Producción de semilla esperada	Clase	APO ^a			SEX ^a		Total de DETDFs
			4:1 ^b	8:1 ^b	8:3 ^b	2:1 ^b	4:1 ^b	
Sexuales (NBE sensible)	Si	A				X		6
	No	B					X	22
	Si/No	C				X	X	1
Apomícticas (NBE insensible)	Si	D	X					3
Apomícticas y Sexuales	Si/Si/Si/Si	E	X	X	X	X		4
	Si/Si	F	X			X		9
	Si/No	G	X				X	2
	Si/Si/Si/Si/No	H	X	X	X	X	X	2
Total								49

Seis DETDFs fueron encontrados en cruzamientos con hembras sexuales y una relación esperada en el endospermo de 2:1 (Tabla 3, Clase A). Podría considerarse como la situación normal y por lo tanto generarían semillas.

Además, 22 DETDFs se expresaron cuando la relación m:p en el endospermo era 4:1 utilizando una planta tetraploide sexual como progenitor femenino (Tabla 3, Clase B). Como la relación m:p fue diferente de la proporción 2:1 necesaria para cumplir con la teoría del NBE, se predijo que no formarían semilla.

Un único transcrito (Tabla 3, Clase C) estuvo presente cuando se compararon solo ovarios de reproducción sexual con relaciones m:p en el endospermo de 2:1 (producirían semillas) y 4:1 (no producirían semillas), considerado entonces como control.

Por otro lado, se expresaron 3 DETDFs exclusivamente en ovarios derivados de cruzamientos donde la madre era apomíctica y la relación m:p era distinta de 2:1, más precisamente 4:1. Situación interesante, porque difiere de la relación 2:1 típica de la mayoría de las angiospermas y de las plantas sexuales de la especie, produciendo semillas independientemente de la relación 2:1 materna:paterna (Tabla 3, Clase D).

A su vez, 17 de los 49 DETDFs fueron detectados en cruzamientos derivados de hembras apomíticas y sexuales (Tabla 3, Clases E, F, G y H). Cuatro fueron encontrados usando un tetraploide apomítico como progenitor femenino (Tabla 3, Clase E), donde las relaciones m:p en el endospermo fueron 4:1, 8:1, 8:3 y, además cuando la hembra era sexual y la relación genómica fue 2:1. En todos los casos se esperaría producción de semillas.

También, 9 DETDFs se expresaron en ovarios obtenidos de cruzamientos que desarrollarían semilla, con un progenitor femenino tetraploide apomítico, donde las relaciones m:p en el endospermo fueron 4:1 y cuando la hembra era sexual, donde el NBE fue 2:1 (Tabla 3, Clase F).

Otros 2 transcriptos fueron encontrados como control cuando se comparó solo ovarios con relación m:p 4:1 de madres apomíticas (que producirían granos por su insensibilidad al NBE) y sexuales (sin esperarse producción de semilla) (Tabla 3, Clase G).

Finalmente dos transcriptos control estuvieron presente en todos los casos analizados, cuando el progenitor femenino fue un tetraploide apomítico, donde las relaciones m:p en el endospermo fueron 4:1, 8:1, 8:3, y también cuando la hembra era sexual con relaciones genómicas 2:1 y 4:1 (Tabla 3, Clase H).

4.4 Análisis Bioinformático

De acuerdo a la calidad de los cromatogramas, resultaron 49 de 91 DETDFs aptos para su análisis bioinformático. Según la analogía con secuencias de *Arabidopsis* y utilizando el criterio de función molecular de Ontología Génica (del inglés Gene Ontology cuya abreviación es GO) de la base de datos de TAIR (Tabla 4), han sido clasificadas en categorías funcionales.

Funciones de las diferentes Clases de DETDFs:

Las seis secuencias Clase A (Tabla 3) fueron clasificadas en las categorías de defensa frente a enfermedades, procesos energéticos y desconocidas (Tabla 4).

Los 22 DETDFs Clase B (Tabla 3) fueron designados en grupos involucrados en transducción de señales, procesos metabólicos, transportadores, síntesis de proteínas, procesos de obtención de energía, transcripción, división y crecimiento celular y función desconocida (Tabla 4).

El único Clase C (Tabla 3), posee función desconocida (Tabla 4).

Se constató que los DETDFs Clase D (Tabla 3), participarían en procesos metabólicos generales (D2, Tabla 4) y en procesos desconocidos (D1 y D3 Tabla 4), pudiendo estar relacionados con la insensibilidad al NBE.

Los cuatro transcritos Clase E (Tabla 3), fueron clasificados dentro de transducción de señales, procesos energéticos y desconocidos (Tabla 4).

En el caso de los nueve Clase F (Tabla 3), correspondieron a las categorías de transducción de señales, división y crecimiento celular, estructura celular, transcripción y desconocidas (Tabla 4).

Las dos secuencias Clase G, tienen función desconocida y de transducción de señales. Mientras que los dos Clase H, pertenecieron a categorías funcionales de procesos metabólicos y tráfico intracelular (Tabla 4).

Los 49 DETDFs fueron clasificados en 11 categorías funcionales. Los grupos más numerosos de genes correspondieron a procesos de transducción de señales (15%), metabolismo y procesos de obtención de energía (6% cada uno), mantenimiento de la estructura celular, transcripción, división y crecimiento celular (4% cada uno). Un grupo menor de DETDFs se clasificó como implicado en procesos de defensa frente a enfermedades, síntesis de proteínas, transportadores y transporte intracelular (2% cada uno). Finalmente, el 53% perteneció a la categoría desconocido (Figura 6).

