



**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO**

**ESTUDIOS DE FACTORES GENETICOS Y EPIGENETICOS SOBRE LA  
EXPRESION DE LA APOMIXIS EN *PASPALUM NOTATUM***

**LIC. MARIA PIA RODRIGUEZ ROMERO**

**TESIS PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTOR EN CIENCIAS AGRARIAS**

**DIRECTORES: DR. JUAN PABLO A. ORTIZ  
ING. CAMILO L. QUARIN**

**ROSARIO - ARGENTINA**

**2010**

**Estudios de factores genéticos y epigenéticos sobre la expresión de la apomixis en**  
*Paspalum notatum*

María Pía Rodríguez Romero

Licenciada en Biotecnología – UNL

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Agrarias, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido previamente presentada para la obtención de otro título en ésta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el laboratorio de Biología Molecular dependiente de la Facultad de Ciencias Agrarias (UNR), y en el Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE), Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Nordeste (UNNE), durante el período comprendido entre diciembre de 2005 y marzo de 2010, bajo la dirección del Dr. Juan Pablo A. Ortiz y el Ing. Camilo L. Quarín.

Lic. María Pía Rodríguez

Dr. Juan Pablo A. Ortiz

Ing. Camilo L. Quarín

Defendida: .....de 2010.

## **Agradecimientos**

Quiero agradecer especialmente a mis directores, el Dr. Juan Pablo Ortiz y el Ing. Camilo Quarin, por la guía y el apoyo permanente que me brindaron, por haberme dado la oportunidad de trabajar junto a ellos y por transmitirme todos sus conocimientos.

Agradezco a las instituciones que a través de subsidios y becas hicieron posible el desarrollo de la presente tesis. A la ANPCyT por haberme otorgado una beca de formación de postgrado, dentro del marco del subsidio PICT 13578, Proyecto: “Genética de la apomixis: Bases citológicas y moleculares de la reproducción apomítica en *Paspalum*”, dirigido por el Ing. Camilo L. Quarin. Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por otorgarme una beca de postgrado tipo II para la finalización del doctorado. A las autoridades de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Rosario, y al Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE-CONICET) de Corrientes por haberme brindado el espacio de trabajo y el marco formal donde realicé mi trabajo de tesis doctoral.

Agradezco al Dr. Gerardo Cervigni por haberme ayudado con el manejo estadístico de los datos y a la Dra. Silvina Pessino por su disposición para discutir los resultados obtenidos.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Biología Molecular por el apoyo permanente y la amistad generada, y en especial a la Dra. Juliana Stein por haberme enseñado y ayudado con la mayoría de las técnicas utilizadas en este trabajo. También quiero agradecer a todos los integrantes de la Cátedra de Genética del IBONE por su hospitalidad cada vez que fue necesario.

En general quiero agradecer a todas y cada una de las personas que vivieron conmigo la realización de esta tesis doctoral y que no necesito nombrar ya que tanto ellos como yo sabemos que desde lo más profundo de mi corazón les agradezco el haberme brindado todo el apoyo, colaboración, ánimo y sobre todo cariño y amistad.

Finalmente quiero agradecer a mi familia por haberme apoyado en forma permanente, y muy especialmente a mi amor por acompañarme en todos estos años, brindándome confianza y mucha felicidad.

Parte de los resultados descriptos en esta tesis han sido dados a conocer a la comunidad académica en los siguientes artículos y comunicaciones científicas:

**Publicaciones:**

Stein J, Pessino SC, Martínez EJ, Rodriguez MP, Siena LA, Quarin CL and Ortiz JPA.

(2007) A genetic map of tetraploid *Paspalum notatum* Flugge (bahiagrass) based on single-dose molecular markers. *Mol Breeding*. Vol. 20, 153-166.

Rodriguez MP, Cervigni GDL, Quarin CL and Ortiz JPA. Frequencies and variation in cytosine methylation patterns in diploid and tetraploid cytotypes of *Paspalum notatum* assessed by MSAP markers. *Biologia Plantarum* (en prensa).

Rebozzio RN, Rodriguez MP, Ortiz JPA, Quarin CL and Espinoza F. Validation of molecular markers linked to apospory in tetraploid races of bahiagrass, *Paspalum notatum*. *Molecular Breeding* (en prensa).

**Presentaciones a Congresos y Reuniones Científicas:**

Rodriguez MP, Stein J, Siena LA, Quarin CL y Ortiz JPA (2006) Determinación de las proporciones relativas de secuencias CCGG metiladas a los niveles diploide y tetraploide de *Paspalum notatum*. XXXV Congreso Argentino de Genética (SAG) San Luis, Argentina. pp 66.

Stein J, Rodriguez MP, Siena LA, Caprile AC, Quarin CL, Pessino SC y Ortiz JPA  
(2006) Caracterización del segmento cromosómico donde se localiza el locus

responsable de la aposporía en *Paspalum notatum*. XXXV Congreso Argentino de Genética (SAG). San Luis, Argentina. pp 65.

Rodriguez MP, Stein J, Siena LA, Pessino SC, Quarin CL y Ortiz JPA (2007) Evaluación de cambios epigenéticos en autotetraploides sintéticos de *Paspalum notatum*. XXXVI Congreso Argentino de Genética (SAG). Pergamino, Argentina. pp 77.

Ortiz JPA, Stein J, Rodriguez MP, Siena LA, Podio M, Pessino SC y Quarin CL (2007) Molecular characterization of the apospory-specific genomic region in *Paspalum notatum* (Bahia grass). The 9th Gatersleben Research Conference - 3rd International Apomixis Conference. Wernigerode, Alemania. pp 53.

Felitti SA, Siena LA, Stein J, Rodriguez MP, Podio M y Ortiz JPA (2008) Identificación de genes candidatos de la apomixis en razas tetraploides de *Paspalum notatum*. XXVII Reunión Argentina de Fisiología Vegetal. Rosario, Argentina. pp 131.

Rebozzio RN, Rodriguez MP, Ortiz JPA, F Espinoza F y Quarin CL (2008) Conservación de la región genómica asociada a la apomixis en diferentes genotipos de *Paspalum notatum*. XXXVII Congreso Argentino de Genética (SAG). Tandil, Argentina. pp 157.

Felitti SA, Podio M, Rodriguez MP, Siena LA y Ortiz JPA (2009) Clonado de genes asociados al desarrollo del saco embrionario en *Paspalum notatum* por

estrategias de caminata cromosomal. VII Simposio Nacional de Biotecnología REDBIO Argentina - II Congreso Internacional - REDBIO - Argentina. Rosario, Argentina. pp 132.

Rodriguez MP, Cervigni GDL, Quarin CL and Ortiz JPA (2010) Estimation of frequencies, patterns and variation of cytosine methylation diploid and tetraploid races of *Paspalum notatum*. The 6<sup>th</sup> International Symposium on Molecular Breeding of Forage and Turf. Buenos Aires, Argentina. pp 196.

**INDICE**

<b>INDICE .....</b>	<b>i</b>
<b>INDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....</b>	<b>iv</b>
<b>ABREVIATURAS, SIMBOLOS Y ANGLICISMOS.....</b>	<b>viii</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>x</b>
<b>I INTRODUCCION.....</b>	<b>1</b>
I.1 El género <i>Paspalum</i> .....	1
I.1.1 Características generales .....	1
I.1.2 <i>Paspalum notatum</i> .....	2
I.1.3 Variabilidad en poblaciones de <i>P. notatum</i> .....	6
I.1.3.1 Modelos propuestos sobre el origen la variabilidad genética en poblaciones de especies apomícticas.....	9
I.1.4 Tipo de herencia en razas tetraploides de <i>P. notatum</i> .....	11
I.1.4.1 Herencia de la apomixis en <i>Paspalum notatum</i> .....	12
I.2 Apomixis.....	14
I.2.1 Definición.....	14
I.2.2 Reproducción sexual en angiospermas .....	16
I.2.3 Tipos de Apomixis.....	17
I.2.4 Importancia agronómica de la apomixis y transferencia del carácter.....	22
I.3 Poliploidía y Poliploidización .....	23
I.3.1 Ventajas de los poliploides.....	26
I.3.1.1 Cambios genéticos .....	28
I.3.1.2 Estudios masivos de expresión génica sobre poliploides.....	31
I.3.2 Apomixis y Poliploidía .....	33
I.4 Epigenética.....	35
I.4.1 Metilación del ADN .....	36
I.4.2 Modificación de Histonas .....	37
I.4.3 Micro ARNs y pequeños ARN de interferencia.....	39
I.4.4 Técnicas para el estudio de la metilación del ADN.....	41
I.4.4.1 Conversión con Bisulfito de Sodio .....	41
I.4.4.2 Enzimas de restricción sensibles a metilación.....	42
I.4.4.3 Purificación por afinidad del ADN metilado.....	43

I.4.5	Metilación del ADN en Poliploides.....	43
I.4.6	Aspectos epigenéticos de la reproducción asexual vía semillas.....	48
I.5	Estudios de la aposporía en especies de <i>Paspalum</i> .....	52
<b>II</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>58</b>
II.1	Objetivo general .....	58
II.2	Objetivos específicos .....	58
<b>III</b>	<b>MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>60</b>
III.1	Material Vegetal .....	60
III.2	Extracción de ADN .....	63
III.3	Generación de Marcadores Moleculares.....	64
III.3.1	Amplificación de Polimorfismos Sensibles a Metilación (MSAP).....	64
III.3.1.1	Análisis de datos .....	66
III.3.1.2	Localización de marcadores MSAP en el genoma de <i>P. notatum</i> .	69
III.3.2	Experimentos de <i>Southern Blot</i> genómicos .....	70
III.3.3	AFLP (“ <i>Amplified fragment length polymorphism</i> ”).....	73
III.3.4	Desarrollo de marcadores de secuencias caracterizadas (SCAR) .....	74
III.4	Clonado y secuenciación de fragmentos de interés.....	75
III.5	Búsqueda de homología de Secuencias .....	77
III.6	Validación de marcadores moleculares por caminata cromosomal .....	78
<b>IV</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>80</b>
IV.1	Estudio global de la metilación de citosinas en el genoma de <i>P. notatum</i> .....	80
IV.1.1	Estimación de las proporciones relativas de secuencias CCGG metiladas en citotipos diploides y tetraploides de <i>P. notatum</i> .....	80
IV.1.2	Variación en los patrones de metilación de citosinas en los citotipos diploides y tetraploides.....	82
IV.1.3	Variación no-epigenética en los citotipos diploides y tetraploides .....	88
IV.1.4	Correlación entre las variaciones sensibles e insensibles a metilación de los citotipos diploides y tetraploides .....	93
IV.1.5	Evaluación de la metilación de citosinas como resultado de la tetraploidización en <i>P. notatum</i> mediante experimentos de MSAP.....	94
IV.1.6	Análisis de las secuencias MSAP.....	98
IV.1.6.1	Caracterización de fragmentos derivados de Q4118 y Q4117 .....	99



IV.1.6.2	Caracterización de fragmentos derivados de C-2x y C4-4x.....	102
IV.1.6.3	Análisis de restricción de los fragmentos secuenciados.....	105
IV.1.7	Localización de marcadores MSAP en el genoma de <i>P. notatum</i> .....	105
IV.2	Estudio del estado de metilación de la región responsable de la aposporía en <i>Paspalum notatum</i> .....	111
IV.2.1	Experimentos de RFLP con enzimas sensibles a metilación y sondas específicas de la región responsable de la aposporía .....	111
IV.3	Identificación de factores genéticos relacionados con la aposporía.....	118
IV.3.1	Factores genéticos relacionados con la aposporía .....	118
IV.3.2	Desarrollo de marcadores SCAR.....	120
IV.3.3	Identificación de secuencias genómicas flanqueantes a marcadores moleculares de la región apo por caminata cromosomal.....	125
<b>V</b>	<b>DISCUSION .....</b>	<b>135</b>
V.1	Estudio global de la metilación de citosinas en el genoma de <i>P. notatum</i> ...	135
V.1.1	Estimación de las proporciones relativas de secuencias CCGG metiladas en citotipos diploides y tetraploides de <i>Paspalum notatum</i> . .....	135
V.1.2	Evaluación de la variación en los citotipos diploides y tetraploides ....	137
V.1.3	Correlación entre las variaciones sensibles e insensibles a metilación de los citotipos diploides y tetraploides .....	142
V.1.4	Evaluación de la metilación de citosinas como resultado de la tetraploidización en <i>P. notatum</i> mediante experimentos de MSAP.....	144
V.1.5	Análisis de las secuencias MSAP.....	149
V.1.6	Localización de marcadores MSAP en el genoma de <i>P. notatum</i> .....	154
V.2	Estudio del estado de metilación de la región responsable de la aposporía en <i>Paspalum notatum</i> .....	158
V.2.1	Experimentos de RFLP con enzimas sensibles a metilación y sondas específicas de la región apo .....	158
V.3	Identificación de factores genéticos relacionados con la aposporía.....	160
<b>VI</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>172</b>
<b>VII</b>	<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>175</b>
<b>VIII</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>199</b>

---

**INDICE DE FIGURAS Y TABLAS**

<b>Figura 1.</b> Representación esquemática del procedimiento experimental utilizado para la generación de las líneas C4-2x y C4-4x de <i>P. notatum</i> . .....	62
<b>Figura 2.</b> Esquema de la obtención de los genotipos tetraploides sexuales y de la población de mapeo. ....	62
<b>Figura 3.</b> Patrones de metilación obtenidos a partir de la técnica de MSAP. ....	81
<b>Figura 4.</b> Esquema de patrón de bandas y codificación de los marcadores MSP .....	83
<b>Figura 5.</b> Dendrograma generado a partir de los polimorfismos sensibles a metilación (MSPs) dentro del grupo diploide de <i>P. notatum</i> . ....	84
<b>Figura 6.</b> Dendrograma generado a partir de los polimorfismos sensibles a metilación (MSPs) dentro del grupo tetraploide de <i>P. notatum</i> . ....	85
<b>Figura 7.</b> Marcadores MSAP de los 4 genotipos diploides (A) y 4 genotipos tetraploides (B) de <i>P. notatum</i> . ....	86
<b>Figura 8.</b> Dendrograma obtenido a partir de los polimorfismos sensibles a metilación (MSPs) derivados de los citotipos diploides y tetraploides de <i>P. notatum</i> . ....	88
<b>Figura 9.</b> Esquema de patrón de bandas y codificación de los marcadores MIP .....	89
<b>Figura 10.</b> Dendrograma generado a partir de los polimorfismos insensibles a metilación (MIPs) dentro del grupo diploide de <i>P. notatum</i> . ....	90
<b>Figura 11.</b> Dendrograma generado a partir de los polimorfismos insensibles a metilación (MIPs) dentro del grupo tetraploide de <i>P. notatum</i> . ....	91
<b>Figura 12.</b> Dendrograma obtenido a partir de los polimorfismos insensibles a metilación (MIPs) derivados de los citotipos diploides y tetraploides de <i>P. notatum</i> . ....	92
<b>Figura 13.</b> Marcadores MSAP generados en los 8 genotipos de <i>P. notatum</i> .....	93
<b>Figura 14.</b> Valores de correlación (r) entre matrices MSP vs. MIP y comparación de índices de similitud medios (T) derivados de los polimorfismos sensibles e insensibles a metilación .....	94
<b>Figura 15.</b> Marcadores MSAP a partir del genotipo C4-2x y su autotetraploide derivado C4-4x. ....	98
<b>Figura 16.</b> Alineamiento de las 3 secuencias derivadas del fragmento F16 <sup>a</sup> y cebadores <i>EcoRI</i> y <i>HpaII/MspI</i> . ....	105
<b>Figura 17.</b> Amplificación MSAP con la combinación E40-HM6 de los progenitores y una muestra de la población segregante. ....	108

<b>Figura 18.</b> Localización de marcadores MSAP en los grupos de ligamiento genético del progenitor femenino (Q4188).....	109
<b>Figura 19.</b> Localización de marcadores de MSAP en los grupos de ligamiento genético del progenitor masculino (Q4117).....	110
<b>Figura 20.</b> M17a: Grupo de ligamiento paterno donde se localiza el locus responsable de la aposporía (grupo-apo). M17b cromosoma homólogo con marcadores ligados en fase de repulsión. ....	112
<b>Figura 21.</b> Experimento de RFLP con el clon M3 y ADN de Q4188 y Q4117 digeridos con las enzimas <i>EcoRI</i> , <i>HindIII</i> , <i>HpaII</i> y <i>MspI</i> . ....	113
<b>Figura 22.</b> Experimento de RFLP con el clon C1069 y ADN de Q4188 y Q4117 digeridos con las enzimas <i>EcoRI</i> , <i>HindIII</i> , <i>HpaII</i> y <i>MspI</i> . ....	114
<b>Figura 23.</b> Experimento de RFLP con el clon M3 con ADN de Q4188, Q4117 Bulk sexual (SB) y Bulk apo (AB) digeridos con las enzimas <i>HpaII</i> y <i>MspI</i> . ....	115
<b>Figura 24.</b> Experimento de RFLP con el clon C1069 con ADN de Q4188, Q4117, <i>bulk</i> sexual (SB) y <i>bulk</i> apo (AB) digeridos con las enzimas <i>HpaII</i> y <i>MspI</i> . ....	116
<b>Figura 25.</b> Experimento de RFLP con el clon C1069 y ADN de Q4188, Q4117, 10 progenies sexuales y 10 apomíticas digeridos con las enzimas <i>HpaII</i> y <i>MspI</i> . ....	117
<b>Figura 26.</b> Esquema indicando los patrones de hibridación con la sonda C1069. ....	118
<b>Figura 27.</b> Gel de agarosa con la amplificación de los marcadores I3 y J7. ....	121
<b>Figura 28.</b> Amplificación de los marcadores SPNA1 y SPNA2 sobre una muestra de la población de mapeo. ....	122
<b>Figura 29.</b> Alineamiento de secuencias: M3 (e36m37c), SPNA1 y SPNA2 .....	123
<b>Figura 30.</b> Gel de Poliacrilamida al 5%. Amplificación del marcador SPNA1 en una población diploide natural de <i>P. notatum</i> . ....	124
<b>Figura 31.</b> Esquema de la ubicación de los pares de cebadores diseñados a partir de la secuencia del fragmento I3.....	127
<b>Figura 32.</b> Esquema de la validación de las extensiones 5' y 3' del marcador I3.....	127
<b>Figura 33.</b> Esquema del diseño de cebadores para las extensiones del marcador I3...	130
<b>Figura 34.</b> Amplificación de secuencias extendidas 5' del marcador I3 con 5 pares de cebadores específicos. ....	132
<b>Figura 35.</b> Gel de acrilamida. Validación caminata cromosomal del marcador I3. ....	133
<b>Figura 36.</b> Gel de acrilamida. Validación caminata cromosomal del marcador I3. ....	134

<b>Tabla 1.</b> Sensibilidad a la metilación y patrones de amplificación esperados en experimentos de MSAP utilizando los isoesquizómeros <i>HpaII</i> y <i>MspI</i> .....	67
<b>Tabla 2.</b> Proporciones relativas y porcentajes de secuencias CCGG metiladas en accesiones diploides y tetraploides de <i>P. notatum</i> .....	82
<b>Tabla 3.</b> Matriz de similitud de MSP (Índice de Jaccard) entre los 4 genotipos diploides de <i>P. notatum</i> .....	84
<b>Tabla 4.</b> Matriz de similitud de MSP (Índice de Jaccard) entre los 4 genotipos tetraploides de <i>P. notatum</i> .....	85
<b>Tabla 5.</b> Patrones y numero de marcadores MSP comunes a los grupos diploide y tetraploide de <i>P. notatum</i> que modificaron su estado de metilación con el nivel de ploidía.....	87
<b>Tabla 6.</b> Matriz de similitud de MSP (Índice de Jaccard) entre todos los genotipos de <i>P. notatum</i> .....	88
<b>Tabla 7.</b> Matriz de similitud de MIP (Índice de Jaccard) entre los 4 genotipos diploides de <i>P. notatum</i> .....	90
<b>Tabla 8.</b> Matriz de similitud de MIP (Índice de Jaccard) entre los 4 genotipos tetraploides de <i>P. notatum</i> .....	91
<b>Tabla 9.</b> Matriz de similitud de MIP (Índice de Jaccard) entre todos los genotipos de <i>P. notatum</i> .....	92
<b>Tabla 10.</b> Proporciones relativas y porcentajes de secuencias CCGG metiladas en los genotipos C4-2x y C4-4x de <i>P. notatum</i> .....	95
<b>Tabla 11.</b> Patrones y frecuencias de la metilación de citosinas de sitios CCGG en el genotipo diploide C4-2x y autotetraploide derivado C4-4x.....	96
<b>Tabla 12.</b> Análisis de secuencias de marcadores MSAP obtenidos a partir de los genotipos tetraploides Q4188 y Q4117 de <i>P. notatum</i> .....	100
<b>Tabla 13.</b> Análisis de secuencias de marcadores MSAP con diferentes patrones de amplificación entre los genotipos C4-2x y C4-4x de <i>P. notatum</i> .....	103
<b>Tabla 14.</b> Análisis de segregación de los marcadores MSAP. ....	107
<b>Tabla 15.</b> Ubicación de los marcadores moleculares MSAP generados en la población de mapeo de <i>Paspalum notatum</i> tetraploide.....	107
<b>Tabla 16.</b> Caracterización molecular de marcadores de AFLP completamente ligados a la aposporía en <i>P. notatum</i> .....	119
<b>Tabla 17.</b> Cebadores SCAR para la amplificación de marcadores AFLP asociados a la apomixis en <i>P. notatum</i> .....	120

**Tabla 18.** Oligonucleótidos utilizados en la extensión por caminata cromosomal..... 126

**Tabla 19.** Análisis de las secuencias extendidas mediante caminata cromosomal..... 128

**Tabla 20.** Combinaciones de cebadores ensayadas en la validación de la caminata cromosomal de los marcadores I3 y J7 ..... 131

## ABREVIATURAS, SIMBOLOS Y ANGLICISMOS

**ADN:** ácido desoxirribonucleico

**ADNc:** ácido desoxirribonucleico complementario

**AFLP:** polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados (“Amplified Fragment Length Polymorphism”)

**ARN:** ácido ribonucleico

**ARNm:** ácido ribonucleico mensajero

**ARNi:** ARN de interferencia

**BSA:** albúmina sérica bovina 1- acetilada

**Buffer:** solución reguladora de pH

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

**CSPD:** disodium 3 - (4 - metoxispiro{1,2 - dioxetane - 3,2'- (5'- cloro) triciclo[3.3.1.1<sup>3,7</sup>] decano} - 4 - yl) phenil phosphate.

**CTAB:** bromuro de cetil-trimetil-amonio (“Cetyltrimethyl Ammonium Bromide”)

**dH<sub>2</sub>O:** agua destilada

**Dig-dUTP:** desoxiuridintrifosfato-digoxigenina

**dNTPs:** nucleótidos libres (adenina, guanina, citosina y timina)

**DTT:** ditioneitol

**EDTA:** ácido etilendiamino-tetra-acético (“Ethylenediamine Tetraacetic Acid”)

**EtBr:** bromuro de etidio

**F<sub>1</sub>:** primera generación en un cruzamiento

**gr/l:** gramos por litro

**KAc:** acetato de potasio

**LB:** medio básico de *Luria Bertani* para cultivo de bacterias

**M:** molaridad

**mg:** miligramo

**mg/l:** miligramo por litro

**MgAc:** acetato de magnesio

**MgCl<sub>2</sub>:** cloruro de magnesio

**ml:** mililitro

**mM:** milimolar

**MSAP:** Polimorfismos de amplificación sensibles a metilación (“Methylation Sensitive Amplification Polymorphism”)

**n:** número cromosómico haploide de una especie

**2n:** número cromosómico diploide de una especie

**NaOH:** hidróxido de sodio

**NaCl:** cloruro de sodio

**NaAc:** Acetato de sodio

**ng:** nanogramos

**NH<sub>4</sub>OAc:** acetato de amonio

**nm:** nanómetro

**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa (“Polymerase Chain Reaction”)

**pb:** pares de bases o nucleótidos

**RAPD:** ADN polimórfico amplificado al azar (“Random Amplified Polymorphism DNA”)

**RFLP:** polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (“Restriction Fragment Length Polymorphism”)

**SCAR:** regiones amplificables caracterizadas por secuencia (“Sequence Characterized Amplified Region”)

**SSR:** repeticiones de secuencias simple (“Simple Sequence Repeats”)

**SDS:** sulfato de dodecil sódico

**SSC:** cloruro de sodio-citrato de sodio

**TAE:** Tris-ácido acético-EDTA

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

**TBE:** Tris-ácido bórico-EDTA

**TE:** Tris-EDTA

**U:** unidad de enzima

**µg:** microgramos

**µl:** microlitro

**UV:** ultravioleta

**x:** número cromosómico básico de una especie

**RESUMEN**

*Paspalum notatum* es una gramínea forrajera nativa de las praderas naturales de las regiones subtropicales de América. Los citotipos diploides son de reproducción sexual y los poliploides, en su mayoría tetraploides, son apomícticos de tipo apospórico. La manipulación de la apomixis, reproducción asexual por semillas, puede tener un gran impacto en la agricultura, principalmente porque su introducción en especies de gran cultivo permitiría la propagación indefinida de genotipos híbridos en forma clonal. En *P. notatum*, la aposporía, un componente de la apomixis, está controlada por un locus complejo localizado en un fragmento cromosómico de gran tamaño, que presenta supresión de la recombinación y apareamiento preferencial de cromosomas con uno de los cuatro homólogos del grupo. Los análisis de secuencias de marcadores moleculares 100 % asociados al carácter mostraron homologías con elementos repetitivos, genes gag/pol de maíz y sectores no codificantes. El objetivo general de este trabajo fue llevar a cabo un análisis de los factores genéticos y epigenéticos asociados a la aposporía en la especie. En este estudio se analizaron las frecuencias, los patrones y la variación en la metilación de citosinas del ADN, en genotipos diploides y tetraploides. La técnica utilizada (MSAP) (“*Methylation Sensitive Amplification Polymorphism*”) está basada en la técnica de AFLP (“*Amplified Fragment Length Polymorphism*”) incluyendo en la etapa de digestión del ADN dos enzimas de restricción diferencialmente sensibles a la metilación. Las proporciones de los sitios CCGG metilados variaron entre 40 - 42 % y 31 - 41 % en diploides y tetraploides, respectivamente. al analizar el número total de sitios blanco metilados y no metilados se obtuvo diferencia significativa entre grupos. Los análisis de similitud basados en los polimorfismos sensibles a metilación mostraron que los tetraploides fueron significativamente más diversos que los diploides. Se encontró una correlación significativa entre la variación epigenética y no epigenética en



ambos grupos. Varios marcadores mostraron estados de metilación diferentes en los distintos niveles de ploidía. El agrupamiento basado en las similitudes en cuanto a la metilación de citosinas, incluyendo todos los genotipos mostró que los cuatro diploides y uno de los tetraploides experimentales de reproducción sexual conforman un solo grupo indicando una estructura epigenética común. Varios marcadores MSAP que mostraron polimorfismos en cuanto a su estado de metilación entre los individuos Q4188 y Q4117 fueron ensayados en una población segregante F<sub>1</sub> derivada de ambos. Este análisis demostró que varios de estos sitios se transmiten a la descendencia en forma mendeliana como alelos en dosis simple. Un análisis similar que se llevó a cabo con el citotipo diploide C4-2x y su autotetraploide derivado C4-4x (ambos de origen experimental) mostró que las dos plantas son muy similares tanto a nivel epigenético como genético aunque se detectaron polimorfismos asociados al nivel de ploidía. Las secuencias derivadas de algunos marcadores MSAP presentaron homología con secuencias codificantes, transposones/retrotransposones y secuencias no codificantes. Los resultados obtenidos en esta parte del trabajo indican que aunque la proporción de sitios metilados entre los dos niveles de ploidía es comparable, el patrón y la variación de los mismos difieren entre los citotipos. Más aun, luego de la tetraploidización se observó la generación de nuevos “epialelos” en la especie.

Análisis de RFLP con clones que mapean en el locus responsable de la aposporía en combinación con enzimas sensibles a metilación mostraron que la región genómica se encuentra metilada e incluso se observan diferencias en el estado de metilación de algunos loci entre los genotipos sexuales y apomícticos.

Se desarrolló un marcador específico de secuencia ligado completamente a la aposporía. La disponibilidad de este marcador simplificará y acelerará la identificación de individuos apomícticos en poblaciones segregantes y permitirá el escrutinio de

bibliotecas genómicas en futuras estrategias de clonado de los genes relacionados. Otra importante cualidad de este marcador fue su consistencia en diferentes fondos genéticos. Este marcador fue ensayado en citotipos diploides de la especie derivados de una población natural y se encontró que su frecuencia en la población es del 0.17. Por otro lado, se aislaron secuencias adyacentes a los marcadores de AFLP 100 % ligados a la aposporía mediante estrategias de caminata cromosomal. Se aislaron secuencias con homología a genes relacionados con la síntesis proteica, metilación de especies de ARN, retrotransposones y proteínas de tipo quinasa. Asimismo, se identificó un nuevo marcador ligado completamente a la aposporía en la especie cuya secuencia corresponde a una proteína con repeticiones de anquirina. Los resultados presentados en esta tesis muestran que tanto factores genéticos como epigenéticos están asociados a la apomixis en *Paspalum*. En particular el carácter aposporía estaría controlado por un locus complejo que incluye secuencias codificantes y no codificantes, elementos repetitivos y metilación de citosinas.

**ABSTRACT**

*Paspalum notatum* is a forage grass native to the subtropical regions of America. Diploid cytotypes reproduce by sexuality and polyploid, mostly tetraploids, through apomixis. Manipulation of apomixis, an asexual reproduction by seeds, can have a major impact on agriculture, mainly because its introduction in crop species will allow the indefinite propagation of hybrid genotypes by seeds. In *P. notatum*, apospory, a component of apomixis, is controlled by a complex locus located on a large chromosome segment, which have suppression of recombination and preferential chromosomes pairing. Sequence analysis of molecular markers 100 % linked to the character showed homology with repetitive elements, genes *gag/pol* of corn and non-coding regions. The overall objective of this study was to conduct an analysis of genetic and epigenetic factors associated with apospory in the species. Because the expression of apospory is almost always associated with polyploidy and chromosomal duplication of sexual diploids can generate aposporous tetraploids, a possible relationship between methylation and the expression/repression of apospory in *P. notatum* is worthy of investigation. This study analyzed the frequency, patterns and variation in cytosine methylation of diploid and tetraploid genotypes. The technique used (MSAP) (Methylation Sensitive Amplification Polymorphism) is based on the AFLP technique (Amplified Fragment Length Polymorphism) but including two restriction enzymes that differ in their sensitivity to DNA methylation. The proportions of methylated CCGG sites ranged from 40-42 % and 31-41 % in diploid and tetraploid, respectively. There were significant differences between the levels of methylated sites between groups. The similarity analysis showed that tetraploids were epigenetically more diverse than diploids. There was a significant correlation between epigenetics and non-epigenetic variation in both groups. Several markers showed different methylation states at the

different levels of ploidy. The clustering based on epigenetic similarities including all genotypes showed that the four diploid and one experimental sexual tetraploid form a single group, indicating a common epigenetic structure. Several MSAP markers that showed polymorphisms in terms of methylation status between individuals Q4188 and Q4117 were tested in an  $F_1$  segregating population derived from both. This analysis showed that several of these sites are transmitted to offspring in Mendelian fashion as alleles in single dose. A similar analysis carried out with the diploid cytotype C4-2x and its autotetraploid derivative C4-4x showed that both plants were very similar at both epigenetic level and genetic level, although polymorphisms associated with the ploidy level were detected. Sequences derived from MSAP markers showed homology with coding and non-coding sequences and transposons/retrotransposons elements. Results obtained in this part of the study indicate that although proportions of methylated sites between the two ploidy levels were comparable, the pattern and variation differ between the cytotypes. Moreover, new epialleles were generated after tetraploidización.

RFLP analysis with clones that map within the locus responsible for apospory, in combination with methylation-sensitive restriction enzymes showed that the genomic aposporous region is methylated. Moreover, differences in the methylation status of some loci in sexual and apomictic genotypes were detected. Based on AFLP, two sequence specific markers (SCARs) completely linked to apospory were developed. The availability of these markers will simplify the identification of apomictic individuals in segregating populations and will allow the screening of genomic libraries for cloning related genes. Another important feature of this marker was its consistency in different genetic backgrounds. SCAR markers were tested in diploid cytotypes of the species derived from a natural population and found that their frequency in the population is 0.17. In addition, adjacent sequences to the AFLP markers 100 % linked to apospory

were isolated by chromosomal walking. The sequences had homology to genes involved in protein synthesis, methylation of RNA species, retrotransposons and protein kinase. Also, we identified a new marker completely linked to apospory in species whose sequence corresponds to a protein with ankyrin repeats. The results presented here showed that both genetic and epigenetic factors are associated with apomixis in *Paspalum*. In particular, apospory, would be controlled by a complex locus comprising coding and non-coding sequences, repetitive elements and methylation of cytosines.

## I INTRODUCCION

### I.1 El género *Paspalum*

#### I.1.1 Características generales

*Paspalum* L. (*Poaceae: Panicoideae: Paniceae*) es un género perteneciente a la familia de las gramíneas ampliamente distribuido en regiones tropicales, subtropicales y templado-cálidas de América. En el centro y sur de Brasil, este de Paraguay y noreste de Argentina se encuentra uno de los centros de diversificación específica más importante de este género (Chase 1929, Burton 1974). El mismo comprende aproximadamente 330 especies (Zuloaga y Morrone 2005) con una notable variabilidad morfológica y genética que ha hecho posible su adaptación a distintas condiciones ambientales, aspecto que resultó de gran interés para estudios aplicados sobre la domesticación de especies forrajeras nativas (Caponio y Quarin 1993). Según Bennett y Bashaw (1966) “toda característica deseable para una planta forrajera puede ser encontrada en alguna de las especies de *Paspalum*”.

La poliploidía está presente en aproximadamente el 80 % de las especies del género, existiendo una gran variación en el nivel de ploidía que va desde 3x (Quarin y Lombardo 1986) hasta excepcionalmente 16x en *Paspalum floridanum* Michx. (Burton 1940). A pesar de esta gran variabilidad en el nivel de ploidía se considera que la mitad de las especies son tetraploides (Quarin 1992). En cuanto a la forma de reproducción, el género está conformado por especies diploides de reproducción sexual alógamas por autoincompatibilidad y poliploides sexuales o apomícticos autofértiles (Quarin y Norrmann 1987, Quarin 1992). En general, los citotipos tetraploides conforman las poblaciones encontradas con mayor frecuencia y de mayor distribución, mientras que los citotipos diploides se encuentran restringidos en áreas más pequeñas (Quarin y

Lombardo 1986).

Hasta el momento se ha logrado la domesticación de algunas especies del género mediante de la selección de genotipos naturales a partir de grandes colecciones de germoplasma. En base a características agronómicas como productividad de biomasa, calidad de forraje, adaptabilidad a distintos ambientes, capacidad de producción de semilla y persistencia al pastoreo se han seleccionado cultivares de *P. notatum*, *P. dilatatum*, *P. plicatulum*, *P. atratum*. En el sur de los Estados Unidos se han popularizado algunas variedades tetraploides apomíticas de *P. notatum* como Argentine, Paraguay, Paraguay 22, Wilmington y Tifton 7. También se cultivan algunas variedades apomíticas de pasto miel (Dallisgrass) (*P. dilatatum*) seleccionadas de la misma manera. En nuestro país se cultivaron durante mucho tiempo dos variedades apomíticas de *P. guenoarum*: el Pasto Rojas y el Pasto Ramírez, seleccionadas en Paraguay (revisado en Ortiz et al. 2004). También se han inscripto y se cultivan en el noroeste de Argentina, dos variedades seleccionadas en la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Nordeste: el cultivar Cambá de *P. atratum* y el cultivar Chané de *P. guenoarum*, que se caracterizan por una importante producción de forraje y un buen valor nutritivo (Pessino y Ortiz 2009). Sin embargo, existe una gran variación genética que aún no ha sido explorada en muchas de las especies del género. Las mismas podrían mejorarse para aumentar su potencial agronómico si se genera información básica sobre su nivel de ploidía, modo de reproducción y características asociadas a la calidad forrajera (Quarin, comunicación personal).

### **I.1.2 *Paspalum notatum***

*Paspalum notatum* Flüge, de nombre vulgar “Bahagrass” (EEUU), “Pasto horqueta” (Argentina), “Capii cabayu” (Paraguay) o “Grama batatais” (Brasil) es una gramínea forrajera rizomatosa perenne ampliamente distribuida en regiones tropicales y

subtropicales de América (Chase 1929, Gates et al. 2004). Se extiende desde México hasta Argentina siendo uno de los principales constituyentes de los campos naturales del sur de Brasil, Paraguay, Uruguay y noreste de Argentina. Esta especie se caracteriza por una gran persistencia, elevada tolerancia a plagas y condiciones adversas (bajos niveles de nutrientes, pH y sequía). Es muy utilizada como forraje en pastoreo directo, rotación de cultivos y ornamentación de jardines y pistas de turf (Gates et al. 2004).

El número básico de la especie es  $x = 10$  y presenta varios niveles de ploidía, donde los citotipos diploides ( $2n = 2x = 20$ ) se reproducen sexualmente y son autoincompatibles y los poliploides son apomícticos, pseudógamos y autocompatibles (Quarin 1992). La forma diploide (*P. notatum* var. *saurae* Parodi) se encuentra naturalmente en un área muy limitada de América del Sur (Burton 1946, 1955, 1967, Daurelio et al. 2004). En Argentina, las poblaciones diploides están restringidas en suelos sueltos de los márgenes de los ríos Uruguay, Paraná y sus afluentes. A principios del siglo XX la forma diploide fue introducida accidentalmente en el estado de Pensacola, Florida (Estados Unidos) (Burton 1946). Luego de programas de mejoramiento tradicional “Pensacola bahiagrass” constituye hoy una de las principales gramíneas forrajeras cultivadas del sur de Estados Unidos y debido a su mayor resistencia al frío se encuentra más ampliamente distribuida que las poblaciones tetraploides. Los citotipos diploides son originarios de las provincias de Corrientes, Santa Fé y Entre Ríos (Gates et al. 2004). El Dr. Glenn Burton descubrió una gran población natural diploide en la isla Berduc sobre el río Paraná (Santa Fé) con toda la variabilidad genética observada en Estados Unidos para la especie cultivada. Por otro lado en la ciudad de Cayastá (Santa Fé) se encontró otra población diploide en cercanía a las ruinas del sitio donde se fundó originalmente la ciudad. La ubicación de estas dos poblaciones, sumada a la gran variabilidad genética observada y al posible origen



autotetraploide de “Bahigrass” (pasto horqueta tetraploide), hizo que esta región sea considerada el centro de origen de la especie (Burton 1967, Gates et al. 2004).

Desde el primer reporte de reproducción apomítica en la especie una amplia bibliografía demuestra que el citotipo tetraploide ( $2n = 4x = 40$ ) predomina ampliamente en la naturaleza. A partir del análisis de 23 accesiones de *P. notatum*, en las cuales determinaron el rango de variación para diferentes indicadores de tolerancia a sequía y a elevadas temperaturas, Tischler y Burson (1995) identificaron 17 (74 %) tetraploides, 4 (17 %) diploides, un triploide y un pentaploide. Luego, Pozzobon y Valls (1997), tras examinar 127 accesiones naturales encontraron que el 91 % de las mismas eran tetraploides. Experimentalmente, como producto de la fecundación de gametas femeninas no reducidas ( $2n$ , sacos embrionarios apospóricos) con gametas masculinas reducidas ( $n$ ) de plantas diploides y tetraploides, se obtuvieron plantas pentaploides ( $2n = 5x = 50$ ) y hexaploides ( $2n = 6x = 60$ ), respectivamente (Burton 1948, Martínez et al. 1994).