Categorías Funcionales:

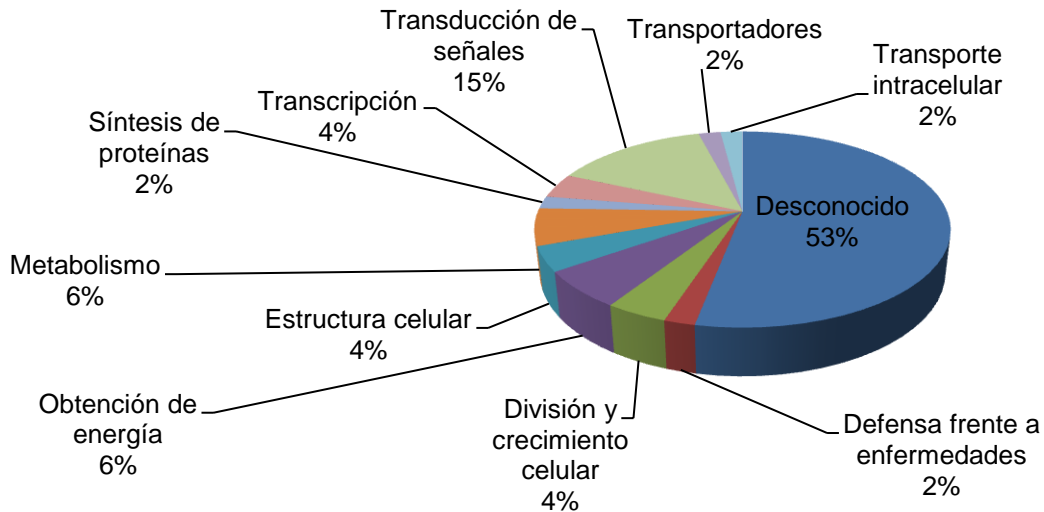


Figura 6. Categorías funcionales de los transcritos de *P. notatum*.

Los resultados se asemejan a los encontrados en el análisis del transcriptoma correspondiente a las 3 horas después de producida la polinización, también llevado a cabo por el grupo de trabajo, pero que no forma parte de esta tesis. Los más grandes conjuntos de genes se refieren a grupos funcionales implicados en la transcripción (10%), transducción de señales, metabolismo y estructura celular (8% cada uno) (Felitti et al., enviado para su publicación). Burson (1987) informó que, incluso en cruces interespecíficos de especies de *Paspalum* el tubo polínico tarda en alcanzar la micropila entre 30 min y 2 h. Por lo tanto, asumimos que la doble fecundación ocurrió en *P. notatum* antes de 3 h después de la polinización.

Tabla 4. Comparación de las secuencias de los DETDFs de *P. notatum* con secuencias de función conocida.

Clase	Presente en Cruzamiento N°	DETDFs	Longitud (pb)	EST con BLASTN	Proteína por BLASTX	TAIR BLASTP	Procesos
				ID; nombre; (e-value)	ID; nombre; (e-value)	ID; GO function; (e-value)	
A	2 y 9 (S 2:1)	A1	113	n	–	–	Desconocido
		A2	380	gb GD005524.1 ; Clon de cDNA <i>Panicum virgatum</i> ; 6e-26	ref XP_007914404.1 ; Supuesta proteína nicotinato fosforribosil transferasa [<i>Togninia minima</i>]; 5e-10	AT2G21550; Actividad oxidoreductasa; e-162	Obtención de energía
		A3	80	gb BM374982.1 ; Clon de cDNA <i>Hordeum vulgare</i> ; 2e-23	n	–	Desconocido
		A4	57	n	–	–	Desconocido
		A5	136	gb BG649280.1 ; Clon de cDNA embrión (EM1) <i>Sorghum bicolor</i> ; 5e-8	XP_004985028.1 Isoforma de proteína [<i>Setaria italica</i>]; 9e-11	AT4G38670; Respuesta a patogénesis; 9e-89	Defensa frente a enfermedades
		A6	162	dbj HX819322.1 ; Clon de cDNA <i>Brachypodium distachyon</i> ; 7e-77	ref XP_003614396.1 ; Proteína hipotética MTR_5g051150 [<i>Medicago truncatula</i>]; 1e-26	–	Desconocido
B	1 y 6 (S 4:1)	B1	169	gb JG825947.1 ; Clon de cDNA <i>Panicum virgatum</i> ; 2e-46	ref XP_004986218.1 ; Receptor quinasa LRR [<i>Setaria italica</i>]; (5e-14)	AT2G16250; Actividad quinasa; 9e-92	Transducción de señales
		B2	296	gb JG772215.1 ; Clon de cDNA <i>Eulalipsis binata</i> ; 1e-13	n	–	Desconocido
		B3	95	gb EE189502.2 ; Clon de cDNA <i>Zea mays</i> ; 2e-29	ref XP_002461336.1 ; Proteína hipotética [<i>Sorghum bicolor</i>]; 4e-09	AT2G23080; Actividad quinasa; e-165	Transducción de señales

B4	235	n	-	-	Desconocido
B5	179	n	-	-	Desconocido
B6	210	n	-	-	Desconocido
B7	164	gb EB656343.1 ; cDNA 3' <i>Cenchrus ciliaris</i> , 1e-05	XP_004953069.1; Proteína con repeticiones de pentapeptidos [<i>Setaria italica</i>]; 4e-64	AT1G19520; Cariogamia; e-123	Metabolismo
B8	124	gb CA285443.1 ; Clon de cDNA Caña de azúcar híbrido <i>Saccharum</i> ; 6e-32	ref XP_002461336.1 ; Proteína hipotética [<i>Sorghum bicolor</i>]; 6e-09	AT2G23080; Actividad quinasa; e-166	Transducción de señales
B9	102	gb AI622797.1 ; Clon de cDNA <i>Zea mays</i> ; 1e-14	n	-	Desconocido
B10	98	gb EE189502.2 ; Clon de cDNA <i>Zea mays</i> ; 2e-30	ref XP_004981671.1 ; Subunidad alfa caseína quinasa II [<i>Setaria italica</i>]; 5e-10	AT2G23080; Actividad quinasa; e-165	Transducción de señales
B11	152	gb JK573076.1 ; Clon de cDNA <i>Setaria italica</i> ; 6e-24	ref XP_004978483.1 ; Proteína no caracterizada [<i>Setaria italica</i>]; 1e-12	AT3G13410; Función molecular; 2e-51	Desconocido
B12	63	gb HO324889.1 ; Clon de cDNA <i>Panicum virgatum</i> ; 2e-14	gb ACN35869.1 ; Desconocido [<i>Zea mays</i>]; 3e-05	AT1G53210; Actividad transportadora; e-107	Transportadores
B13	174	gb CX622676.1 ; Clon cDNA <i>Sorghum bicolor</i> ; 6e-47	gb AFW84801.1 ; Proteína hipotética [<i>Zea mays</i>]; 5e-06	AT2G27020; Actividad peptidasa; e-119	Síntesis de proteínas

		B14	83	n	-	-	Desconocido
		B15	85	dbj CJ667666.1 ; Clon de cDNA <i>Triticum aestivum</i> ; 5e-11	ref XP_001783093.1 ; Proteína predicha [<i>Physcomitrella patens</i>]; 3e-05	AT1G48030; Unión de ATP; 2e-64	Obtención de energía
		B16	131	n	-	-	Desconocido
		B17	322	gb CA292713.1 ; Clon cDNA del híbrido <i>Saccharum</i> , Caña de azúcar; 4e-34	ref XP_002447111.1 ; Proteína hipotética [<i>Sorghum bicolor</i>]; 6e-21	AT5G60570; Función molecular; e-100	Desconocido
		B18	128	gb FL937539.1 ; Clon de cDNA de raíz <i>Panicum virgatum</i> ; 5e-8	ref NP_001151606.1 ; LOC100285240 [<i>Zea mays</i>]; 5e-5	AT4G36020; Proteína de unión al ADN; 3e-24	Transcripción
		B19	88	gb ES888878.1 ; cDNA <i>Nicotiana benthamiana</i> ; 1e-13	ref XP_003613035.1 ; Proteína hipotética MTR_5g031940 [<i>Medicago truncatula</i>]; 3e-08	n	Desconocido
		B20	106	n	-	-	Desconocido
		B21	224	gb JG814581.1 ; Clon cDNA <i>Panicum virgatum</i> ; 4e-95	ref XP_002460109.1 ; Proteína hipotética [<i>Sorghum bicolor</i>]; 1e-22	AT5G62740; Proteína de unión; e-133	División y crecimiento celular
		B22	71	dbj CJ823604.1 ; Clon de cDNA <i>Triticum aestivum</i> ; 3e-12	XP_003588355.1; Proteína mitocondrial [<i>Medicago truncatula</i>]; 1e-70	ATMG00030.1; Función molecular; 2e-31	Desconocido
C	1 y 6 (S 4:1) 2 y 9 (S 2:1)	C1	164	gb FG970314.1 ; Clon cDNA de embrión maduro <i>Oryza sativa</i> ; 3e-75	XP_007132740.1 ; Proteína hipotética [<i>Phaseolus vulgaris</i>]; 4e-25	n	Desconocido

D	3, 5 y 7 (A 4:1)	D1	124	n	–	–	Desconocido
		D2	297	gb EB655165.1]; Clon de cDNA <i>Cenchrus ciliaris</i> ; 6e-31	AEO09338.2], Sacarosa sintasa [<i>Musa acuminata</i> AAA Group], 9e-11	AT5G20830.1; Actividad sacarosa sintasa; e-111	Metabolismo
		D3	241	gb BE357883.1]; Clon de cDNA <i>Sorghum bicolor</i> ; 1e-115	ref XP_002488947.1]; Proteína hipotética [<i>Sorghum bicolor</i>]; 9e-49	n	Desconocido
E	2 (S 2:1) 3 (A 4:1) 4 (A 8:1) 8 (A 8:3)	E1	263	gb JK591437.1]; DAHP sintasa <i>Setaria italica</i> ; 7e-99	ref NP_001182963.1]; Proteína no caracterizada [<i>Zea mays</i>]; 1e-46	n	Desconocido
		E2	104	gb EE189502.2]; Clon de cDNA <i>Zea mays</i> ; 4e-26	gb EMS68493.1]; Subunidad alfa caseína quinasa II [<i>Triticum urartu</i>]; 1e-10	AT2G23080; Actividad quinasa; e-165	Transducción de señales
		E3	100	gb JG913881.1]; Clon de cDNA <i>Panicum virgatum</i> , 4e-14	ref NP_973518.1]; Proteína caseína quinasa II cadena alfa 3, [<i>Arabidopsis thaliana</i>]; 8e-06	AT5G67380; Unión de ATP; 3e-76	Obtención de energía
		E4	90	n	–	–	Desconocido
F	2 y 9 (S 2:1) 3, 5 y 7 (A 4:1)	F1	142	gb CN606831.1]; Clon de cDNA de verticilo foliar de Caña de azúcar híbrido <i>Saccharum</i> ; 1e-61	ref XP_003614385.1]; Endonucleasa [<i>Medicago truncatula</i>]; 9e-13	AT3G13920; Proteína de unión; e-164	División y crecimiento celular
		F2	151	gb EE292604.2]; Clon de cDNA <i>Zea mays</i> ; 3e-24	ref XP_004980340.1]; Proteína no caracterizada [<i>Setaria italica</i>]; 8e-06	AT5G65910; Función molecular; 2e-41	Desconocido
		F3	100	gb EE189502.2]; Clon de cDNA <i>Zea mays</i> ; 5e-31	ref XP_004981671.1]; Subunidad alfa caseína quinasa II [<i>Setaria italica</i>]; 2e-10	AT2G23080; Actividad quinasa; e-165	Transducción de señales
		F4	114	gb CA280749.1]; Clon cDNA híbrido <i>Saccharum</i> Caña de azúcar; 1e-08	KCW87067; Proteína hipotética [<i>Eucalyptus grandis</i>]; (1e-17)	AT1G50010; Constituyente estructural citoesqueleto; 2e-42	Estructura celular