Hasta el momento no se han encontrado citotipos tetraploides completamente sexuales en la naturaleza. Sin embargo, plantas tetraploides de reproducción sexual han sido obtenidas experimentalmente tras la duplicación cromosómica por tratamientos con colchicina de un individuo diploide (Quarin et al. 2001) o bien a partir de cruzamientos entre dos individuos apomíticos, siendo el parental femenino apomítico facultativo (Martínez et al. 2001). La obtención de estas plantas tetraploides “sexuales” es un requisito importante para estudios básicos del sistema reproductivo como así también para iniciar programas de mejoramiento genético, ya que los análisis de segregación genética requieren contar con progenies obtenidas del cruzamiento entre individuos sexuales y apomíticos con el mismo nivel de ploidía. En 1961, Forbes y Burton (1961) obtuvieron plantas de *P. notatum* tetraploides mediante el tratamiento con colchicina, y

a través de pruebas de pro genie basadas en características morfológicas demostraron que las mismas eran sexuales. Quarin et al. (2001) indujeron la duplicación cromosómica en tres plantas de *P. notatum* individuales pertenecientes a una población natural diploide. Los estudios embriológicos demostraron que uno de estos nuevos autotetraploides presentaba reproducción sexual, mientras que los otros dos resultaron apomíticos facultativos. Un genotipo de *P. notatum* inducido se considera sexual si luego del análisis citológico de al menos 200-500 óvulos no existe evidencia de aposporía. Esto es muy importante ya que existe evidencia de que algunos diploides poseen la capacidad, aunque en baja frecuencia, de formación de sacos embrionarios apospóricos, y que los tetraploides derivados de estos diploides pueden resultar apomíticos (Quarin et al. 2001). En la actualidad se dispone de un número importante de individuos tetraploides sexuales derivados de proyectos científicos que emplearon estas primeras plantas para estudios genéticos y moleculares. Estos individuos están siendo utilizados en programas de mejoramiento tradicional de selección e incorporación de caracteres de interés agronómico para la generación de nuevos cultivares.

El análisis del apareamiento cromosómico durante la meiosis de distintas plantas tetraploides (sexuales inducidas, apomíticas naturales o híbridos provenientes del cruzamiento sexual x apomítico) indicaron que las razas tetraploides apomíticas son de origen autotetraploide (Forbes y Burton 1961). Quarin et al. (1984) identificaron una homología completa entre el juego de cromosomas de una planta diploide con los dos juegos de cromosomas de otra tetraploide, confirmando así la hipótesis de que *P. notatum* forma un complejo agámico con diversos niveles de ploidía originados por autoploidización (Gates et al. 2004).

Además de la gran diferencia en cuanto a la distribución geográfica y el modo de

reproducción entre los citotipos diploides y tetraploides existen otras características morfológicas y fisiológicas distintivas. En general, los citotipos diploides se propagan más rápido y presentan tallos más altos, con hojas más largas y angostas. Los rizomas de los tetraploides son anchos con entrenudos cortos, mientras que los diploides se caracterizan por rizomas delgados. Las inflorescencias de los tetraploides son más anchas y rígidas con dos racimos de espiguillas, mientras que en los diploides además de ser más delgadas y flexibles, pueden tener de 2 a 3 racimos por inflorescencia (Gates et al. 2004).

### **I.1.3 Variabilidad en poblaciones de *P. notatum***

Según Nogler (1984) apomixis (en sentido restringido) hace referencia a una forma de reproducción asexual por semillas que genera progenies genéticamente idénticas a la planta madre (ver detalles más adelante). Debido a esta forma de reproducción, por mucho tiempo se pensó que las poblaciones de especies apomícticas presentarían una muy baja variabilidad genética (revisado en Asker y Jerling 1992).

El análisis de la diversidad genética dentro o entre poblaciones naturales de *P. notatum* y la caracterización genética de los germoplasmas han constituido las bases fundamentales para la selección de accesiones adecuadas para realizar cruzamientos, ya sea para el estudio de la apomixis en la especie, como para los programas de mejoramiento. Se han utilizado diversos tipos de marcadores moleculares para la caracterización y estimación de la diversidad genética en gramíneas (Li et al. 1999, Liu et al. 1994; Larson et al. 2001). Daurelio et al. (2004) estudiaron la variabilidad genética en poblaciones naturales diploides y tetraploides de *P. notatum* por técnicas moleculares (RAPD). Los autores analizaron la diversidad genética presente en una población tetraploide (R4x, Corrientes) creciendo en simpatria con una diploide (R2x, Corrientes) y la variabilidad de otra población tetraploide creciendo en alopatría (C4x, Chaco).

Considerando a todos los individuos tetraploides como apomícticos obligados, seleccionaron al azar 2 individuos de cada población y llevaron a cabo pruebas de progenie para descartar que la variabilidad observada proviniera de sexualidad residual o mutaciones esporádicas. Los resultados determinaron que la población R2x (población diploide) presentaba la máxima variación, la población R4x (tetraploide creciendo en simpatria con la R2x) una variación intermedia (a pesar de tratarse de una población de reproducción apomíctica) y la población C4x una variabilidad casi nula, ya que la mayoría de sus individuos eran genéticamente idénticos. Al observar una mayor variabilidad en la población tetraploide simpátrica en comparación con la alopátrica los autores sugirieron que la coexistencia de los tetraploides con los diploides impulsaría la generación de variabilidad en este sistema apomíctico, a través de un flujo génico entre diploides y tetraploides (modelo del puente triploide propuesto por Quarin (1992), ver mas adelante). Sin embargo, como no observaron individuos de la población simpátrica mezclados con los de la población diploide, postulan que los eventos de triploidización ocurrirían solo ocasionalmente, y en este caso todos los tetraploides podrían haber surgido de un único triploide que sufrió varios episodios de hibridación. Finalmente, los autores concluyen que los nuevos poliploides surgen no solo por que la apomixis es muy pocas veces completamente obligada sino también por este flujo génico que ocurre entre diploides y tetraploides que generaría continuamente nuevos genotipos tetraploides (Daurelio et al. 2004).

Otro trabajo, que incluyó la caracterización genética de una colección completa de germoplasma de *P. notatum* mantenida en el Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE), Corrientes, Argentina, estudió la variabilidad genética entre las diferentes accesiones y su relación al modo de reproducción de cada una de ellas (Espinoza et al. 2006). En este trabajo se analizaron genotipos naturales y experimentales, con distintos

orígenes, nivel de ploidía y modo de reproducción. Luego de los estudios citoembriológicos los autores confirmaron la inexistencia de tetraploides completamente sexuales en la naturaleza, ya que la totalidad de las accesiones analizadas resultaron apomícticas facultativas, con un grado variable de sexualidad, o apomícticas obligadas. Mediante la técnica de AFLP observaron un muy bajo grado de variabilidad genética entre 42 accesiones de *P. notatum*, y postulan que sería consecuencia de que la especie opera como un complejo agámico, donde la gran distribución de los genotipos tetraploides se debe a la propagación de los mejores individuos originados a partir de poblaciones tetraploides en simpatria con diploides sexuales ubicados en el centro de origen de la especie (Daurelio et al. 2004, Espinoza et al. 2006). El trabajo de Espinoza et al. (2006) permitió identificar 11 marcadores presentes solo en los genotipos apomícticos y ausentes en los sexuales, los cuales fueron validados posteriormente (Rebozzio, comunicación personal). Finalmente, resaltan las ventajas de contar con este tipo de estudios, ya que la información derivada de ellos facilita la selección de genotipos parentales requeridos para generar poblaciones segregantes por el modo de reproducción y/u otra característica de interés. Además con ellos es posible identificar fácilmente plantas cuasi-isogénicas que difieren en su modo de reproducción para el estudio de expresión diferencial de genes.

Más recientemente, Cidade et al. (2008), mediante una técnica basada en SSR (“*Simple Sequence Repeats*”) denominada ISSR (“*Inter Simple Sequence Repeats*”) evaluaron la diversidad genética en aprox. 100 accesiones de *P. notatum* de diferentes lugares de América del Sur, principalmente pertenecientes al estado de Río Grande do Sul (Brasil) y compararon estos resultados con el nivel de ploidía y las características morfológicas de cada uno. A partir de 91 marcadores observaron un elevado polimorfismo entre las accesiones (97,8 %) y aunque remarcan que la técnica revela

regiones microsátélites potencialmente polimórficas (Morgante y Olivieri 1993) sus resultados parecen contradictorios, ya que se ha asumido que la diversificación de la especie es relativamente reciente y que su principal modo de reproducción es la apomixis. Por otro lado, los agrupamientos obtenidos resultaron contrastantes con los de Espinoza et al. (2006) por lo que los autores proponen que esta diferencia puede ser debido a la técnica utilizada y al número de genotipos empleados. Además de la gran variabilidad genética y morfológica visualizada no encontraron correlación entre la ubicación geográfica de las accesiones y el agrupamiento obtenido con los datos moleculares. Al observar accesiones del norte de Brasil cercanas genéticamente a las del sur de Brasil y Argentina los autores postulan que debe haber habido una dispersión desde el sur (supuesto centro de origen de la especie) hacia el norte. Por lo que pueden existir genotipos genéticamente muy relacionados pero en ubicaciones muy distantes (Cidade et al. 2008).

#### I.1.3.1 Modelos propuestos sobre el origen la variabilidad genética en poblaciones de especies apomícticas

Se han propuesto diferentes modelos que intentan explicar el origen de la variabilidad genética y la evolución de los complejos agámicos. En primer lugar, Gustafsson (1947a, 1947b) definió varios aspectos de la apomixis y postuló que muchos individuos apomícticos mantendrían cierto grado de sexualidad que les permitiría generar esporádicamente nuevas combinaciones genéticas para sortear cambios ambientales. Posteriormente, dos modelos fueron propuestos para explicar la generación y evolución de los complejos agámicos en las gramíneas de subfamilia *Panicoideae*: de Wet (1968), de Wet y Harlan (1970) y Savidan y Pernès (1982), propusieron el modelo del “ciclo diploide-tetraploide-dihaploide” para explicar la variabilidad observada en los sistemas *Bothriochloa-Dichanthium* y *Panicum máximum*, respectivamente. En este

modelo la variabilidad genética se generaría en el nivel diploide (sexual) y sería transmitida a niveles superiores de ploidía a través de sucesivas hibridaciones ocasionales de gametas no reducidas de un diploide con polen reducido de algún diploide o poliploide ( $2n+n$ ). Ocasionalmente, este nuevo poliploide podría generar dihaploides ( $n$ ) de manera de llevar los genes nuevamente al nivel diploide cerrando el ciclo. Hasta el momento no se han observado eventos de dihaploidización en especies del género *Paspalum* y también han fallado los experimentos que intentaron la obtención de los mismos (Quarin, comunicación personal). Debido a esto, otro sistema evolutivo presentado por Quarin (1992) postula que los tetraploides en el género se originarían a partir de un proceso que consta de dos pasos: un ocasional saco embrionario apospórico (no reducido,  $2n$ ) de una planta diploide sería fecundado con un núcleo espermático reducido de otra planta diploide de la misma población, dando origen así a una planta triploide ( $2n+n$ ). Este triploide (de reproducción apomíctica), aunque posee baja fertilidad podría producir nuevos tetraploides cuando es fecundado con polen de otro diploide cercano ( $3n+n$ ). Esta teoría fue reforzada en *P. notatum* por el hallazgo de triploides en poblaciones naturales (Quarin et al. 1989, Tischler y Burson 1995) y que tras su fecundación con diploides co-específicos se obtuvo un 12 % de la descendencia tetraploide (Quarin et al. 1989). Este mecanismo del “puente triploide” fue demostrado experimentalmente con razas diploides de *Paspalum rufum* (Siena et al. 2008). En diferentes especies del género se han observado óvulos conteniendo un saco apospórico junto a un saco meiótico (Quarin y Lombardo 1986, Quarin y Norrmann 1987, Norrmann et al. 1989 y Quarin et al. 2001). Sin embargo, no existía evidencia experimental acerca de la funcionalidad de los sacos apospóricos. Norrmann et al. (1994) plantearon la posible funcionalidad de los mismos cuando tras la fecundación de una planta diploide de *P. rufum* con polen de una tetraploide de la misma especie,

obtuvieron híbridos con 40 cromosomas, aunque en una muy baja proporción. En un trabajo reciente Siena et al. (2008) mediante análisis de progenies con marcadores moleculares y citometría de flujo demostraron que al menos un genotipo diploide de *P. rufum* produce sacos embrionarios apospóricos con capacidad de formar progenies por apomixis. Este resultado demostró la funcionalidad de la aposporia y partenogénesis al nivel diploide en la especie. De esta manera, comprobaron que todos los componentes que caracterizan la apomixis gametofítica son funcionales el nivel diploide en *P. rufum* y aportaron evidencia sobre la teoría del “puente triploide” postulado por Quarin (1992) como sistema que describe el flujo génico desde el nivel diploide al poliploide.

#### **I.1.4 Tipo de herencia en razas tetraploides de *P. notatum***

La forma de segregación de las razas tetraploides es un aspecto fundamental en los estudios genéticos de la especie ya sea para el desarrollo de estrategias adecuadas de mejoramiento genético como también para la formulación de hipótesis en el estudio de la herencia de la apomixis. Los estudios citogenéticos realizados por Forbes y Burton, (1961) y Quarin et al. (1984) postularon que las razas tetraploides de *P. notatum* fueron originadas por autoploidía. Sin embargo, el tipo de herencia (disómica o polisómica) en la especie era hasta hace poco tiempo desconocido. A partir de las relaciones de segregación de marcadores moleculares de AFLP, Stein et al. (2004) determinaron el tipo de herencia, y con ello infirieron el origen de las razas tetraploides de *P. notatum*. Una relación de segregación polisómica es indicativa de un origen autoploidio y una disómica de un origen aloploidio (Qu y Hancock 1995). Como el análisis citogenético de los parentales de una población segregante por el modo de reproducción mostró una variada proporción de cromosomas formando asociaciones cuadrivalentes durante la meiosis, la presencia frecuente de asociaciones bivalentes y univalentes, los autores postularon que ambos tipos de herencia (polisómica y disómica) deben ser



considerados. El análisis de los datos de segregación de los marcadores moleculares determinó que las razas tetraploides de *P. notatum* presentan en general una herencia de tipo tetrasómica, sin embargo en algunos sectores del genoma se observaron segregaciones indicativas del apareamiento preferencial de cromosomas (o herencia disómica). Particularmente, el grupo de ligamiento donde se localiza el locus responsable de la aposporía muestra este tipo de segregación (ver más abajo).

#### I.1.4.1 Herencia de la apomixis en *Paspalum notatum*

Los primeros trabajos sobre la herencia de la apomixis en la especie fueron realizados por Burton y Forbes (1960). A partir de cruzamientos entre plantas tetraploides sexuales, obtenidas por duplicación cromosómica con colchicina de Pensacola Bahiagrass (*P. notatum* var. *saurae*) con plantas tetraploides naturales apomícticas, los autores postularon que el carácter apomixis en la especie estaría controlado por unos pocos genes recesivos en presencia de factores modificantes. En todos los cruzamientos el modo de reproducción de los genotipos parentales se determinó a partir del estudio de caracteres morfológicos de 10-15 plantas F<sub>2</sub>. De la misma manera el origen (sexual o apomíctico) de cada una de estas últimas fue determinado a través del análisis de 5 progenies F<sub>3</sub> (Burton y Forbes 1960). Si bien este trabajo fue un paso importante en el estudio del tipo de herencia en *P. notatum*, Martínez et al. (2001) postularon que el mismo presentó importantes limitaciones relacionadas con la técnica de clasificación del modo de reproducción, el bajo número de individuos segregantes utilizados y el posible error cometido al considerar que los autotetraploides inducidos eran completamente de reproducción sexual ya que se ha demostrado la posibilidad de obtener tetraploides apomícticos facultativos por este método (Quarin et al. 2001). Debido a que la reproducción apomíctica en *Paspalum* involucra al menos 3 procesos (aposporía, partenogénesis del embrión y pseudogamia)

los estudios de herencia del carácter resultan sumamente complejos. Una forma de simplificar el análisis es estudiar cada uno de los componentes por separado. En particular el carácter aposporía es relativamente fácil de seguir debido a que los sacos embrionarios apospóricos pueden diferenciarse morfológicamente de los meióticos por estudios citoembriológicos (ver mas abajo). Martínez et al. (2001) estudiaron el tipo de herencia de la aposporía en la especie mediante técnicas embriológicas (clarificado de ovarios) y a través de marcadores moleculares (RAPD y RFLP). A partir del cruzamiento entre una planta tetraploide experimental 100 % sexual (la totalidad de los óvulos mostraba sacos embrionarios meióticos) y una planta tetraploide natural apomítica (la totalidad de los óvulos mostraba sacos embrionarios apospóricos o mixtos) generaron una población de 213 individuos  $F_1$  de los cuales 157 resultaron no-apospóricos (sexuales) y 56 apospóricos, dando una relación de segregación de 2,8:1 no-aposopóricas vs apospóricas. Por otro lado, la autopolinización del parental femenino y de cuatro individuos  $F_1$ , el cruzamiento de dos  $F_1$  sexuales y la retrocruza entre un  $F_1$  sexual con el parental sexual femenino, generaron progenies exclusivamente sexuales. Mientras que las progenies obtenidas del cruzamiento  $F_1$  sexual x  $F_1$  apomítico y de dos retrocruzas ( $F_1$  sexual x parental apomítico y  $F_1$  apomítico x parental sexual) presentaron una segregación aproximada de 3:1 sex:apo. Teniendo en cuenta que para la especie se demostró su origen autotetraploide (Forbes y Burton, 1961, Quarin et al. 1984), los autores asumen como modelo genético más probable que la aposporía estaría controlada por un tipo de “herencia tetrasómica monogénica con segregación al azar de las cromátidas durante la meiosis”. Debido a que estos resultados no se ajustan al modelo de herencia para un factor mendeliano simple con herencia tetrasómica (1:1) aceptado para la herencia de la aposporía en la mayoría de las gramíneas estudiadas (Savidan 1981, do Valle et al. 1994, Ozias-Akins et al. 1998), los

autores proponen la existencia de un mecanismo de distorsión de la segregación a favor a las plantas sexuales. Como modelo general los autores concluyeron que la aposporía se comporta como un carácter dominante simple y que se transmite a la progenie de manera no mendeliana debido a una segregación distorsionada. La cual estaría relacionada con algún efecto letal pleiotrópico con penetrancia incompleta, o con la letalidad parcial de factores ligados que afectan a las gametas masculinas (Martínez et al. 2001).

## **I.2 Apomixis**

### **I.2.1 Definición**

El término apomixis hace referencia a una forma de reproducción asexual a través de semillas que excluye los procesos de meiosis y fecundación de la célula huevo, y origina por partenogénesis progenies genéticamente idénticas a la planta madre (Nogler 1984). Esta supresión de la recombinación genética en algún momento fue considerada una “vía muerta” en la vía evolutiva (Darlington 1939). Sin embargo, dado que algunas de las plantas más exitosas ecológicamente y ampliamente distribuidas son apomícticas, el potencial evolutivo y de fitomejoramiento de este tipo de reproducción comenzó a ser reconsiderado más recientemente (revisado en Miles 2007).

Este tipo de reproducción fue observado por primera vez en la planta australiana *Alchornea ilicifolia* por J. Smith en 1841, cuando un ejemplar femenino de esta especie dioica fue llevado a Inglaterra y estando aislado en los Kew Gardens de Londres floreció y produjo abundantes semillas viables (Savidan 2000). Paradójicamente, los primeros trabajos con plantas apomícticas fueron realizados mucho antes que este tipo de reproducción fuera comprendido. Gregor Mendel en 1869 intentó confirmar los

resultados obtenidos en sus famosos estudios sobre la herencia en las arvejas de jardín luego de realizar cruzamientos interespecíficos de plantas del género *Hieracium*. La dificultad para realizar los cruzamientos y la falta de segregación observada en estas poblaciones fueron atribuidas erróneamente a una supuesta “frecuente autopolinización”. Hoy sabemos que esto era debido a la apomixis se encuentra ampliamente distribuida dentro de este género (Asker y Jerling 1992).

La apomixis ha sido descrita en más de 300 especies de plantas pertenecientes a 35 familias diferentes, entre las que se destacan las *Poáceas* (Gramíneas), las *Asteráceas* (Compuestas), las *Rosáceas* y las *Rutáceas* (Richards 1986, Hanna y Bashaw 1987, Carman 1997). Existe un marcado sesgo en la distribución del carácter ya que el 75 % de las plantas apomícticas gametofíticas (un tipo de apomixis) pertenecen a muy pocas familias que en conjunto representan un 10 % de las plantas con flores (Bicknell y Koltunow 2004). Se ha postulado que este patrón de distribución podría estar reflejando la predisposición, por parte de un cierto grupo de plantas, a los cambios genéticos que caracterizan a la reproducción apomíctica (Grimanelli et al. 2001). Algo de este sesgo también podría estar relacionado con la facilidad con que se puedan llevar a cabo los estudios embriológicos en estas especies y con la información derivada de este tipo de análisis asociada al mejoramiento de cultivos (Bicknell y Koltunow 2004). A excepción de la manzana, los cítricos, el mango y las fresas, la apomixis no es común en cultivos de interés agronómico (Koltunow 1993). Debido a que la reproducción apomíctica involucra principalmente un cambio en el desarrollo del megagametofito femenino, para comprender mejor el fenómeno y determinar sus características generalmente se lo compara con la reproducción sexual normal de las angiospermas.

### I.2.2 Reproducción sexual en angiospermas

La sexualidad en las angiospermas comprende la alternancia cíclica entre los estados de esporófito (la planta misma,  $2n$ ) y gametófito (el grano de polen y el saco embrionario,  $n$ ). La meiosis que ocurre en las flores posibilita la recombinación y reducción del contenido genético, y da lugar a la formación de las esporas femeninas (megásporas) en el óvulo y masculinas (microsporas) en las anteras. En la megasporogénesis se generan cuatro células haploides a partir de una “célula madre de la megáspora” que se diferencia en la nucela del óvulo. En la mayor parte de las angiospermas, tres de estas células haploides degeneran, mientras que la restante constituye la megáspora funcional. Por el proceso de megagametogénesis (serie acotada de mitosis ordenadas) esta célula desarrolla un megagametófito conocido como “saco embrionario”. El saco embrionario más común es el de tipo *Polygonum* que está formado por 8 núcleos haploides ( $n$ ) contenidos en siete células, a saber: la ovocélula, dos sinérgidas, una célula central binucleada, y tres antípodas. Por otra parte, en las anteras las microsporas desarrollan los granos de polen mediante un proceso de microgametogénesis. El polen maduro está típicamente integrado por tres células haploides ( $n$ ), dos de las cuales constituyen los gametos masculinos. La otra tiene una función relacionada con el crecimiento del tubo polínico. La formación de la semilla requiere del proceso de doble fecundación: un gameto masculino ( $n$ ) se fusiona con la ovocélula ( $n$ ) para originar al cigoto ( $2n$ ). A partir de este cigoto se desarrolla el embrión. La célula central del saco embrionario con sus dos núcleos ( $n + n$ ) se fusiona con el otro gameto masculino para originar el endosperma. Así, la fusión de dos gametos haploides únicos derivados de la distribución al azar del material genético durante las meiosis masculina y femenina resulta en la generación de progenies genéticamente diversas. En resumen, en la reproducción sexual la meiosis produce la

recombinación genética de los caracteres de ambos progenitores y gametos haploides. La fecundación fusiona de manera aleatoria un gameto masculino con uno femenino para originar un nuevo individuo con una constitución genética única (revisado en Pessino y Ortiz 2009).

### **I.2.3 Tipos de Apomixis**

Las tres características que definen a este tipo de reproducción son: i) una falla o sustracción de la meiosis previa a la formación del saco embrionario, ii) la partenogénesis donde el embrión se desarrolla de manera autónoma y iii) ciertas adaptaciones para la formación del endosperma. La apomixis y la sexualidad no son procesos mutuamente excluyentes, ya que pueden ocurrir simultáneamente en la misma planta e incluso en el mismo óvulo (Nogler 1984). Según Savidan (2000) la apomixis se originaría por la expresión a destiempo y fuera de lugar (ectópica) de genes que regulan el desarrollo del embrión. Los mismos se activarían antes de lo que ocurre en el proceso sexual y hasta incluso en células que normalmente no participan en el proceso reproductivo, y su expresión sólo resultaría en un fondo genético favorable. Se ha planteado que ambas formas de producción tienen en común muchos procesos y la diferencia entre los dos tipos de reproducción radicaría en la regulación del lugar y el momento en que ocurren dichos procesos (Koltunow y Grossniklaus 2003, Tucker et al. 2003). Más recientemente, Ozias-Akins y van Dijk (2007) postularon que los genes que controlan la reproducción apomíctica no deben ser nuevos en cuanto a su función, sino que estarían alterados a nivel regulatorio en comparación con la reproducción sexual. Salvo algunas excepciones, la mayoría de las plantas apomícticas retienen la capacidad de reproducirse sexualmente por lo cual se denominan apomícticas facultativas (Koltunow y Grossniklaus 2003).

El tipo de reproducción apomíctica varía según el origen de la célula que la

inicia el proceso y si su destino inmediato es la formación de un saco embrionario o un embrión. También de cómo se evita la meiosis, el grado en el que el proceso sexual ocurre en paralelo y el requerimiento de fecundación y adaptaciones específicas para la formación del endosperma. En general la apomixis puede ser iniciada en diferentes etapas durante el desarrollo del óvulo y la frecuencia de eventos sexuales en el mismo óvulo u óvulos adyacentes se utilizan como punto de referencia para tanto el inicio como la progresión de la apomixis (Koltunow y Grossniklaus 2003).

Los embriones de las semillas apomícticas pueden formarse a través de una ruta **esporofítica** o **gametofítica**. En el primer caso, también denominada *embrionía adventicia*, se produce una embriogénesis espontánea a partir de células de la nucela o de los tegumentos del óvulo (Koltunow et al. 1995). El desarrollo sexual de la semillas se inicia normalmente en el óvulo y se produce un saco embrionario meiótico. Sin embargo, junto con este desarrollo sexual múltiples células somáticas (nucelares o del tegumento) que rodean al saco meiótico, inician un proceso de embriogénesis de manera espontánea. El desarrollo de estos embriones es dependiente de la fecundación del saco sexual, posiblemente por los nutrientes y/o señales aportados por su endosperma (Tucker y Koltunow 2009) por lo que es muy común la presencia de embriones múltiples, unos de origen sexual y otros de origen materno (apomíctico). La embrionía adventicia “nucelar” es la más común y es la que se encuentra presente en los cítricos, por lo que han representado un sistema modelo para su estudio. Las células nucelares destinadas a formar embriones son morfológicamente distinguibles de las otras células del tejido, ya que poseen un núcleo más grande y un citoplasma denso (Koltunow 1993). Hasta el presente se desconoce el mecanismo y el momento en el que células de la nucela formaran células iniciales embrionarias. La embrionía adventicia se ha reportado como un carácter dominante de herencia simple. El único estudio de

mapeo que se llevó a cabo en citrus reveló una segregación 3:1, sin embargo se observó un patrón mas complejo luego de un estudio de mapeo de QTLs (“Quantitative Trait Loci”) (Revisado en Ozias-Akins 2006).

En la apomixis de tipo **gametofítica**, se forman sacos embrionarios que contienen ovocélulas no reducidas (apomeiosis) y se generan embriones en ausencia de fecundación (vía partenogénesis). A diferencia de la esporofítica, la apomixis gametofítica puede reemplazar por completo a la “sexualidad” en un individuo apomíctico obligado, aunque es poco probable que exista un individuo de este tipo (Asker y Jerling 1992). Según el origen de la célula que genera el saco embrionario, este tipo de apomixis puede clasificarse en: a) **diplospórica**, cuando el saco embrionario se genera a partir de la célula madre de la megáspora, directamente por mitosis o después de una falla en la meiosis y b) **apospórica**, cuando el saco embrionario se genera por mitosis a partir de células somáticas del óvulo, generalmente provenientes de la nucela. A diferencia de la embrionía adventicia, ambas son iniciadas en una etapa temprana del desarrollo del óvulo (Koltunow 1993).

En la **diplosporía**, la célula madre de la megáspora sufre un cambio de la ruta sexual y genera un saco embrionario no reducido tras eludir la meiosis. Existen variaciones en el desarrollo de la célula madre de la megáspora previas a la formación del saco diplospórico que han llevado a clasificar a la apomixis diplospórica en meiótica y mitótica. En la primera, la célula madre de la megáspora se diferencia de la nucela y comienza la meiosis, que luego es inhibida por un mecanismo que aun se desconoce. El núcleo es restaurado a una forma que permite que la división curse mediante una mitosis (ej: tipo *Taraxacum*) (Koltunow 1993). Mientras que en la diplosporía mitótica, la célula madre de la megáspora se encuentra inhibida completamente para realizar meiosis, o esta inhibición ocurre en una fase muy



temprana indistinguible a nivel citológico (ej: tipo *Antennaria*) (Nogler 1984, Koltunow 1993). En ambos casos, la célula no reducida continúa su desarrollo y resulta equivalente (en cuanto a desarrollo) a una megáspora, ya que puede realizar mitosis para formar un saco embrionario similar a un saco sexual, en cuanto a número y distribución de sus células pero cuyos núcleos son todos no reducidos. En el caso de la diplosporía, la meiosis de la célula huevo resulta completamente comprometida.

Por otro lado, en la aposporía, la formación mitótica de un saco embrionario no reducido a partir de una célula somática del óvulo permite que los procesos sexual y apomítico puedan ocurrir en la misma planta e incluso en el mismo ovulo de un apomítico facultativo (Ozias-Akins 2006). La formación del saco apospórico tiene lugar cuando una o más células nucleares iniciales de la aposporía se diferencian en cercanía a células involucradas en la reproducción sexual (Bhat et al. 2005). A pesar de que la aposporía se inicia luego de la diferenciación de la célula madre de la megáspora, el saco apospórico se desarrolla más rápidamente que el saco embrionario meiótico (Koltunow 1993). Tanto el número de sacos embrionarios apospóricos por óvulo, como el porcentaje de óvulos conteniendo sacos apospóricos y meióticos varían según la especie en estudio (Nogler 1984, Richards 1986, Asker y Jerling 1992). La aposporía es muy común en un gran número de gramíneas de interés forrajero pertenecientes a los géneros *Brachiaria*, *Panicum*, *Paspalum*, *Pennisetum* y *Poa* y puede ser de tipo *Hieracium* o *Panicum* (ver más adelante).

Casi todos los sacos embrionarios diplospóricos (a excepción de los de *Eragrostis*) conservan la típica estructura de los sacos embrionarios de origen meiótico, generalmente con siete células y ocho núcleos. Sin embargo, en la aposporía los sacos muestran por lo general una constitución muy variable. Por ejemplo, en gramíneas tropicales o subtropicales, el saco apospórico se forma por dos mitosis consecutivas,

con permanencia de los cuatro núcleos en un solo polo celular. Así se organiza un megagametófito con una ovocélula flanqueada por dos sinérgidas, la ovocélula y una célula central con un solo núcleo polar, careciendo de antípodas. Esta estructura de saco apospórico fue descrita por primera vez para *Panicum maximum* y por esa razón a los megagametófitos con esta morfología se los conoce como sacos apospóricos de tipo *Panicum*. Sin embargo, en las especies apospóricas de *Paspalum*, existe una característica en la constitución de los sacos apospóricos que los diferencia netamente del tipo *Panicum*. Generalmente presentan una célula central con dos núcleos polares y a veces tres. Esta característica es importante porque debido a la *pseudogamia*, la relación genómica materna/paterna del endosperma es distinta en las plantas sexuales y en las apospóricas. En las sexuales, hay una relación 2/1 materno/paterno (madre  $n + n$ ; padre  $n$ ), mientras que en las apospóricas esa relación es generalmente 4/1 (madre  $2n + 2n$ ; padre  $n$ ). En *Panicum* la relación es 2/1 tanto en las sexuales como en las apospóricas ( $n + n/n$  en las sexuales y  $2n/n$  en las apospóricas) (Revisado Pessino y Ortiz 2009).

La apomixis gametofítica fue estudiada más profundamente que la apomixis esporofítica, principalmente por ser el tipo presente en las gramíneas, donde muchas especies con valor agronómico presentan este modo de reproducción. La mayoría de las plantas apomícticas gametofíticas son poliploides mientras que las apomícticas esporofíticas son diploides (Asker y Jerling 1992).

En la apomixis gametofítica el embrión se desarrolla por *partenogénesis*, proceso que excluye invariablemente una de las etapas de la doble fecundación presente en la reproducción sexual de las angiospermas: la unión de los gametos masculinos con los femeninos. Sin embargo, no necesariamente se anula la fecundación de los núcleos polares. Aunque existen casos en que el endosperma se puede desarrollar en forma

autónoma, en la mayoría de las gramíneas tropicales apomícticas es necesario que un gameto masculino se fusione con el o los núcleos polares de la célula central del saco embrionario para formar el endosperma (*pseudogamia*) (Chaudhury et al. 2001).

Es importante destacar que la embrionía adventicia, la diplosporía y la aposporía coexisten en especies apomícticas de *Beta* y en algunas Rosáceas. Asimismo en algunos pastos apospóricos, cítricos y ciertas especies de *Hieracium*, coexisten la aposporía con la embrionía adventicia (revisado en Koltunow y Grossniklaus 2003). En *P. minus* se han observado óvulos conteniendo sacos embrionarios apospóricos y diplospóricos (Bonilla y Quarín 1997).

La apomixis gametofítica se encuentra fuertemente asociada a la poliploidía. La mayoría de las especies con este tipo de reproducción presentan este tipo de constitución genética y si bien se han descrito algunos casos de apomixis al nivel diploide (Sharbel y Mitchell-Olds 2001, Siena et al. 2008), la completa expresión del carácter se produce casi invariablemente en un entorno poliploide.

#### **I.2.4 Importancia agronómica de la apomixis y transferencia del carácter**

Aunque desde el punto de vista del mejoramiento genético la apomixis puede considerarse como un sistema que restringe la variabilidad genética, esta forma de reproducción constituye una herramienta única para desarrollar cultivares superiores y preservar combinaciones híbridas indefinidamente (Pessino y Ortiz 2009). La ausencia de recombinación y de fecundación de la ovocélula por un gameto masculino dan lugar a la generación de embriones con una constitución genética idéntica a la planta madre. En teoría, cualquier combinación genética que lleve los factores determinantes de la apomixis puede ser mantenida y multiplicada como una réplica exacta por innumerables generaciones vía semilla.

Dentro de las principales ventajas agronómicas de la apomixis, Bicknell y

Koltunow (2004) destacan la rápida generación y multiplicación vía semillas, la reducción de costos y tiempos de los programas de mejoramiento, la prevención de las complicaciones asociadas con la reproducción sexual (polinizadores e incompatibilidad) y la prevención de transferencia viral en plantas que normalmente se propagan vegetativamente (Hanna 1995, Jefferson y Bicknell 1995, Koltunow et al. 1995, Savidan 2000). Otros autores destacan como principal ventaja la posibilidad de multiplicación y mantenimiento de híbridos de alto potencial de rendimiento en forma indefinida y por semillas, sin los problemas de segregación y/o depresión por endogamia (Vielle-Calzada et al. 1996). La importancia o el valor de cada una de estas ventajas dependen del cultivo y del sistema de producción del mismo. Los agricultores del primer mundo esperan que el mayor beneficio sea la producción de nuevas variedades, con alto rendimiento para su uso en sistemas agrícolas mecanizados. Mientras que para los agricultores de los países en desarrollo los mayores beneficios que se esperan son referidos al mejoramiento de variedades, con alto rendimiento para condiciones ambientales locales específicas, a la seguridad en el suministro de alimentos y a una mayor autonomía sobre las variedades propias (Bicknell y Bicknell 1999).

### **I.3 Poliploidía y Poliploidización**

La poliploidía, definida como la propiedad de poseer tres o más juegos completos de cromosomas, es una característica muy importante en la evolución de muchos organismos eucariotas. A diferencia de los animales donde es menos frecuente, salvo algunos casos de poliploidización ancestral en insectos, peces, anfibios y reptiles (Otto y Whitton 2000), se ha estimado que alrededor del 70 % de las angiospermas y el 95 % de los helechos sufrieron un proceso de poliploidización al menos una vez durante su evolución (Leitch y Bennett 1997). A partir de la secuenciación completa de los

genomas de *Arabidopsis* y arroz, considerados típicos diploides, se observó que ambas especies son paleopoliploides (poliploides ancestrales). Con esto, es razonable asumir que la mayoría de las plantas superiores, consideradas como diploides por su comportamiento genético y citogenético, son paleopoliploides que sufrieron un proceso de diploidización (Levy y Feldman 2002).

El término poliploidía fue introducido en 1916 por Winkler, y en 1917, Winge advirtió sobre la importancia de la misma al especular que la especiación podría haber ocurrido a través de hibridación interespecífica seguida de duplicación cromosómica (revisado en Comai 2000). Como este autor pensaba que la hibridación entre especies muy distantes daría lugar a progenies estériles debido a un desequilibrio cromosomal, razonó que al duplicar los genomas esto dejaría de ocurrir. En 1937, Blakeslee y Avery, generaron las primeras plantas poliploides “sintéticas” mediante el tratamiento de plantas diploides con colchicina, un inhibidor químico de la polimerización de los microtúbulos durante las divisiones celulares. Estos poliploides sintéticos constituyen un excelente material para llevar a cabo análisis comparativos, ya que se conocen exactamente sus progenitores, mientras que a excepción de los poliploides naturales de *Spartina*, *Tragopogon* y *Senecio*, la mayoría de los progenitores no se conocen o no están disponibles (Chen y Ni 2006).

La clasificación de los poliploides ha sido motivo de controversia durante mucho tiempo. La mayoría de los autores, basándose en el origen de los genomas que los componen, los clasifican en autopoliploides (misma especie) y alopoliploides (especies diferentes). Grant (1981) en su libro de especiación de las plantas se refirió a los auto y alopoliploides como los “miembros de una serie gradual de poliploides” e incluyó a los alopoliploides segmentales como una clase de alopoliploides. Por otro lado, Stebins (1971) coincidió en que la clasificación de los poliploides en dos categorías bien

discretas confunde en lugar de aclarar este sistema complejo de interrelaciones.

Los autopoliploides pueden ser originados por duplicación genómica o por fusión de gametas no reducidas (poliploidización sexual). La duplicación somática puede ocurrir en el cigoto o en embriones jóvenes, generando un esporofito completamente poliploide. Mientras que la ausencia de reducción gamética ocurre durante la micro y la megasporogénesis, y de esta forma se pueden generar embriones con diferentes niveles de ploidía ya que las gametas no reducidas pueden unirse tanto a gametas no reducidas como reducidas. De la misma manera, los alopoliploides se originan por duplicación genómica, pero en este caso de híbridos inter-específicos o por poliploidización sexual, donde se produce la fusión de dos gametas no reducidas de especies diferentes. Además, los alopoliploides pueden ser generados directamente por cruzamiento entre autotetraploides de diferentes especies (Hegarty y Hiscock 2008).

El comportamiento de los cromosomas durante la meiosis es muy diferente en los distintos tipos de poliploides. En los autopoliploides, al tratarse de cromosomas homólogos, más de dos cromosomas pueden aparearse en las mismas zonas originando así diferentes configuraciones de multivalentes (herencia polisómica). Ramsey y Schermeske (1998) definen como “diploidización” al proceso en el cual los neopoliploides (recientemente formados) se van estabilizando (pérdida masiva de genes y reorganización genómica) durante su evolución, y en ellos se observa una segregación de tipo “diploide”. Una evidencia de este proceso sería cuando en un autopoliploide se observan sectores del genoma que tienden a presentar un apareamiento preferencial de cromosomas homólogos donde un par de ellos se aparean como bivalentes con mayor frecuencia que el resto. En el caso de los alopoliploides, el comportamiento de los cromosomas se encuentra relacionado con la divergencia entre los genomas de las especies que lo conforman. Aquí, sólo se forman asociaciones bivalentes debido a que

el apareamiento meiótico ocurre entre cromosomas homólogos (herencia disómica). Si ocurre algún apareamiento entre cromosomas homeólogos, por la existencia de homología entre ellos, se observan además asociaciones multivalentes y se denominan alopoliploides segmentales (Grant 1981).