		F5	84	gb DN195851.1 ; Clon cDNA de tejido maduro de hoja Caña de azúcar híbrido <i>Saccharum</i> ; 3e-33	gb ACN37093.1 ; Desconocido [<i>Zea mays</i>]; 1 e-11	n	Desconocido
		F6	82	gb FL900548.1 ; Clon de cDNA de plántulas de <i>Panicum virgatum</i> ; 3e-32	ref XP_003627732.1 ; Subunidad beta de la ATP sintasa [<i>Medicago truncatula</i>]; 0.001	n	Desconocido
		F7	67	dbj CI284837.1 ; Clon de cDNA <i>Oryza sativa</i> Japonica; 9e-6	ref NP_001047832.1 ; Os02g0699600 [<i>Oryza sativa</i> Japonica Group]; 2e-34	AT2G37190; Constituyente estructural ribosomal; 1e-83	Estructura celular
		F8	97	dbj FS963530.1 ; cDNA <i>Arachis hypogaea</i> ; 5e-38	ref XP_003627732.1 ; Subunidad beta de la ATP sintasa [<i>Medicago truncatula</i>]; 4e-06	n	Desconocido
		F9	73	gb FL579433.1 ; <i>Triticum dicoccoides</i> cDNA, 2e-28	ref YP_173415.1 ; Proteína hipotética [<i>Nicotiana tabacum</i>]; 4e-08	AT2G28930; Proteína de unión al ADN; e-146	Transcripción
G	3, 5 y 7 (A 4:1) 1 y 6 (S 4:1)	G1	84	gb DV638762.1 ; Clon de cDNA raíz de Caña de azúcar híbrido <i>Saccharum</i> ; 9e-27	ref XP_004981671.1 ; Subunidad alfa caseína quinasa II [<i>Setaria italica</i>], 2e-12	AT3G50000; Actividad quinasa; e-173	Transducción de señales
		G2	85	gb DN195851.1 ; Clon cDNA de tejido maduro de hoja Caña de azúcar híbrido <i>Saccharum</i> ; 3e-33	gb ACN37093.1 ; Desconocido [<i>Zea mays</i>]; 1 e-11	n	Desconocido
H	1 (S 4:1) 2 (S 2:1) 3 (A 4:1) 4 (A 8:1) 8 (A 8:3)	H1	146	gb JK817808.1 ; cDNA similar a proteína peroxidasa <i>Brassica juncea</i> ; 3e-12	emb CAA17163.1 ; Peroxidasa [<i>Arabidopsis thaliana</i>]; 2e-14	AT4G21960.1; Actividad peroxidasa; 0,0	Tráfico intracelular
		H2	221	dbj FS955206.1 ; Clon de cDNA <i>Camellia sinensis</i> ; 3e-33	ref XP_003614382.1 ; Proteína hipotética [<i>Medicago truncatula</i>]; 1e-06	AT3G05190; Actividad catalítica; 4e-14	Metabolismo

n : similitud por debajo del umbral utilizado (e-value mayor a 0,01). A menor e-value, más significativo es el alineamiento.

_ : "no hit", secuencia sin similitud encontrada

5. DISCUSIÓN

En este trabajo, se hizo un análisis del transcriptoma 24 horas luego de producida la polinización, pudiendo determinarse que ya ocurrieron las primeras divisiones celulares durante el desarrollo del embrión y del endospermo (resultados no mostrados).

Analizamos 91 transcritos de expresión diferencial (DETDFs) entre cruzamientos con diferentes niveles de ploidía y vías de formación de semilla, tanto sexuales como apomícticas. De acuerdo a la calidad de los cromatogramas, quedaron 49 DETDFs para su análisis bioinformático.

La categoría funcional principal corresponde a transducción de señales. Esto podría estar indicando que una o más señales extracelulares, detectadas por receptores celulares, son las que desencadenan respuestas en el desarrollo del endospermo y por consiguiente, en la producción de semillas.

Un importante porcentaje de los transcritos identificados pertenecen a categorías de metabolismo, obtención de energía y mantenimiento de la estructura celular. Se prevé que funcionan en el metabolismo de aminoácidos, pared celular, transporte y organización del citoesqueleto (Tabla 4, DETDFs B7, B15, D2, E3, F4, F7, H2). Estos procesos son fundamentales durante la división celular activa en la fase inicial de desarrollo de la semilla. Especialmente el citoesqueleto, es un factor clave para la vía de desarrollo del endospermo en cereales. Incluye un programa específico de cambios en la organización de los microtúbulos que finalmente forman un endospermo especializado para la absorción de metabolitos (células de transferencia), el almacenamiento de reservas (endospermo amiláceo), y la síntesis de enzimas (aleurona) (Brown y Lemmon, 2007). Existe la posibilidad de que los transcritos detectados, intervengan en la acumulación de reservas, preparando a la célula central para la división celular activa al comienzo de la formación del mismo (Felitti et al., enviado para su publicación).

La mayoría de los transcritos expresados diferencialmente 24 horas luego de la polinización fueron encontrados en cruzamientos en los que se utilizaron plantas sexuales como progenitor femenino, NBE sensible.

El transcritos (B7) clasificado como metabolismo, presentó alta similitud (e^{-123} BLASTp) con una secuencia de *Arabidopsis thaliana* implicada en procesos de fusión nuclear o cariogamia. Este locus (AT1G19520) es también conocido como *Fusión Nuclear Defectuosa 5 (NFD5)* y está implicado en procesos de cariogamia o fusión nuclear, esencial para la reproducción sexual. En las angiospermas, esto ocurre tres veces: dos

durante la fecundación del óvulo y la célula central, y una durante el desarrollo del gametofito femenino cuando los dos núcleos polares se fusionan para formar el núcleo de la célula central diploide.

Los mecanismos moleculares que controlan la cariogamia son poco conocidos. Se han identificado nueve mutantes en el gametofito femenino de *A. thaliana*, llamados fusión nuclear defectuosa 1 (nfd1) a 9 (nfd9), que presentan defectos en la fusión de los núcleos polares (Portereiko et al., 2006).

En los mutantes nfd1 a nfd6, la falta de fusión de los núcleos polares es el único defecto detectado durante la megagametogénesis. Los mutantes nfd3, nfd5 y nfd6 contienen inserciones de ADN-T para codificar proteínas que se localizan en la mitocondria, lo que sugiere un papel para esta organela en el proceso de fusión nuclear (Portereiko et al., 2006). El transcripto B7 de *P. notatum* presentó alta similitud de secuencia con nfd5 de *A. thaliana*. Esto podría indicar que la falla en la fusión de los núcleos polares sería causante de la no producción de semillas cuando la hembra es sexual y el NBE difiere de 2:1 (situación donde se encontró el transcripto).

Tres transcriptos (B3, B8 y B10) de cruzamientos donde no es esperada la producción de semillas en hembras sexuales con NBE distinto a 2:1, clasificados en la categoría funcional principal (transducción de señales), presentaron alta similitud (e^{-165} , e^{-166} y e^{-165} respectivamente) con una proteína de actividad quinasa involucrada en vías de señalización mediadas por calcio en *A. thaliana* (AT2G23080).

Muchos procesos de desarrollo y crecimiento son regulados por influjos de calcio. Un ejemplo sucede en arroz, donde una CDPK (proteína quinasa dependiente de calcio) denominada SPK, se expresa de forma exclusiva en el endospermo de las semillas inmaduras, implicada en vías biosintéticas de productos de almacenamiento (Asano et al., 2002). Esta hipótesis se confirmó utilizando un ARN antisentido codificante para SPK. Las plantas transgénicas no acumulaban productos de almacenamiento, como por ejemplo almidón, en cambio, estas líneas de plantas producían semillas con gran concentración de sacarosa. Esto demuestra que la quinasa SPK es una enzima que interviene en la degradación de sacarosa y que podría ser importante para la biosíntesis de productos de almacenamiento (Asano et al., 2002), por lo tanto, en el desarrollo del endospermo.

El transcripto D2 (At5g20830.1) está relacionado con procesos metabólicos y fue encontrado específicamente cuando se usaron plantas apomícticas como madres (4x A) y tetraploides sexuales (4x S) y apomícticos (4x A) como padres, dando una relación m:p 4:1. Este transcripto presentó similitud (e^{-111} BLASTp) con una sacarosa sintasa de *A.*

thaliana. El gen SUS1 (At5g20830) se expresa durante la morfogénesis de la semilla, periodo que corresponde a la fase de acumulación masiva de almidón y de hexosas en el endospermo, indicando la importancia de esta enzima (SUS1) en la formación de semillas. La mutación en la isoforma-1 de la sacarosa sintasa afecta el peso seco de la semilla al inicio de la maduración (cociente hexosas/sacarosa), provocando una disminución importante en la acumulación de ácidos grasos y de almidón transitorio en estadios tempranos del desarrollo de la semilla en *Arabidopsis* (Angeles-Núñez, 2014).

El metabolismo de la sacarosa que participa en la síntesis de la pared celular, en la respiración y además como reserva (azúcar, almidón y otros polisacáridos), podría estar relacionada con la insensibilidad al NBE presente en ovarios derivados de cruzamientos donde la madre es apomíctica y la relación m:p difiere de 2:1.

E2 y F3 estuvieron presentes en cruzamientos que es esperada su producción de semillas por provenir de hembras apomícticas y sexuales con relación 2m:1p en el endospermo. Ambos, tuvieron alta similitud (e^{-165}) con la proteína de actividad quinasa involucrada en vías de señalización mediadas por calcio en *A. thaliana* (AT2G23080), ya reportada en B3, B8 y B10. La acumulación de esta CDPK estaría involucrada en el éxito (E2 y F3) o fracaso (B3, B8 y B10) de la producción de semillas.

La seguridad alimentaria es un reto para el futuro de nuestro planeta, con una población mundial esperada de nueve mil millones en el año 2050. Una mayor producción de alimentos puede resultar en el detrimento de las tierras cultivables, independientemente de las presiones cambiantes del clima.

Los cultivos híbridos presentan rendimientos superiores (15%-35%), atribuidos al fenómeno poco comprendido de heterosis o vigor híbrido (Kempe y Gils, 2011). Además de un mayor rendimiento, los híbridos muestran una mayor estabilidad física, respuestas más altas a los fertilizantes, mejor penetración de las raíces e importante tolerancia a la sequía y al calor (Kempe y Gils, 2011).

Sin embargo, la obtención y el uso de híbridos en la producción mundial de alimentos se restringe a unos pocos cultivos, como el maíz, el sorgo, el girasol, el pepino, la cebolla y al arroz (Koltunow et al., 2013).

La aplicación de la apomixis en la producción de semilla híbrida, permitiría la fijación de genotipos superiores a bajo costo y una multiplicación a gran escala de las mismas. Los beneficios económicos de la aplicación de la apomixis a la agricultura son enormes y han sido mencionados en la introducción de esta tesis (Koltunow et al., 1995;

Vielle-Calzada et al., 1996; Ramulu et al., 1999).

Las semillas son el principal recurso para la nutrición humana y animal en todo el mundo. También son materia prima para la industria y la producción de energía alternativa. La comprensión de la formación de las semillas, es esencial para mejorar las propiedades del grano con respecto al rendimiento, valor nutricional o uso industrial (Guillon et al., 2012).

El endospermo tiene una gran influencia sobre la masa de la semilla, y dado que hace a la mayor parte de estas en los cereales, los genes que afectan el crecimiento del endospermo tienen efectos directos sobre el tamaño de la misma (Ohto et al., 2007).

Un modelo establece que el tamaño final es determinado por el producto de la tasa de crecimiento de la semilla (SGR) y la duración de llenado (Egli, 1998). Además de eso, la SGR está influenciada por un componente genético, regulado por ella misma a través del número de células en el endospermo (o los cotiledones) y componentes ambientales, tales como la temperatura y la disponibilidad de agua (Egli, 1998). La culminación en el crecimiento requiere un mecanismo de regulación (Egli, 2004).

Los reguladores del ciclo celular son cruciales para el normal desarrollo del endospermo y la determinación del tamaño de la semilla.

Se ha informado que un factor nuclear Y (NF-Y) específico del endospermo, está codificado por el gen *OsNF-YB1* de arroz. Los resultados sugieren que *OsNF-YB1* podría ser un regulador del ciclo celular y jugar un papel en el mantenimiento de la proliferación de las células del endospermo (Xiaocong et al., 2014). Sin embargo, se necesitan realizar más experimentos para evidenciar los factores que determinan el número de semillas producidas y las razones por las que se detiene su crecimiento.

Observaciones de ovarios 48 horas después de la polinización en *P. notatum*, realizadas por nuestro grupo de investigación, indicaron que el volumen del endospermo es considerablemente mayor en los ovarios de plantas apomícticas, en comparación con plantas sexuales, utilizando como polinizadores plantas 2x de *P. notatum* (resultados no mostrados). Los genes expresados diferencialmente en estos tejidos son candidatos interesantes para ser investigados con más detalle en relación con el número de células en el endospermo y, por tanto, el tamaño final de la semilla.