### **I.3.1 Ventajas de los poliploides**

Una de las principales ventajas de los alopoliploides es la heterosis generada por la combinación de genes homeólogos (Allard et al. 1993). Stebbins (1971) y Grant (1981) postularon que los alopoliploides son mucho más frecuentes que los autopoliploides, en parte debido a la heterosis y homeostásis conferida por el “permanente” estado híbrido de los alopoliploides (revisado en Ramsey y Schemske, 1998). Mientras que en una progenie  $F_1$  diploide, la heterocigocis decae (en cada generación la mitad de los loci heterocigótas se vuelven homocigótas), el apareamiento “forzado” de los cromosomas homólogos de un alopoliploide, previene las recombinaciones entre genomas, manteniendo el mismo nivel de heterocigocis a través de las generaciones y con ello la fijación de los genomas parentales divergentes (Comai 2005). En comparación con sus contrapartes diploides, los autopoliploides mantienen una elevada heterocigocis debido a que son autocompatibles, con herencia polisómica y poseen múltiples alelos por locus (Osborn et al. 2003). Esta heterosis y características derivadas como mayor tolerancia a sequía, apomixis, resistencia a enfermedades, variación en los tiempos de floración y tamaño de los órganos, han permitido que los poliploides colonicen nuevos nichos o mejoren su adaptabilidad (Chen 2007). En general, en comparación con los diploides, los poliploides sobreviven mejor en condiciones y ambientes más extremos (Grant 1981). Otra ventaja importante de los poliploides, conferida mediante la redundancia génica, es el efecto de enmascaramiento de mutaciones recesivas deletéreas o letales a través de alelos dominantes “*wild-type*”

(Comai 2005). Por otro lado, esta redundancia de los genes les permite diversificar funciones alterando alguna de las copias, produciendo así una “experimentación evolutiva” (Adams y Wendel 2005). Por último, los poliploides pueden afectar la sexualidad de manera de proporcionar ventajas selectivas muy importantes, ya sea modificando los sistemas de autoincompatibilidad y permitiendo las autofecundaciones, o bien favoreciendo a la reproducción asexual (apomixis) (Comai 2005).

La poliploidización es el proceso más común y probablemente el único que da lugar a una nueva especie en un solo paso (Levy y Feldman 2002). Este proceso ha sido considerado como un “shock genómico” (McClintock 1984) ya que los nuevos poliploides necesitan solucionar problemas como el dosaje génico, el aumento del contenido de ADN en el núcleo, la replicación de múltiples y/o diferentes genomas, asegurarse del apareamiento entre homólogos y evitarlo entre homeólogos. Su gran éxito y las evidencias de que se trata de un proceso que sigue funcionando, sugieren que las plantas se encuentran preadaptadas para enfrentarse a los desafíos de la poliploidía (Levy y Feldman 2002).

La ocurrencia de los nuevos fenotipos presentes en los poliploides involucra modificaciones en la expresión génica, que pueden ser causados, entre otras cosas, por cambios genéticos y epigenéticos de los genomas parentales (Osborn et al. 2003). La exacta contribución de estos cambios resultaba difícil de estudiar ya que normalmente no se conocen los genomas que dan origen a los poliploides naturales o han evolucionado desde la formación del mismo. Afortunadamente, análogos de estos poliploides naturales pueden ser sintetizados a partir de progenitores diploides de manera de poder comparar exactamente eventos genéticos y epigenéticos tempranos que ocurren durante la duplicación genómica (Adams y Wendel 2005).

Los efectos de poliploidización sobre la regulación y expresión de genes siguen



siendo poco claros. Osborn et al. (2003) presentan tres ideas de cómo se pueden generar variaciones en la expresión génica tras la poliploidización. La primera está relacionada con el aumento del número de copias de genes regulados por “dosaje génico”. Esto podría introducir variaciones en la expresión génica y conducir a la expresión de nuevos genes en las progenies poliploides en comparación con sus progenitores. Guo et al. (1996) fueron los primeros en estudiar los efectos de la ploidía en la regulación génica, midiendo los niveles de ARNm de 18 genes en una serie euploide de maíz (1x, 2x, 3x y 4x). Encontraron que la expresión de la mayoría aumentaba de manera proporcional con el dosaje conferido por nivel de ploidía, y que un 10 % de los genes presentaban respuesta a las ploidías impares (1x y 3x) (revisado en Comai 2005). Mediante esta hipótesis se podría explicar el elevado nivel de retención de los genes duplicados en poliploides ya establecidos. La segunda fuente de variación presentada por Osborn et al. (2003) se basa en la compleja regulación de la mayoría de los genes (por ejemplo mediada por factores de transcripción) ya que en los poliploides la regulación dependería de la interacción entre los factores reguladores de cada progenitor divergente (alopoliploides) o entre los distintos reguladores de cada alelo (autopoliploides). Y por último Osborn et al. (2003) postula que los nuevos poliploides son muy propensos a cambios rápidos, genéticos y epigenéticos, variando así la expresión génica a lo largo de todo el genoma.

#### I.3.1.1 Cambios genéticos

Song et al. (1995) observaron cambios rápidos en la organización genómica de alotetraploides sintéticos de *Brassica*. Los poliploides que utilizaron eran derivados de hibridaciones interespecíficas recíprocas entre tres especies diploides diferentes. En todos los casos detectaron una herencia no aditiva de los fragmentos genómicos, ausencia de fragmentos genómicos de los parentales o presencia de nuevos fragmentos

en los poliploides. A partir de estos resultados postularon que la frecuencia de los cambios estaba relacionada con la divergencia entre los genomas diploides parentales que provocaba re-arreglos cromosomales como ser la recombinación entre los dos genomas (no homólogos). En todas las generaciones estudiadas (F<sub>2</sub> a F<sub>5</sub>) observaron gran cantidad de meiosis aberrantes con puentes de cromatina, cromosomas retrazados y asociaciones multivalentes indicativos de una asociación entre genomas y posterior segregación de cromosomas recombinantes o fragmentados. Comai et al. (2000) describen este tipo de cambio como consecuencia de una disminución en la función del sistema de reparación de “*mismatch*” que daría lugar a la “recombinación homeóloga”.

Estudios en alopoliploides sintéticos de trigo revelaron resultados similares a los de Song et al. (1995). En general, observaron que las modificaciones ocurrían a través de la eliminación de secuencias de ADN en baja copia y en etapas tempranas de la formación del poliploide (Feldman et al. 1997). A partir de diferentes combinaciones interespecíficas e intergenéricas entre híbridos y poliploides (*Aegilopus-Triticum*) se observó que la eliminación de secuencias ocurre de una manera reproducible y que puede involucrar hasta un 15 % de ADN genómico (Ozkan et al. 2001, Shaked et al. 2001). El hecho de que las eliminaciones no sean al azar, provocaría un aumento de la divergencia física entre los cromosomas homeólogos de manera de suprimir la recombinación (revisado en Levy y Feldman 2002).

En alopoliploides sintéticos de algodón (Liu et al. 2001) y *Spartina* (Salmon et al. 2005) no observaron ningún tipo de cambio genómico por lo que se puede pensar que estas especies presentan un mayor nivel de tolerancia a la hibridación interespecífica y a la duplicación genómica.

Los cambios genómicos y cromosomales observados en alotetraploides sintéticos de *Arabidopsis* no fueron tantos como los de trigo ni tan pocos como los de

algodón. Mediante estudios moleculares y citogenéticos, Madlung et al. (2005) detectaron re-arreglos cromosomales y anormalidades que involucraban puentes de cromatina y ruptura de cromosomas, y concluyeron que esta inestabilidad genómica provendría de la inestabilidad de unos pocos loci específicos.

A diferencia de lo que ocurre con los aloploidos, la presencia de cambios genómicos en autoploidos sintéticos no ha sido muy estudiada. Mecchia et al. (2007) analizaron la estructura genómica de una serie euploide de *Eragrostis curvula*, que consistía en un tetraploide natural, su dihaploide derivado y dos tetraploides obtenidos por tratamiento con colchicina del dihaploide. Luego de la identificación de un 28 % de polimorfismos en los eventos de poliploidización y la observación de que muchos de estos marcadores polimórficos revertían tras los sucesivos cambios de ploidía, postularon que las alteraciones genéticas eran específicas y conferirían una estructura característica para cada nivel de ploidía. Martelotto et al. (2007) estudiaron las variaciones en secuencias genómicas luego de la autotetraploidización en dos especies del género *Paspalum*. El incremento del nivel de ploidía fue llevado a cabo por hibridación de gametas no reducidas (*P. rufum*) y por tratamiento con colchicina (*P. notatum*). En el primer caso, observaron un 15-23 % de polimorfismo genómico mientras que para *P. notatum* un 9,55 % de los loci detectados cambiaron con el aumento de la ploidía. En ambos casos la frecuencia de pérdida de bandas de los progenitores (83 %) fue mayor que la aparición de nuevas bandas (17 %). Con esto, los autores postularon que las modificaciones genómicas en estas especies, involucrarían principalmente la eliminación de secuencias. Otra explicación sería que la pérdida frecuente de bandas se debe a la inserción de elementos repetitivos movilizados luego de la hibridación y duplicación genómica. Finalmente, concluyen que un incremento en el nivel de ploidía da lugar a alteraciones en la secuencia de ADN que involucran

diferentes mecanismos según la especie en estudio. A diferencia de los observado en estas gramíneas, Ozkan et al. (2006) no identificaron cambios genéticos asociados a la autoploidía en *Arabidopsis*. Mediante la técnica de AFLP compararon los patrones de híbridos F<sub>1</sub> con los de sus respectivos parentales autotetraploides y observaron una perfecta aditividad en los híbridos.

Un mecanismo que puede causar cambios genómicos en la formación de los poliploides es la activación de elementos repetitivos (retrotransposones y transposones de ADN). Estos elementos representan entre el 50-80 % del genoma de las plantas y aunque la mayoría se encuentran inactivos pueden ser activados en respuesta a algún tipo de estrés (revisado en Chen y Ni 2006) como por ejemplo la combinación de dos genomas divergentes evolutivamente. Kashkush et al. (2003) observaron que la activación de retrotransposones LTRs (“*Long Terminal Repeats*”) en alopoliploides de trigo daba lugar a la activación o silenciamiento de los genes adyacentes a el (revisado en Levy y Feldman 2004). Madlung et al. (2005), mediante microarreglos genómicos analizaron una región heterocromática de *Arabidopsis* conteniendo muchos transposones e identificaron que un transposón de la familia *Suf* (“*Sunfish*”) se encontraba activado en un alopoliploide híbrido de *Arabidopsis* en comparación con sus parentales autotetraploides. Estos y otros estudios demuestran que la alopoliploidización promueve la activación de los elementos repetitivos y con ello una posible mutagénesis insercional con cambios en el fenotipo y/o regulación de la expresión génica (Adams y Wendel 2005).

#### I.3.1.2 Estudios masivos de expresión génica sobre poliploides

Con el advenimiento de estudios transcriptómicos a gran escala y mediante el uso de micromatrices de ADN en diferentes especies de plantas poliploides se ha confirmado que existe un cambio radical en la expresión génica debida a la

poliploidización. Los efectos varían en función de la especie en estudio, pero existe información suficiente como para hacer algunas generalizaciones, sobre todo referidas a los alopoliploides. Sorprendentemente, una gran proporción de estos cambios no son aditivos, el nivel de expresión del alopoliploide no es simplemente una mezcla de los niveles de expresión de los parentales, representando esto una explicación a los fenotipos no intermedios presente en los poliploides (revisado en Hegarty y Hiscock 2008). Wang et al. (2006) observaron una regulación génica no aditiva en alotetraploides sintéticos de *Arabidopsis*. Además, al no identificar ningún cambio en la expresión génica tras la comparación del autotetraploide sintético (*A. thaliana*) con el alotetraploide (*A. suecica*) concluyeron que la hibridación interespecífica es la causa primaria de las alteraciones observadas y no la poliploidización propiamente dicha. Además para evitar confusión de los efectos de la hibridación y la duplicación, los autores incluyeron el análisis de expresión diferencial entre un diploide y su tetraploide isogénico. Al observar muy pocas diferencias postularon que en la formación de los autotetraploides prevalecen los mecanismos regulatorios debidos a efectos de dosaje. En papa, Stupar et al. (2007) identificaron que un 10 % de 9000 genes analizados, presentaban expresión diferencial entre diploides y autotetraploides sintéticos. También observaron diferencias fenotípicas. Sin embargo caracterizaron a estas diferencias en la expresión como “muy sutiles” (revisado en Doyle et al. 2008).

En algodón, Flagel et al. (2008) compararon las contribuciones de dos genomas (A y D) al transcriptoma, en híbridos sintéticos diploides  $F_1$  y en individuos alopoliploides naturales. Mediante esta comparación los autores determinaron que un 24 % de los genes con patrones de expresión sesgados eran consecuencia de la unión de los genomas, mientras que el resto (76 %) sería el resultado de transformaciones evolutivas de los genes duplicados a largo plazo, como la neofuncionalización y la

subfuncionalización.

Otro estudio donde fue posible estudiar los efectos de los eventos de hibridación y duplicación por separado se llevó a cabo en *Senecio cambrensis* (6x) por Hegarty et al. (2005, 2006). *S. cambrensis* es el producto de la combinación entre un tetraploide natural (*S. vulgaris*) y un diploide (*S. squalidus*) donde primeramente se forma un triploide estéril (*S. baxteri*) que por la unión de gametas no reducidas da lugar a este hexaploide fértil. Al observar que los niveles de expresión génica estaban más perturbados en el triploide que en el hexaploide, sugirieron que la duplicación genómica tendría un efecto de “atenuador” del gran efecto provocado por la hibridación (revisado en Hegarty y Hiscock 2008).

### **I.3.2 Apomixis y Poliploidía**

La observación de que todas las especies que presentan apomixis del tipo gametofítica son poliploides y altamente heterocigótas ha hecho sugerir que la hibridación y poliploidización han tenido un papel muy importante en la evolución de este carácter (Tucker y Koltunow 2009). Aunque han sido informados algunos ejemplos de plantas diploides apomícticas gametofíticas (Asker y Jerling 1992, Koltunow y Grossniklaus 2003, Sharbel et al. 2009) las mismas presentaban una escasa proporción de producción asexual de semillas, por lo que se postuló que la poliploidía incrementaría aunque no aseguraría la expresión de la apomixis (revisado en Bath et al. 2005). En gramíneas, una baja expresión de aposporía se encontró en diploides naturales de *Brachiaria decumbens* (Naumova et al. 1999) y en algunas especies de *Paspalum* (Quarin et al. 1982, Quarin y Norrmann 1987, Norrmann et al. 1989).

Muchos autores han propuesto que la apomixis estaría expresada en los individuos diploides, pero que los alelos responsables de la apomixis no pueden ser transmitidos a través de gametas monoploides o son letales en progenies diploides

(Grimanelli et al. 1998b, Bicknell et al. 2000, Martínez et al. 2007), sugiriendo una relación estructural entre la apomixis y la poliploidía. En *Ranunculus auricomus*, Nogler (1982) demostró la obtención de individuos diploides apomícticos a partir del desarrollo partenogenético de ovocélulas reducidas de tetraploides apomícticos o por cultivo de anteras (dihaploides). Sin embargo, nunca observó reproducción apomíctica en diploides cigóticos obtenidos por fusión de gametas haploides. Estos resultados llevaron a Nogler a proponer la existencia de un alelo dominante de la apomixis (A) en esta especie que no puede ser transmitido a través de gametas haploides.

Por otro lado, existen evidencias que sugieren un rol funcional de la poliploidía sobre la expresión de la apomixis. En *P. notatum*, existe evidencia experimental que el aumento del nivel de ploidía desde diploides sexuales induce la expresión de la apomixis en los autotetraploides (Quarin et al. 2001). Esto puede deberse tanto a la influencia de la ploidía en el locus que controla el carácter o a través de un locus secundario que requiere mayor dosis alélica para así afectar la expresión de la apomixis (Quarin et al. 2001). Sin embargo, la primera hipótesis puede ser descartada debido a que estudios genéticos en la especie determinaron que un solo locus es el responsable del carácter y que el mismo tendría una constitución genética de simple dosis para un alelo A dominante para la aposporía (Martínez et al. 2001, Stein et al. 2004, Stein et al. 2007). A diferencia de este modelo de “regulación por ploidía”, Carman et al. (1997) propuso un modelo de “regulación por asincronía” donde la hibridación de dos especies relacionadas con caracteres reproductivos divergentes generaría un alopoliploide de reproducción apomíctica. La expresión asincrónica de los genes duplicados relacionados con el desarrollo del saco embrionario, provocaría la superposición de los programas de desarrollo como por ejemplo la omisión de la meiosis si se afecta la megasporogénesis (revisado en Tucker y Koltunow 2009). Roche et al. (2001b) modificaron la teoría de

Carman, sugiriendo que los genes responsables de la apomixis se encontrarían en regiones heterocromáticas similares a los bloques presentes en los cromosomas supernumerarios. Dentro de los argumentos postulados por los autores se destaca la presencia de este tipo de cromatina en muchas especies apomícticas, el modo de herencia no mendeliana de los mismos (segregación distorsionada) y la falta de recombinación alrededor del locus que controla la apomixis en *Tripsacum* (Grimanelli et al. 1998a), en *Pennisetum squamulatum* y *Cenchrus ciliaris* (Ozias-Akins et al. 1998, Roche et al. 2001a, 2001b) y *P. notatum* (Martínez et al. 2003, Stein et al. 2004 y Stein et al. 2007).

#### **I.4 Epigenética**

Uno de los principios centrales del proceso evolutivo es la disponibilidad de variación genética sobre la cual puede actuar la presión de selección. Esta noción fundamental neo-darwiniana impregnó todo el pensamiento biológico y probablemente, la mayoría de los biólogos asumen que el poder de la selección natural depende de la existencia, cantidad y estructuración de la variación genética. Sin embargo, en los últimos años se ha puesto de manifiesto cómo la variación hereditaria no necesariamente debe estar basada en secuencias nucleotídicas, sino que por el contrario se observan nuevos cambios en los patrones de expresión espaciales y temporales, provocados por un conjunto de mecanismos en ausencia completa de variabilidad genética (Rapp y Wendel 2005). El término epigenética hace referencia a estos mecanismos o eventos moleculares heredables que no implican cambios en la secuencia de ADN (Bender 2002). En la década pasada muchos estudios revelaron la importancia de estos mecanismos epigenéticos en la regulación transcripcional que afectan directamente las propiedades estructurales de la cromatina. Berger et al. (2009) postulan que estos eventos se han desarrollado para proporcionar un control más preciso y



estable de la expresión génica a través de múltiples generaciones. Estos mecanismos incluyen: i) la metilación de la citosinas del ADN, ii) las modificaciones covalentes de las histonas, y iii) ciertos aspectos del ARN de interferencia (ARNi) (Zhang 2008).

#### **I.4.1 Metilación del ADN**

Uno de los mecanismos epigenéticos mas frecuentes es la hipermetilación del ADN o marca predominante de motivos GpC, CpNpNp y CpNpG (Finnegan et al. 1998). Esta modificación covalente post-replicativa, que involucra la incorporación de un grupo metilo en la posición 5' del anillo de citosina, es uno de los mecanismos epigenéticos mas ampliamente estudiado tanto en plantas como en animales. Generalmente se asocia a la condensación de la cromatina y represión de la transcripción. El descubrimiento de su papel en el silenciamiento de secuencias repetitivas, virales y transgenes sugiere que este mecanismo evolucionó para asegurar la estabilidad genómica (revisado en Rodrigues y Koltunow 2005). El donante del grupo metilo, exclusivo de todos los eucariotas, la S-adenosilmetionina (Chiang et al. 1996) proporciona el grupo metilo a enzimas esenciales de *Arabidopsis thaliana* como “CHROMOMETHYLASE 3” (CMT3) y “DOMAINS REARRANGED METHYLASE 2” (DRM2), responsables de marcar motivos CpNpG y CpNpN respectivamente, y “METHYLTRANSFERASA 1” (MET1), marcador de las islas CpG y encargada principalmente del mantenimiento de la metilación (Kankel et al. 2003). La metilación no sólo promueve el silenciamiento de los genes, sino también el de los transposones que de otra manera proliferarían, como lo demuestran los doble “knockouts” de los loci CMT3 y MET1, en los que se liberó de la supresión a la familia CACTA de elementos transponibles (Kato et al. 2003). En animales se ha descrito una enzima con capacidad desmetilante, pero su homólogo no se ha descubierto en plantas (revisado en Rapp y Wendel 2005).

La frecuencia de metilación de residuos de citosinas varía considerablemente a lo largo de los genomas vegetales y participa en la regulación de la expresión génica tanto a nivel local, de una secuencia nucleotídica única (gen) como a nivel de grandes regiones cromosomales que involucran a varios genes. Todos estos sistemas exhiben efectos epigenéticos sobre la expresión génica por medio del cual secuencias nucleotídicas idénticas son utilizadas diferencialmente. Como en las plantas el estado de metilación puede ser mantenido durante la replicación, MET1 utiliza como molde la cadena madre de ADN para remetilar la recién sintetizada, estos patrones de expresión diferencial son transmitidos a la descendencia en forma clonal durante la división celular. Los cambios en los patrones de metilación pueden ocurrir ya sea por una nueva metilación ("de novo") o por una demetilación pasiva debido a una falla en el mantenimiento de la metilación durante la replicación.

#### **I.4.2 Modificación de Histonas**

La modificación covalente de proteínas histonas es otro mecanismo epigenético importante del control de la expresión génica. Las histonas constituyen una familia de proteínas globulares altamente conservadas cuyas colas N-terminal están ubicadas en la superficie del nucleosoma y expuestas a modificaciones químicas. Estas proteínas constituyen el primer nivel de empaquetamiento del ADN cromosomal en los eucariotas, con cada histona se empaquetan ~146 pb de ADN para formar los nucleosomas, estructurados a partir de dos copias de cada una de cuatro subunidades diferentes: H2A, H2B, H3 y H4 (Luger et al. 1997).

La cromatina se puede encontrar en forma compacta, condensada, inaccesible a los factores de transcripción y a la ARN polimerasa, transcripcionalmente silenciada (heterocromatina) o en un estado menos condensado asociado a la actividad transcripcional (eucromatina). Este grado de condensación depende del ADN y de las

modificaciones que pueden sufrir las histonas. La variedad de modificaciones de las histonas es tan grande que los investigadores han propuesto un “código de histonas” capaz de especificar el estado de la cromatina y con ello el estado transcripcional de los genes (Turner 2000).

La modificación más estudiada de las histonas es la N-acetilación, donde los grupos  $\epsilon$ -amino de residuos de lisina son acetilados, reduciendo así la carga positiva de la superficie de estas proteínas. Originalmente se postuló que esta disminución de la carga positiva reduce la afinidad de las histonas por el ADN, aumentando el acceso de la maquinaria transcripcional aunque una hipótesis sugiere que actuaría como señal para el silenciamiento (Jenuwein y Allis 2001). Por el contrario, la desacetilación da lugar a la supresión de la expresión ya que la cromatina se condensa de eucromatina a heterocromatina (Turner 2000). Tian et al. (2005) demostraron que la sobreexpresión de una desacetilasa de *Arabidopsis* resultó en la expresión ectópica de ciertas rutas y represión de otras, dependiendo del tejido, demostrando que el estado de acetilación sirve como elemento regulador en las distintas etapas de desarrollo (revisado en Rapp y Wendel 2005).

Otra modificación de histonas identificada como marca epigenética es la metilación de los residuos de lisina de la H3 (H3K4me2, H3K9me2/3 y H3K27me2/3). El patrón de distribución genómico de estas modificaciones fue determinado recientemente en *Arabidopsis* mediante análisis de micromatrices con muestras derivadas de ChIP (“Chromatin immunoprecipitation”) (Lippman et al. 2004, Zhang et al. 2007). Los resultados fueron consistentes con las funciones de estas modificaciones inferidas a través de estudios locus-específicos. H3K4me2 está implicada en la activación de genes, se ubica preferentemente en genes endógenos y no en transposones. Por el contrario, H3K9me2 se solapa casi exclusivamente con transposones y otras

repeticiones, consistente con su principal función en el silenciamiento de los mismos. H3K27me3 se encontró presente en un gran número de genes (~ 4400), la mayoría de los cuales eran altamente específicos de tejido y transcripcionalmente silenciados en los tejidos analizados (plántulas jóvenes) (Zhang et al. 2007, Zhang 2008).

No está claro si la metilación del ADN da lugar a la metilación de histonas o al revés, o si existe una comunicación generalizada entre ellas (Jenuwein y Allis 2001). Estudios recientes indican enlaces interesantes entre la remodelación de la cromatina, la metilación de las histonas, la metilación del ADN y el ARN de interferencia (Tariq y Paszkowski 2004). Estos mecanismos se encuentran interconectados a nivel regulatorio y constituyen los mecanismos encargados de controlar el nivel de condensación de la cromatina (Rapp y Wendel 2005). En general, la metilación de histonas se asocia a la metilación del ADN y a la desacetilación de histonas. Esta combinación particular de modificaciones da lugar a la condensación de la cromatina por lo que se asocia al silenciamiento génico. Por otra parte, la acetilación y metilación de histonas también puede determinar un estado de cromatina más relajado compatible con actividad transcripcional. La metilación de histonas está asociada a los dos estados de cromatina debido a que en cada caso se metilan diferentes residuos de amino ácidos. H3K9 y H3K27 se asocian al silenciamiento mientras que H3K4 a una cromatina activa (Rodrigues y Koltunow 2005).

#### **I.4.3 Micro ARNs y pequeños ARN de interferencia**

Para comprender la regulación epigenética de los genomas es importante comprender como las secuencias son identificadas “*targets*” para el silenciamiento. Existen evidencias de que los *siRNA* (“*small interfering RNA*”) generados por la ruta del ARN de interferencia son los que proveen la especificidad de secuencia para llevar a cabo las modificaciones epigenéticas (revisado en Henderson y Jacobsen 2007).

Mediante esta ruta se produce el silenciamiento post-transcripcional de genes específicos, donde pequeñas moléculas de ARN complementarias a un ARN mensajero conducen habitualmente a la degradación de éste. Estos ARN pequeños de 21-24 nucleótidos de longitud, se encuentran en todos los organismos eucariotas y se ha demostrado que controlan rutas homólogas conservadas. Actúan como indicadores moleculares de objetivos a ser silenciados: retrovirus, retrotransposones, genes aberrantes expresados y *loci* normales del desarrollo. En plantas, según su estructura, origen y rutas en las que participan se pueden dividir en dos clases: miRNA y siRNA (Rapp y Wendel 2005). Los microARN (en inglés, micro-RNA o miRNA) son pequeños ARN interferentes que se generan a partir de precursores específicos codificados en el genoma, que al transcribirse se pliegan en horquillas intramoleculares que contienen segmentos de complementariedad imperfecta. El procesamiento de los precursores ocurre generalmente en dos etapas catalizado por dos enzimas, Drosha en el núcleo y DICER en el citoplasma. Una de las hebras del miRNA (la hebra 'antisentido') se incorpora a un complejo RISC (“*RNA-induced silencing complex*”). Dependiendo del grado de complementariedad del miRNA con el ARNm, los miRNA pueden inhibir la traducción del ARNm o inducir su degradación. Sin embargo, a diferencia con la vía de los siRNA (ver mas adelante), la degradación de ARNm mediada por miRNA se inicia con la eliminación enzimática de la cola de poli(A) del ARNm. Los siRNA son moléculas de ARN bicatenario perfectamente complementarias de aproximadamente 20 o 21 nucleótidos. Cada hebra de ARN tiene un grupo fosfato 5' y un grupo hidroxilo 3'. Esta estructura proviene del procesamiento llevado a cabo por DICER que corta moléculas largas de ARN bicatenario (dsRNA, *double stranded RNA*) en varios siRNA. Una de las hebras del siRNA (la hebra 'antisentido') se ensambla al complejo proteico RISC que utiliza la hebra de siRNA como guía para identificar el ARN mensajero

complementario. El complejo RISC cataliza el corte del ARNm complementario en dos mitades que son degradadas por la maquinaria celular, bloqueando así la expresión del gen.

#### **I.4.4 Técnicas para el estudio de la metilación del ADN**

El análisis de la metilación del ADN se puede llevar a cabo ya sea, estudiando el nivel global de citosinas metiladas o examinando la metilación de secuencias específicas (Riddle y Richards 2002, Cervera et al. 2002). Hasta el momento se han desarrollado varios métodos para la detección de los cambios de metilación de las citosinas tanto en animales como en plantas. En general se basan en alguna de las tres técnicas que se describen a continuación: la conversión con bisulfito, la digestión con enzimas de restricción sensibles a metilación y la purificación por afinidad del ADN metilado.

##### **I.4.4.1 Conversión con Bisulfito de Sodio**

Una citosina metilada posee las mismas características en cuanto al apareamiento de bases que una citosina no metilada, por lo que resultan indistinguibles por los métodos de secuenciación estándar. Una opción es tratar al ADN genómico con bisulfito de sodio (Clark et al. 1994, Clark et al. 2006) lo cual bajo condiciones adecuadas provoca la desaminación de las citosinas no metiladas en uracilos, dejando intacta las citosinas metiladas (Zilberman y Henikoff 2007). La amplificación por PCR de este ADN convertido reemplaza los uracilos por timinas y la comparación de las secuencias derivadas de los fragmentos tratados y no tratados (reemplazos de T por C, respectivamente) se utiliza para cuantificar el grado de metilación. Un problema potencial con esta técnica es que depende de la conversión completa de citosinas no metiladas. En el ADN de los animales, esta conversión incompleta se manifiesta con

una abundante metilación de citosinas que no se encuentran en dinucleótidos CG. En plantas, este problema puede ser más difícil de detectar, pero en general se manifiesta como una extensión continua de citosinas metiladas en la mayoría de las secuencias.

#### I.4.4.2 Enzimas de restricción sensibles a metilación

Las enzimas de restricción sensibles a la metilación son la herramienta clásica de análisis de metilación del ADN. La mayoría de estas son inhibidas por la metilación de su sitio de reconocimiento, mientras que algunas, como *McrBC*, digieren el ADN metilado. Las enzimas de restricción más comúnmente utilizadas son los isoesquizómeros *HpaII* y *MspI*. Ambas enzimas reconocen la secuencia de 5'-CCGG-3' pero exhiben sensibilidad diferencial en cuanto a la metilación de alguna de las citosinas. *HpaII* es sensible a la metilación completa (ambas hebras) de alguna de las dos citosinas del sitio, mientras que *MspI* es sensible a la metilación (hemi o completa) de la citosina externa (McClelland et al. 1994). Además *HpaII* (y no *MspI*) puede cortar secuencias blanco hemimetiladas en la citosina externa. Sin embargo, la eficiencia de corte en este caso es inferior. Por lo tanto, para una dada muestra se pueden distinguir claramente entre dos estados de metilación: la full metilación de la citosina interna (observada en *MspI* y no en *HpaII*) y la hemi metilación de la citosina externa (presente solo en la digestión con *HpaII*). Mediante la incorporación de este par de isoesquizómeros a la técnica de AFLP (Vos et al. 1995) se desarrolló la técnica de MSAP ("Methylation Sensitive Amplified Polymorphism") (Reyna-López et al. 1997), que representa un método seguro y eficiente para la detección de cambios (nivel y patrón) en la metilación desde una perspectiva general del genoma. Debido a que estas enzimas no pueden diferenciar entre algunos estados de metilación, como ser CCGG no metilada, C<sup>5m</sup>CGG o <sup>5m</sup>C<sup>5m</sup>CGG (hemi metiladas), los porcentajes de metilación calculados por esta técnica serán inferiores a los valores absolutos (Reyna-López et al.

1997, Cervera et al. 2002, Dong et al. 2006). Además, si las bandas analizadas contienen sitios internos CCGG full-metilados, los porcentajes serán aún más subestimados. Sin embargo, la capacidad de esta técnica para comparar los porcentajes de metilación relativos totales de los dos estados de metilación mencionados anteriormente ha mostrado ser técnicamente segura y eficiente (Baurens et al. 2003).

#### I.4.4.3 Purificación por afinidad del ADN metilado

Estas técnicas hacen uso de los dominios de unión a metilo (MBD) con capacidad de unión a sitios CG metilados. Un dominio MBD de *E. coli* es purificado por afinidad y la columna MBD se utiliza posteriormente en la purificación del ADN metilado. Alternativamente, se puede utilizar anticuerpos monoclonales que reconocen específicamente citosinas metiladas (Zhang et al. 2006) y que a diferencia del método MBD en el que se purifican sólo las CG metiladas, con los anticuerpos se precipita al ADN metilado en cualquier contexto. Todas las técnicas basadas en afinidad miden la densidad de metilación en una región determinada.

#### **I.4.5 Metilación del ADN en Poliploides**

Las alteraciones epigenéticas parecen ser especialmente prevalentes durante la formación de híbridos interespecíficos y poliploides (Levy y Feldman 2004, Wang et al. 2004). Muchos fenómenos de silenciamiento/activación génicos observados en poliploides sintéticos se encuentran bajo un control epigenético que surgen en respuesta a la hibridación y duplicación genómica, especialmente debido a la presencia de copias de genes con funciones similares. Estos cambios epigenéticos, que no involucran modificaciones en la secuencia de ADN y que son potencialmente reversibles, proveen una forma efectiva y flexible para responder a la poliploidización o “shock genómico” (Chen 2007), y como se mencionó anteriormente la variación en la expresión génica se



puede dar a través de metilación del ADN, modificaciones de histonas y/o modificaciones mediadas por ARNs no codificantes (Osborn et al. 2003).

Uno de los fenómenos epigenéticos más estudiados que regulan la expresión génica en poliploides, es la dominancia nucleolar o expresión preferencial de genes de ARNr de uno de los progenitores en un alopoliploide (Pikaard 2000). En alotetraploides de *Arabidopsis* y *Brassica*, el silenciamiento de genes de ARNr de uno de los progenitores está asociado con la hiper-metilación del ADN y la hipo-acetilación de histonas (Chen y Pikaard 1997).

Song et al. (1995) en su trabajo con alotetraploides sintéticos de *Brassica* en el que observaron recombinaciones homeólogas, realizaron experimentos de metilación y postularon que la metilación de ADN también podría estar involucrada en estos cambios, pero no como un factor principal. Identificaron demetilaciones e hipermetilaciones de sitios CG y CNG, aparentemente al azar y en baja frecuencia.

En trigo, Shaked et al. (2001) analizaron tres combinaciones diferentes de alotetraploides sintéticos, híbridos F<sub>1</sub> y sus parentales homocigótas diploides, de manera de obtener una estimación cuantitativa sobre la frecuencia de las alteraciones epigenéticas a lo largo de todo el genoma relacionadas con la poliploidización. Mediante la técnica de MSAP observaron que el 13 % de los loci analizados presentaba un patrón de metilación diferencial entre los parentales y los alotetraploides (metilaciones o demetilaciones) y se afectaron tanto secuencias en baja copia como elementos repetitivos. Los autores observaron que las alteraciones ocurrieron a lo largo de todo el genoma y que diferían significativamente entre los dos genomas que constituyen el alopoliploide. Identificaron 11 secuencias con un cambio heredable de metilación (ocurrió en la hibridación y se mantuvo estable luego de la duplicación genómica) de las cuales la mayoría pertenecían a uno de los parentales, por lo que

sugirieron que los genomas difieren en su habilidad para ser modificados. Previamente ya se había detectado que en esta especie las alteraciones no eran al azar ya que las mismas ocurrían en individuos diferentes seleccionados arbitrariamente e inclusive se conservaban entre poliploides naturales y sintéticos (Liu et al. 1998). Una interpretación alternativa es que algunas de estos cambios en la metilación aparentemente “dirigidos” representan cambios genéticos al azar beneficiosos por lo que son seleccionados (Rieseberg 2001). Contrariamente, Liu et al. (2001) postularon que los cambios en la metilación no siempre acompañan a un proceso de aloploidización, ya que observaron aditividad de la metilación cuando compararon tetraploides y hexaploides sintéticos de algodón (*Gossypium*) con sus progenitores diploide y tetraploide, respectivamente.

Con el objetivo de estudiar las consecuencias de la hibridación y duplicación sobre la adaptación de un genoma poliploide en el género *Spartina*, Salmon et al. (2005) compararon la metilación de dos híbridos (*Spartina* × *Townsendii* y *Spartina* × *neyrautii*) con la de sus progenitores hexaploides (*Spartina maritima* y *Spartina alterniflora*). Mediante MSAP observaron que el genoma de los dos híbridos experimentó una metilación masiva. Los autores especularon que sería una consecuencia del origen aloploide de los progenitores, sumado al elevado nivel de ploidía de los híbridos. Vale la pena destacar que un gran porcentaje de estos fragmentos metilados (71,4 %) eran comunes a ambos híbridos, por lo cual postulan que estos cambios podrían ser “dirigidos” o al menos no estocásticos y aportan evidencia de que es la hibridación, mas que la duplicación, la que provoca los cambios.

En *Arabidopsis*, Madlung et al. (2002) analizaron la existencia de algún fenómeno epigenético involucrado en el silenciamiento previamente observado por Comai et al. (2000) en aloploidios sintéticos de *Arabidopsis*. Luego del estudio de la

ocurrencia y los efectos de los cambios en la metilación del ADN no observaron un cambio global en la metilación del mismo en los aloploidos. Con experimentos de MSAP detectaron cambios (aumento y disminución) pero no una hiper o hipo metilación generalizada. Algo muy interesante fue que muchos de estos cambios se observaban en diferentes aloploidos de la misma generación, por lo que postularon que algunos de estos cambios son heredados o específicos del locus. La mayoría de las secuencias diferencialmente metiladas no presentaban homología con secuencias de función conocida. Por otro lado estudiaron el estado de metilación de una región centromérica (heterocromática) de 180 bp (1-2 % del genoma) y encontraron que tanto en los parentales como en los aloploidos esta se encontraba hiper-metilada. En base a estos resultados concluyeron que las diferencias fenotípicas que observaban no eran debidas a grandes cambios en la metilación. Mediante el tratamiento de las plantas con un agente demetilante (inhibidor de la ADN metiltransferasa) observaron una gran inestabilidad fenotípica y transcripcional (cDNA-AFLP) específica de los aloploidos y concluyeron que una estructura cromatínica previamente alterada parecería mas susceptible. Dado que los parentales y los aloploidos eran tetraploides, los efectos observados fueron debidos a la hibridación más que al cambio de ploidía, y lo que observaron es una incompatibilidad entre los diferentes genomas. Estos mismos autores, mas recientemente, observaron que la reactivación del transposón de la familia *Suf* (ver mas arriba), estaba asociado a la demetilación de las secuencias CG y CNG del transposón. El mismo se encuentra metilado e inactivo en el parental autotetraploide y se demetila y activa en el alotetraploide (Madlung et al. 2005).

Mas evidencias de que estos cambios ocurren “dirigidos” y por lo tanto son repetibles en poliploidizaciones diferentes fueron encontradas en *Arabidopsis* (Wang et al. 2004). En este trabajo se crearon líneas transgénicas defectivas para dos genes

involucrados en la metilación del ADN y observaron que la expresión de dos genes previamente silenciados se activaba en estas líneas. Como no ocurría lo mismo con otros genes los autores postularon que la metilación del ADN sería responsable solo de algunos fenómenos de silenciamiento (revisado en Rapp y Wendel 2005).

Existen aún pocos trabajos de los efectos de la metilación de citosinas en la expresión génica derivados de la autoploidización en gramíneas. Recientemente, Ochogavía et al. (2009) mediante la técnica de MSAP analizaron el estado global de metilación de una serie “tetraploide-diploide-tetraploide” de *Eragrostis curvula*. Los autores identificaron polimorfismos epigenéticos considerables durante la conversión entre los niveles de ploidía. Una proporción significativa de los cambios observados en la conversión tetraploide-diploide revertía cuando se restablecía el nivel tetraploide. Esta evidencia implicaría la existencia de un “epigenoma” característico de cada nivel de *ploidía* que afecta a un grupo de loci.

Además de la metilación del ADN, existen otras modificaciones epigenéticas encargadas del silenciamiento de genes duplicados en circunstancias donde la actividad de más de una copia de un mismo gen es contraproducente. En poliploides, se han observado genes silenciados que no son reactivados mediante demetilación del ADN debido a que los mismos se encuentran regulados a través de las interacciones entre loci homeólogos. Este fenómeno, denominado “paramutación” genera cambios heredables en la expresión que son provocados por la regulación en *trans* de uno de los alelos por parte del otro y se encuentra relacionado con la regulación génica post-transcripcional mediada por ARN (siARN o miARN). Mittelsten Scheid et al. (1996) identificaron que el cambio de ploidía en *Arabidopsis* afectaba al silenciamiento génico ya que un dado transgen silenciado al nivel diploide y tetraploide, se reactivaba al nivel triploide. Los autores relacionan la regulación por ARNi con interacciones de tipo paramutaciones

como los responsables de la regulación en poliploides. Otra evidencia de este tipo de regulación surgió en un estudio con alotetraploides sintéticos de trigo (Kashkush et al. 2003) donde la reactivación de transposones provocó la lectura de transcritos relacionados con la regulación de genes cercanos dependiendo si los transcritos se encontraban en orientación sense o anti-sense. Con la formación del poliploide, las vías de ARNi de los parentales se modifican (incompatibilidad entre los genomas) en cuanto a su biogénesis, acumulación y especificidad, por lo que se puede observar una regulación negativa del gen blanco de uno u otro de los genotipos parentales o de los dos al mismo tiempo (Chen y Ni 2006).

#### **I.4.6 Aspectos epigenéticos de la reproducción asexual vía semillas**

La relación entre la reproducción sexual y apomítica puede ser explicada a través de dos modelos. El primero, de la “mutación génica”, postula que algún factor clave regulatorio de la reproducción sexual se encuentra mutado o con su función alterada, provocando la desregulación de la vía sexual. El segundo, “modelo de la epimutación”, considera que cambios reversibles en la configuración de la cromatina alterarían la expresión de genes regulatorios claves, temporal y espacialmente, disparando la vía apomítica en diferentes momentos del desarrollo o en diferentes tipos de célula (Koltunow y Grossniklaus 2003). No se trata de modelos mutuamente excluyentes ya que una mutación en un regulador epigenético provocaría una alteración en la formación de la cromatina (Rodrigues y Koltunow 2005).

Las evidencias de que la apomixis podría estar regulada epigenéticamente se basan principalmente en que los programas de desarrollo de la mayoría de las especies apomíticas no están fuertemente conservados. Presentan diferencias en el momento de iniciación y en las estructuras formadas en respuesta a diferentes condiciones ambientales. Incluso se observa variabilidad en el desarrollo apomítico dentro de una

misma planta de reproducción vegetativa (Koltunow et al. 2000). Las epimutaciones son reversibles y pueden ser transmitidas a la progenie, por lo que es más probable que generen múltiples cambios en la expresión génica y así permitir el desarrollo de un carácter complejo como la apomixis, que ocurre simultáneamente con la reproducción sexual en una misma planta (Koltunow y Grossniklaus 2003).

Los cambios epigenéticos pueden ser una consecuencia de la hibridación o el resultado de los cambios de ploidía en los híbridos o autoploidos. Los cambios epigenéticos observados después de la poliploidización en *Arabidopsis* resultaron estables y se mantuvieron incluso después de una reducción de la ploidía (revisado en Koltunow y Grossniklaus 2003), como puede haber ocurrido en paleopoliploides. El modelo de control epigenético proporciona una solución al enigma de cómo varios caracteres (apomeiosis, partenogénesis y formación de endosperma) evolucionaron de forma coordinada para producir apomícticos funcionales. Como la ocurrencia simultánea de varias mutaciones es poco probable, los modelos de participación de un gen maestro regulador único fueron los más aceptados en el pasado. Sin embargo, actualmente hay evidencias de que en algunas especies apomícticas los componentes de la apomixis se encuentran bajo control genético independiente. Si los cambios que dieron lugar a la apomixis fueron epigenéticos, es posible que estas epimutaciones hayan ocurrido en una misma planta ancestral. A diferencia de las mutaciones, los cambios epigenéticos pueden ocurrir rápidamente y pueden ser particularmente frecuentes como resultado de la hibridación y/o la poliploidía. Esto fue demostrado experimentalmente por Quarin et al. (2001) donde la duplicación cromosómica de un diploide sexual produjo plantas tetraploides apomícticas funcionales en *Paspalum notatum*.

Si las modificaciones epigenéticas están involucradas en la reproducción apomítica es importante pensar cómo surgen y se mantienen. Las características genéticas y moleculares de mutantes con ADN hipo-metilados sugieren que la alteración en la maquinaria de metilación de mantenimiento conduce a la acumulación de estados alterados de metilación que no son reformulados incluso después de restaurar los componentes genéticos (Kakutani et al. 1996, Jeddeloh et al. 1998, Saze et al. 2003). En estos mutantes la hipo-metilación de loci específicos podría coexistir con los loci metilados generando así variación epigenética (Saze et al. 2003).

La apomixis podría haber surgido tras la perturbación de los mecanismos de metilación del ADN como se observó en mutantes *ddm* (Jeddeloh et al. 1999), de manera que la acumulación de epimutaciones causaría una expresión alterada de los principales genes de desarrollo. Alternativamente, las epimutaciones causadas por algún tipo de estrés en el ambiente o hibridaciones causarían también una expresión alterada de los genes que controlan la vía de reproducción que conduce a la apomixis.

Recientemente, se han asociado transposones al locus responsable de la reproducción apomítica en especies de *Pennisetum* (Labombarda et al. 2002, Akiyama et al. 2004) y *Paspalum notatum* (Stein et al. comunicación personal) lo cual sugiere que la alteración en la metilación del ADN podría estar implicada en la expresión de genes que conduce a la manifestación de la apomixis ya que las secuencias repetitivas en los genomas de las plantas son blancos comunes de la metilación de citosinas (Rabinowicz et al. 1999).

Sigue sin quedar claro si los niveles de actividad transposicional son de importancia funcional para la reproducción apomítica. Es tentador especular que los transposones podrían insertarse en los principales reguladores epigenéticos de la reproducción sexual en las plantas apomíticas, desregulando así la expresión del

programa de desarrollo sexual espacial y temporalmente. Lippman et al. (2004) demostraron que la expresión de los transposones puede conducir a la expresión inadecuada de sus genes vecinos. Alternativamente, si un defecto en la maquinaria RNA de interferencia desregula la expresión de los genes de la reproducción sexual en plantas apomícticas, entonces el actividad transposicional que se observa sería mas un efecto que una causa de la apomixis.

Las epimutaciones, patrones aberrantes de metilación de ADN y defectos en genes involucrados en la remodelación de la cromatina, han sido asociados con diferentes problemas en el desarrollo, transformaciones homeóticas, esterilidad, activación de transposones y defectos en la floración (Rodrigues y Koltunow 2005). Específicamente relacionado con la reproducción de las plantas, la metilación del ADN ha sido asociada en el control del “imprinting” genómico, fenómeno en el que los genes son expresados diferencialmente dependiendo del origen materno o paterno de los mismos (Grossniklaus et al. 2001).

Hasta el momento no existen evidencias directas sobre la asociación entre la regulación epigenética y la apomixis. La formación de un embrión viable y el éxito del establecimiento de la plántula tras la fecundación requieren de la formación del endosperma. El aislamiento de diversos mutantes en *Arabidopsis* ha permitido estudiar y comprender más acerca de la formación del endosperma. Los mutantes FIS (“*fertilization-independent seed*”), MEA (*Medea*), fis2 y FIE (“*fertilization-independent endosperm*”) se caracterizan por su capacidad de formación de endosperma en ausencia de fecundación (Grossniklaus et al. 2001). Una forma de avanzar en el tema podría incluir el aislamiento de los genes ortólogos *FIS* a partir de plantas apomícticas. Por otro lado, si la metilación del ADN está involucrada en el control de la expresión de los genes implicados en el desarrollo apomíctico, la alteración de los niveles de metilación



en etapas clave de la reproducción apomítica permitiría identificar las etapas en las que estas marcas epigenéticas son importantes. Finalmente, se podrían analizar los patrones de metilación del ADN de genes específicos y así identificar las posibles diferencias entre plantas apomíticas y sexuales durante todo el desarrollo del óvulo.

### **I.5 Estudios de la aposporia en especies de *Paspalum***

Entre las diferentes especies del género *Paspalum*, *P. simplex* Morong y *P. notatum* Flüge han sido las más estudiadas en cuanto a la genética molecular de la apomixis. *Paspalum simplex* Morong es una gramínea americana perteneciente al subgénero *Anachyris* (Hitchcock 1927). Esta especie presenta citotipos diploides sexuales y alógamos por autoincompatibilidad (Espinoza y Quarin 1997) y citotipos autotetraploides apomíticos, pseudógamos y autofértiles. Además, cuenta con citotipos triploides ( $2n = 3x = 30$ ) y hexaploides ( $2n = 6x = 60$ ) para los cuales se desconoce el sistema reproductivo y comportamiento meiótico (Caponio y Quarin 1987, Pupilli et al. 1997).

A pesar de ser distantes genéticamente, ambas especies comparten muchas características en relación a la apomixis. Un similar control genético y distorsión en la segregación fueron detectados en poblaciones segregantes de ambas especies (Pupilli et al. 2001, Martínez et al. 2001). Pupilli et al. (2001) localizaron el segmento cromosómico que controla la apomixis (ACL) en *P. simplex*. El mismo es un segmento relativamente grande, con fuerte represión de la recombinación y sinténico con una porción telomérica del brazo largo del cromosoma 12 de arroz. Estos mismos autores, mediante mapeo comparativo, determinaron un grado parcial de sintenia entre esta especie y *P. notatum*, ya que los marcadores más distantes fueron remplazados por marcadores del cromosoma 2 de arroz en esta última especie (Pupilli et al. 2004). Por esto, los autores sugirieron que una translocación ocurrió entre estas dos especies. Mas

recientemente, a partir de marcadores de AFLP obtuvieron 33 marcadores presentes solo en plantas apomícticas (Calderini et al. 2006) con los que posteriormente confirmaron la hemigocidad de la región (Labombarda et al. 2002) mediante la hibridación de los mismos con ADN genómico de plantas sexuales y apomícticas. También lo confirmaron citológicamente con experimentos de FISH utilizando un clon de BAC ligado a la apomixis (346H10). Con estos experimentos determinaron que el ACL se encuentra en regiones no pericentroméricas del genoma de *P. simplex*. La secuenciación de 346H10 confirmó la sintenia con el cromosoma 12 de arroz y reveló 2 regiones que mostraron homología con los genes EXS (un receptor del tipo proteína quinasa rico en leucinas) y PKD (dominio de proteína quinasa). Estos genes resultaron similares a SERK (receptor tipo proteína quinasa de la embriogénesis somática) el cual fue asociado con la formación de los sacos embrionarios apospóricos en *Poa* (Albertini et al. 2005).

Ortiz et al. (2001) construyeron el mapa genético de *Paspalum notatum* al nivel diploide a partir de marcadores moleculares de RFLP, RAPD y AFLP. La localización de sondas heterólogas (RFLP) de arroz, maíz y avena en diferentes regiones del genoma, les permitieron identificar distintas regiones sinténicas con dichas especies. Además, lograron identificar dos grupos de ligamiento que incluyen marcadores relacionados con la aposporia en *Brachiaria* (Pessino et al. 1998). Con el objetivo de identificar marcadores ligados a la aposporia en *P. notatum*, Martínez et al. (2003) generaron una población segregante por el modo de reproducción a partir del cruzamiento de una planta tetraploide experimental 100 % sexual y una planta tetraploide natural apomíctica. Luego de determinar citoembriológicamente el modo de reproducción de 290 individuos F<sub>1</sub> (219 sexuales y 71 apomícticos) y realizar una estrategia de BSA (“Bulk segregant analysis”) identificaron 8 marcadores moleculares

(2 RAPD, 4 AFLP y 2 RFLP, generados con la misma sonda) completamente ligados al carácter. Estos presentaban la misma distorsión de la segregación observada previamente (Martínez et al. 2001) al compararlos con las relaciones esperadas 1:1 y 13:15 (segregación al azar de cromosomas y de cromátidas, respectivamente), consideradas para el control por un único gen dominante. Stein et al. (2004) ampliaron estos estudios de herencia e identificaron la región responsable de la apomixis en *P. notatum*, utilizando una población F<sub>1</sub> de 113 individuos segregante por el modo de reproducción, obtenida a partir de los mismos parentales empleados por Martínez et al. (2003). El modo de reproducción de cada individuo F<sub>1</sub> fue determinado a través de dos marcadores de RAPD completamente ligados a la aposporía (Martínez et al. 2003) y confirmado citoembriológicamente. También observaron que el carácter presentaba una fuerte desviación de la relación 1:1 (sex:apo) esperada para un factor dominante simple, ya que identificaron 98 plantas sexuales y 15 apomícticas (6,5:1). A partir de las distancias de recombinación de los marcadores ligados en fase de repulsión pudo determinarse que el cromosoma que contiene la región responsable de la aposporía presenta apareamiento preferencial de cromosomas con uno de los otros tres homólogos.

Más recientemente, con esta misma población segregante por el modo de reproducción desarrollaron el mapa de ligamiento completo de *Paspalum notatum* a nivel tetraploide a partir de marcadores de AFLP y RFLP (Stein et al. 2007). El carácter aposporía (grupo-apo) se asoció a un solo grupo de ligamiento de los 39 que constituyen el mapa del parental apomíctico (Q4117) y quedó conformado por 25 loci, de los cuales solo 15 co-segregan estrictamente con el carácter. Algunos de estos marcadores presentaron homología con elementos repetitivos y coincidentemente con otras especies estos agentes causantes de reordenamientos estructurales parecen estar fuertemente asociados a la región que controla la apomixis. A partir del ligamiento completo de

estos marcadores con la aposporía confirmaron la supresión de la recombinación genética en esa región del genoma. Los autores postulan que puede deberse a distintos factores como: localización pericentromérica, telomérica o heterocromática, una inversión o una translocación. La elevada densidad de marcadores en la región sugiere que puede tratarse de un fragmento cromosómico de gran tamaño (aproximadamente 36 Mpb) que incluye varios genes relacionados por función y aislados por recombinación (Stein et al. 2007).

En estudios realizados en paralelo a partir de una población segregante por el modo de reproducción, Pessino et al. (2001) aislaron e identificaron inicialmente 3 transcriptos de ARNm diferencialmente expresados entre genotipos sexuales y apomíticos de *P. notatum*. Utilizaron la técnica de “differential display” y un procedimiento en “bulks” con el fin de reducir los falsos positivos debidos a la variabilidad genética. Los transcriptos presentaron una elevada homología entre ellos pero no mostraron una similaridad de secuencia significativa con genes conocidos. Posteriormente, Laspina et al. (2008) llevaron a cabo una caracterización más extensa del transcriptoma en la especie en la que aislaron 65 genes de expresión diferencial en flores de genotipos sexuales y apospóricos, de los cuales 45 pudieron ser categorizados funcionalmente. Los genes identificados se ubican dentro de unas pocas clases ontológicas: transducción de señales, proteólisis, control del ciclo celular, regulación de la transcripción y actividad de transposones. Cinco de estos genes resultaron con idéntica función a genes relacionados con la aposporía en *Poa* (Albertini et al. 2004; 2005) y en ambas especies existen numerosos representantes de una cascada de transducción de señales de tipo ERK (“*extracellular receptor kinase*”). Por otro lado, mediante mapeo *in silico* sobre el genoma de arroz, se observa una mayor frecuencia de clones que se localizan en una de las regiones sinténicas a la región apo (brazo largo del

cromosoma 2 de arroz). Curiosamente, todos estos genes fueron aislados a partir del genotipo sexual, por lo que estarían silenciados en el genotipo apomítico. Más aún, cuando algunos de estos genes silenciados fueron localizados en la propia especie, resultaron asociados al locus apo. Es por esto que los autores postularon que la región conteniendo el apo-locus en *P. notatum* contaría con genes determinantes para el desarrollo sexual que podrían estar silenciados en los genotipos apomíticos.

Esta tesis intenta contribuir al estudio de la apomixis en *Paspalum* desde esta perspectiva y aportar conocimientos sobre la naturaleza de las secuencias asociadas físicamente a la aposporia y la caracterización molecular de la región responsable de la misma. Asimismo se pretende realizar una evaluación de las frecuencias relativas, distribución y patrones de metilación de los citotipos diploides y tetraploides de la especie y determinar patrones comunes presentes en plantas apomíticas y sexuales.

Las hipótesis que se detallan a continuación estuvieron dirigidas a iniciar estudios sobre los niveles de metilación del ADN en el genoma de *Paspalum notatum*, su distribución y relación con el sistema reproductivo:

- Existen diferencias en los niveles de sitios CCGG metilados entre los citotipos diploides y tetraploides de *Paspalum notatum*.
- La distribución de los sitios metilados es uniforme a lo largo del genoma de *Paspalum notatum*.
- La región genómica responsable de la aposporia se encuentra hipo-metilada en la especie.

Por otro lado se formularon hipótesis relacionadas con las secuencias de los marcadores moleculares de AFLP completamente ligados a la aposporia en *P. notatum*,

la búsqueda de homologías con genes conocidos y el desarrollo de herramientas moleculares para profundizar los estudios genéticos y moleculares del carácter:

- Los marcadores completamente ligados a la región que controla la aposporía pueden utilizarse para la identificación de genes relacionados al carácter apomixis en *Paspalum notatum*.
- La información de secuencias específicas de esta región puede emplearse para el desarrollo de marcadores alelo específicos asociados al modo de reproducción.
- Los marcadores moleculares ligados al carácter apomixis en razas tetraploides de *P. notatum* están presentes en poblaciones de plantas diploides de la misma especie.

## II OBJETIVOS

### II.1 Objetivo general

El objetivo general del presente trabajo de tesis fue estudiar desde una perspectiva global el epigenoma de las razas diploides y tetraploides de *Paspalum notatum* y su relación con la apomixis, y caracterizar a nivel molecular la región genómica responsable de la aposporía en la especie

### II.2 Objetivos específicos

1. Determinar las proporciones relativas y variabilidad de secuencias CCGG metiladas en citotipos diploides y tetraploides de *Paspalum notatum* empleando la técnica de MSAP.
2. Analizar la distribución de las regiones metiladas en el genoma de *Paspalum* mediante el mapeo de marcadores de MSAP en una población tetraploide segregante por el modo de reproducción.
3. Determinar el estado de metilación de la región genómica responsable de la apomixis empleando clones de RFLP y AFLP completamente ligados al carácter en la especie y enzimas sensibles a metilación.
4. Clonar y secuenciar marcadores de AFLP completamente ligados a la aposporía en *P. notatum* y determinar su homología con genes de funciones conocidas.
5. Desarrollar marcadores de PCR alelo-específicos a partir de fragmentos de AFLP asociados al modo de reproducción y validarlos en la población segregante

disponible así como en distintas accesiones apospóricas y no apospóricas de la especie.

6. Aislar secuencias flanqueantes de marcadores moleculares asociados a la región que controla la aposporía en la especie e identificar secuencias anotadas (genes) asociadas al modo de reproducción.



### III MATERIALES Y METODOS

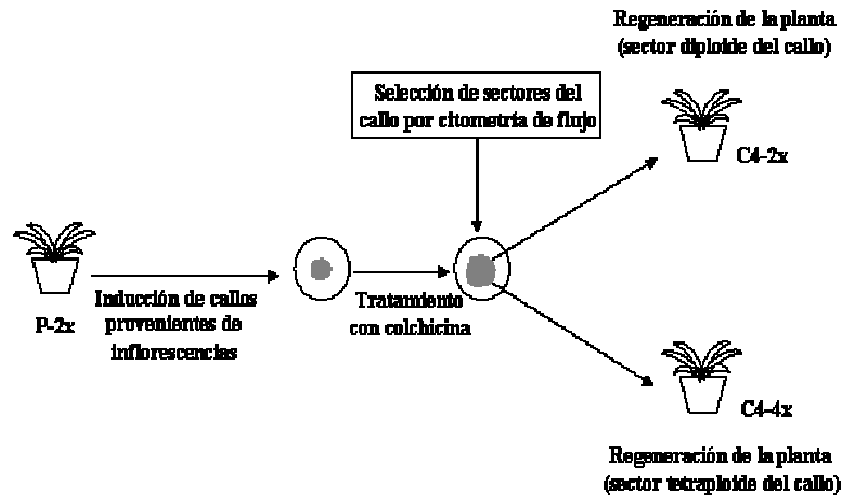
#### III.1 Material Vegetal

El material vegetal utilizado en este trabajo pertenece a la colección de germoplasma de *Paspalum notatum* presente en el Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE) – Facultad de Ciencias Agrarias, UNNE, Corrientes, Argentina. Como citotipos diploides se emplearon: el cultivar Tifton 9, desarrollado en la estación experimental “Coastal Plains Station” (Georgia, EEUU) y previamente empleado como progenitor de una población de mapeo para desarrollar el mapa genético de la especie al nivel diploide (Ortiz et al. 2001); la accesión Q4175 derivada de una población natural ubicada a 15 Km de la ciudad de La Criolla (Santa Fé, Argentina) y 57 genotipos pertenecientes a una población natural localizada en el centro de la provincia de Santa Fé (Cayastá), de los cuales dos de ellos (3-Cay y 6-Cay) fueron utilizados en la primera parte de este trabajo. También se incluyó, un genotipo diploide de *P. notatum* (C4-2x,  $2n = 2x = 20$ ) y su contraparte autotetraploide (C4-4x,  $4n = 4x = 40$ ) que fueron obtenidos previamente en forma experimental (Quarin et al. 2001). Las plantas C4-2x y C4-4x fueron obtenidas por Quarin et al. (2001) luego del tratamiento con colchicina de callos inducidos *in vitro* a partir de inflorescencias jóvenes de un genotipo diploide de *P. notatum* (Figura 1).

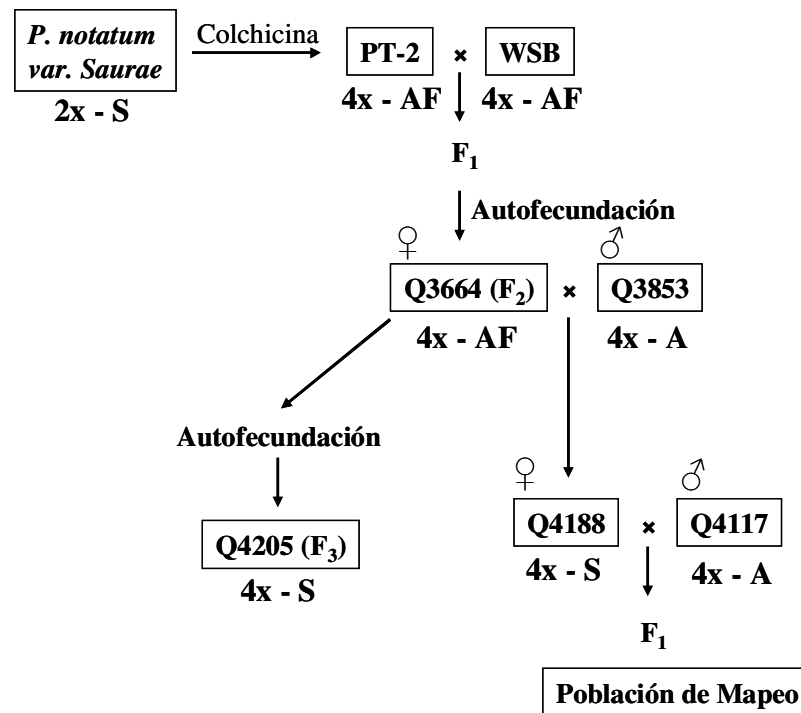
Para este trabajo se dispuso asimismo de una población de mapeo  $F_1$  de *P. notatum* tetraploide ( $2n = 4x = 40$ ) de 113 individuos, segregantes por el modo de reproducción. La misma fue obtenida por el Ing. Camilo L. Quarin y colaboradores en el IBONE (Corrientes, Argentina) a partir del cruzamiento entre una planta experimental tetraploide sexual como progenitor femenino, Q4188 y un genotipo apomíctico obligado, Q4117, colectado de una población natural del estado de Rio Grande do Sul, Brasil. Q4188 fue obtenida del cruzamiento entre las plantas Q3664 y la

accesión Q3853 (Quarin et al. 2003), siendo esta última tetraploide apomíctica natural originaria de Rio Grande do Sul, Brasil. La planta Q3664 (4x, Apo-facultativa) fue generada en Tifton (Georgia, EEUU) por cruzamientos controlados entre un tetraploide sexual inducido por colchicina (PT-2) de Pensacola Bahiagrass (*P. notatum* var. *Saurae*, 2x) y un tetraploide apomíctico de estigmas blancos (WSB) (Figura 2). El modo de reproducción de los progenitores de la población fue estudiado por métodos citoembriológicos y moleculares, determinándose que Q4188 sólo produce sacos embrionarios de tipo meióticos y progenies de origen sexual (Quarin et al. 1984, Ortiz et al. 1997) mientras que Q4117 genera sacos embrionarios de tipo apospórico y progenie de tipo materno (Martínez et al. 2001, Ortiz et al. 1997). Esta población se encuentra establecida en terrenos del IBONE (Corrientes, Argentina) y un duplicado de la misma está cultivado en macetas en la Facultad de Ciencias Agrarias de la UNR. Cada F<sub>1</sub> fue clasificada de acuerdo a su modo de reproducción en plantas apospóricas o no apospóricas utilizando marcadores moleculares de RAPD (“*Random Amplified Polymorphic DNA*”), previamente detectados como ligados completamente al carácter aposporia (Martínez et al. 2003) y posteriormente corroborado por estudios embriológicos (Stein et al. 2004, Stein et al. 2007).

Como genotipos tetraploides también fueron incluidos en este trabajo el genotipo apomíctico natural N160, colectado a 25 Km al norte de la ciudad Pedro Juan Caballero, departamento Amambay (Paraguay), y el genotipo experimental de reproducción sexual Q4205, obtenido a partir de la autofecundación de la planta Q3664 citada anteriormente (Figura 2).



**Figura 1.** Representación esquemática del procedimiento experimental utilizado para la generación de las líneas C4-2x y C4-4x de *P. notatum* (adaptado de Martelotto et al. 2005).



**Figura 2.** Esquema de la obtención de los genotipos tetraploides sexuales y de la población de mapeo utilizado en este trabajo de tesis (S = sexual, AF = apomítico facultativo, A = apomítico obligado).

### **III.2 Extracción de ADN**

La extracción del ADN genómico de las plantas experimentales se realizó según la técnica descrita por Shagai-Marroof et al. (1984) incluyendo modificaciones introducidas por Ortiz et al. (1997). Brevemente, 6 g de hojas frescas fueron congeladas con N<sub>2</sub> líquido, disgregadas mecánicamente con mortero hasta obtener un polvo fino y transferidas a tubos de polipropileno de 50 ml conteniendo 20 ml de buffer de extracción (Tris-HCl 100 mM pH 7,5; EDTA 50 mM pH 8,0; 2 % p/v CTAB; NaCl 700 mM y 2-mercaptoetanol 140 mM). La preparación fue incubada a 65 °C con agitación suave durante 60 minutos, y se realizaron dos extracciones sucesivas con cloroformo, 10 ml cada vez, centrifugando a 5000 rpm y recuperando la fase acuosa. El ADN fue precipitado mediante el agregado de un volumen de isopropanol frío e incubado a -20 °C por 16 h. El ovillo de ADN fue recogido con una varilla de vidrio y lavado durante 20 minutos en una solución de etanol 76 % y acetato de sodio 0,2 M. Luego de ser secado durante 20 minutos a 37 °C fue resuspendido en 700 µl de buffer TE pH 8,0 (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM). Cada muestra fue incubada con 5 µl de RNAsa A (4 mg/ml) (Biodynamics) a 37 °C por 1 hora y posteriormente el ADN fue precipitado con 5 % v/v de 5 M NaCl y un volumen de isopropanol frío. Finalmente, la muestra fue centrifugada por 20 minutos a 10.000 rpm, lavada con etanol 70 %, secada en estufa a 37 °C durante 1 hora y disuelta en 500 µl de agua ultra pura estéril. La cantidad y calidad de la muestra fueron analizadas midiendo la absorbancia a 260 nm y el índice de absorbancia a 260/280 (nm) respectivamente, con un espectrofotómetro Perking-Elmer Lambda Bio+. Por otro lado, la integridad del ADN y la ausencia de ARN contaminante fueron determinadas mediante electroforesis en gel de agarosa 0,8 % de acuerdo a Sambrook et al. (1989).

### III.3 Generación de Marcadores Moleculares

#### III.3.1 Amplificación de Polimorfismos Sensibles a Metilación (MSAP)

Los marcadores MSAPs se generaron según la técnica descrita por Xiong et al. (1999) con modificaciones propuestas por Xu et al. (2000). Ambos son adaptaciones del trabajo descrito por Reyna-López et al. (1997), quien modificó el protocolo original para la obtención de marcadores de AFLP (“*Amplified Fragment Length Polymorphism*”) (Vos et al. 1995) mediante la incorporación de enzimas de restricción sensibles a metilación. Los isoesquizómeros *HpaII* y *MspI* fueron utilizados en lugar de la enzima de corte frecuente *MseI* mientras que *EcoRI* se empleó como enzima de corte poco frecuente.

Los marcadores MSAP se generaron llevando a cabo dos reacciones de digestión en paralelo para cada muestra de ADN. En una reacción, 600 ng de ADN genómico fueron digeridos con 5U de *EcoRI* y 5U de *HpaII* en un volumen final de 40  $\mu$ l conteniendo buffer OPA 1X (Tris acetato 100 mM, pH 7.5, acetato de magnesio 100 mM y acetato de potasio 500 mM) (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK), DTT 5 mM y BSA 50 ng/ $\mu$ l a 37 °C durante 3 horas. La otra reacción de digestión fue llevada a cabo de la misma manera, excepto que se utilizó la enzima *MspI* en lugar de *HpaII*. Luego, los productos de digestión fueron ligados a los adaptadores correspondientes, durante 3 horas a 37 °C mediante el agregado de 10  $\mu$ l de mezcla de ligación, conteniendo 5 pmoles de adaptador *EcoRI*, 50 pmoles de adaptador *HpaII-MspI*, 1U de ADN ligasa T4 (Promega), ATP 1 mM, buffer OPA 1X, DTT 5 mM y BSA 50 ng/ $\mu$ l. El adaptador *EcoRI* fue el mismo que el utilizado en el protocolo original de AFLP (Vos et al. 1995) (Anexo A). El adaptador *HpaII-MspI*, fue diseñado para evitar la reconstrucción del sitio de restricción y consistió en la combinación de los siguientes cebadores:

5'-GACGATGAGTCTAGAA-3'

3'-CTACTCAGATCTTGC-5'

Ambos adaptadores (*EcoRI* y *HpaII-MspI*) fueron preparados mezclando cantidades equimolares de cada cebador, manteniendo la mezcla por 10 minutos a 65 °C y permitiendo el enfriamiento lento hasta temperatura ambiente. La reacción de pre-amplificación se realizó utilizando cebadores complementarios a la secuencia de los adaptadores y a los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción. Así, el cebador *HpaII-MspI* utilizado fue:

ADAPTADOR	ENZ	EXT
5'-GATGAGTCTAGAA	CGG	ANN-3'

La misma se llevó a cabo a partir de 2 µl del producto de ligación, en un volumen final de 25 µl conteniendo 30 ng de cada cebador con una base selectiva en el extremo 3' (*EcoRI* + A y *HpaII-MspI* + A), dNTPs 0,2 mM, 1U de Taq polimerasa (Promega), MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM y buffer de PCR 1X (Promega). La reacción de amplificación involucró 20 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 60 °C, 1 min a 72 °C y 5 min finales de elongación a 72 °C. Estos productos fueron diluïdos 1/10 en TE 0,1 (Tris-HCl 10 mM y EDTA 0,1 mM) para ser utilizados como templados en la reacción de amplificación selectiva que se realizó en un volumen final de 25 µl conteniendo 30 ng de cada cebador con 3 bases selectivas en el extremo 3' (*EcoRI* + 3 y *HpaII-MspI* + 3) (Anexo A), dNTPs 0,2 mM, Taq polimerasa 1U (Promega), MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM y buffer de PCR 1X (Promega). Esta amplificación selectiva consistió en un ciclo inicial de 30 seg a 94 °C, 30 s a 65 °C, 1 min a 72 °C, seguido de 12 ciclos iguales donde la temperatura de anillado fue disminuyendo 0,7 °C por ciclo hasta llegar a 56 °C. Finalmente, 22 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 56 °C, 1 min a 72 °C y 5 min de elongación final a 72 °C. Las secuencias de todos los oligonucleótidos utilizados en la técnica de MSAP se

encuentran detallados en el Anexo A. Los productos de amplificación fueron desnaturalizados 5 min a 94 °C luego del agregado de 10 µl de buffer de siembra (formamida 95 %, NaOH 10 mM y azul de bromofenol 2 mg/ml). Alícuotas (5 µl) de cada muestra fueron resueltas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 5% (acrilamida: bisacrilamida (19:1), TBE 0,5X, Urea 7,5 M) en cuba de secuenciación (Gibco-BRL) a 60 Watts constantes por 2:30 h. Se utilizaron, TBE 0,5X y TBE 1X, como soluciones reguladoras en los reservorios superior e inferior de la cuba, respectivamente. Finalmente, la visualización de los fragmentos se llevó a cabo a través de la tinción de los geles con nitrato de plata. La misma involucró una fijación de 20 min en ácido acético glacial 10 % v/v, tres lavados de 3 min cada uno con H<sub>2</sub>O, tinción de 30 min con una solución conteniendo AgNO<sub>3</sub> 1 g/l y formaldehído 0,1 % v/v y previo lavado de 10 seg con H<sub>2</sub>O revelado con solución de carbonato de sodio (carbonato de sodio 30 g/l, formaldehído 0,1% v/v, tiosulfato de sodio 2 mg/ml). En la electroforesis, los productos de amplificación de cada genotipo digerido con *EcoRI/HpaII* o *EcoRI/MspI* fueron sembrados uno al lado del otro de manera de facilitar la visualización de los fragmentos diferencialmente metilados.

#### III.3.1.1 Análisis de datos

Los isoesquizómeros utilizados en la técnica de MSAP, *HpaII* y *MspI*, reconocen la misma secuencia blanco (5'-CCGG-3') pero exhiben sensibilidad a la metilación. *HpaII* es inactiva cuando cualquiera de las dos citosinas de la secuencia blanco se encuentra metilada (en ambas hebras), mientras que *MspI* es sensible (inactiva) solo a la metilación de la citosina externa, esto es, cliva la secuencia C<sup>5m</sup>CCGG, pero no <sup>5m</sup>CCGG (Reyna-Lopez et al. 1997, Cervera et al. 2002) (Tabla 1). Además de esto, *HpaII* puede restringir la hebra no metilada de una secuencia blanco “hemi” metilada (en una sola hebra) en la citosina externa, aunque la eficiencia de corte

es menor (Walder et al. 1983, Tardy-Planechaud et al. 1997). Estas características hacen que para una dada muestra de ADN sea posible diferenciar entre dos estados principales de metilación de sitios CCGG, la metilación de la citosina interna (ambas hebras) y menos frecuentemente la hemi-metilación de la citosina externa. Las comparaciones entre los productos de amplificación obtenidos de las digestiones *EcoRI/HpaII* y *EcoRI/MspI* permiten la detección de diferencias de metilación. Un fragmento presente en ambas digestiones indica que el sitio CCGG correspondiente no se encuentra metilado. La presencia de fragmentos a partir de las digestiones *EcoRI/HpaII* y ausencia en *EcoRI/MspI* es indicativo de hemi-metilaciones en la citosina externa, mientras que los fragmentos presentes solo a partir de las digestiones *EcoRI/MspI* se atribuyen a la metilación completa de la citosina interna. No obstante, algunos estados de metilación como la metilación completa de la citosina externa o de ambas citosinas no generan productos de amplificación en ninguna de las digestiones.

**Tabla 1.** Sensibilidad a la metilación y patrones de amplificación esperados en experimentos de MSAP utilizando los isoesquizómeros *HpaII* y *MspI*

Estado de metilación de la secuencia blanco	Digestibilidad de las enzimas		Patrón digestión/amplificación	
	<i>HpaII</i>	<i>MspI</i>	<i>EcoRI/HpaII</i>	<i>EcoRI/MspI</i>
CCGG GGCC	Activa	Activa	+	+
<sup>5m</sup> CCGG GGCC	Parcialmente activa	Inactiva	+	-
C <sup>5m</sup> CGG GG <sup>5m</sup> CC	Inactiva	Activa	-	+
<sup>5m</sup> C <sup>5m</sup> CGG GG <sup>5m</sup> C <sup>5m</sup> C	Inactiva	Inactiva	-	-

“+” presencia de banda, “-” ausencia de banda

Para la cuantificación de las secuencias CCGG metiladas y las estimaciones de la variabilidad entre los genotipos, los patrones de amplificación producidos por cada muestra a partir de ambas digestiones fueron registrados según Cervera et al. (2002). La



totalidad de los fragmentos obtenidos fueron cuantificados y se clasificaron de dos formas diferentes. Los fragmentos amplificados que diferían en cuanto a presencia/ausencia para una dada muestra digerida con *EcoRI/HpaII* y *EcoRI/MspI* fueron incorporados en una matriz binaria de datos denominada “Polimorfismos Sensibles a Metilación” (MSP). En esta matriz, se codificó con “1” cuando el polimorfismo se detectó entre las dos digestiones de una dada muestra y con “0” cuando no se observó polimorfismo, ya sea por presentar el mismo fragmento de amplificación o por no detectarse amplificación. Por otro lado, los fragmentos que presentaban un patrón monomórfico entre las digestiones de una dada muestra, pero que exhibían polimorfismos entre las distintas muestras fueron utilizados para crear una matriz binaria de “Polimorfismos Insensibles a Metilación” (MIP), donde “1” indicaba presencia y “0” ausencia del fragmento amplificado. Parte de estos polimorfismos derivarían de diferencias genéticas entre las muestras. Se llevaron a cabo comparaciones de a pares con el fin de generar matrices de similitud epigenética y no-epigenética basadas en el coeficiente de *Jaccard* (Jaccard 1908)  $J(ij) = a / (a + b + c)$ , donde  $J(ij)$  es la medida de la similitud entre los individuos  $i$  y  $j$ ,  $a$  es el número de fragmentos polimórficos compartidos por los dos individuos,  $b$  es el número de fragmentos presentes en  $i$  y ausentes en  $j$  y  $c$  es el número de fragmentos ausentes en  $i$  y presentes en  $j$ . A partir de las matrices de similitud se establecieron las relaciones entre los genotipos a través de la aplicación del algoritmo UPGMA (“*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic averaging*”) (Michener y Sokal 1957). Los límites de confianza de los conglomerados de los dendrogramas fueron obtenidos por medio de análisis “*bootstrap*” con 5000 repeticiones del programa WINBOOT (Yap y Nelson 1996, Felsenstein 1985). Se obtuvo el porcentaje de veces que cada nodo de los dendrogramas se repitió en 5000 muestras bootstrap, lo que a su vez indicó la robustez de los grupos

formados en cada nodo. Un porcentaje cercano a 100 % sugiere que el grupo refleja la estructura de la población y que el error de muestreo es mínimo. Para determinar la correlación entre los dos tipos de matrices dentro de cada grupo se realizó la prueba de Mantel con 1.000 permutaciones aleatorias (Mantel 1967). Todos los análisis fueron llevados a cabo con los paquetes estadísticos NTSYS-PC versión 2.10e (Rohlf 2000) e Infostat (2001).