Particularmente en esta especie, el modo de reproducción añade otro nivel de complejidad al proceso. El endospermo de una planta sexual tiene una contribución genómica materna en concordancia con su nivel de ploidía, mientras que una planta apomíctica proporciona dos núcleos polares no reducidos para la formación del

endospermo (Quarin, 1999). Por lo tanto, las contribuciones maternas son diferentes.

Se han propuesto varios mecanismos genéticos para explicar el efecto del progenitor, observado durante el desarrollo de semillas, incluyendo la contribución materna desproporcionada para el endospermo, la herencia plástica y citoplásmica, la expresión de genes en los gametofitos, y la expresión diferencial de alelos de los padres en la semilla en desarrollo (Dilkes y Comai, 2004). Estos autores presentaron un modelo más amplio para interpretar el efecto del progenitor, que es compatible con la teoría del NBE y afirma que los componentes sensibles a la dosis contribuidos diferencialmente por los padres interactúan para producir un endospermo viable (Dilkes y Comai, 2004).

En los últimos 20 años, se han logrado avances significativos en la definición de genes reguladores que controlan los aspectos de desarrollo de la semilla (Felitti et al., enviado para su publicación).

Un reto importante es definir las redes de genes que operan durante el desarrollo de las mismas (Ohto *et al.*, 2007). En los últimos años, se ha logrado un progreso en las descripciones de los transcriptomas y proteomas de semillas en desarrollo de distintas especies (Lai et al., 2004; Casson et al., 2005; Grimanelli et al., 2005; Day et al., 2008; Ge et al., 2008; Polegri et al., 2010; Sharbel et al., 2010; Guillon et al., 2012; Pellny et al., 2012; Thiel et al., 2012; Schmidt et al., 2014).

El grupo de investigación donde desarrollé mi tesis ha obtenido resultados correspondientes al análisis de expresión diferencial de genes 3 y 24 h post polinización. Actualmente se está investigando el transcriptoma de semillas en desarrollo de *P. notatum*, 48 h después de la polinización. Finalmente, todo este conocimiento integrado con la descripción fisiológica, bioquímica y morfológica de semillas, proporcionará una comprensión global de su desarrollo.

6- CONCLUSIONES

Los genotipos con diferentes niveles de ploidía utilizados como polinizadores: 2x sexuales naturales, 4x apomícticos naturales, 4x sexuales experimentales y 6x apomícticos y los citotipos usados como hembras: 2x sexuales, 4x sexuales y 4x apomícticos, permitieron obtener las distintas relaciones m:p en el endospermo (desde 2:1 a 8:1) como se planteó en el objetivo específico 2.2.1.

La metodología utilizada en este estudio (cDNA-AFLP) planteada como objetivo específico 2.2.2, permitió identificar genes de expresión diferencial entre distintos cruzamientos de plantas de *P. notatum*.

De la comparación de los patrones de expresión génica del endospermo, para las diferentes contribuciones genómicas maternas:paternas esperadas (NBE), objetivo específico 2.2.3, se secuenciaron exitosamente 49 transcritos de expresión diferencial, permitiendo considerar que:

1. La falla en la fusión de los núcleos polares (B7) en ovarios de madres sexuales con un NBE diferente a 2:1, podría estar involucrado el fracaso del desarrollo del endospermo y la producción de semillas en *P. notatum* (Sensibilidad al NBE)
2. El metabolismo de la sacarosa (enzima SUS1) en la fase de acumulación masiva de almidón y de hexosas en el endospermo (D2), podría estar relacionada, con la insensibilidad al NBE en ovarios derivados de madres apomícticas.
3. La acumulación de CDPK, interviniendo posiblemente al comienzo de una vía de transducción de señales, desencadenaría diferentes respuestas que estarían involucradas en el éxito (E2 y F3) o fracaso (B3, B8 y B10) del desarrollo del endospermo.
4. La mayoría de los transcritos diferenciales encontrados participan de rutas de transducción de señales. Esto podría estar indicando que una o más señales extracelulares, detectadas por receptores celulares, son las que desencadenan respuestas en el desarrollo del endospermo y, por consiguiente, en la producción

de semillas.

5. Un porcentaje importante de los transcritos identificados pertenecen a categorías funcionales de vías metabólicas, procesos energéticos y mantenimiento de la estructura celular. Puede predecirse así, que un número importante de los mismos intervienen en el metabolismo y transporte de aminoácidos, y en la organización de la pared celular y del citoesqueleto. Estos procesos desempeñan papeles fundamentales durante la división celular activa que se produce en la fase inicial de desarrollo de la semilla. Especialmente, el citoesqueleto es un factor clave para la vía de desarrollo de endospermo en cereales. Existe la posibilidad de que los transcritos detectados en esta etapa estén involucrados en la acumulación de reservas para la formación de endospermo.

Como el relevamiento del transcriptoma permitió identificar genes diferencialmente expresados durante las primeras fases de formación y desarrollo de semillas (con énfasis en el endospermo en relación a la poliploidía y a la apomixis), se acepta la hipótesis planteada en el inicio. Concluyendo que existen diferencias de expresión en el transcriptoma de ovarios de plantas apomícticas y sexuales, en el momento de la polinización y luego de las primeras horas, etapa en la que se observa el inicio del desarrollo del endospermo en sacos embrionarios.

7- CONSIDERACIONES FINALES Y PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en este trabajo permitieron identificar transcritos potencialmente relacionados con el éxito o el fracaso del desarrollo del endospermo en la especie *P. notatum*. Contribuyen a comprender más acerca del mecanismo por el cual este sistema de reproducción genera semillas independientemente de la estricta relación genómica materna y paterna (2m:1p) presente en la mayoría de las especies de gramíneas.

El grupo de investigación va a continuar trabajando en la validación de los patrones de expresión de los genes identificados, mediante PCR en tiempo real, usando réplicas técnicas y biológicas de algunos cruzamientos. Además se hará selección de genes candidatos para realizar estudios funcionales en sistemas modelo como *A. thaliana*. Esto permitirá conocer fehacientemente la función de los mismos, ya que a través del análisis de secuencias cortas no se puede establecer más que una función probable.