### III.3.1.2 Localización de marcadores MSAP en el genoma de *Paspalum notatum*

Con el objetivo de determinar la distribución de los marcadores MSAP en el genoma de *P. notatum* se realizaron experimentos de mapeo utilizando los datos de segregación de una población segregante de tipo F<sub>1</sub> desarrollada previamente por Stein et al. (2007). La estrategia utilizada para el análisis de la distribución de los sitios CCGG metilados fue la misma empleada para el desarrollo del mapa de ligamiento a nivel tetraploide de *P. notatum* (Stein et al. 2007) basada en la identificación de marcadores presentes en dosis simple (ADS, alelos en dosis simple) segregantes de cada uno de los progenitores de la población de mapeo (Wu et al. 1992, Grattapaglia y Sederoff 1994). Los marcadores en esta situación presentan una segregación esperada de 1:1 (Aaaa x aaaa) en la progenie por lo es posible determinar con exactitud el genotipo de cada individuo de la población (Wu et al. 1992). La detección de los ADS se realizó confrontando los valores de segregación observados contra los valores esperados mediante una prueba de  $\chi^2$  a un  $p < 0.01$ . Los datos de segregación de cada genotipo parental se analizaron independientemente y se incluyeron en los archivos de datos de segregación de marcadores de AFLP de cada uno de los progenitores (Stein et al. 2007).

Los marcadores segregantes fueron clasificados de dos formas diferentes. Los fragmentos amplificados que diferían en cuanto a presencia/ausencia en alguno de los

parentales digerido con *EcoRI/HpaII* y *EcoRI/MspI*, fueron clasificados como “Polimorfismos Sensibles a Metilación” (MSP). Mientras que los fragmentos que presentaban un patrón monomórfico entre las digestiones de los parentales, pero que diferían entre ellos y segregaban en la población fueron clasificados como “Polimorfismos Insensibles a Metilación” (MIP) (Cervera et al. 2002).

El análisis de ligamiento se realizó utilizando el programa de mapeo Mapmaker 3.0 (Lander et al. 1987) codificando los datos de los marcadores ADS como del tipo “*F<sub>2</sub> backcross*” donde la presencia o ausencia de un determinado marcador indica heterocigosis u homocigosis respectivamente para el locus considerado. Los datos de segregación de los marcadores de MSAP se tomaron de una muestra de la población de mapeo de 20 individuos. El dato del polimorfismo en la metilación de cada genotipo (MSP o MIP) se agregó al final del archivo de datos preexistente de cada progenitor. Los mismos contenían 275 y 229 marcadores para los mapas materno y paterno, respectivamente. El programa MAPMAKER 3.0 permite asignar los nuevos marcadores a los grupos preexistentes mediante el comando “*assign*”. Posteriormente, la ubicación de cada marcador de MSAP en el grupo de ligamiento correspondiente fue determinada mediante el comando “*try*”. Las unidades de mapeo en cM derivaron de la función de Kosambi (1994). El análisis de ligamiento usando valores de LOD score entre 6.0 y 2.0 un  $r_1$  (máx) = 0.33 (Wu et al. 1992).

### III.3.2 Experimentos de *Southern Blot* genómicos

Los marcadores de RFLP (“*Restriction fragment length polymorphism*”) se generaron de acuerdo a lo descrito por Ortiz et al. (1997) con algunas modificaciones: la digestión de 30 µg ADN genómico de cada muestra se realizó durante toda la noche a 37 °C con 2,5 U/µg de ADN con las enzimas *EcoRI*, *HindIII*, *HpaII* y *MspI*. Luego de confirmar la digestión completa en agarosa al 1% se inactivaron las enzimas mediante la

precipitación del ADN (0,05 vol de NaCl 5M y 2,5 vol de etanol absoluto), se lavaron las muestras con etanol 70% v/v y se resuspendieron en 25 µl de H<sub>2</sub>O ultrapura estéril. Las muestras fueron sembradas en geles de agarosa al 1 % y resueltas a 80 mA por 6 h. La desnaturalización de los fragmentos se llevó a cabo por el método alcalino (NaOH 0,4 N y NaCl 0,6 M) durante 30 min, seguido de 30 min de neutralización (Tris-HCl 0,5 M pH 7,5; NaCl 1,5 M). Los fragmentos de digestión fueron transferidos a membranas de nylon (Hybond N, Amersham Pharmacia Biotech) mediante la técnica de Southern (1975) y siguiendo el protocolo descrito por Sambrook et al. (1989). La solución de transferencia fue SSC 10X y el ADN fue fijado a la membrana mediante un tratamiento de 3 minutos bajo luz UV e incubación a 80 °C por 2 horas.

La marcación de sondas, hibridación y detección fueron realizados empleando el método no radioactivo del *Dig Luminicent Detection Kit* (Boehringer-Mannheim), que incluye CSPD como sustrato quimioluminiscente. La marcación de las sondas se realizó por PCR en un volumen final de 100 µl conteniendo dig-dUTP 2,5 µM, 50 µM [dATP, dGTP, dCTP], 47,5 µM dTTP, 0,2 µM de cebadores superior e inferior M13, Taq polimerasa 1U (Promega), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, buffer de PCR 1X (Promega), glicerol 15 % y 10 ng de ADN plasmídico. La incorporación del nucleótido marcado se verificó por electroforesis en geles de agarosa al 1,5 %, mediante un retraso en la movilidad electroforética con respecto a los mismos fragmentos amplificados sin marcar. La concentración de las sondas se estimó por comparación de la intensidad de las bandas con un marcador de concentración conocida y por medición en fluorómetro (Qubit<sup>TM</sup>, Invitrogen). Las sondas utilizadas se diluyeron en solución de hibridación (SSC 5X, SDS 0,02 %, S-lauril sarcosina 0,1 %, reactivo de bloqueo 0,5 %, pH 7,5) hasta una concentración de 50 ng/ml.

Las membranas se pre-hibridaron durante 2 h y las hibridaciones se realizaron a

65 °C (homólogas) o a 60 °C (heterólogas) durante 18 h. Se lavaron dos veces durante 5 min con SSC 2x - SDS 0,1 % a temperatura ambiente y dos veces durante 15 min con SSC 0,25X - SDS 0,1% a 60-65 °C con fuerte agitación. La sensibilidad del experimento o control de hibridación se llevó a cabo empleando filtros conteniendo 1, 5, 50 y 100 pg del fragmento de ADN correspondiente a la sonda previamente desnaturalizado.

La detección de los fragmentos hibridados se realizó a temperatura ambiente, con agitación e incluyó: un lavado de 5 min en solución conteniendo ácido maleico 0,1M, NaCl 0,15M, Tween 20, pH 7,5, 30 min en solución de bloqueo (ácido maleico 0,1M, NaCl 0,15M, reactivo de bloqueo 1 %, pH 7,5, 30 min en solución de anticuerpo conjugado (*anti-Dig-AP* diluído 1:10.000), dos lavados de 15 min en la solución de lavado y 10 min en la solución de detección (Tris-HCl 0,1M pH 9,5, NaCl 0,1M, MgCl<sub>2</sub> 0,05M). La incubación de las membranas con el sustrato quimioluminiscente (CSPD) se realizó por 5 min en oscuridad y con agitación. Se incubaron 10 min a 37 °C (temperatura óptima de la fosfatasa alcalina) para aumentar la eficiencia de reacción y se expusieron a placas radiográficas X-Omat (Kodak) por 2-24 h. Finalmente, las placas expuestas fueron reveladas en cuarto oscuro con soluciones comerciales de revelador y fijador hasta la aparición de bandas.

Se utilizaron sondas homólogas de *P. notatum* generadas a partir de marcadores de AFLP 100 % ligados a la aposporía y una sonda heteróloga de arroz (C1069) del New Landmarker Set del *Rice Genome Research Program* de Japón (Nagamura et al. 1997). En estudios previos se determinó que esta sonda generaba fragmentos completamente ligados al locus de la aposporía *P. notatum* y *P. simplex* (Pupilli et al. 2001, Martínez et al. 2003).

### III.3.3 AFLP (“*Amplified fragment length polymorphism*”)

Los marcadores de AFLP se generaron según la técnica descrita por Vos et al. (1995) con las siguientes modificaciones: se digirieron 600 ng de ADN genómico de cada individuo con 5 U de *MseI* y *EcoRI* en un volumen final de 40 µl conteniendo buffer OPA 1X (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, acetato de magnesio 10 mM, acetato de potasio 50 mM), DTT 5mM y BSA 50 ng/µl, a 37 °C durante 2 h. Luego de la digestión se agregaron a cada tubo 10 µl de una mezcla conteniendo: 5 pmoles de adaptador *EcoRI*, 50 pmoles de adaptador *MseI* (Key Gene) (Anexo A), 1U de ADN ligasa T4 (promega), ATP 1 mM, buffer OPA 1X, DTT 5mM y BSA 50 ng/µl. La ligación de los adaptadores se realizó a 37 °C por 3 h. La pre-amplificación de las muestras se realizó en un volumen final de 25 µl conteniendo 2 µl de la mezcla de ligación, 1,2 ng/µl de cada cebador conteniendo una base selectiva en el extremo 3' (*EcoRI*+A y *MseI*+A) (Key Gene) (Anexo A), dNTPs 0,2 mM, Taq polimerasa 1U (Promega), MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM y buffer de PCR 1X (Promega). Las reacciones de amplificación incluyeron una etapa de desnaturalización inicial de 30 s a 94 °C seguida de 20 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 60 °C, 1 min a 72 °C y 5 min finales de elongación a 72 °C. Los productos de PCR se diluyeron 1/10 en un buffer compuesto por Tris-HCl 10 mM pH 8,0 y EDTA 0,1 mM [solución de trabajo de ADN pre-amplificado (pre-AFLP WS)]. Las amplificaciones selectivas se realizaron utilizando diferentes combinaciones de cebadores *EcoRI* - *MseI*, en un volumen final de 10 µl conteniendo 2 µl de pre-AFLP WS, 1,2 ng/µl de cada cebador *EcoRI* +3 y *MseI* +3 (Anexo A), dNTPS 0,2 mM, Taq polimerasa 0,5 U (Promega), MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM y buffer de PCR 1X (Promega). Las condiciones de amplificación incluyeron una desnaturalización inicial de 30 s a 94 °C, un ciclo de 30 s a 94 °C, 30 s a 65 °C, 1 min a 72 °C, seguido de 12 ciclos iguales donde la temperatura de anillado fue disminuyendo 0,7 °C por ciclo hasta llegar a 56 °C y 22 ciclos finales de

30 s a 94 °C, 30 s a 56 °C, 1 min a 72 °C con una elongación de 5 min a 72 °C. Los productos de PCR fueron suplementados con 5 µl de buffer de siembra (formamida 95 % p/v, NaOH 10 mM y azul de bromofenol 2 mg/ml), denaturalizados a 96 °C por 5 min y sembrados en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 5% (acrilamida:bisacrilamida (19:1) 5 %, TBE 0,5X, urea 7,5 M). La electroforesis se realizó empleando un equipo de secuenciación Gibco-BRL modelo S2, USA a 60 W por 2:30 h (1 h de pre-corrída y 1:30 h de corrída) usando buffers TBE 0,5X y 1X (pH 8,0) en los reservorios superior e inferior, respectivamente. Los geles se revelaron con nitrato de plata siguiendo el mismo protocolo utilizado en los experimentos de MSAP (III.3.1).

#### **III.3.4 Desarrollo de marcadores de secuencias caracterizadas (SCAR)**

Fragmentos de AFLP (I3, M3, J7, J5, U16, U14 y C5) asociados al modo de reproducción obtenidos previamente (Martínez et al. 2003, Stein et al. 2004, Stein et al. 2007) fueron utilizados para el desarrollo de marcadores específicos de la región responsable de la aposporía. Para ello se reprodujo la reacción de amplificación a partir del ADN de los progenitores Q4117 (apomítico) y Q4188 (sexual) mediante la utilización de los cebadores correspondientes. Los fragmentos del tamaño esperado fueron eluidos del gel (acetato de sodio 0,5 M, EDTA 1 mM pH 8,0) y re-amplificados con sus respectivos cebadores específicos. Los productos fueron clonados en un vector pGEM-Teasy (Promega, USA) y utilizados para transformar *E. coli* DH5a. Diez colonias de cada transformación fueron sometidas a una reacción de PCR (“colony PCR”) de manera de verificar la presencia del inserto según lo descrito por Sambrook et al. (1989). A partir del cultivo de las colonias que mostraban una reacción de amplificación positiva se realizaron las preparaciones de plásmido utilizando el *Wizard Plus Minipreps DNA Purification System* (Promega, USA). Los plásmidos purificados

fueron secuenciados por Macrogen Inc., Corea.

Los alineamientos de las secuencias obtenidas con cada uno de los fragmentos de AFLP se realizaron con el programa de acceso público ClustalX (<http://innprot.weizmann.ac.il/software/ClustalX.html>). Para cada secuencia consenso se diseñaron dos cebadores con el programa público Primer3 ([http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3\\_www.cgi](http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi)). Cada par de cebadores fue diseñado conservando el sitio flanqueante al corte con las enzimas de restricción y al menos 20 nucleótidos de la secuencia. La amplificación de los ADN genómicos con los cebadores SCAR inicialmente se llevó a cabo mediante una PCR estándar que consistió en 35 ciclos de 30 seg a 94 °C , 40 seg a 56 °C y 1 min a 70 °C. Para cada par de cebadores específicos se llevó a cabo la optimización de las condiciones de amplificación empleando distintas temperaturas de anillado (46 a 57 °C) y reacciones del tipo “*Touchdown*” (Don et al. 1991). Los productos amplificados fueron analizados por electroforesis en agarosa 2 % y en acrilamida 5 %, teñidos con EtBr y AgNO<sub>3</sub>, respectivamente.

#### **III.4 Clonado y secuenciación de fragmentos de interés**

Las bandas de interés correspondientes a los marcadores de AFLP ligados al carácter, los marcadores tipo SCAR y las pertenecientes a la validación de la extensión por caminata cromosomal (ver mas adelante), fueron cortadas del gel cuidadosamente con un bisturí. Luego de la trituración sobre un portaobjeto fueron eluidas con 50 µl de buffer de elusión (acetato de amonio 0,5 M; EDTA 1 mM pH 8,0) por 16 h a 37 °C (Sambrook et al. 1989). El ADN obtenido en el sobrenadante (recuperado después de una centrifugación a 12.000 rpm durante 20 min) fue precipitado con 2,5 volúmenes de etanol absoluto y 5 % v/v de NaCl 5 M. Finalmente el ADN fue lavado de 5 min con etanol 70 %, secado en estufa a 37 °C por una hora y disuelto en 15 µl de agua ultra



pura estéril.

Cada fragmento de interés fue amplificado por PCR utilizando los cebadores y las condiciones de amplificación específicas de cada uno. La reacción de ligación con el vector comercial pGEM-T Easy (Promega) se realizó durante 16 h a 4 °C. Las mismas se realizaron en un volumen final de 5 µl conteniendo 2,5 µl del buffer de ligación (2X), 0,5 µl del vector pGEM-T Easy (50 ng) y 0,5 µl de Ligasa T4 (3 W U/ µl), la cantidad correspondiente (1-5 µl) de cada producto de amplificación dependiendo del tamaño y la concentración de los mismos. Dichas cantidades fueron calculadas según el procedimiento de optimización descrito en el manual del usuario (<http://www.promega.com/tbs/tm042/tm042.pdf>, Sección 6.C). La transformación de células *E. coli* DH5-*a* fue realizada agregando los 5 µl de mezcla de ligación a un tubo conteniendo 100 µl de células competentes. Se incubó en hielo por 10 min y posteriormente las células fueron sometidas a un shock térmico 45 seg a 42 °C. Luego fueron mantenidas en hielo por 5 min e incubadas con agitación a 37 °C por 1 h con 500 µl de medio LB (peptona de carne 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l y NaCl 10 g/l pH 7,5). Se concentraron las células por centrifugación a 5000 rpm durante 5 min y el sedimento fue sembrado en placas de LB agar (15 g/l)- ampicilina (100 µg/ml) - X-Gal (40 µg/ml) y se incubaron a 37 °C por 24 h. Fueron incluidos dos controles negativos en los que se sembraron las células competentes sin transformar en medio sin antibiótico (control de células) y en medio con antibiótico (control de selección). Como control positivo de transformación se empleó un vector de tipo pGEM-T conteniendo un inserto de tamaño conocido. La identificación de colonias conteniendo los plásmidos con los insertos de interés se realizó mediante la técnica de “Colony PCR” (Sambrook et al. 1989) con los cebadores específicos o con los cebadores M13 “*forward*” y “*reverse*” ubicados en las posiciones 2949-2972 y 176-197 respectivamente, y que flanquean al

sitio de múltiple clonado (10-128) del vector, adicionando así un total de ~260 pb a los fragmentos clonados. Cada colonia fue disuelta en 10 µl de agua ultra pura estéril, calentada durante 10 min a 95 °C y dejada enfriar lentamente. Como molde de las reacciones de amplificación se utilizaron 2 µl de cada preparación. Los productos de amplificación fueron resueltos en geles de agarosa al 1,5 %. Las colonias de interés fueron aisladas de la placa y cultivadas en 5 ml de medio LB/ampicilina (100 µg/ml) por 24 h con agitación en un baño termostatzado a 37 °C. La purificación de ADN plasmídico se realizó mediante el juego de reactivos comercial “*Wizard Plus Minipreps*” (Promega) siguiendo con las recomendaciones de los fabricantes. Finalmente, luego de determinar la concentración de las preparaciones de plásmido en un fluorómetro Qubit<sup>TM</sup> (Invitrogen), al menos tres clones obtenidos a partir de cada una de las transformaciones fueron secuenciados por MacroGen Inc., Corea.

### **III.5 Búsqueda de homología de Secuencias**

El análisis de las secuencias se llevó a cabo con los marcadores que presentaban al menos un 95 % de homología entre 2-3 clones del mismo inserto. En primer lugar se eliminaron las secuencias del vector de clonado utilizando el programa VecScreen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>) de la base NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). La homología entre los distintos clones de cada fragmento se determinó a través de la opción especializada *bl2seq* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) del mismo centro y mediante el programa *Sequencher* 3.1.1 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI) que permite el ensamblado secuencias de DNA. Este programa además, elimina de forma automática las regiones de menor calidad de cada secuencia, así como las regiones correspondientes al vector. Después de realizar el ensamblaje de los diversos clones, se generó una secuencia consenso de cada fragmento.

Los análisis comparativos contra las distintas bases de datos se llevaron a cabo mediante el algoritmo BLAST (“Basic Local Alignment Search Tool”) (Altschul et al. 1990). La primera base de datos utilizada fue la de nucleótidos del NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) con la opción *blastn* para realizar la comparación entre secuencias de ADN similares. Por otro lado se utilizaron bases de datos de genomas específicos: Gramene ([www.gramene.org](http://www.gramene.org)) que es una base comparativa sobre cereales centrada en arroz y TIGR (“The Institute for Genomic Research”) (<http://www.tigr.org/tdb/e2k1/ath1/>) derivada del proyecto genoma de *A. thaliana*.

### **III.6 Validación de marcadores moleculares extendidos por caminata cromosomal**

Con el objetivo de aislar regiones genómicas adyacentes a los marcadores moleculares de AFLP que resultaron completamente ligados al carácter aposporía en *P. notatum* se desarrolló en el laboratorio una estrategia de caminata cromosomal basada en el protocolo “Genome Walker™ Universal Kit” (Clontech Laboratories, Inc.) (Silvina Felitti, comunicación personal). Brevemente, el ADN genómico del genotipo parental apomítico (Q4117) fue digerido (total y parcialmente) con tres enzimas de restricción (*EcoRV*, *DraI*, *PvuII*). Posteriormente los productos de digestión fueron ligados a los adaptadores correspondientes de manera de obtener 6 bibliotecas no clonadas. Las mismas fueron utilizadas como molde en reacciones de amplificación, utilizando cebadores complementarios a los adaptadores y al fragmento específico identificado previamente. Los fragmentos amplificados a partir del adaptador 5´(o 3´) que se extendía hacia el ADN genómico adyacente desconocido 3´ (o 5´, respectivamente) fueron clonados y secuenciados. Basándose en la información de la secuencia se diseñaron nuevos cebadores de manera de poder revelar polimorfismos entre individuos sexuales y apomíticos. Luego, para cada par de cebadores se llevó a cabo la

optimización de las condiciones de amplificación y se verificó su co-segregación con la región que controla la aposporia mediante el uso de una muestra de entre 45 y 65 individuos de la población de mapeo segregante por el modo de reproducción descrita previamente.

## IV RESULTADOS

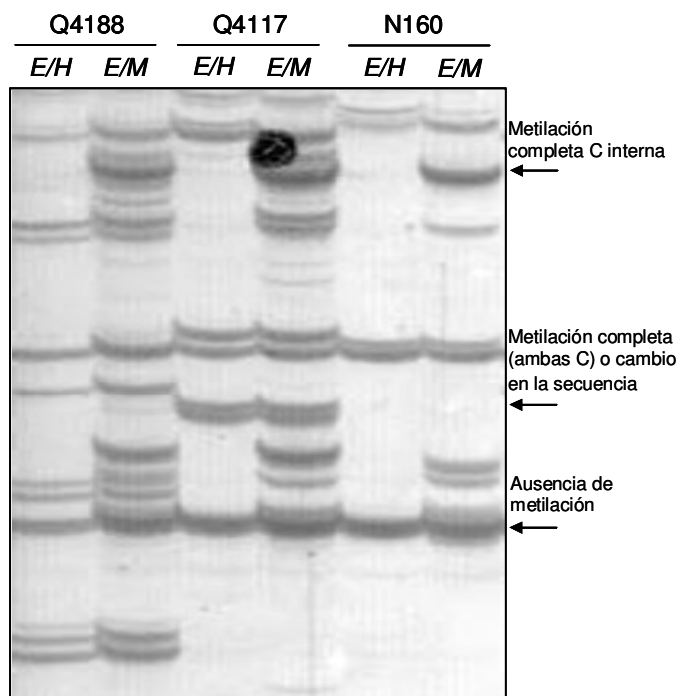
### IV.1 Estudio global de la metilación de citosinas en el genoma de *Paspalum notatum*

#### IV.1.1 Estimación de las proporciones relativas de secuencias CCGG metiladas en citotipos diploides y tetraploides de *P. notatum*.

Con el objetivo general de determinar el nivel o grado de metilación en el genoma de *P. notatum* se realizó una estimación de las proporciones relativas de secuencias CCGG metiladas en 4 genotipos diploides (Tifton 9, Q4175, 3-Cay y 6-Cay) y 4 genotipos tetraploides (Q4188, Q4117, N160 y Q4205) de la especie mediante la utilización de marcadores moleculares de tipo MSAP (Xiong et al. 1999). El ADN de cada muestra fue digerido con los pares de enzimas *EcoRI/HpaII* y *EcoRI/MspI* y los fragmentos generados fueron ligados a adaptadores específicos. Los marcadores MSAP fueron generados utilizando 15 y 14 combinaciones cebadores selectivos para el grupo diploide y tetraploide respectivamente.

A partir de la comparación de los patrones de amplificación generados por cada muestra entre ambas digestiones se determinó el nivel de metilación de citosinas para cada uno de los genotipos utilizados. Para una dada muestra, los fragmentos provenientes de la digestión *EcoRI/HpaII* que se ubicaron en la misma posición que aquellos generados por la digestión con *EcoRI/MspI* fueron considerados marcadores provenientes de sitios CCGG no metilados, situación en la que ninguna de las enzimas se encontraba inhibida (patrón 11). Cuando para una determinada muestra se observaron bandas presentes en la digestión con *EcoRI/HpaII* y ausentes en *EcoRI/MspI* (patrón 10) fueron consideradas como originadas por la hemi-metilación de citosina externa del sitio de reconocimiento, mientras que las bandas ausentes en *EcoRI/HpaII* y presentes

en la digestión con *EcoRI/MspI* (patrón 01) fueron consideradas como provenientes de la metilación (completa) de la citosina interna (Figura 3). El número total de marcadores analizados en los genotipos diploides y tetraploides, y la proporción de secuencias CCGG metiladas en cada uno se muestran en la Tabla 2.



**Figura 3.** Patrones de metilación obtenidos a partir de la técnica de MSAP. *E/H*: Muestra digerida con el par de enzimas *EcoRI/HpaII*. *E/M*: Muestra digerida con el par de enzimas *EcoRI/MspI*

En todos los genotipos analizados los polimorfismos producidos por la metilación de la citosina interna (bandas presentes solo en *EcoRI/MspI*) fueron los más abundantes. En los citotipos diploides, en promedio un 41,4 % de los marcadores (cuyo rango de variación se ubicó entre 40,0 y 42,4 %, DS = 1,14 %) revelaron sitios metilados. De la misma manera, el porcentaje promedio de sitios metilados en los tetraploides fue de 34,0 %, con un máximo de 41,2 % (Q4205) y un mínimo de 30,9 % (N160) (DS = 4,86 %). Cuando se analizó el número total de sitios metilados y no metilados en los grupos diploide y tetraploide por medio de la prueba de Ji-cuadrado, se

observaron diferencias significativas ( $\chi^2 = 18,58$ ,  $P < 0,0001$ ) entre ambos niveles de ploidía.

**Tabla 2.** Proporciones relativas y porcentajes de secuencias CCGG metiladas en accesiones diploides y tetraploides de *P. notatum*

Genotipo	Bandas Totales	Sitios CCGG no metilados	Sitios CCGG metilados		Total
			Sitios hemi-metilados	Sitios full-metilados	
			(C externa)	(C interna)	
<i>Tifton 9</i>	373	215 (57,6%)	6 (1,6%)	152 (40,8%)	158 (42,4%)
<i>Q4175</i>	380	228 (60,0%)	8 (2,1%)	144 (37,9%)	152 (40,0%)
<i>3-Cay</i>	363	214 (59,0%)	12 (3,3%)	137 (37,7%)	149 (41,0%)
<i>6-Cay</i>	333	192 (57,7%)	11 (3,3%)	130 (39,0%)	141 (42,3%)
<i>Q4188</i>	408	280 (68,6%)	7 (1,7%)	121 (29,7%)	128 (31,4%)
<i>Q4117</i>	377	255 (67,6%)	12 (3,2%)	110 (29,2%)	122 (32,4%)
<i>N160</i>	278	192 (69,1%)	6 (2,2%)	80 (28,8%)	86 (30,9%)
<i>Q4205</i>	255	150 (58,8%)	9 (3,5%)	96 (37,6%)	105 (41,2%)

#### IV.1.2 Variación en los patrones de metilación de citosinas en los citotipos diploides y tetraploides.

Con el fin de estudiar la similitud en cuanto a la metilación de citosinas dentro de cada grupo analizado (diploide y tetraploide), los datos derivados de los experimentos de MSAP fueron utilizados para construir matrices de polimorfismos sensibles a metilación (MSP). Dichas matrices fueron generadas a partir de los marcadores que mostraron diferencias en el patrón de amplificación para una dada muestra digerida con *EcoRI/HpaII* y *EcoRI/MspI*. En este tipo de polimorfismo los dos principales estado de metilación, hemi-metilación de la citosina externa y metilación completa de la citosina interna, observados como patrones 01 y 10 respectivamente, fueron codificados de la misma manera (1). Por lo que los sitios que presentaban

diferente tipo de metilación entre los genotipos fueron considerados como idénticos. Cuando no se detectó polimorfismo entre los productos *EcoRI/HpaII* y *EcoRI/MspI* para una dada muestra, ya sea por la amplificación en ambas o la no amplificación de un dado fragmento, se codificó con cero (0). En la Figura 4 se muestran ejemplos de posibles patrones de amplificación en 3 muestras hipotéticas y la codificación de los marcadores MSP.

<i>Genotipo 1</i>		<i>Genotipo 2</i>		<i>Genotipo 3</i>		Codificación MSP		
<i>EcoRI/HpaII</i>	<i>EcoRI/MspI</i>	<i>EcoRI/HpaII</i>	<i>EcoRI/MspI</i>	<i>EcoRI/HpaII</i>	<i>EcoRI/MspI</i>	<i>Genotipo 1</i>	<i>Genotipo 2</i>	<i>Genotipo 3</i>
—	—	—		—	—	0	1	0
	—	—	—			1	0	0
	—				—	1	0	1

**Figura 4.** Esquema de patrón de bandas y codificación de los marcadores MSP (sensibles a metilación)

Se utilizaron 200 y 186 marcadores del tipo MSAP para la construcción de la matriz MSP diploide y tetraploide, respectivamente. La estimación de la similitud entre las muestras se calculó empleando el coeficiente de *Jaccard* (Jaccard 1908) (ver Materiales y Métodos).

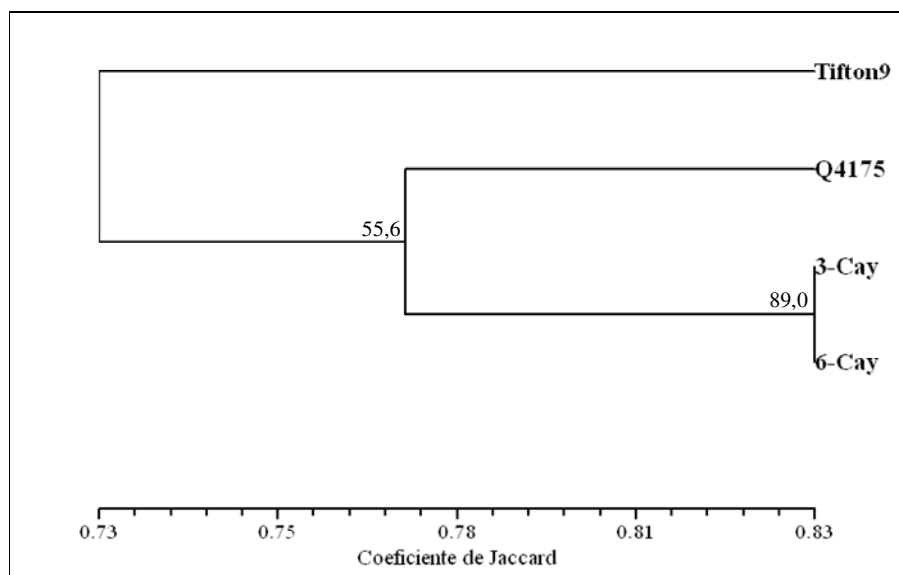
En el grupo diploide, los coeficientes de similitud basados en los polimorfismos sensibles a metilación variaron entre 0,70 y 0,83, con un valor promedio de 0,76 (DS = 0,05) (Tabla 3). El dendrograma generado mostró que los dos genotipos más similares fueron 3-Cay y 6-Cay ( $J = 0,833$ ) (Figura 5). Los mismos provienen de la misma población natural y el agrupamiento resultó muy confiable ya que dicho nodo presentó un valor elevado de bootstrap (89 %). El genotipo Q4175, colectado en una población



natural del centro de Argentina ubicada a 150 Km de la población de 3-Cay y 6-Cay, agrupa con estos genotipos conformando un cluster con un moderado valor de bootstrap (55,6 %). Por otro lado, Tifton 9, proveniente de una selección en EEUU se presenta aislado de este grupo, indicando que posee un patrón de metilación de citosinas diferente al resto de los diploides.

**Tabla 3.** Matriz de similitud de MSP (Índice de Jaccard) entre los 4 genotipos diploides de *P. notatum*.

	Tifton 9	Q4175	3-Cay	6-Cay
Tifton 9	1,000			
Q4175	0,769	1,000		
3-Cay	0,710	0,754	1,000	
6-Cay	0,699	0,789	0,833	1,000



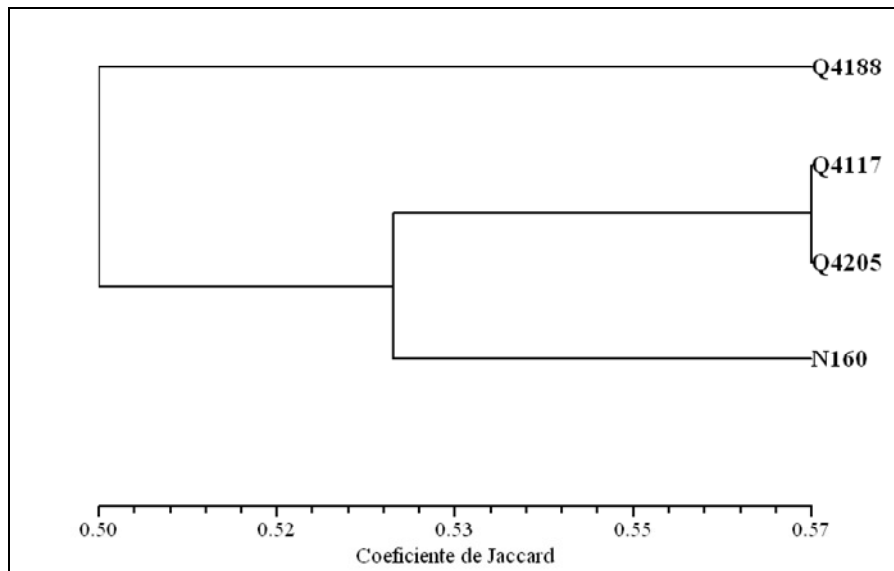
**Figura 5.** Dendrograma generado a partir de los polimorfismos sensibles a metilación (MSPs) dentro del grupo diploide de *P. notatum*.

Un análisis similar se llevó a cabo con los genotipos pertenecientes al grupo tetraploide, en donde el coeficiente de similitud promedio fue de 0,52 ( $S = 0,04$ ) (Tabla 4). Los genotipos más relacionados fueron Q4117 y Q4205 ( $J = 0,566$ ), mientras que los más distantes resultaron N160 y Q4188 ( $J = 0,463$ ). A partir del análisis de

agrupamiento por el método de UPGMA se observó un grupo conformado por los genotipos Q4117, Q4205 y N160 (Figura 6). Sin embargo, dichos clusters no pudieron ser validados a través del procedimiento bootstrap ya que presentaron valores de probabilidades menores al 50 % y por lo que no fueron incluidos en el dendrograma. Los nodos que no se repitieron con al menos la frecuencia establecida como límite (50 %) se consideraron posiblemente aleatorios y no como una consecuencia de la asociación entre las variables observadas.

**Tabla 4.** Matriz de similitud de MSP (Índice de Jaccard) entre los 4 genotipos tetraploides de *P. notatum*.

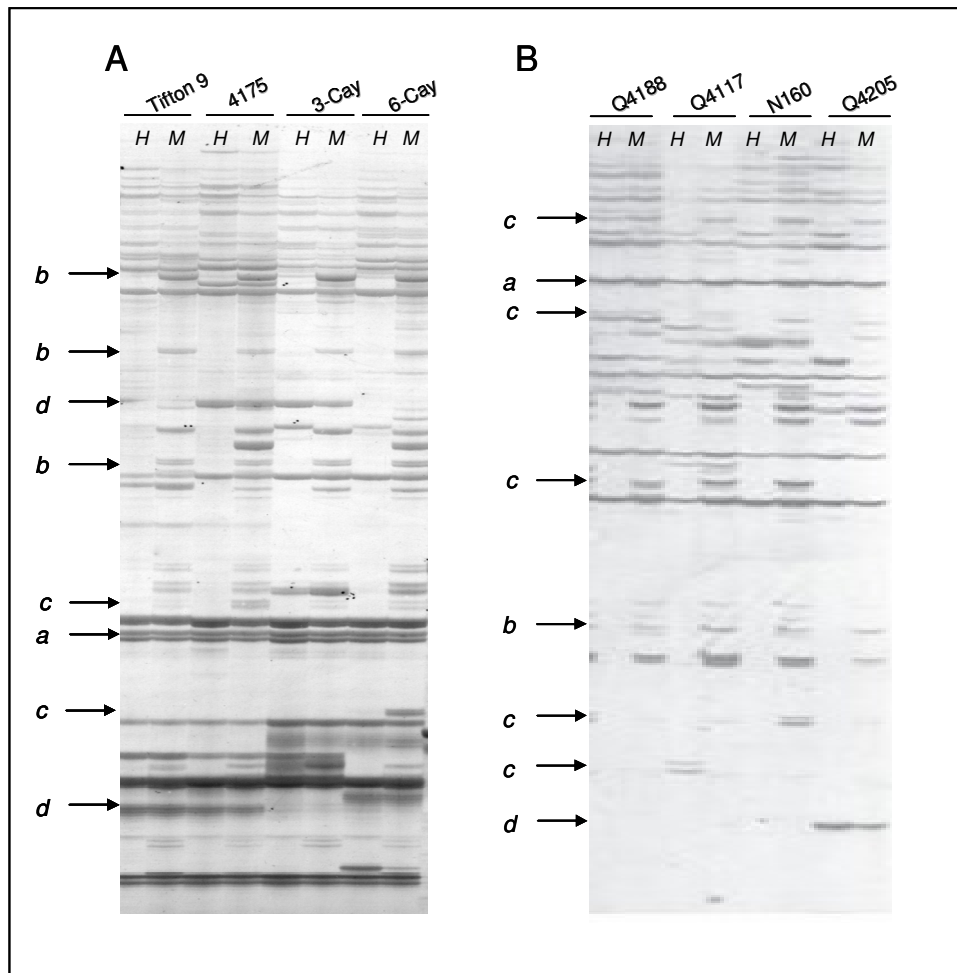
	<b>Q4188</b>	<b>Q4117</b>	<b>N160</b>	<b>Q4205</b>
<b>Q4188</b>	1,000			
<b>Q4117</b>	0,503	1,000		
<b>N160</b>	0,463	0,558	1,000	
<b>Q4205</b>	0,543	0,566	0,500	1,000



**Figura 6.** Dendrograma generado a partir de los polimorfismos sensibles a metilación (MSPs) dentro del grupo tetraploide de *P. notatum*.

Por otro lado, el promedio de las similitudes entre genotipos derivadas de los MSP en los grupos diploide y tetraploide resultaron significativamente diferentes ( $t = 9,06$ ,  $p = 3,9 \times 10^{-6}$ ). La menor similitud epigenética promedio y la ausencia de

agrupamientos confiables dentro del grupo tetraploide indicaría que el mismo es más variable en cuanto a los patrones de metilación de citosinas que el grupo diploide.



**Figura 7.** Marcadores MSAP de los 4 genotipos diploides (A) y 4 genotipos tetraploides (B) de *P. notatum*. Los patrones de amplificación fueron generados con la combinación de cebadores específicos *EcoRI* + AAG/*HpaII-MspI* +AGC (A) y *EcoRI* + AAT/*HpaII-MspI* +AGC (B). Las flechas indican marcadores correspondientes a: a) sitios CCGG no metilados monomórficos entre muestras, b) y c) sitios CCGG metilados (MSP) monomórficos y polimórficos entre muestras, respectivamente y d) sitios CCGG polimórficos insensibles a metilación (MIP). H = muestra digerida con el par de enzimas *EcoRI/HpaII*, M = muestra digerida con *EcoRI/MspI*

A partir del análisis de 159 marcadores MSP comunes a los genotipos diploides y tetraploides (Figura 13) obtenidos con 10 combinaciones de cebadores selectivos, se

observó que 30 (18,9 %) de estos variaban su estado de metilación con el cambio del nivel de ploidía (Tabla 5). Veintitrés marcadores que mostraron un patrón de metilación idéntico en los 4 genotipos diploides cambiaron su estado de metilación en al menos uno de los genotipos tetraploides. Por otra parte, 7 marcadores MSP con el mismo patrón de metilación en los tetraploides modificaron su patrón en al menos uno de los diploides (Tabla 5).