8- BIBLIOGRAFÍA

Acuña C.A., Blount A.R., Quesenberry K.H., Hanna W.W., Kenworthy K.E. (2007). Reproductive characterization of bahiagrass germplasm. *Crop Sci.*, 47: 1711–1717.

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

Acuña C.A., Blount A.R., Quesenberry K.H., Kenworthy K.E., Hanna W.W. (2011). Tetraploid bahiagrass hybrids: breeding technique, genetic variability and proportion of heterotic hybrids. *Euphytica*, 179: 227–235.

Aguado-Santacruz G.A., Rascón Cruz Q., Pons Hernández J.L., Grageda Cabrera O., García Moya E. (2004). Manejo biotecnológico de gramíneas forrajeras. *Técnicas Pecuarias de México*, 42: 261-276.

Angeles-Núñez J.G., Herrera-Corredor C., Martínez-Martínez T.O. (2014). Importancia de la isoforma-1 de la sacarosa sintasa en el metabolismo del carbono durante el desarrollo de la semilla de *Arabidopsis thaliana*. *Rev. Mex. Cienc. Agr.*, 5: 727-739.

Asano T., Kunieda N., Omura Y., Ibe H., Kawasaki T., Takano M., Sato M., Furuhashi H., Mujin T., Takaiwa F., Wu C-Y., Tada Y., Satozawa T., Sakamoto M., Shimada H. (2002). Rice SPK, a Calmodulin-Like Domain Protein Kinase, Is Required for Storage Product Accumulation during Seed Development. *Plant Cell*, 14: 619-628.

Asker S.E., Jerling L. (1992). Apomixis in plants. Boca Raton, FL. CRC Press. pp. 298.

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

Berger F. (1999). Endosperm development. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2:28-32.

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

Brown R.C., Lemmon B.E. (2007). The developmental biology of cereal endosperm. In *Endosperm, Developmental and Molecular Biology* (Ed. O-A. Olsen). Heidelberg, Germany: Springer.

Burson B.L., Bennett H.W. (1970). Cytology, method of reproduction and fertility of Brunswickgrass, *Paspalum nicorae* Parodi. *Crop Sci.*, 10:184-187.

Burton G.W. (1948). Artificial fog chamber facilitates *Paspalum* emasculation. *J. Am. Soc. Agron.*, 40: 281-282.

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

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

Casson S., Spencer M., Walker K., Lindsey K. (2005) Laser capture microdissection for the analysis of gene expression during embryogenesis of *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 42: 111-123.

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

Chen L., Okabe R., Hamaguchi T., Guan L., Adachi T. (2002). Effect of harvest seasons on the efficiency of ovary culture in *Panicum maximum*. *Plant Biotech.*, 19:173-179.

Day R.C., Herridge R.P., Ambrose B.A., Macknight R.C. (2008). Transcriptome analysis of proliferating *Arabidopsis* endosperm reveals biological implications for the control of syncytial division, cytokinin signaling and gene expression regulation. *Plant Physiol.*, 148: 1964–1984.

Dilkes B.P., Comai L. (2004). A differential dosage hypothesis for parental effects in seed development. *Plant Cell*, 16: 3174–3180.

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

Egli D.B. (1998). *Seed Biology and the Yield of Grain Crops*. UK: CAB International, pp 178.

Egli D.B. (2004). Seed-fill duration and yield of grain crops. *Adv. Agron.*, 83: 243-279.

Forbes I., Burton G.W. (1961). Cytology of diploids, natural and induced tetraploids, and intraspecific hybrids of bahiagrass, *Paspalum notatum* Fluggé. *Crop Sci.*, 1:402-406.

Friedman W.E. (1994). The evolution of embryogeny in seed plants and the developmental origin and early history of endosperm. *Am. J. Bot.*, 81:1468-1486.

Friedman W.E. (1998). The evolution of double fertilization and endosperm: an “historical” perspective. *Sex. Plant Reprod.*, 11:6-16.

Garcia D., Saingery V., Chambrier P., Mayer U., Jurgens G., Berger F. (2003). *Arabidopsis* haiku mutants reveal new controls of seed size by endosperm. *Plant Physiol.*, 131:1661-1670.

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

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

Ge X., Chen W., Song S., Wang W., Hu S., Yu J. (2008). Transcriptomic profiling of mature embryo from an elite super-hybrid rice LYP9 and its parental lines. *BMC Plant Biol.*, 8: 1-20.

Gehring M., Choi Y., Fischer R.L. (2004). Imprinting and Seed Development. *Plant Cell*, 16: S203–S213.

Guillon F., Larré C., Petipas F., Berger A., Moussawi J., Rogniaux H., Santoni A., Saulnier L., Jamme F., Miquel M., Lepiniec L., Dubreucq B. (2012). A comprehensive overview of grain development in *Brachypodium distachyon* variety Bd21. *J. Exper. Bot.*, 63: 739–755.

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

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

Grimanelli D., Perotti E., Ramirez J., Leblanc O. (2005). Timing of the maternal zygotic transition during early seed development in maize. *Plant Cell*, 17: 1061-1072.

Hanna W.W. (1995). Use of apomixis in cultivar development. *Adv. Agric.*, 54: 33-35.

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

Kempe K., Gils M. (2011). Pollination control technologies for hybrid breeding. *Mol. Breed.*, 27: 417-437.

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

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

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

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

Lai J., Dey N., Kim C-S., Bharti A.K., Rudd S., Mayer K.F.X., Larkins B.A., Becraft P., Messing J. (2004). Characterization of the maize endosperm transcriptome and its comparison to the rice genome. *Genome Res.*, 14: 1932-1937.

Lopes M.A., Larkins B.A. (1993). Endosperm origin, development, and function. *Plant Cell*, 5:1383-1399.

Luo M., Dennis E.S., Berger F., Peacock W.J., Chaudhury A. (2005). MINISEED3 (MINI3), a WRKY family gene, and HAIKU2 (IKU2), a leucine-rich repeat (LRR) KINASE gene, are regulators of seed size in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102:17531-17536.

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

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

McMeniman S., Lubulwa G. (1997). Internal Report (Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra), pp1-26.