**Tabla 5.** Patrones y numero de marcadores MSP comunes a los grupos diploide y tetraploide de *P. notatum* que modificaron su estado de metilación con el nivel de ploidía.

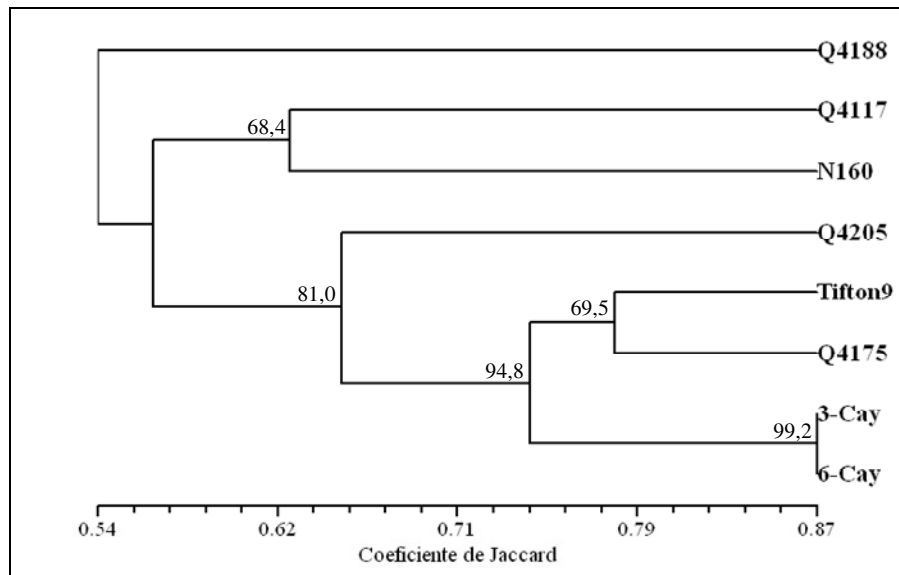
Tifton9	Genotipos diploides			Genotipos tetraploides				Nro. de marcadores
	Q4175	3-Cay	6-Cay	Q4188	Q4117	N160	Q4205	
1	1	1	1	1	0	1	1	4
1	1	1	1	1	0	0	1	3
1	1	1	1	0	1	1	1	3
1	1	1	1	0	1	0	1	5
1	1	1	1	1	0	1	1	4
1	1	1	1	1	0	1	0	1
1	1	1	1	0	1	1	0	1
1	1	1	1	0	0	0	1	1
1	1	1	1	0	1	0	0	1
1	1	0	0	1	1	1	1	3
1	1	0	1	1	1	1	1	1
0	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	1	1	1	1	1
0	0	1	0	1	1	1	1	1
Total								30

El análisis de agrupamiento basado en la similitud epigenética entre pares de genotipos (Tabla 6) obtenida a partir de estos 159 marcadores comunes mostró a todos los genotipos diploides y la planta tetraploide Q4205 conformando un grupo, mientras que el resto de los genotipos tetraploides no conformaron un grupo definido y significativo (Figura 8). Este resultado indicaría que los citotipos diploides y Q4205 compartirían un perfil de metilación de citosinas característico a pesar de la diferencia

en el nivel de ploidía y que el resto de los individuos tetraploides presentarían una estructura de metilación inespecífica. El análisis de bootstrap permitió validar el dendrograma formado y confirmó la asociación entre la estructura epigenética de los genotipos diploides y Q4205.

**Tabla 6.** Matriz de similitud de MSP (Índice de Jaccard) entre todos los genotipos de *P. notatum*.

	Q4188	Q4117	N160	Q4205	Tifton 9	Q4175	3-Cay	6-Cay
<b>Q4188</b>	1,000							
<b>Q4117</b>	0,524	1,000						
<b>N160</b>	0,536	0,628	1,000					
<b>Q4205</b>	0,590	0,600	0,526	1,000				
<b>Tifton9</b>	0,520	0,583	0,532	0,681	1,000			
<b>Q4175</b>	0,500	0,565	0,534	0,626	0,779	1,000		
<b>3-Cay</b>	0,555	0,609	0,527	0,664	0,718	0,743	1,000	
<b>6-Cay</b>	0,543	0,622	0,543	0,637	0,739	0,759	0,873	1,000



**Figura 8.** Dendrograma obtenido a partir de los Polimorfismos Sensibles a Metilación (MSPs) derivados de los citotipos diploides y tetraploides de *P. notatum*.

#### IV.1.3 Variación no-epigenética en los citotipos diploides y tetraploides

Con el objetivo de balancear la variación detectada a partir de la metilación de sitios CCGG con la variación no-epigenética existente en el grupo de genotipos

analizados, la información generada a partir de los Polimorfismos Insensibles a Metilación (MIP) fue utilizada de manera similar a lo descrito anteriormente. Dichas matrices fueron construidas con los marcadores que presentaban el mismo patrón de amplificación para una dada muestra digerida con *EcoRI/HpaII* y *EcoRI/MspI*, pero que diferían entre genotipos en cuanto a presencia/ausencia (Figura 9). Debido a que la ausencia de una banda de amplificación en ambas digestiones para un dado genotipo puede ser originada por la metilación completa del sitio blanco (CCGG) o por la ausencia del sitio (diferencias genéticas) se considera que el total de variación no-epigenética estimada por este método estará subestimada. Consecuentemente, por esta limitación, las estimaciones derivadas de este análisis deben ser consideradas como mínimos.

**Figura 9.** Esquema de patrón de bandas y codificación de los marcadores MIP (insensibles a metilación)

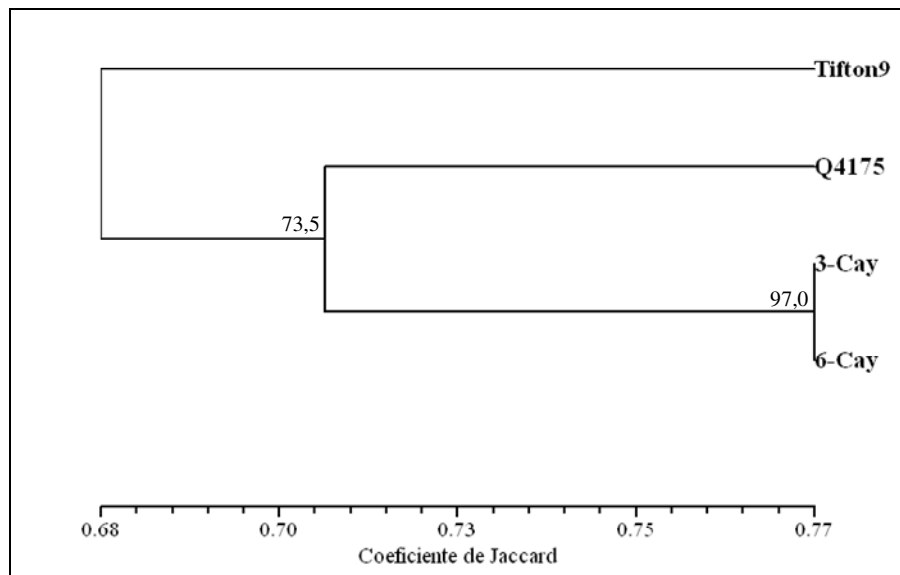
<i>Genotipo 1</i>		<i>Genotipo 2</i>		<i>Genotipo 3</i>		Codificación MIP		
<i>EcoRI/HpaII</i>	<i>EcoRI/MspI</i>	<i>EcoRI/HpaII</i>	<i>EcoRI/MspI</i>	<i>EcoRI/HpaII</i>	<i>EcoRI/MspI</i>	<i>Genotipo 1</i>	<i>Genotipo 2</i>	<i>Genotipo 3</i>
—	—			—	—	1	0	1
		—	—	—	—	0	1	1

A partir de 283 marcadores MIP del grupo diploide obtenidos mediante 15 combinaciones de cebadores selectivos se generó la matriz de similitud (Jaccard) y el dendrograma correspondiente (Tabla 7 y Figura 10). El coeficiente de similitud promedio dentro de grupo fue de 0,705 ( $S = 0,04$ ). Este valor coincide con el rango de similitud genética identificado previamente para un grupo de genotipos diploides de la especie por Daurelio et al. (2004). Los genotipos 3-Cay y 6-Cay fueron los mas

relacionados ( $J = 0,775$ ) lo que era de esperar ya que ambos derivan de la misma población natural. El dendrograma generado permitió la visualización de un grupo formado por 3-Cay, 6-Cay y Q4175, todos derivados del centro de Argentina, y el cultivar Tifton 9 proveniente de EEUU separado del mismo. Aunque el agrupamiento a partir de estos marcadores es similar al obtenido con los marcadores sensibles a metilación, en este caso el agrupamiento fue más robusto (73,5 % y 97 %).

**Tabla 7.** Matriz de similitud de MIP (Índice de Jaccard) entre los 4 genotipos diploides de *P. notatum*.

	<b>Tifton 9</b>	<b>Q4175</b>	<b>3-Cay</b>	<b>6-Cay</b>
<b>Tifton 9</b>	1,000			
<b>Q4175</b>	0,688	1,000		
<b>3-Cay</b>	0,683	0,709	1,000	
<b>6-Cay</b>	0,668	0,710	0,775	1,000



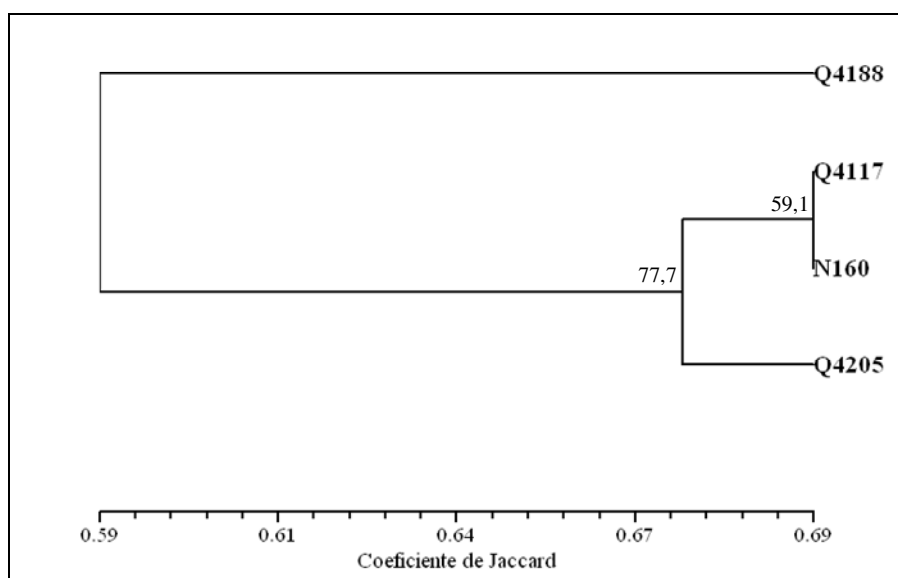
**Figura 10.** Dendrograma generado a partir de los polimorfismos insensibles a metilación (MIPs) dentro del grupo diploide de *P. notatum*.

Por otro lado, la similitud no-epigenética dentro del grupo tetraploide, estimada a partir de 332 marcadores MIPs reveló un coeficiente de similitud promedio de 0,630 ( $S = 0,06$ ) (Tabla 8). Este valor también coincidió con estimaciones previas acerca de las similitudes genéticas entre genotipos tetraploides de la especie que incluían los

genotipos utilizados en este trabajo (Espinoza et al. 2006). Con un apoyo moderado de bootstrap, los genotipos de reproducción apomítica (Q4117 y N160) conformaron un grupo que resulto asociado al genotipo Q4205 (Figura 11).

**Tabla 8.** Matriz de similitud de MIP (Índice de Jaccard) entre los 4 genotipos tetraploides de *P. notatum*.

	Q4188	Q4117	N160	Q4205
Q4188	1,000			
Q4117	0,572	1,000		
N160	0,540	0,692	1,000	
Q4205	0,648	0,674	0,672	1,000



**Figura 11.** Dendrograma generado a partir de los polimorfismos insensibles a metilación (MIPs) dentro del grupo tetraploide de *P. notatum*.

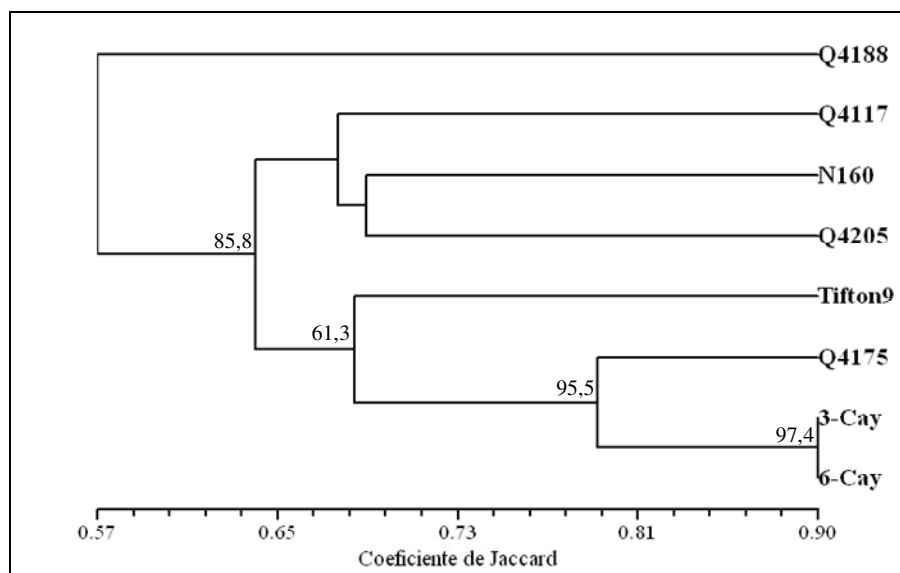
El análisis de 215 marcadores insensibles a metilación (MIPs) comunes a los genotipos diploides y tetraploides (Figura 13) mostró resultados similares a los obtenidos independientemente para cada grupo en lo que respecta a valores de coeficientes de similitud y agrupamientos. El dendrograma generado resultó en la formación de un grupo conteniendo a los 4 genotipos diploides, y el otro a 3 de los 4 genotipos tetraploides (Q4205, Q4117 y N160) (85,8 % de bootstrap) mientras que



Q4188 resultó separado de ambos (Tabla 9 y Figura 12).

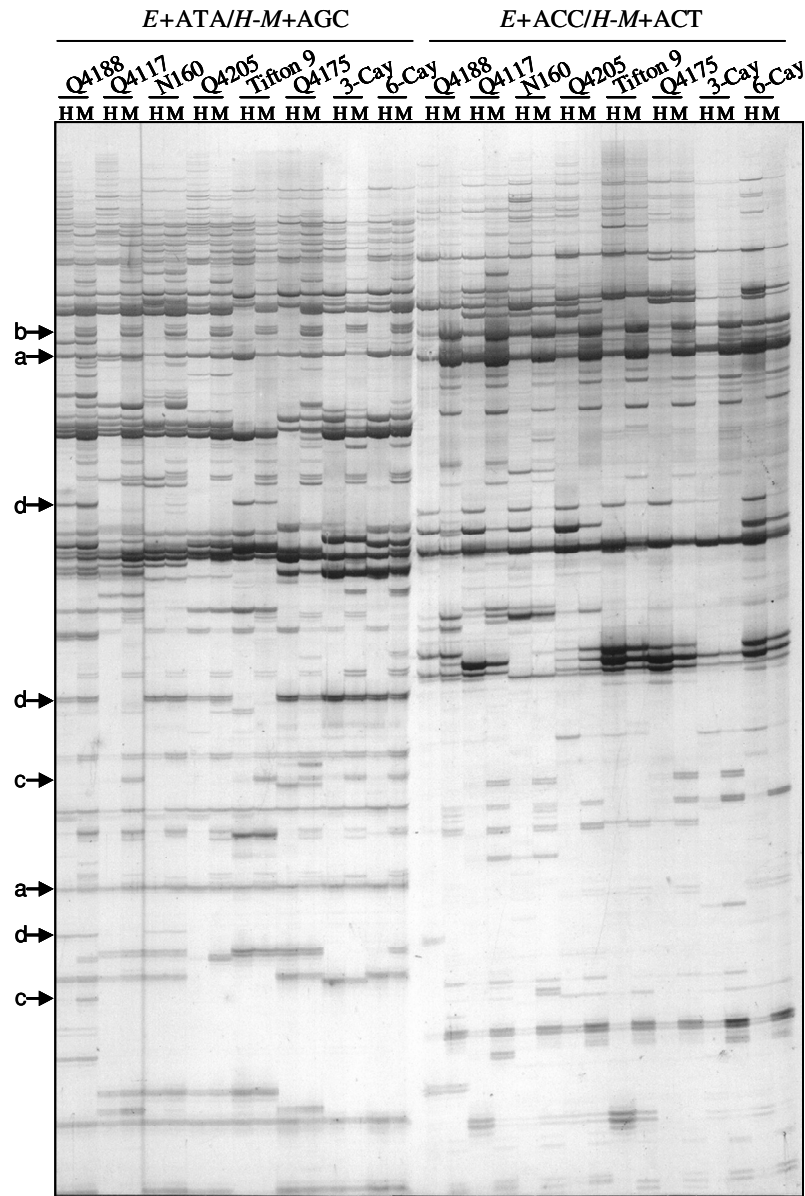
**Tabla 9.** Matriz de similitud de MIP (Índice de Jaccard) entre todos los genotipos de *P. notatum*.

	Q4188	Q4117	N160	Q4205	Tifton 9	Q4175	3-Cay	6-Cay
Q4188	1,000							
Q4117	0,572	1,000						
N160	0,507	0,681	1,000					
Q4205	0,648	0,671	0,689	1,000				
Tifton 9	0,524	0,628	0,594	0,656	1,000			
Q4175	0,536	0,587	0,606	0,641	0,659	1,000		
3-Cay	0,561	0,613	0,673	0,709	0,708	0,813	1,000	
6-Cay	0,613	0,605	0,639	0,706	0,684	0,778	0,897	1,000



**Figura 12.** Dendrograma obtenido a partir de los polimorfismos insensibles a metilación (MIPs) derivados de los citotipos diploides y tetraploides de *P. notatum*.

El agrupamiento entre Q4205, Q4117 y N160 no pudo ser validado mediante el análisis de aleatorización (bootstrap) ya que las probabilidades obtenidas fueron menores al 50 %. Sin embargo, este resultado demostró que el agrupamiento basado en marcadores MIP es capaz de diferenciar entre ambos niveles de ploidía, como se observó en trabajos anteriores de la especie llevados a cabo con marcadores de AFLP (Espinoza et al. 2006).

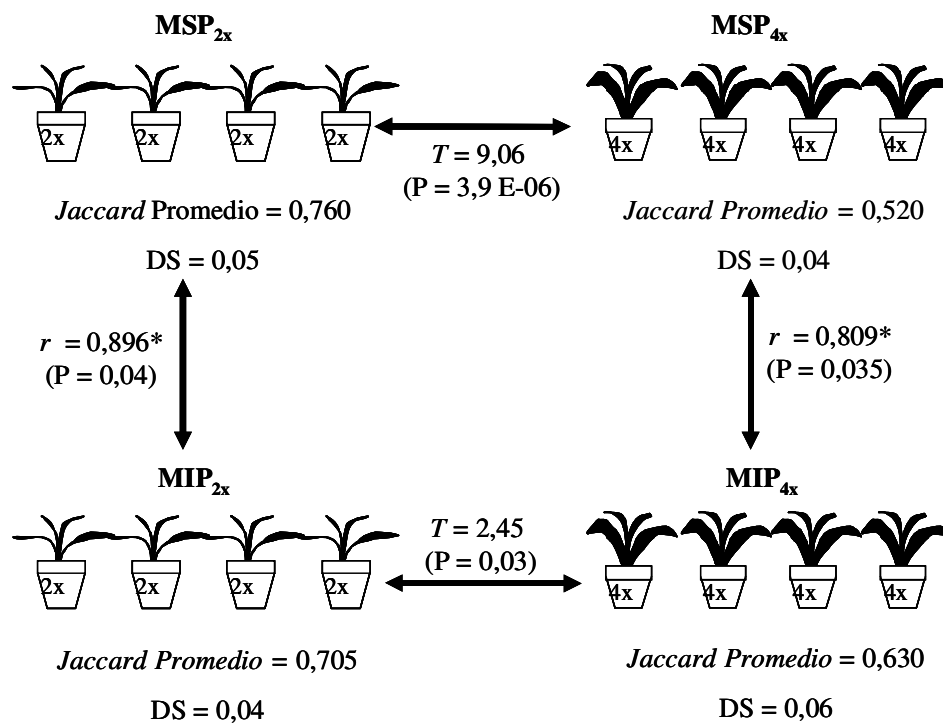


**Figura 13.** Marcadores MSAP generados en los 8 genotipos de *P. notatum* a partir de la combinación de cebadores específicos *EcoRI* + ATA /*HpaII-MspI* +AGC y *EcoRI* + ACC /*HpaII-MspI* +ACT. a y d marcadores insensibles a metilación (MIP), b y c marcadores sensibles a metilación. H = *EcoRI/HpaII*, M = *EcoRI/MspI*

#### IV.1.4 Correlación entre las variaciones sensibles e insensibles a metilación de los citotipos diploides y tetraploides

Para determinar si existe correlación entre la variación detectada a través de los polimorfismos sensibles a metilación y la variación no-epigenética determinadas

anteriormente para cada nivel de ploidía, las matrices de similitud MSP y MIP obtenidas para cada grupo fueron comparadas a través de la prueba de Mantel, mediante el programa NTSYSpc. El significado de las correlaciones fue evaluada con 1.000 permutaciones. Dentro de cada nivel de ploidía la comparación de la matriz de polimorfismos sensibles a metilación con la matriz de polimorfismos insensibles a metilación resultaron correlacionados significativamente ( $MSP_{S(2x)}$  vs.  $MIP_{S(2x)}$   $r = 0.896$ ,  $p = 0.04$  y  $MSP_{S(4x)}$  vs.  $MIP_{S(4x)}$   $r = 0.809$   $p = 0.035$ ) (Figura 14).



**Figura 14.** Valores de correlación ( $r$ ) entre matrices MSP vs. MIP y comparación de índices de similitud medios ( $T$ ) derivados de los polimorfismos sensibles e insensibles a metilación de los genotipos diploides y tetraploides de *P. notatum*.

#### IV.1.5 Evaluación de la metilación de citosinas como resultado de la tetraploidización en *P. notatum* mediante experimentos de MSAP

Con el objetivo de determinar la ocurrencia de cambios en los niveles y patrones de metilación como consecuencia del aumento en el nivel de ploidía en *P. notatum* se

analizaron mediante experimentos de MSAP los genotipos C4-2x (diploide) y su autotetraploide derivado C4-4x. Ambas plantas derivan del cultivo *in vitro* de una planta diploide en donde los callos obtenidos fueron tratados con colchicina. Secciones diploides y tetraploides de un mismo callo fueron seleccionadas por citometría de flujo y transferidas a un medio de regeneración donde se obtuvieron los genotipos C4-2x y C4-4x (Quarin et al. 2001) (Figura 1).

A partir del empleo de 17 combinaciones de cebadores selectivos de MSAP, se generaron un total de 889 marcadores. El análisis de los patrones de amplificación indicaron que el 25,25 % y el 23,50 % de los sitios detectados, correspondieron a secuencias CCGG metilados para el genotipo C4-2x y C4-4x respectivamente (Tabla 10). La comparación del total de bandas metiladas y no metiladas entre estos dos genotipos no mostró diferencias significativas ( $\chi^2 = 0,74$ ,  $P = 0,3894$ ). Sin embargo, cuando estos valores fueron incluidos en la comparación entre los sitios metilados previamente realizado sobre los genotipos diploides y tetraploides nuevamente se observará diferencias significativas entre ambos grupos ( $\chi^2 = 17,42$ ,  $P < 0,0001$ ).

**Tabla 10.** Proporciones relativas y porcentajes de secuencias CCGG metiladas en los genotipos C4-2x y C4-4x de *P. notatum*

Genotipo	Bandas Totales	Sitios CCGG no metilados	Sitios CCGG metilados		
			Sitios		Total
			Hemi-metilados (C externa)	Full-metilados (C interna)	
C4-2x	887	663 (74,75%)	53 (5,98%)	171 (19,28%)	224 (25,25%)
C4-4x	881	674 (76,50%)	41 (4,65%)	166 (18,84%)	207 (23,50%)

Los marcadores obtenidos fueron clasificados en 5 grupos diferentes (Tabla 11 y Figura 15).

**Tabla 11.** Patrones y frecuencias de la metilación de citosinas de sitios CCGG en el genotipo diploide C4-2x y autotetraploide derivado C4-4x, obtenidos mediante marcadores MSAP.

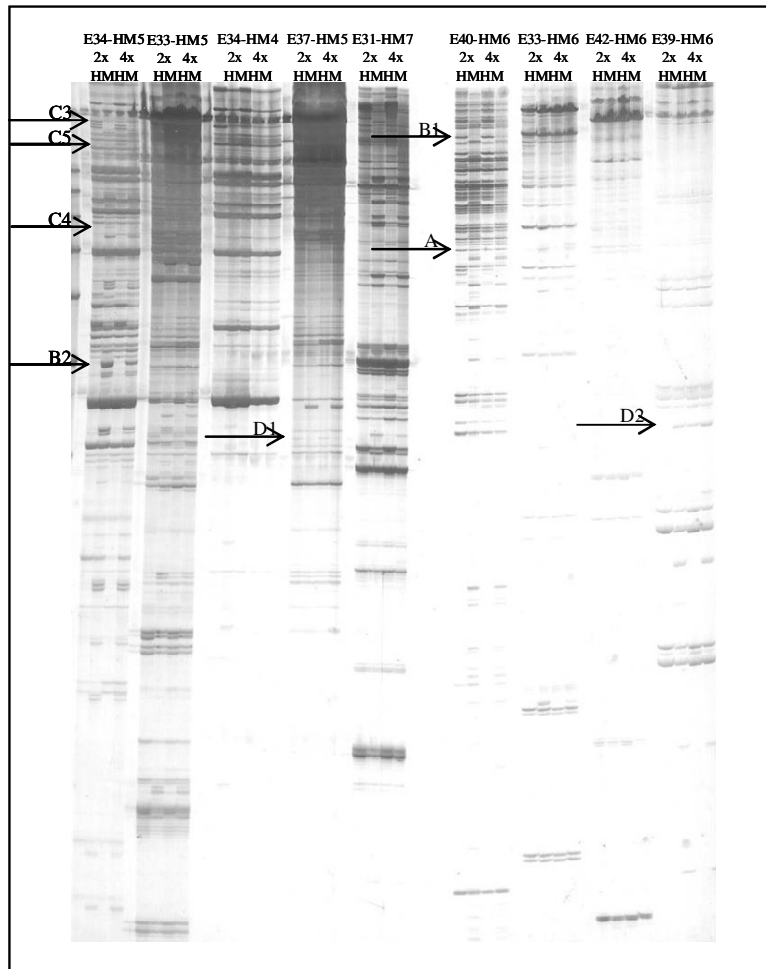
Clase	C4-2x		C4-4x		Numero de bandas	Bandas por clase	%
	<i>EcoRI/HpaII</i>	<i>EcoRI/MspI</i>	<i>EcoRI/HpaII</i>	<i>EcoRI/MspI</i>			
A	+	+	+	+	657	657	73,9
B1	+	-	+	-	39	202	22,7
B2	-	+	-	+	163		
C1	+	+	-	-	1	10	1,1
C2	-	-	+	+	2		
C3	+	-	-	-	3		
C4	-	+	-	-	4		
C5	-	-	+	-	0		
C6	-	-	-	+	0		
D1	+	-	+	+	11	15	1,7
D2	-	+	+	+	4		
H1	+	+	+	-	2	5	0,6
H2	+	+	-	+	3		

“+”presencia de banda, “-”ausencia de banda

La mayoría de los marcadores evaluados (73,9 %) correspondieron a fragmentos que mostraron un patrón monomórfico (bandas presentes en ambas digestiones) entre ambos genotipos (Clase A). Este tipo de bandas representa sitios CCGG no metilados que no sufrieron alteraciones luego de la tetraploidización. Por otro lado se detectaron marcadores correspondientes a secuencias metiladas (Clase B), hemi-metiladas en la citosina externa (B1) o completamente metiladas en la citosina interna (B2), que permanecieron invariables luego de la tetraploidización. Esta clase representó un 23 % del total de marcadores evaluados. La Clase C representa a todos los marcadores que presentaron variaciones asociadas a cambios en la secuencia blanco o cambios en su

estado de metilación como consecuencia de la tetraploidización. Estos polimorfismos indistinguibles entre sí por esta técnica representaron un 1,1 % del total de marcadores evaluados y podrían estar indicando un aumento de la metilación en el sitio blanco (C1, C3 y C4) o una demetilación (C2, C5 y C6) como consecuencia de la duplicación genómica. Muy interesante fue la identificación de otro grupo de marcadores, Clases D y H, que presentaban diferencias de metilación asociadas únicamente al cambio en el nivel de ploidía. Dentro de esta clase, la mayoría de los marcadores polimórficos resultaron de la demetilación tras el cambio del nivel de ploidía (Clase D, 1,7 %), mientras que el resto de los marcadores (Clase H, 0,6 %) se originaron a partir de la hiper-metilación del sitio blanco. En total estos cambios representaron un 2,3 % del total de sitios analizados.

Estos resultados indican que al producirse un cambio en el nivel de ploidía en *P. notatum* aunque la mayoría de las secuencias metiladas permanecen invariables, existe una proporción de fragmentos que sufren cambios asociados a la tetraploidización. Esto podría estar relacionado a la represión/desrepresión de genes para adecuarse a un entorno poliploide y/o a la activación/inactivación de transposones luego de la duplicación.



**Figura 15.** Marcadores MSAP a partir del genotipo C4-2x y su autotetraploide derivado C4-4x. Las flechas indican el tipo de marcador especificado en la Tabla 11.

#### IV.1.6 Análisis de las secuencias MSAP

Con el objetivo de determinar las secuencias nucleotídicas de los marcadores de MSAP analizados, 14 fragmentos representando diferentes tipos de alteraciones en el patrón de metilación fueron clonados y secuenciados (Tablas 12 y 13, Anexo B). En promedio 327 pb fueron secuenciados por fragmento, con un mínimo de 185 bp y un máximo de 482 bp. El análisis de secuencia se llevó a cabo con los marcadores que mostraron al menos un 95 % de homología entre 3 clones de un mismo inserto, determinado a través de la opción “*Blast 2 sequences*” del NCBI ([www.ncbi.org](http://www.ncbi.org)) y/o

del programa Sequencher 3.1.1 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI).

#### IV.1.6.1 Caracterización de fragmentos derivados de Q4118 y Q4117

Los tipos de polimorfismos seleccionados para este análisis, las homologías (NCBI), la anotación funcional y número de alineamientos (*hits*) en el genoma de arroz de 9 secuencias derivadas de los genotipos tetraploides Q4188 (sexual experimental) y Q4117 (apomíctico natural) se muestran en la Tabla 12.

#### ***Análisis de secuencias de fragmentos co-migrantes en Q4188 y Q4117:***

En primer lugar se analizaron secuencias provenientes de sitios no metilado (patrón 1111) en Q4188 y Q4117 (A7 y A9). Las mismas fueron evaluadas con el fin de analizar la homología entre bandas co-migrantes en el gel. Las tres secuencias del marcador 7 y las tres secuencias del marcador 9 presentaron un 98 % de identidad entre si y alinearon (Blastn) con un clon del cromosoma 2 de *Solanum lycopersicum* (C02SLe0056J10). El análisis de estas secuencias en la base de datos TIGR (*A. thaliana*) (<http://www.tigr.org/tdb/e2k1/ath1/>) arrojó una homología significativa con un segmento del gen de enzima Fosfoetanolamina N-metiltransferasa involucrada en un paso limitante de la síntesis de novo de la *fosfatidilcolina*, uno de los principales fosfolípidos de membrana (E = 0.024, P = 0.024). El análisis de BLAST en el genoma de arroz (Gramene) mostró 90 *hits* en la especie. Este resultado indicó que los fragmentos co-migrantes de ambos genotipos resultaron homólogos entre si y que este sitio no metilado correspondió a una secuencia génica.



**Tabla 12.** Análisis de secuencias de marcadores MSAP obtenidos a partir de los genotipos tetraploides Q4188 y Q4117 de *P. notatum*

Patrón	Nombre Marcador	Tamaño (bp)	Blastn (NCBI) <sup>1</sup>	Valor E	Anotación <sup>2</sup>	Hits en arroz <sup>3</sup>
A (1111)	A7 <sup>a</sup>	484	<b>gb AC232774.1 </b> <i>Solanum lycopersicum</i> chromosome 2 clone C02SLe0056J10.	5e-4	<b>At1g73600</b> 68414.t07798 phosphoethanolamine N-methyltransferase 3, putative (NMT3) strong similarity to SPIQ9FR44 Phosphoethanolamine N-methyltransferase 1 (EC 2.1.1.103) (PEAMT 1) (AtNMT1) { <i>Arabidopsis thaliana</i> } E = 0.024, P = 0.024	90
	A9 <sup>b</sup>					
B (0101)	B11 <sup>a</sup>	389	No Hit	-	-	0
C (1010)	C19 <sup>a</sup>	185	<b>reflXM_002440910.1 </b> <i>Sorghum bicolor</i> hypothetical protein. GENE ID: 8084727 SORBIDRAFT_09g017821	2e-30	-	0
D (1100)	D3 <sup>a</sup>	403	<b>emblAM479609.1 </b> <i>Vitis vinifera</i> contig VV78X007059.3	4e-3	-	8
E (0011)	E8 <sup>b</sup>	382	<b>dbj AP002902.2</b> <i>Oryza sativa</i> Japonica Group genomic DNA, chromosome 1, PAC clone: P0492F05.	5e-21	<b>ORSiTEM00100011</b> gil6979318 nt226750-227095 Repeat_region from: <i>Oryza sativa adh1-adh2</i> region, MITE, Tourist E = 5.4e-07, P = 5.4e-07	1103
F (0100)	F16 <sup>a</sup>	282	<b>gb GQ353528.1 </b> <i>Zea mays</i> subsp. <i>mays</i> cultivar 622219-CN-21 ADP-glucose pyrophosphorylase small subunit (bt2) gene, partial cds.	4e-8	<b>At4g02780</b> 68417.t00347 copalyl diphosphate synthase / CPS / entkaurene synthetase A (GA1) identical to GI:571330 [PMID: 7994182]; formerly called entkaurene synthetase A. E = 0.28, P = 0.25	121
	F18 <sup>a</sup>	332	<b>dbj AP008212.1 </b> <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group) genomic DNA, chromosome 6. Intronic region.	3e-05	-	11
G (0111)	G17 <sup>a</sup>	280	<b>reflXM_002441819.1 </b> <i>Sorghum bicolor</i> hypothetical protein. GENE ID: 8079847 SORBIDRAFT_08g003780	3e-89	<b>LOC_Os12g06380.</b> Transposon protein, putative, unclassified, expressed. E = 9e-38	3

<sup>a</sup> Q4188, <sup>b</sup> Q4117. <sup>1</sup> NCBI (Blastn) ([www.ncbi.org](http://www.ncbi.org)), <sup>2</sup> Según Gramene ([www.gramene.org](http://www.gramene.org)), NCBI (Blastx) o TIGR ([www.tigr.org/tdb/e2k1/ath1/](http://www.tigr.org/tdb/e2k1/ath1/)), <sup>3</sup> Gramene.

---

***Análisis de secuencias de sitios igualmente metilados en Q4188 y Q4117 (patrones 0101, 1010):***

Se incluyeron en el análisis secuencias de marcadores indicativos de sitios igualmente metilados en ambos genotipos (marcadores B11 y C19). El fragmento B11 derivó de un sitio completamente metilado en la citosina interna (presente solo en *EcoRI/MspI*) y el fragmento C19 fue generado a partir de una hemi-metilación de la citosina externa (presente solo en *EcoRI/HpaII*). El análisis del fragmento B11 no arrojó homologías significativas en ninguna de las bases de datos analizadas, mientras que el marcador C19 mostró una elevada homología de secuencia ( $2e^{-30}$ ) con una proteína hipotética de *Sorghum bicolor* indicando que se trataría de una región codificante.

***Análisis de secuencias que mostraron polimorfismos entre Q4188 y Q4117 (patrones 1100, 0011 y 0100):***

Se analizaron las secuencias de marcadores que mostraron polimorfismos entre ambos genotipos. Estas diferencias corresponderían a cambios en las secuencias nucleotídicas de las regiones blanco de las enzimas empleadas en la generación de los MSAP o a cambios en los patrones de metilación entre ambos genotipos. El marcador D3 corresponde a un fragmento no metilado del genotipo sexual (Q4188), que está ausente en el genotipo apomítico Q4117. El marcador E8 representa al patrón inverso, es decir un fragmento no metilado en Q4117 y ausente en Q4188. Los análisis de secuencias mostraron que el marcador D3 alineó con un clon de *Vitis vinifera* (AM479609.1) aunque no mostró homología con genes conocidos. Por su parte, el marcador E8 alineó con un clon del cromosoma 1 de arroz y mostró homología con un transposón de la clase MITE (“*Miniature Inverted-repeats Transposable Elements*”), tipo *Tourist*. Los MITEs son pequeños transposones de DNA sin capacidad codificante,

presentes en un elevado número de copias en la mayoría de los genomas, y específicamente los de tipo *Tourist* son los elementos transponibles más abundantes asociados con los genes de las plantas (Wessler et al. 1995).

Dentro de los marcadores MSAP en los que no es posible distinguir entre la metilación completa del sitio y una variación en la secuencia de ADN se incluyeron los marcadores F16 y F18. Ambos corresponden a fragmentos provenientes de sitios presentes (metilados) en Q4188 y ausentes Q4117. El marcador F16 presentó homología de secuencia con una porción del gen *bt2* correspondiente a la subunidad menor de la ADP-glucosa pirofosforilasa de maíz, mientras que el marcador F18 lo hizo con ADN genómico de arroz. El marcador F16 fue asociado funcionalmente con el gen de la copalil difosfato sintasa (CPS)/ent-kaureno sintasa (KS) de *A. thaliana*, ambas enzimas involucradas en la biosíntesis de las gibberelinas.

#### ***Análisis de secuencias diferencialmente metiladas en Q4188 y Q4117 (patrón 0111):***

El marcador G17 representa un ejemplo de marcadores que indican sitios diferencialmente metilados entre ambos genotipos. En este caso se observa que mientras en la planta Q4188 se encuentra metilado, en Q4117 se encuentra demetilado. El análisis de secuencia mostró un alineamiento con una hipotética proteína de *Sorghum bicolor*, mientras que la anotación funcional en TIGR mostró una homología significativa con una proteína de un transposón de arroz, aunque solo 3 *hits* fueron detectados en esta especie en la base de datos de Gramene.

#### **IV.1.6.2 Caracterización de fragmentos derivados de C-2x y C4-4x**

Un análisis similar a lo descrito anteriormente se llevó a cabo con 5 fragmentos generados a partir de los genotipos sexuales C4-2x y C4-4x con el objetivo de determinar el tipo de secuencias detectadas con los marcadores MSAP en este sistema

experimental diploide-tetraploide. El tipo de marcador analizado, su anotación funcional y el número de hit en el genoma de arroz se muestran en la Tabla 13.

**Tabla 13.** Análisis de secuencias de marcadores MSAP con diferentes patrones de amplificación entre los genotipos C4-2x y C4-4x de *P. notatum*

Patrón	Nombre Marcador	Tamaño (bp)	Blastn (NCBI) <sup>1</sup>	Valor E	Anotación <sup>2</sup>	Hit en arroz <sup>3</sup>
A (1111)	A23 <sup>a</sup>	360	<b>gb AC130732.2 </b> <i>Oryza sativa</i> Japonica Group chromosome 5 clone P0708D12.	4e-3	-	115
B (0101)	B26 <sup>b</sup>	315	<b>gb AC134926.3 </b> <i>Oryza sativa</i> Japonica Group chromosome 11 clone OSJNBb0056110.	6e-13	<b>LOC_Os03g39210</b> Retrotransposon protein, putative, unclassified. E = 3e-14	123
E (0011)	E32 <sup>b</sup>	270	<b>emb AM432369.2 </b> <i>Vitis vinifera</i> contig VV78X056203.22. Intronic Region	1e-2	<b>At3g04910</b> 68416.t00482 protein kinase family protein contains protein kinase domain, Pfam: PF00069. E = 0.0079, P = 0.0078	7
G (0111)	G43 <sup>a</sup>	437	<b>emb AM428644.2 </b> <i>Vitis vinifera</i> contig VV78X098338.8.	0.057	-	0
	G44 <sup>b</sup>	462	<b>gb AC108498.2 </b> <i>Oryza sativa</i> Japonica Group chromosome 5 clone OJ1076_H08.	2e-13	<b>LOC_Os05g12550.1</b> Retrotransposon, putative, centromere-specific. E = 1.2e-18	35

<sup>a</sup> C4-2x, <sup>b</sup> C4-4x. <sup>1</sup> NCBI (Blastn) ([www.ncbi.org](http://www.ncbi.org)), <sup>2</sup> Según Gramene ([www.gramene.org](http://www.gramene.org)), NCBI (Blastx) o TIGR ([www.tigr.org/tdb/e2k1/ath1/](http://www.tigr.org/tdb/e2k1/ath1/)), <sup>3</sup> Gramene.

#### **Análisis de secuencias de sitios no metilados en C4-2x y C4-4x (patrón 1111):**

El marcador A23, proveniente de sitios no metilados en C4-2x y C4-4x, mostró un alineamiento con un clon del cromosoma 5 de arroz (P0708D12) y no fue posible asignarle una anotación funcional a través de las bases de datos utilizadas. Sin embargo, el análisis de Blast en el genoma de arroz (Gramene) mostró 115 alineamientos lo cual podría corresponder a una región repetitiva.

---

***Análisis de secuencias de sitios igualmente metilados en C4-2x y C4-4x (patrón 0101):***

El análisis de secuencia del marcador B26, el cual es indicativo de un sitio igualmente metilado en los dos niveles de ploidía, mostró un alineamiento con secuencias del cromosoma 11 de arroz (clon OSJNBb0056I10) y una alta homología con un retrotransposón de arroz. En este caso, la secuencia mostró también un número relativamente alto de hits en arroz, confirmando su posible anotación funcional.

***Análisis de secuencias que mostraron polimorfismos entre C4-2x y C4-4x (patrón 0011):***

El marcador E32 muestra un polimorfismo derivado de una variación en la secuencia entre los genotipos C4-2x y C4-4x o de una demetilación del sitio blanco en el genotipo C4-4x luego de la tetraploidización. El análisis de secuencia mostró un alineamiento con una región intrónica de *Vitis vinifera* (AM432369.2) y una posible anotación funcional con una enzima del tipo proteína quinasa de *A. thaliana* (At3g04910). A pesar de que el patrón de este marcador no permite distinguir entre una variación genética y variación epigenética del sitio detectado, al tratarse de una región codificante este caso podría representar una demetilación de una proteína quinasa en el genotipo tetraploide.

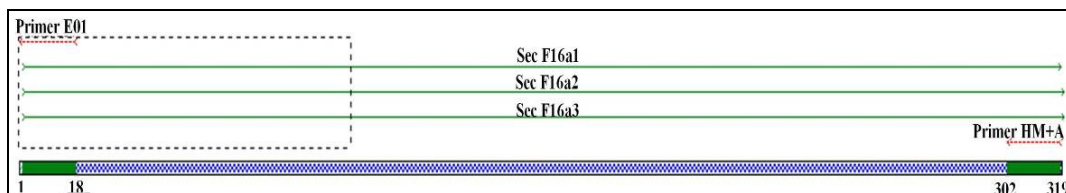
***Análisis de secuencias diferencialmente metiladas en C4-2x y C4-4x (patrón 0111)***

La caracterización de los fragmentos G43 y G44 revela diferencias en sitios metilados relacionados con el nivel de ploidía. Los mismos mostraron homología con clones de *Vitis vinifera* (emblAM428644.2) y arroz (gblAC108498.2), respectivamente. El fragmento G44 mostró además una anotación funcional relacionada con un retrotransposón de arroz (LOC\_Os05g12550.1). El patrón de MSAP observado

indica que esta región genómica fue demetilada luego de la tetraploidización.

#### IV.1.6.3 Análisis de restricción de los fragmentos secuenciados

La identificación de los cebadores específicos en los extremos de las secuencias analizadas permitió determinar que de las 14 secuencias, 13 resultaron de heterodigestiones *EcoRI* - *HpaII/MspI* correspondientes a marcadores MSAPs (Figura 16). Solo en una de las secuencias obtenidas (A23<sup>a</sup>) no fue posible confirmar su origen ya que no se identificó el cebador *HpaII/MspI*. Por otro lado todas las secuencias fueron sometidas a un análisis *in silico* de sitios de restricción utilizando la opción CUT MAP del programa *Sequencher*. En ningún caso se detectaron sitios internos CCGG que no hubieran sido digeridos por el par *HpaII/MspI* durante la preparación del ADN genómico para la generación de los marcadores. Este resultado indica que todos los sitios blancos de las enzimas sensibles a la metilación fueron clivados y por lo tanto las proporciones de metilación estimadas en los estudios anteriores son altamente confiables.



**Figura 16.** Alineamiento de las 3 secuencias analizadas derivadas del fragmento F16<sup>a</sup> y cebadores *EcoRI* y *HpaII/MspI* (Sequencher)

#### IV.1.7 Localización de marcadores MSAP en el genoma de *Paspalum notatum*

Con el objetivo de estudiar la distribución de un grupo de marcadores MSAP en mapa de ligamiento genético al nivel tetraploide de *P. notatum*, se analizó la segregación de los polimorfismos presentados por estos fragmentos en una población de

mapeo segregante por el modo de reproducción. Debido a que la población de mapeo es una familia  $F_1$  derivada del cruzamiento de dos genotipos tetraploides altamente heterocigotos, se esperan distintas configuraciones alélicas para los diferentes *loci* examinados (Ritter et al. 1990). Los marcadores MSAP se analizaron con los datos obtenidos a partir de una muestra de la población de mapeo constituida por 10 individuos de reproducción apomítica y 10 individuos caracterizados como de reproducción sexual. Se analizaron 6 combinaciones de cebadores de MSAP (E31-HM1, E33-HM3, E31-HM3, E34-HM3, E34-HM5 y E40-HM6) (Anexo A). Para cada una de ellas se determinó la presencia de: a) marcadores maternos: fragmentos segregantes provenientes exclusivamente del progenitor femenino (Q4188) y b) marcadores paternos: fragmentos provenientes exclusivamente del progenitor apomítico (Q4117). Cada marcador fue clasificado en función del estado de metilación del sitio correspondiente mediante la comparación del patrón de amplificación generado a partir de ambas digestiones (*EcoRI/HpaII* y *EcoRI/MspI*) de cada planta  $F_1$ . Los marcadores que mostraron patrones del tipo 01 o 10 segregantes en la muestra de la población se consideraron como epialelos. Los que mostraron un patrón 11 o 00 fueron considerados como marcadores no epigenéticos o insensibles a metilación ya que la doble ausencia del marcador puede derivar de un cambio en la secuencia.

En total se identificaron 9 marcadores maternos, de los cuales 2 fueron clasificados como epialelos y 7 como insensibles a metilación, respectivamente. Por otro lado los marcadores paternos segregantes fueron 11, con 5 epialelos y 6 insensibles a metilación. Se determinó la relación de segregación por presencia/ausencia de cada *locus* comparando la segregación observada con la segregación esperada (tanto para herencia tetrasómica como disómica) para un alelo en dosis simple (ADS, Aaaa x aaaa) 1:1 (Tabla 14).

**Tabla 14.** Análisis de segregación de los marcadores MSAP, sensibles (S) e insensibles (I) a metilación.

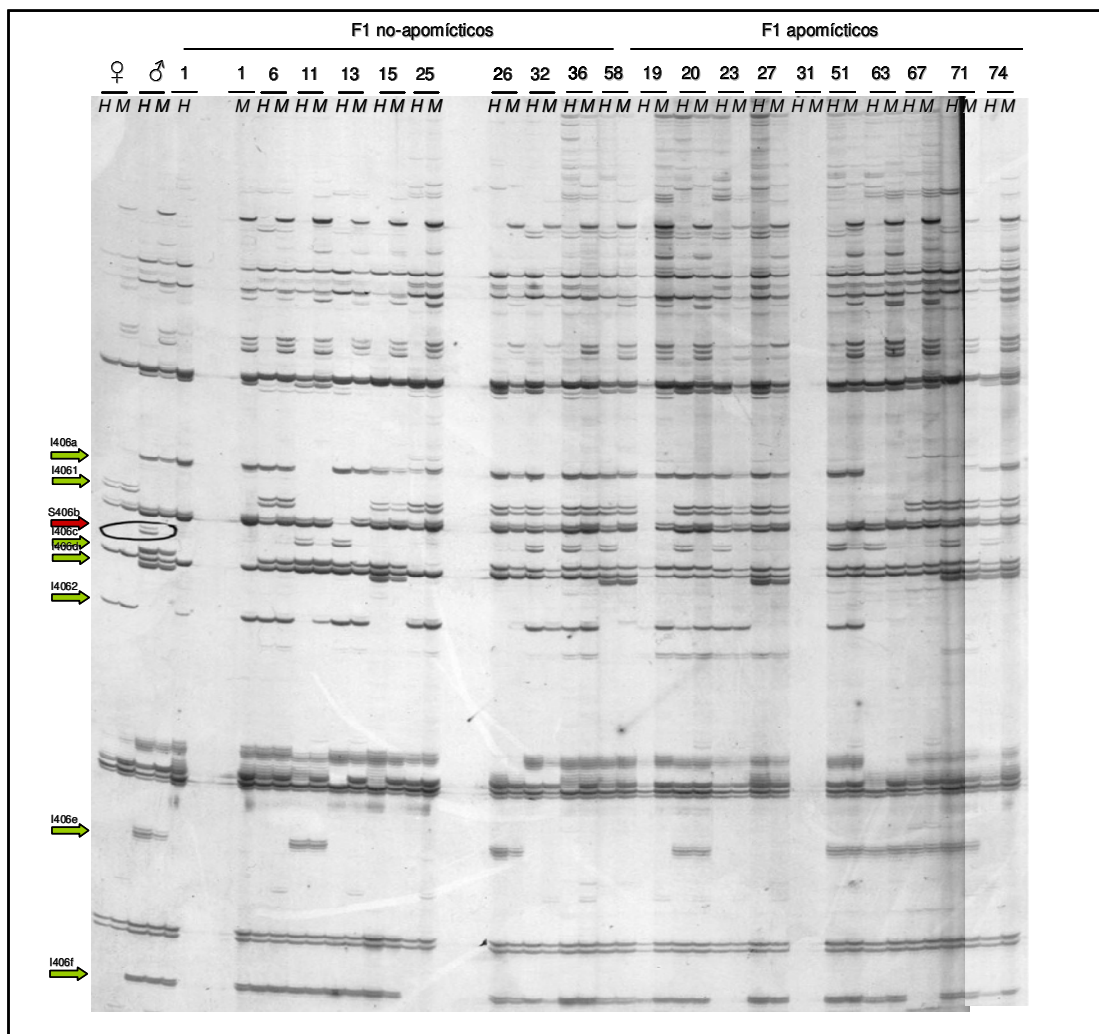
Marcador	Nombre	n	Presentes	Ausentes	$\chi^2_{1:1}$	P asociada
Materno (Q4188)	S333m	19	8	11	0,47	0,491
	S345b	20	7	13	1,80	0,180
	I331a	20	9	11	0,20	0,655
	I331b	20	9	11	0,20	0,655
	I406 <sub>1</sub>	19	13	6	2,58	0,108
	I406 <sub>2</sub>	17	9	8	0,06	0,808
	I345a	20	18	2	12,80	0,000
	I345c	20	13	7	1,80	0,180
	I345d	20	9	11	0,20	0,655
Paterno (Q4117)	S333p	18	10	8	0,22	0,637
	S331	20	11	9	0,20	0,655
	S406b	18	12	6	2,00	0,157
	S345a	20	11	9	0,20	0,655
	S345c	20	13	7	1,80	0,180
	I406a	19	15	4	6,37	0,012
	I406c	19	17	2	11,84	0,001
	I406d	19	5	14	4,26	0,039
	I406e	19	7	12	1,32	0,251
	I406f	19	16	3	8,89	0,003
	I345b	20	14	6	3,20	0,074

**Tabla 15.** Ubicación de los marcadores moleculares MSAP generados en la población de mapeo de *Paspalum notatum* tetraploide.

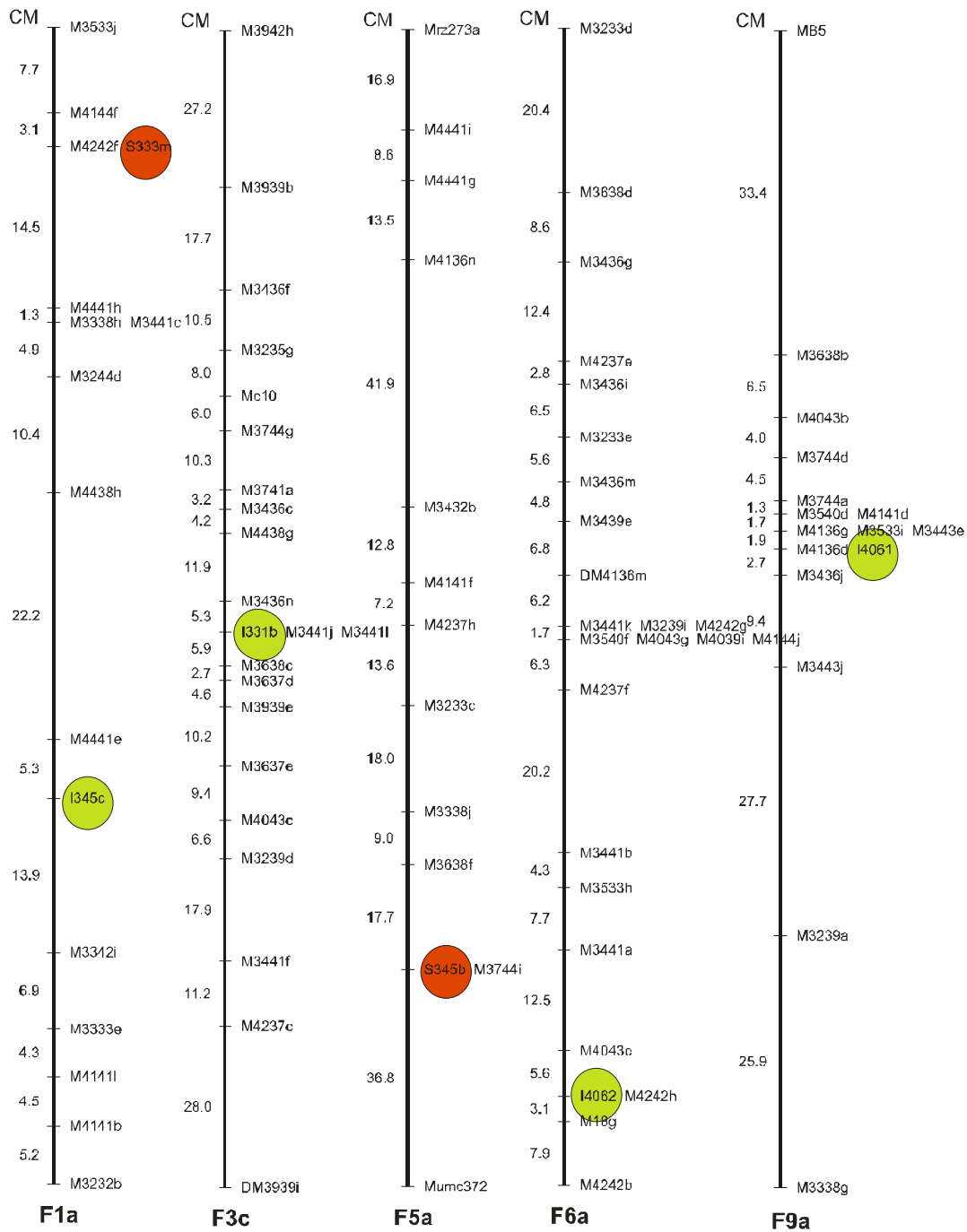
Polimorfismo	Progenitor	Marcador	Grupo de Ligamiento	Lod
Sensible a Metilación	Q4188	S333m	F1a	5,7
		S345b	F5a	5,7
	Q4117	S333p	M3b	3,2
		S331	M3b	3,2
		S406b	<i>no ligado</i>	-
		S345a	<i>no ligado</i>	-
		S345c	M9a	3,2
Insensible a Metilación	Q4188	I331a	<i>no ligado</i>	-
		I331b	F3c	6,0
		I406 <sub>1</sub>	F9a	4,0
		I406 <sub>2</sub>	F6a	5,1
		I345c	F1a	2,9
		I345d	<i>no ligado</i>	-
	Q4117	I406d	M4	2,1
		I406e	M18b	2,7
		I345b	<i>no ligado</i>	-



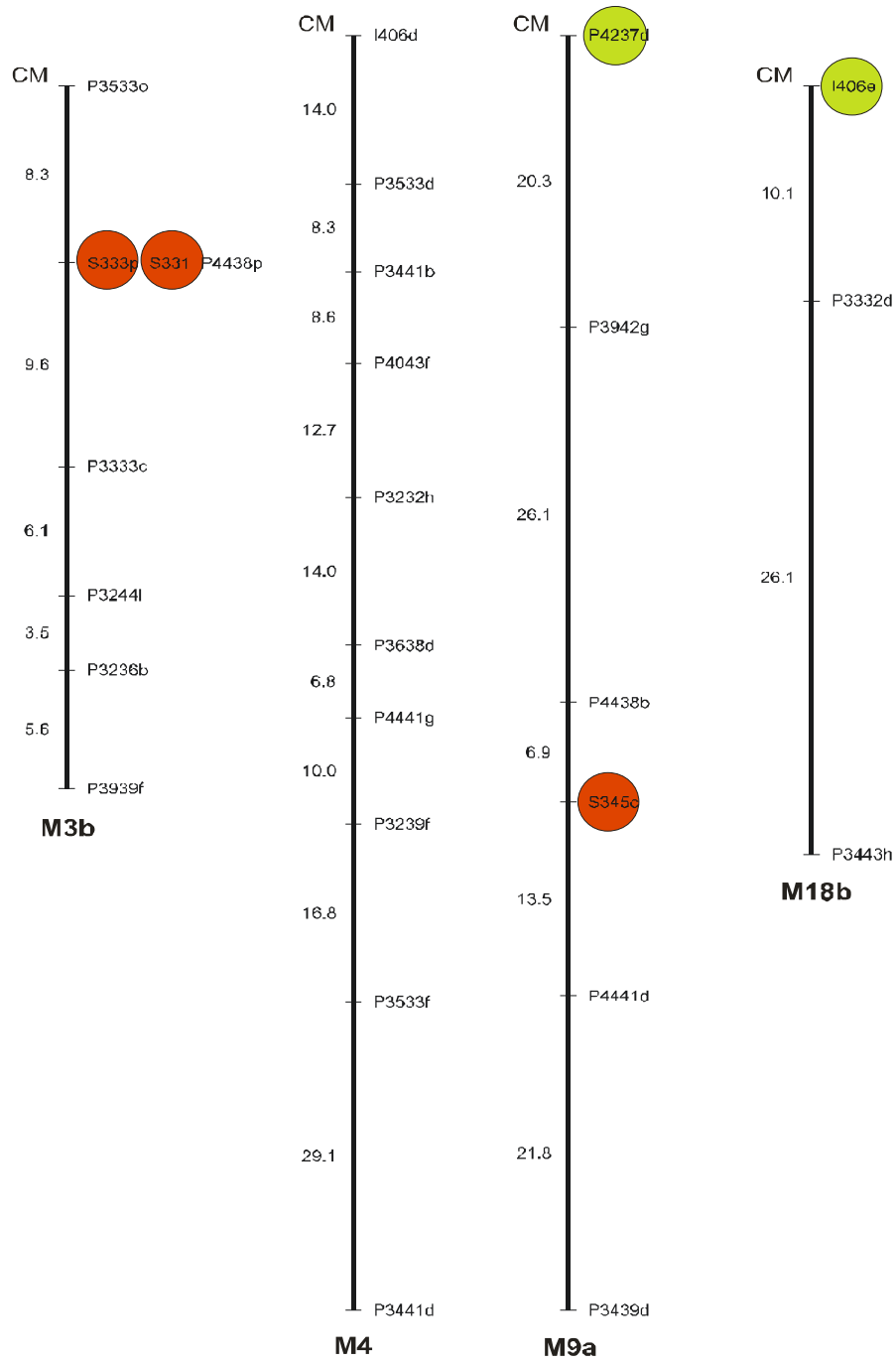
Del total de marcadores analizados, 16 segregaron de acuerdo al modelo esperado. Los mismos fueron localizados en los respectivos mapas de ligamiento desarrollados por Stein et al. (2007) mediante la utilización del programa Mapmaker/Exp versión 3.0 (Lander et al. 1987) (Tabla 15, Figuras 18 y 19). En la Tabla 15 se indica el grupo de ligamiento con el cual agrupo cada marcador y su respectivo valor de LOD y en la Figura 17 se muestra el patrón de segregación obtenido con la combinación de cebadores E40-HM6 (Anexo A).



**Figura 17.** Amplificación MSAP con la combinación E40-HM6 de los progenitores y una muestra de la población segregante. Las flechas en rojo y en verde indican los marcadores segregantes sensibles e insensibles a la metilación.



**Figura 18.** Localización de marcadores MSAP en los grupos de ligamiento genético del progenitor femenino (Q4188). En rojo y en verde se muestran los marcadores sensibles e insensibles a metilación respectivamente



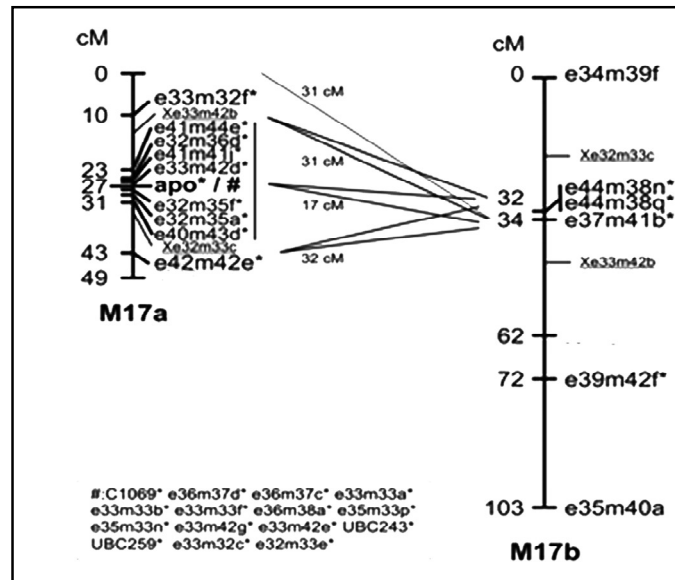
**Figura 19.** Localización de marcadores de MSAP en los grupos de ligamiento genético del progenitor masculino (Q4117). En rojo y en verde se indican los marcadores sensibles e insensibles a metilación respectivamente.

## **IV.2 Estudio del estado de metilación de la región responsable de la aposporía en *Paspalum notatum***

### **IV.2.1 Experimentos de RFLP con enzimas sensibles a metilación y sondas específicas de la región responsable de la aposporía**

A partir de la construcción de un mapa de ligamiento genético de *Paspalum notatum* al nivel tetraploide realizado dentro de este grupo de trabajo (Stein et al. 2007) se localizó el grupo de ligamiento que contiene el/los factores determinantes de la aposporía en la especie. En este grupo se identificaron 12 marcadores moleculares de AFLP, 2 marcadores de RAPD y 1 marcador de RFLP completamente ligados al carácter (Figura 20). En esta figura los nombres de los marcadores de AFLP y la distancia de mapeo en cM (Kosambi) se muestran a la derecha e izquierda, respectivamente. El análisis de ligamiento se realizó usando el programa MAPMAKER 3.0 a LOD score = 4.0 y un valor máximo de recombinación de 0.39. Este sector del genoma mostró una fuerte supresión de la recombinación y apareamiento preferencial de cromosomas (Stein et al. 2004, Stein et al. 2007).

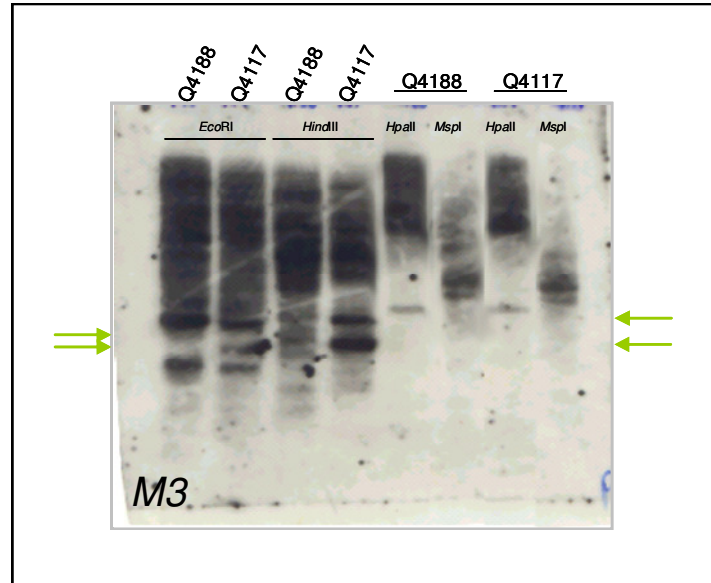
En este trabajo de tesis se utilizó la misma población de mapeo F<sub>1</sub> segregante por el modo de reproducción utilizada por Stein et al. (2007), la cual fue obtenida a partir del cruzamiento entre la planta experimental tetraploide sexual como progenitor femenino, Q4188 y el genotipo apomíctico natural, Q4117. Con el objetivo de determinar el estado de metilación de la región genómica relacionada con el apo-locus se llevaron a cabo experimentos de RFLP involucrando enzimas sensibles a metilación (*Hpa*II y *Msp*I) y las sondas M3 y C1069 que generan marcadores específicos de esa región del genoma (Stein et al. 2004). Asimismo se utilizaron enzimas insensibles a metilación como controles de los patrones de hibridación de ambas sondas.



**Figura 20.** M17a: Grupo de ligamiento paterno donde se localiza el locus responsable de la aposporía (grupo-*apo*). M17b cromosoma homólogo con marcadores ligados en fase de repulsión (tomado de Stein et al. 2007).

El clon M3, deriva de un marcador de AFLP (e36m37c\*) de 110 bp que mostró homología de secuencia con un retrotransposón del tipo “Ty1-copia subclass” de arroz. El clon C1069 genera un marcador 100 % ligado a la aposporía en *P. notatum*, *P. simplex* y *P. mallacophyllum* (Martínez et al. 2003, Pupilli et al. 2004). Una parte de este clon presenta homología con una transposasa. En primer lugar se realizaron experimentos de hibridación contra el ADN de los genotipos Q4118 y Q4117. La hibridación del clon M3 con el ADN genómico de ambos genotipos parentales digeridos con las enzimas insensibles a la metilación del ADN (*EcoRI* y *HindIII*) mostraron un patrón de hibridación característico de un sector repetitivo, aunque se observaron algunas bandas discretas que mostraron polimorfismos entre Q4188 y Q4117 (Figura 21). Un patrón de hibridación similar se observó con el ADN digerido con las enzimas sensibles a metilación (*HpaII* y *MspI*). Para cada genotipo, el mismo mostró ser polimórfico entre el par de isoesquizómeros indicando que la región homóloga detectada se encuentra metilada. Cuando se compararon los perfiles de hibridación entre

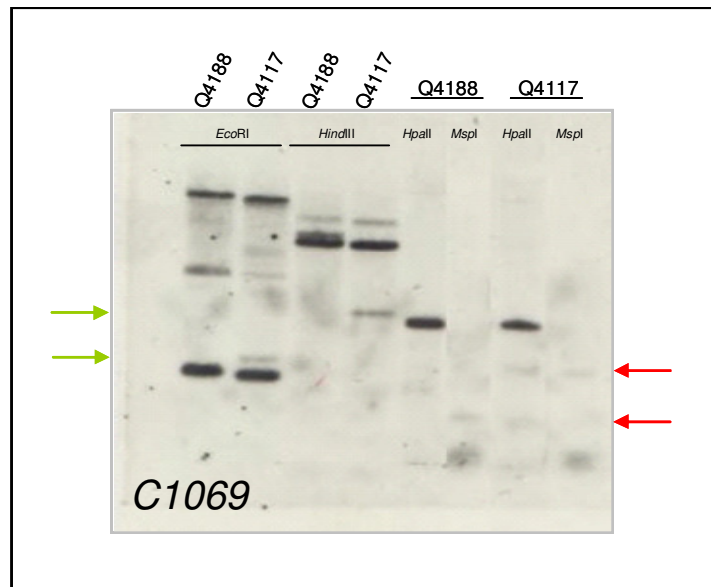
los genotipos parentales Q4188 y Q4117 se observó un patrón de bandas similar entre ellos, indicando que el estado de metilación de este locus en particular es el mismo en ambos genotipos (Figura 21).



**Figura 21.** Experimento de RFLP con el clon M3 y ADN de Q4188 y Q4117 digeridos con las enzimas *EcoRI*, *HindIII*, *HpaII* y *MspI*. Las flechas verdes indican polimorfismos genéticos entre las muestras.

La hibridación con el clon C1069 sobre el ADN digerido con *EcoRI* y *HindIII* mostró un número de bandas discretas (indicativas de una secuencia de bajo número de copias) y se identificaron los marcadores de RFLP completamente ligados al carácter reportados previamente (Martínez et al. 2003, Stein et al. 2004) (Figura 22). La hibridación con el ADN digerido con *HpaII* y *MspI*, al igual que el caso anterior, mostró diferencias entre isoescizómeros en ambos genotipos confirmando la metilación del sitio. A diferencia del resultado obtenido con el clon M3 en este caso se observaron polimorfismos entre los genotipos, indicando que los sectores homólogos presentan diferencias en la metilación de citosinas. Los mismos representaron sitios metilados en el genotipo parental femenino (Q4188) y demetilados en el genotipo

parental masculino (Q4117) (este último estado determinado por la presencia de banda en ambas digestiones).

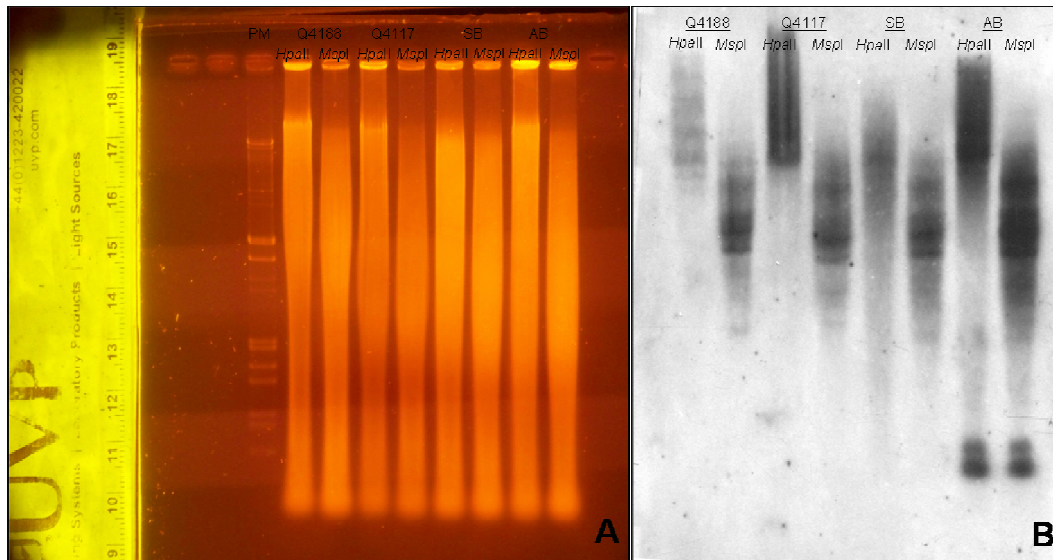


**Figura 22.** Experimento de RFLP con el clon C1069 y ADN de Q4188 y Q4117 digeridos con las enzimas *EcoRI*, *HindIII*, *HpaII* y *MspI*. Las flechas rojas y verdes indican polimorfismos epigenéticos y genéticos, respectivamente.

Para determinar si los polimorfismos de metilación revelados entre los genotipos parentales estaban asociados con la aposporía, se llevaron a cabo experimentos de segregantes en grupos (*Bulk Segregant Analysis* o BSA) (Paran y Michelmore 1993) empleando el par de isoesquizómeros sensibles a metilación (*HpaII* y *MspI*) y progenies  $F_1$  sexuales y apospóricas derivadas de ambos. El BSA se realizó incluyendo 10 individuos sexuales y 10 apomícticos de la población segregante, generando así dos grupos contrastantes por el modo de reproducción. De esta manera, en cada grupo analizado, el fondo genético se homogeneizó quedando como diferencial la región genómica correspondiente al tipo de reproducción.

La hibridación con el clon M3 nuevamente mostró un patrón que consistió en bandas inespecíficas de alto peso molecular y una serie de bandas discretas de menor peso molecular. La comparación entre los grupos sexual y apomíctico no mostró

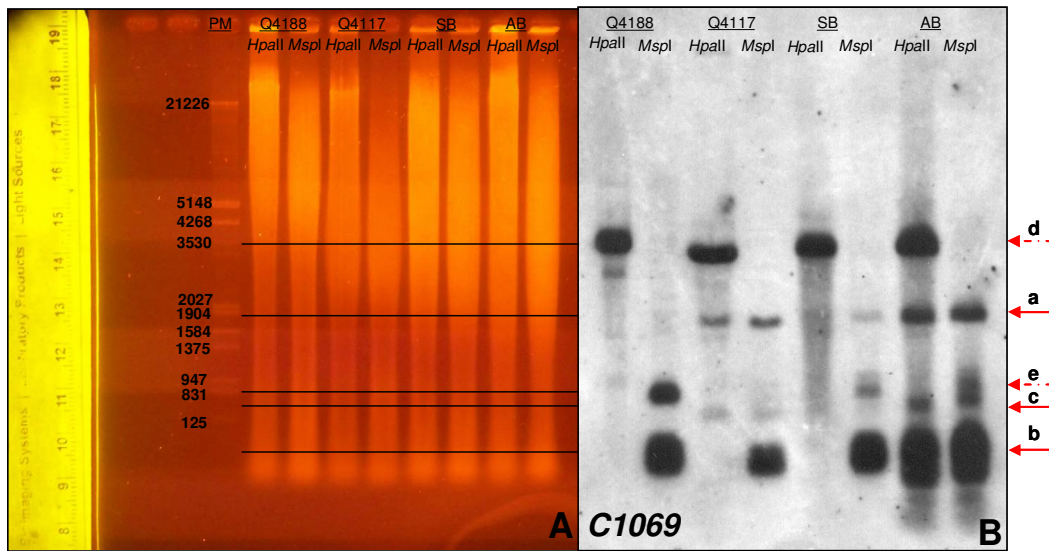
polimorfismos asociados a la metilación del ADN (Figura 23). Cabe destacar que se observaron dos bandas de bajo peso molecular presentes en las digestiones (*HpaII* y *MspI*) del *bulk* apomítico que no estaban presentes en el parental apomítico.



**Figura 23.** Experimento de RFLP con el clon M3 con ADN de Q4188, Q4117 Bulk sexual (SB) y Bulk apo (AB) digeridos con las enzimas *HpaII* y *MspI*. PM: Marcador de peso molecular ( $\lambda$  *EcoRI/HindIII*). A: Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. B: Autoradiografía de la membrana luego de 12 h de exposición.

Un análisis similar fue llevado a cabo con el clon C1069. La comparación de los patrones de hibridación de C1069 sobre los grupos mostró la presencia de tres marcadores indicativos de sitios metilados en el sexual y demetilados en el grupo apomítico (Figura 24). Los marcadores a y b (1,8 Kpb y 0,125 Kpb, respectivamente) presentaron un patrón 0111, indicativo de secuencias que presentaban metilación de la citosina interna en el grupo sexual y que se encuentran demetiladas en el grupo apomítico. Por otro lado, se observó otro sitio demetilado en el grupo apomítico de 0,5 Kpb identificado a través de un patrón de bandas 0011 (c) y sitios igualmente metilados en ambos grupos, marcadores de 3,5 Kpb y 0,8 Kpb (d y e).

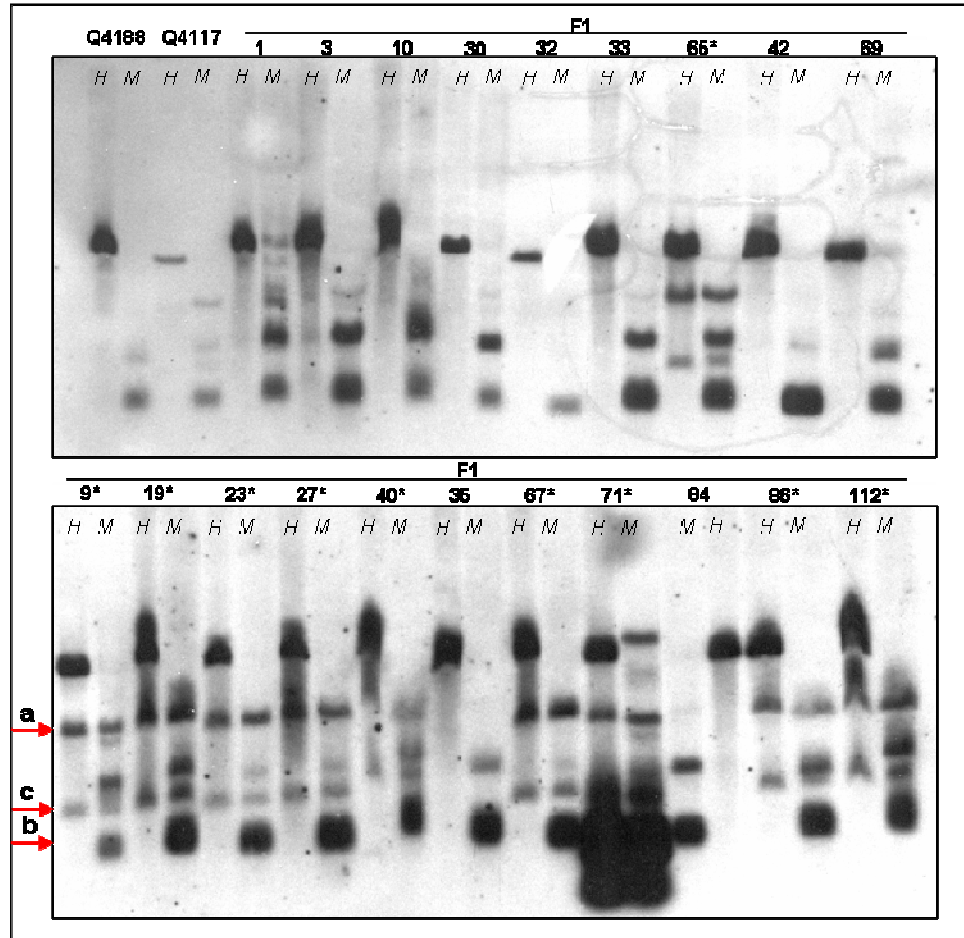




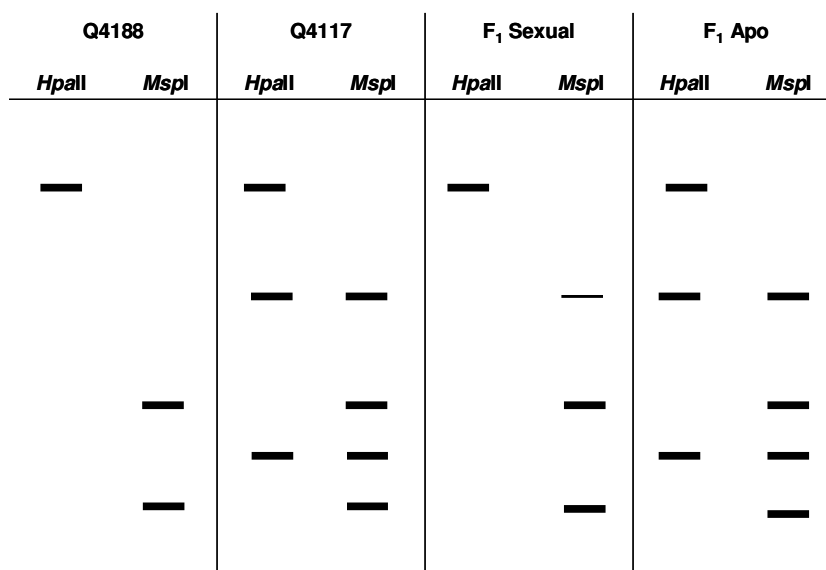
**Figura 24.** Experimento de RFLP con el clon C1069 con ADN de Q4188, Q4117, *bulk* sexual (SB) y *bulk* apo (AB) digeridos con las enzimas *HpaII* y *MspI*. A: Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. B: Autoradiografía de la membrana luego de 12 h de exposición.