Morrone O., Aagesen L., Scataglini M., Salariato D., Denham S., Chemisquy M., Sede S., Giussani L., Kellogg E., Zuloaga F. (2012) Phylogeny of the Paniceae (Poaceae:

Panicoideae): integrating plastid DNA sequences and morphology into a new classification. *Cladistics* 1–24

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

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

Ohto M-A., Stone S.L., Harada J.J. (2007). Genetic control of seed development and seed mass. In: *Seed development, dormancy and germination* (Eds K.J. Bradford, H. Nonogaki). United States of America: Blackwell Publishing. 1-24

Olsen O.A. (1998). Endosperm development. *Plant Cell*, 10:485-488.

Opsahl-Ferstad H.G., Le D.E., Dumas C., Rogowsky P.M. (1997). *ZmEsr*, a novel endosperm-specific gene expressed in a restricted region around the maize embryo. *Plant J.*, 12:235-246.

Ozias-Akins P., van Dijk P.J. (2007). Mendelian genetics of apomixis in plants. *Ann. Rev. Genet.*, 41:509-537.

Pellny T.K., Lovegrove A., Freeman J., Tosi P., Love C.G., Knox J.P., Shewry P.R., Mitchell R.A. (2012). Cell walls of developing wheat starchy endosperm: comparison of composition and RNA-Seq transcriptome. *Plant Physiol.*, 158:612-627.

Petrov D.F., Belousova N.I., Fokina E.S. (1979). Inheritance of apomixis and its elements in corn-*Tripsacum* hybrids. *Genetika* 15: 1827-1836.

Portereiko M.F., Sandaklie-Nikolova L., Lloyd A., Dever C.A., Otsuga D., Drews G.N. (2006). NUCLEAR FUSION DEFECTIVE1 Encodes the Arabidopsis RPL21M Protein and is Required for Karyogamy During Female Gametophyte Development and Fertilization. *Plant Physiol.*, 141:957-65.

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

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

Quarin C.L. (1999). Effect of pollen source and pollen ploidy on endosperm formation and seed set in pseudogamous apomictic *Paspalum notatum*. *Sex. Plant Reprod.*, 11: 331-335.

Quarin C.L., Espinoza F., Martinez E.J., Pessino S.C., Bovo O.A. (2001). A rise of ploidy level induces the expression of apomixis in *Paspalum notatum*. *Sex. Plant Reprod.*, 13: 243-249.

Quarin C.L., Urbani M.H., Blount A.R., Martínez E.J., Hack C.M., Burton G.W., Quesenberry K.H. (2003). Registration of Q4188 and Q4205, sexual tetraploid germplasm lines of Bahiagrass. *Crop Sci.*, 43:745-746.

Quesenberry K.H., Dampier J.M., Lee Y.Y., Smith R.L., Acuña C.A. (2010). Doubling the chromosome number of bahiagrass via tissue culture. *Euphytica*, 175:43–50.

Ramulu K.S., Sharma V.K., Naumova T.N., Dijkhuis P., van Lookeren Campagne M.M. (1999). Apomixis for crop improvement. *Protoplasma*, 208: 196–205.

Rombauts S., Van de Peer Y., Rouz P. (2003). AFLP in Silico, simulating AFLP fingerprints. *Bioinformatics*, 19:776-777.

Savidan Y. (2000). Apomixis: Genetics and Breeding. In: *Plant Breeding Reviews*, volume 18. J. Janick (Ed.). John Wiley & Sons, Inc. London, p. 13–86.

Schmidt A., Schmid M.W., Klostermeier U.C., Qi W., Gutho D., Sailer C., Waller M., Rosenstiel P., Grossniklaus U. (2014). Apomictic and sexual germline development differ

with respect to cell cycle, transcriptional, hormonal and epigenetic regulation. PLOS Genet, 10, e1004476. DOI:10.1371/journal.pgen.1004476.

Sharbel T.F., Voigt M-L., Corral J.M., Galla G., Kumlehn K., Klukas C., Schreiber F., Vogel H., Rotterd B. (2010). Apomictic and sexual ovules of *Boechera* display heterochronic global gene expression patterns. Plant Cell, 22: 655-671.

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

Stebbins G.L. (1974). Evolution of morphogenetic patterns. In: Basic Mechanisms in Plant Morphogenesis. Brookhaven Symp. Boil., 25: 227-243.

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

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

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

Thiel J., Hollmann J., Rutten T., Weber H., Scholz U., Weschke W. (2012). 454 transcriptome sequencing suggests a role for two-component signaling in cellularization and differentiation of barley endosperm transfer cells. Plos One, 7, e41867. DOI:10.1371/journal.pone.0041867.

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

Tucker M.R., Koltunow A.M.G. (2009). Sexual and asexual (apomictic) seed development in flowering plants: molecular, morphological and evolutionary relationships. Funct. Plant

Biol., 36: 490-504.

Van Hengel A.J., Guzzo F., Van K.A., de Vries S.C. (1998). Expression pattern of the carrot EP3 endochitinase genes in suspension cultures and in developing seeds. *Plant Physiol.*, 117:43-53.

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

Vielle-Calzada, J-P., Nuccio, M.L., Budiman, M.A., Thomas, T.L., Burson, B.L., Hussey, M.A., Wing R.A. (1996). Comparative gene expression in sexual and apomictic ovaries of *Pennisetum ciliare* (L.) Link. *Plant Mol. Biol.*, 32, 1085-1092.

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

Xiao X., Li H., Tang C. (2009). A Silver-Staining cDNA-AFLP Protocol Suitable for Transcript Profiling in the Latex of *Hevea brasiliensis* (Para Rubber Tree). *Mol. Biotech.*, 42:91-99.

Xiaocong S., Sheng L., Zhanhua L., Yi-dan O., Shasha L., Jialing Y. (2014). OsNF-YB1, a rice endosperm specific gene, is essential for cell proliferation in endosperm development. *El Sev.*, 551: 214-221.

Young B.A., Sherwood R.T., Bashaw E.C. (1979). Cleared pistil and thick sectioning techniques for detecting aposporous apomixis in grasses. *Can. J. Bot.*, 57:1668-1672.

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

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