Para corroborar estos resultados se realizaron experimentos de hibridación con el clon C1069 incluyendo todos los individuos que conformaban los grupos (*debulk*) (Figura 25). Los patrones de hibridación de cada individuo  $F_1$  se compararon con los patrones detectados previamente en los genotipos parentales y en los *bulks* (Figuras 22 y 24). El marcador de 1,8 Kpb (banda a) con patrón 01 (sexuales) 11 (apomícticos) se reprodujo en 9/10 progenies apomícticas indicando una metilación diferencial asociada al modo de reproducción. La banda con ese mismo patrón de hibridación pero de menor PM (0,125 Kpb) (banda b) observada en los *bulks* (y no en los genotipos parentales) no pudo ser asociada al modo de reproducción debido a que la misma solo se observó en uno de los individuos apomícticos ( $F_1$  71). Este patrón de hibridación inespecífico pudo ser debido a una degradación del ADN. Por otro lado, el marcador indicativo de un sitio demetilado en el grupo apomíctico (0,5 Kpb, patrón 0011, banda c) se reprodujo en todas las progenies apomícticas, indicando un estado de metilación específico para los

genotipos con este tipo de reproducción. En la Figura 26 se presenta un esquema de los patrones de hibridación característicos de la sonda C1069 con los genotipos sexuales y apomícticos.



**Figura 25.** Experimento de RFLP con el clon C1069 y ADN de Q4188, Q4117, 10 progenies sexuales y 10 progenies apomícticas (\*) digeridos con las enzimas *Hpa*II (H) y *Msp*I (M).



**Figura 26.** Esquema indicando los patrones de hibridación característicos de los parentales (Q4188 y Q4117) y los individuos F<sub>1</sub> segregantes por el modo de reproducción con la sonda C1069.

### IV.3 Identificación de factores genéticos relacionados físicamente con la aposporía

#### IV.3.1 Caracterización molecular de factores genéticos relacionados con la aposporía

A partir de estudios previos sobre la localización y herencia de genes relacionados con la apomixis en razas tetraploides de *P. notatum* se construyó el primer mapa genético marco para esta especie y se identificó el grupo de ligamiento donde se localiza el locus responsable de la aposporía (Stein et al. 2007). En este, se identificaron varios marcadores de AFLP completamente ligados a la región que controla la aposporía (Tabla 16 y Anexo C). Estos marcadores constituyeron el punto de partida para el desarrollo de marcadores tipo SCAR (“*Sequence Characterized Amplified Region*”) y la identificación de secuencias físicamente asociadas a la región responsable de la aposporía en la especie mediante una estrategia de caminata cromosomal.

**Tabla 16.** Caracterización molecular de marcadores de AFLP completamente ligados a la aposporia en *P. notatum*

Marcador	Tamaño	Blastn NCBI	Blastn Gramene	Blastn TIGR*
<b>J5</b>	207 bp	<b>gb AC231617.2 </b> <i>Zea mays</i> BAC clone CH201-190G15 from chr. 8. E: 6e-04	2 Hits (E < 1)	<b>ORSiTERT00200067</b> gil4512226 dbj AB014738.1 A B014738 <i>Oryza sativa</i> gypsy- type retrotransposon RIRE3 DNA, internal region. E: 0.43
<b>J7</b>	115 bp	s.h	9 Hits (E < 1)  Intrón de <b>LOC_Os06g24980</b> transposon protein putative CACTA, En/Spm subclass.	<b>At1g08320</b> 68414.t00819 bZIP family transcription factor contains Pfam profile: PF00170 bZIP transcription factor. E: 0.28
<b>U14</b>	91 bp	s.h	1 Hits (E < 10)  <b>LOC_Os09g20250.1</b> retrotransposon protein, putative, Ty1- copia subclass.	s.h
<b>U16</b>	176 bp	s.h	n.h	<b>At4g00650</b> 68417.t00080 FRIGIDA protein identical to Swiss-Prot:Q9FDW0 FRIGIDA protein [Arabidopsis thaliana]. E: 0.50
<b>M3</b>	87 bp	<b>gb AF434192.1 </b> <i>Zea mays</i> line LH82 transposon Ins2, YZ1 (yz1) gene, YZ1-LH82 allele, complete cds; tRNA- Phe (trnF) gene, complete sequence; retrotransposon Machiavelli Gag and Pol (gag/pol) gene, complete cds; and retrotransposon-like Ozymandias and MITE Gnat1, complete sequence. E: 7e-16	193 Hits (E < e-06)  <b>LOC_Os02g09870.1</b> Retrotransposon protein, putative, Ty1- copia subclass.	<b>ORSiTERTO00019</b> alulu_3615-1 Rice Fourf retrotransposon. E: 2.1e-06
<b>C5</b>	96 bp	<b>gb AC135233.19 </b> <i>Medicago</i> <i>truncatula</i> clone mth2-14c14, complete sequence. E: 3e-02	1 Hits (E < 1)  Intrón de <b>LOC_Os05g37830</b> expressed protein.	s.h
<b>I3</b>	279 bp	s.h	n.h	n.h

\* Arabidopsis thaliana Blast Search o TIGR Plant Repeat Database (www.jcvi.org)

s.h: sin homología; n.h: ningún hit

De la totalidad de los fragmentos ensayados 7 pudieron aislarse y reamplificarse de manera exitosa. Luego del clonado en el vector pGEM-Teasy (Promega, USA), todos los fragmentos fueron secuenciados por Macrogen, Corea. Los análisis de secuencia mostraron que el fragmento M3 presentó homología significativa con un

retrotransposición de maíz. Aunque con menor significancia los fragmentos J5, J7, U14 también mostraron homologías con proteínas de transposones o retrotransposones. El fragmento U16 mostró homología con un segmento de la proteína FRIGIDA (FRI) de *Arabidopsis thaliana*. Esta proteína está involucrada en la regulación del tiempo de floración regulando positivamente al represor FCL (“Flowering Locus C”) (Johanson et al. 2000). El fragmentos C5 mostró homología con una secuencia intrónica de una presunta proteína y el fragmento I3 no mostró homología significativa con secuencias anotadas en las bases de datos utilizadas (Tabla 16).

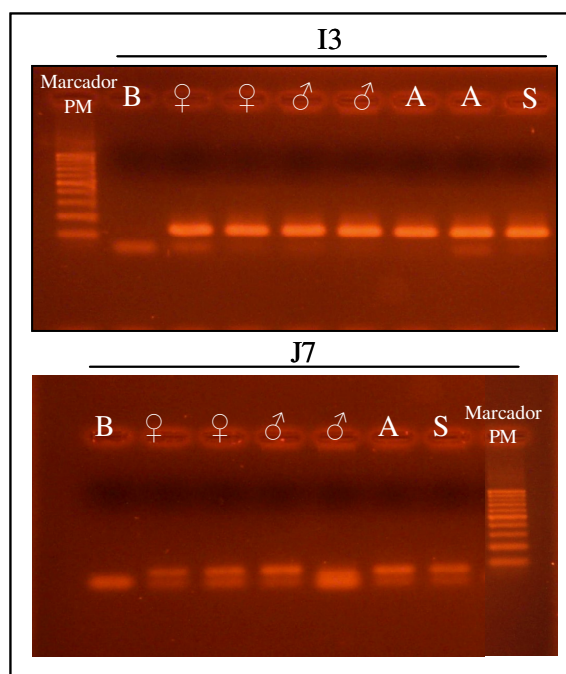
### IV.3.2 Desarrollo de marcadores SCAR

Sobre la base de la secuencia de los fragmentos de AFLP 100 % ligados a la aposporía en *P. notatum* (Tabla 16, Anexo C) se diseñaron cebadores internos para su amplificación por PCR a partir del ADN genómico mediante la utilización del programa libre *Primer3* (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>). Los cebadores utilizados en cada caso se muestran en la Tabla 17.

**Tabla 17.** Cebadores SCAR para la amplificación de marcadores AFLP asociados a la apomixis en *P. notatum*

Combinación AFLP	Marcador	Tamaño	Cebador <i>upper</i> (5'-3')	Cebador <i>lower</i> (5'-3')
eAAG/mAGT	J5	74 bp	TCAAGAATCATT GGGAAGC	CTCTCGGCATC ACCA
eAAG/mAGT	J7	90 bp	AAAGTCTTAAAGT TGTAGG	AGGCGCTAGCTAT GAATA
eACA/mATA	U14	54 bp	GAACTCACCAATC AAGCGTAATA	GCTCTGAGTGATG GGCTGTC
eACA/mATA	U16	142 bp	GAGCGAGGCAGGC AGCACT	TATCTTCTTGGTTT CTTGGACTTC
eACC/mACG	M3	65 bp	GAATTCACCAAGT CAGTCAA	TATTCACCCAAGT CTAACG
eAAC/mAAG	C5	68 bp	TTCAACAATCATC AAAGACT	TAGGGCTGGACAA AATACA
eAAG/mAAC	I3	137 bp	CCCAGACCGTTCG ATATGTGTAAT	CAATGACCAATGC CGTGAAGC

Inicialmente, se llevaron a cabo las reacciones de optimización para cada par de cebador diseñado a partir de las 7 secuencias (Tabla 17). Se utilizaron diferentes temperaturas de anillado (46 a 57 °C) y se incluyeron reacciones de amplificación por enriquecimiento del templado mediante un “*touchdown*” de 62 °C a 55 °C, de acuerdo a las temperaturas de anillado de los pares de cebadores utilizados. En el caso de los marcadores I3, J7, U14, J5, U16 y C5 se obtuvo el producto de amplificación del tamaño esperado pero ninguna reacción de amplificación mostró patrones polimórficos entre los parentales (sexual y apomítico) (Figura 27).

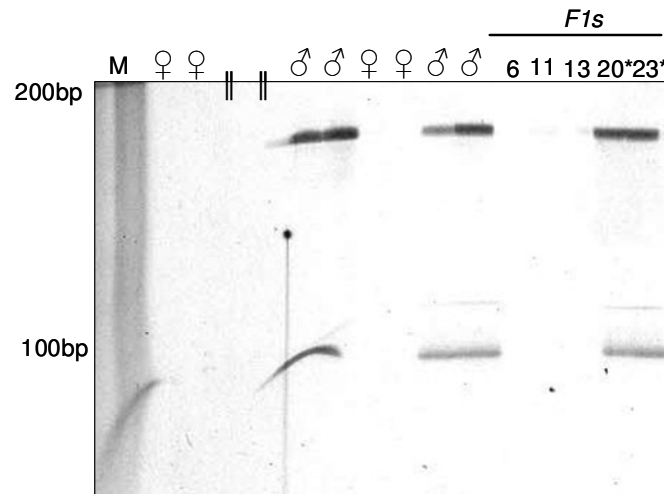


**Figura 27.** Gel de agarosa con productos de amplificación de los marcadores I3 y J7.

PM = Marcador 100 bp; B = blanco de reacción; ♀ = Q4188 (sexual); ♂ = Q4117 (apomítico); A = F<sub>1</sub> apomítico y S = F<sub>1</sub> sexual.

De la misma manera que lo descrito anteriormente, sobre la base de la secuencia nucleotídica del marcador M3 (e36m37c) se diseñaron un par de cebadores específicos para amplificar un fragmento interno de 65 bp (Tabla 17). En este caso, cuando los cebadores diseñados a partir de este marcador se utilizaron en una reacción

de amplificación de tipo “*touchdown*” sobre los genotipos parentales de la población de mapeo, Q4188 (sexual) y Q4117 (apomítico) y algunos individuos F<sub>1</sub>, se observaron dos bandas, de 65 bp (SPNA1) y 182 bp (SPNA2) respectivamente presentes solo en el parental apomítico y en los genotipos F<sub>1</sub> apomíticos (Figura 28).



**Figura 28.** Amplificación de los marcadores SPNA1 y SPNA2 sobre una muestra de la población de mapeo. ♀ = Q4188; ♂ = Q4117; 6, 11 y 13 individuos de la población F<sub>1</sub> de reproducción sexual; 20\* y 23\* individuos F<sub>1</sub> apomíticos.

El análisis de estos marcadores SCAR sobre la población de mapeo mostró que ambos marcadores segregaban juntos y completamente ligados a la aposporía ( $r = 0.00$ ;  $LOD = 13.245$ ). Las bandas amplificadas a partir de Q4117 se extrajeron de los geles, fueron clonadas y secuenciadas. El análisis de la secuencia de SPNA1 mostró una homología completa con el fragmento interno del marcador original de AFLP (e36m37c) de la cual derivó. Como era de esperar el análisis de la secuencia de SPNA2 mostró 100 % de homología tanto a la secuencia de e36m37c y SPNA1, pero en su extremo 3' incluyó una región sin homología con las secuencias anteriores (Figura 29).

CLUSTAL 2.0.12 multiple sequence alignment

```

E36M37c      GACTGCGTACCAATTCACCAAGTCAGTCAACGTGCGGTTTTTCCTCTCGGCAATCCCGTT 60
SPNA1        -----GAATTCACCAAGTCAGTCAACGTGCGGTTTTTCCTCTCGGCAATCCCGTT 50
SPNA2        -----TGAATTCACCAAGTCAGTCAACGTGCGGTTTTTCCTCTCGGCAATCCCGTT 51
              *****

E36M37c      AGACTTGGGTGAATAAGA-----TCAGACCTAAGGCG----TTTACTCAGGACTC 106
SPNA1        AGACTTGGGTGAATA-----TCAGACCTAAGGCG----TTTACTCAGGACTC 65
SPNA2        AGACTTGGGTGAATAGGGAGGCGTCCTCTCAATGAATAATGCAATGTTCCGCACAGAAATC 111
              *****

E36M37c      ATCA-----TCAGACCTAAGGCG----TTTACTCAGGACTC 110
SPNA1        -----TCAGACCTAAGGCG----TTTACTCAGGACTC 65
SPNA2        ATCAAAGACTTTAGAAAAATACTCGCCACCACGATTTACCTCTCGGCAATCCCGTTAGAC 171

E36M37c      -----
SPNA1        -----
SPNA2        TTGGGTGAATA 182

```

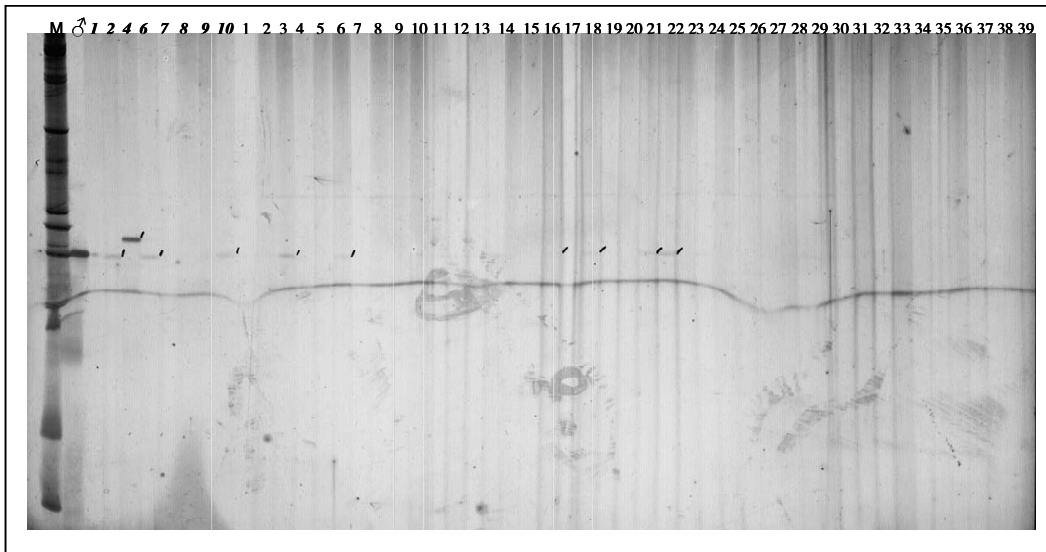
**Figura 29.** Alineamiento de secuencias: Marcador M3 (e36m37c), SPNA1 y SPNA2  
(ClustalW 2.0.12)

El análisis Blastn del fragmento SPNA2 completo mostró 106 *hits* en el genoma del arroz (Gramene). La mejor alineación en esta base de datos mostró que los primeros 142 nt (4-146) fueron homólogos a un retrotransposón de la subclase Ty1-Copia (LOC\_Os08g03030.1, % de identidad: 86,11, valor E: 4,6 e-23). Por otro lado, el análisis Blastn incluyendo sólo los 36 nucleótidos del extremo 3' que no presentaban homología con el retrotransposón produjo un solo hit en el genoma del arroz, más específicamente en la región pericentromérica del brazo corto del cromosoma 12. Este pequeño segmento resultó homólogo a una región intrónica del locus LOC\_Os12g15010 de arroz que codifica para una proteína retrotransposón putativo, de la subclase Ty1-Copia (% de identidad: 92,31, Valor E: 0,28). Los marcadores de RFLP que mapean en el brazo largo del cromosoma 12 del arroz han sido previamente asociados con la aposporía en *P. notatum*, *P. simplex* y *P. malacophyllum* (Pupilli et al. 2001, Pupilli et al. 2004, Martínez et al. 2003, Stein et al. 2004).

En un experimento paralelo se ensayó este marcador específico del modo de



reproducción en una población natural diploide de *P. notatum*. Se utilizaron las mismas condiciones de amplificación y se incluyó el genotipo Q4117 apomítico como control. Se observó la presencia de la banda del tamaño esperado en 10 de los 57 individuos que constituyen esta población natural (Figura 30). Este resultado indica que una región homóloga a la amplificada en los citotipos tetraploides se encuentra presente en los diploides en una proporción aproximada del 17,54 %.



**Figura 30.** Gel de Poliacrilamida al 5%. Amplificación del marcador SPNA1 en una población diploide natural de *P. notatum*. ♂ = Q4117 (apomítico).

Con el objetivo de determinar si esta banda amplificada en los genotipos diploides correspondía al marcador específico *SPNA1*, estas fueron eluidas del gel, clonadas y secuenciadas. En todos los casos el fragmento presentó homología con el retrotransposón de arroz del tipo subclase Ty1-Copia, confirmando la homología de secuencia con el fragmento 100 % ligados a la aposporia obtenido previamente.

### **IV.3.3 Identificación de secuencias genómicas flanqueantes a marcadores moleculares de la región apo por caminata cromosomal**

Con el objetivo de identificar secuencias génicas físicamente asociadas al locus responsable de la aposporía en *P. notatum* se diseñó una estrategia de caminata cromosomal basada en el protocolo “*Genome Walker*” de Clontech. A partir de las secuencias de los marcadores de AFLP 100 % ligados a la aposporía se realizaron reacciones de extensión 3’ y 5’ sobre las bibliotecas a fin de determinar la presencia de segmentos codificantes que pudieran estar relacionadas al modo de reproducción. Las reacciones de caminata cromosomal se llevaron a cabo sobre los marcadores I3, J7 y C5 (Tabla 16 y Anexo C).

Las secuencias de los adaptadores y cebadores para la amplificación de los fragmentos extendidos se tomaron del manual del kit GenomeWalker™ Universal (<http://www.clontech.com/images/pt/PT3042-1.pdf>). Paralelamente se diseñaron cebadores específicos para la extensión del marcador I3 teniendo en cuenta para el diseño de los mismos, su ubicación en el fragmento, un tamaño de 26-30 nucleótidos, un contenido de GC entre 40-60 % y no más de 3 G+Cs en las últimas 6 posiciones del extremo 3’ del mismo (según manual GenomeWalker™ Universal kit). Para las extensiones de los marcadores J7 y C5 se utilizaron como cebadores específicos juegos previamente diseñados para la conversión de los mismos en marcadores tipo SCAR (Tabla 18).

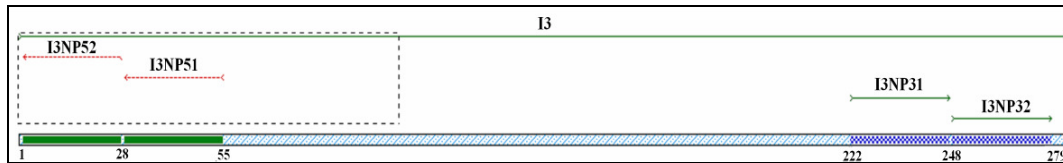
Las 6 bibliotecas fueron utilizadas como molde en reacciones de PCR “anidadas” empleando combinaciones de los cebadores correspondientes a los extremos de restricción y cebadores específicos para los marcadores moleculares en estudio. En el caso de la extensión 5’ del marcador I3 se realizaron tres rondas de PCR. En la primera se utilizaron los cebadores externos, el cebador específico del adaptador (AP1) junto al

cebador específico de la secuencia (I3NP51). Para la segunda reacción de PCR, empleando como molde el producto de la primera reacción, se utilizaron los cebadores internos específicos (AP2 y I3NP52). Finalmente, a partir de una dilución (1/50) del producto de esta segunda reacción se repitió esta amplificación con los mismos cebadores. De la misma manera se procedió para la extensión 3' de este marcador, pero en este caso se utilizaron los cebadores específicos del adaptador (AP1 y AP2) y I3NP31 y I3NP32 específicos del fragmento, para la reacción externa e interna o “anidada”, respectivamente (Figura 31). Por otro lado, para la extensión 3' de los fragmentos J7 y C5 se utilizaron los cebadores específicos J7F y C5F respectivamente y los cebadores J7R y C5R para su extensión hacia el extremos 5' (Tabla 18).

**Tabla 18.** Oligonucleótidos utilizados en la extensión por caminata cromosomal

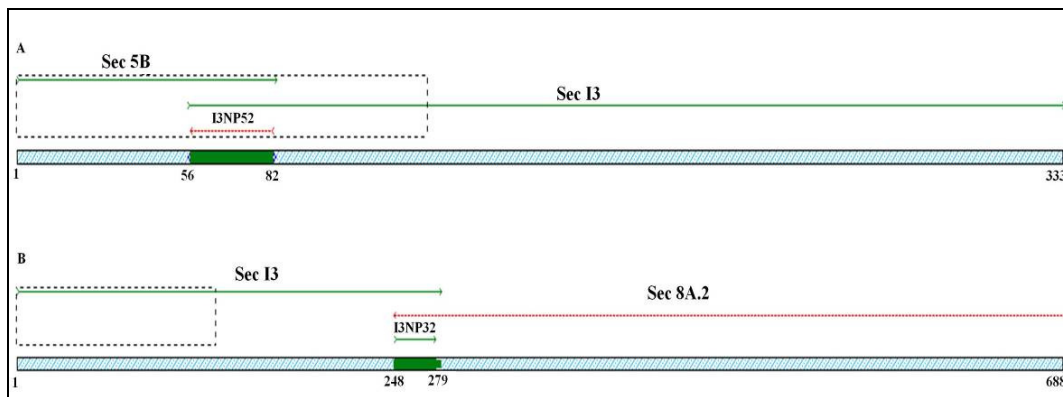
Nombre	Secuencia (5' – 3')
<i>Adaptador 1*</i>	GTAATACGACTCACTATAGGGCACGCGTGGTTCGACG GCCCCGGGCTGGT
<i>Adaptador 2*</i>	ACCAGCCC-NH <sub>2</sub>
<i>AP1*</i>	GTAATACGACTCACTATAGGGC
<i>AP2*</i>	ACTATAGGGCACGCGTGGT
<i>I3NP51</i>	CAGGCGTCGGACGTTCCAGTGAATGCA
<i>I3NP52</i>	CTAGGGGTCCGATTGGTTGCTTGAATT
<i>I3NP31</i>	AAATTTCGGCTTCACGGCATTGGTCATT
<i>I3NP32</i>	GATGCCTTGGGTCTTCTTTATACGTT
<i>J7F</i>	AAAGTCTTAAAGTTGTAGG
<i>J7R</i>	TATTCATAGCTAGCGCCT
<i>C5F</i>	TTCAACAATCATCAAAGACT
<i>C5R</i>	TAGGGCTGGACAAAATACA

\* tomado del manual GenomeWalker™ Universal kit



**Figura 31.** Esquema de la ubicación de los pares de cebadores diseñados a partir de la secuencia del fragmento I3

Los productos de amplificación de estas reacciones anidadas fueron eluidos de los geles de agarosa, clonados en pGEMT-Easy (Promega) y secuenciados (Macrogen Inc. Corea). La validación de los fragmentos extendidos se realizó mediante la identificación de los cebadores correspondientes a ambos extremos de cada secuencia y la conformación de contiguos (*contigs*) con la secuencia original del fragmento de AFLP extendido (Figura 32). Las secuencias 5B y 8A.2 que se muestran en la Figura 32 son derivadas de la extensión 5' y 3' (respectivamente) del marcador I3.



**Figura 32.** Esquema de la validación de las extensiones 5' (A) y 3' (B) del marcador I3

A partir de los experimentos descritos anteriormente y considerando las extensiones hacia los extremos 3' y 5' se obtuvieron en total 12 fragmentos flanqueantes correspondientes a los marcadores I3 y J7. En promedio los fragmentos extendidos contenían 258 nucleótidos, con un máximo y mínimo de 54 y 826 respectivamente. Las características de los fragmentos extendidos y las homologías de secuencias detectadas se muestran en la Anexo D y la Tabla 19.

Tabla 19. Análisis de las secuencias extendidas mediante caminata cromosomal

M	Ext	Nombre	Tamaño (bp)	Blastn (NCBI)	Blastx (NCBI)	Blastn (Gramene)
I3	5'	2B	133	<b>gblEU558534.1</b> <i>Arabidopsis lyrata</i> clone SINE9 transposon-insertion display band genomic sequence (E: 0.59).	n.h	2 Hits (E < 1) n.h
		3B	101	n.h	n.h	<b>LOC_Os07g30070.1</b> Retrotransposon protein (E: 0.94)
			54	<b>dbjlAP009415.1</b> <i>Solanum lycopersicum</i> genomic DNA, chromosome 8, clone: C08SLm0019J03 (E: 0.86)	n.h	n.h
		4B	85	<b>dbjlAK241017.1</b> <i>Oryza sativa</i> Japonica Group cDNA, clone: J065054E09, full insert sequence (E: 0.78)	n.h	1 Hit (E < 1) n.h
		5B	90	<b>gblBT094704.1</b> Soybean clone JCVI- FLGm-24P16 unknown mRNA (E: 1.1)	n.h	1 Hit (E < 1) <b>LOC_Os06g21210.1</b> Glycine rich protein family protein (E:0.94)
	3'	8A	260	<b>dbjlAB040052.1</b> <i>Oryza sativa</i> Japonica Group mEF-G gene for mitochondrial elong. factor G (E: 1e-38)	<b>gblEEF44417.1</b> Translation elong. factor G, putative [ <i>R. communis</i> ] (E:6e-13)	1 Hit (E < 1) <b>LOC_Os03g36780.1</b> Elongation factor (E: 1.2e-28)
			441	<b>reflNM_001154411.1</b> <i>Zea mays</i> N6- adenosine- methyltransferase MT- A70-like protein (LOC100281493) mRNA (E: 2e-64)	<b>gblACG29004.1</b> N6-adenosine- methyltransferase MT-A70-like protein [ <i>Zea mays</i> ] (E: 4e-34)	2 Hits (E < 1) <b>LOC_Os02g45110.1</b> MT-A70 domain containing protein (E: 3.5e-59) <b>LOC_Os12g01355.1</b> Expressed protein (E: 0,016).
		9A	617	<b>gblDQ417753.1</b>   <i>Zea mays</i> B73 serine/threonine kinase protein, expressed protein and RNA- dependent RNA polymerase (mop1) genes (E: 2e-27).	<b>gblAAL59229.1</b>   <b>A F448416_9</b> gag- pol <i>Zea mays</i> (E: 9e-27) <b>gblABA98741.2</b>   retrotransposon, put, Ty3-gypsy subclass <i>O. sativa</i> (E:9e-24)	163 Hits <b>LOC_Os07g16360.1</b> Retrotransposon protein (E: 1.2e-14)
		10A	826	<b>gblDQ417753.1</b>   <i>Zea mays</i> B73 serine/threonine kinase protein, expressed protein and RNA- dependent RNA polymerase (mop1) genes (E: 3e-78)	<b>gblAAL59229.1</b>   <b>A F448416_9</b> gag-pol <i>Zea mays</i> (E: 9e- 48) <b>gblABA98741.2</b>   retrotransposon put., Ty3-gypsy subclass [ <i>O. sativa</i> ] (E: 9e-43)	184 Hits <b>LOC_Os04g06360.1</b> Retrotransposon protein, putative, Ty3- gypsy subclass (E: 2.0e-25)

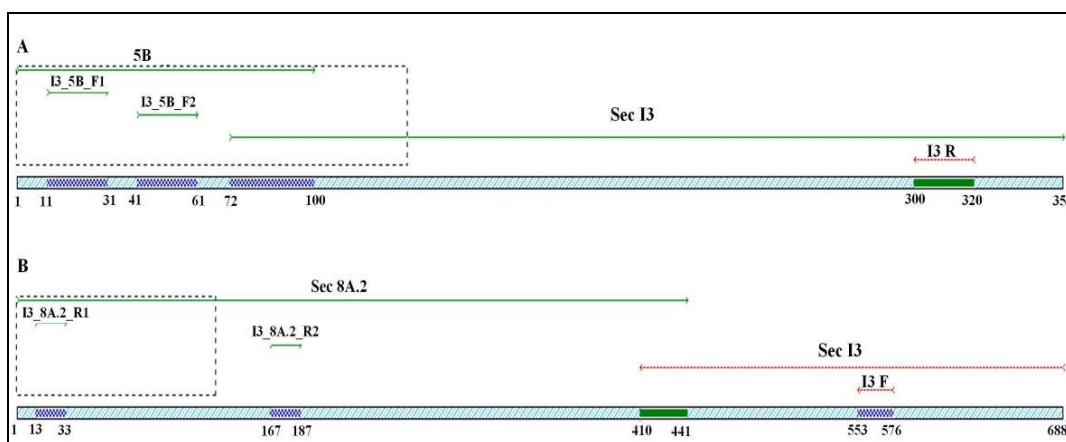
Continúa

		11A	106	<b>gblEU139072.1 </b> <i>Solanum lycopersicum</i> chromosome 9 clone C09HBa0226D21 (E: 0.01)	n.h	n.h
		12A	102	n.h	n.h	n.h
J7	3'	3D	273	<b>gblGU080322.1 </b> Saccharum hybrid cultivar R570 clone BAC 086H20 (E:0.032)	n.h	<b>At5g06670</b> 68418.t00685 kinesin motor protein-related (E: 0.26)

Cuando se analizaron las secuencias generadas tras la extensión 5' del fragmento I3, el tamaño de las mismas en general resultó inferior al obtenido a partir de la extensión 3' del mismo. Consecuentemente, las homologías de estas últimas fueron más significativas cuando se compararon con las bases de datos y resultaron las únicas secuencias con una posible anotación funcional (Blastx). El fragmento designado como 8A mostró homología con un componente fundamental de la maquinaria de síntesis proteica (gblEEF44417.1) y una enzima asociada a la metilación de especies de ARN (gblACG29004.1). Esta secuencia presentó dos localizaciones físicas en el genoma de arroz, en los cromosomas 2 y 12 de esta especie (Tabla 19). Como se mencionó anteriormente existen cada vez mas evidencias acerca de la asociación entre esta región genómica de arroz y los factores determinantes de la apomixis en distintas especies de *Paspalum* (Pupilli et al. 2001, Pupilli et al. 2004, Martínez et al. 2003, Stein et al. 2004, Laspina et al. 2008). Por otro lado, dos de los fragmentos obtenidos a partir de la extensión 3' del marcador I3 (9A y 10A) que presentaron la misma anotación funcional resultaron coincidentes con una de las clases mas comunes de los retrotransposones LTRs ("Long terminal repeats") de plantas (tipo *Gypsy*) (gblABA98741.2). Sin embargo, estos fragmentos mostraron asimismo una homología de secuencia (Blastn, NCBI) significativa ( $E = 3e-78$ ) con genes de una proteína quinasa, una proteína expresada y una ARN polimerasa dependiente de ARN de maíz (gblDQ417753.1). El análisis *in silico* de las secuencias de los fragmentos obtenidos en los experimentos de

extensión 5' del marcador I3 mostraron homología con una secuencia genómica de *Arabidopsis lyrata* derivada de la técnica de “*Tansposon Display*” (2B), un retrotransposón de arroz (3B), una proteína rica en glicina (5B) o resultaron secuencias no codificantes (4B). Por último, la única secuencia derivada de la extensión del marcador J7 (3D) mostró homología de secuencia con un clon de BAC de caña de azúcar y con menor significancia con una proteína *quinesina* de arroz.

Con el objetivo de lograr una asociación entre los fragmentos extendidos mediante caminata cromosomal y la región responsable de la apomixis en *P. notatum* se realizó un análisis de ligamiento genético entre los amplicones y el modo de reproducción. Para ello, a partir de los *contigs* formados por las secuencias extendidas o flanqueantes con el marcador del cual se partió con la caminata cromosomal se diseñaron cebadores específicos para su amplificación a partir del ADN genómico (Figura 33). Estos últimos, junto con el cebador anclado respectivo fueron inicialmente ensayados sobre los genotipos Q4188 y Q4117, sexual y apomítico respectivamente (Figura 34) y luego sobre 20 individuos F<sub>1</sub> de la población segregante por el modo de reproducción (Figura 35).



**Figura 33.** Esquema del diseño de cebadores para las extensiones 5' (A) y 3' (B) del marcador I3

Las reacciones de validación se llevaron a cabo a partir de 5 secuencias extendidas del marcador I3 (3B, 4B, 5B, 8A y 10A) y de la secuencia extendida del marcador J7 (D3) (Tabla 20). En todos los casos se realizó la optimización de la temperatura de anillado entre 54 – 64 °C.

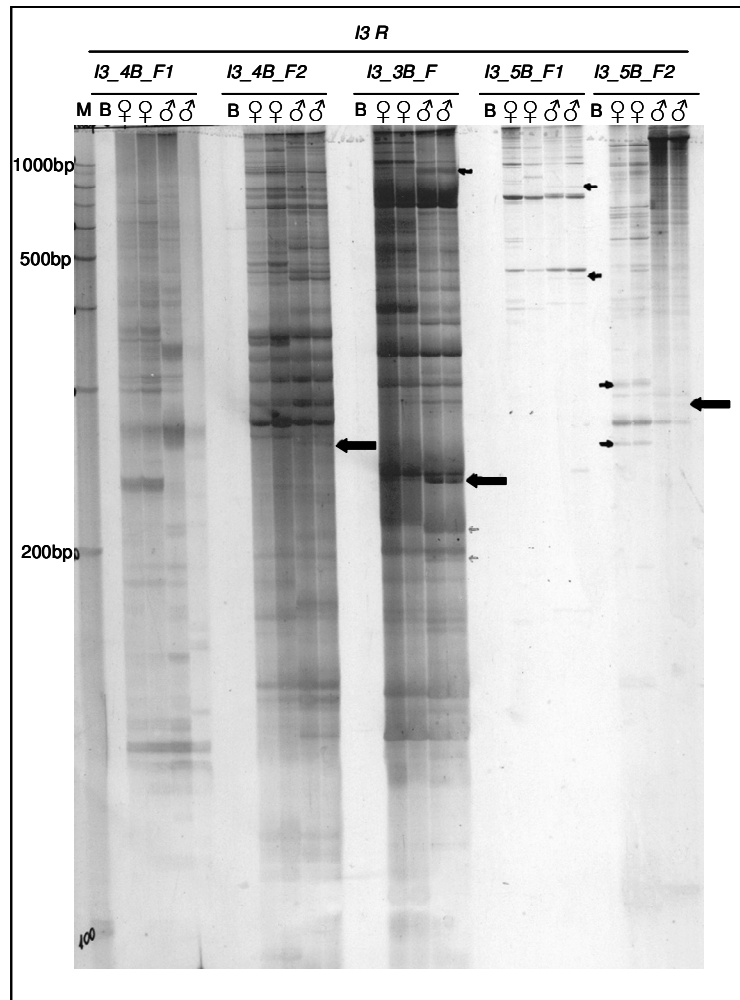
**Tabla 20.** Combinaciones de cebadores ensayadas en la validación de la caminata cromosomal de los marcadores I3 y J7

M	Ext.	Nombre y secuencia cebador anclado (5'-3')	Secuencia extendida	Nombre y secuencia cebador diseñado (5'- 3')	Fragmento esperado (bp)
I3	5'	<b>I3R</b> CAATGACCAATGCCG TGAAGC	3B	<b>I3_3B_F</b> GGGCTGGTCTGTGCA ACAAT	264bp
			4B	<b>I3_4B_F1</b> CAGAAGGCCAGAAGA ACTCA	326 bp
				<b>I3_4B_F2</b> CAGAAGGCCAGAAGA ACTCA	278 bp
			5B	<b>I3_5B_F1</b> GGCTGGTATCTAGCA GCTCAA	309 bp
				<b>I3_5B_F2</b> GCATGTTCAAGCACA TCTATC	279 bp
			3'	<b>I3F</b> CCCAGACCGTTCGAT ATGTGTAAT	8A (441 bp)
	<b>I3_8A_R2</b> GCTCGTAGTGGACAT ATTTGC	409 bp			
	10A	<b>I3_10A_R1</b> TAGTCATTGGCGGTG GTGGAT			344 bp
		<b>I3_10A_R2</b> GTGAGTGCCAGGAAC TCTTCT			763 bp
	J7	3'	<b>J7F</b> AAAGTCTTAAAGTTG TAGG	3D	<b>J7_3D_R</b> GCTGGTAAAGACCAT AATTGG

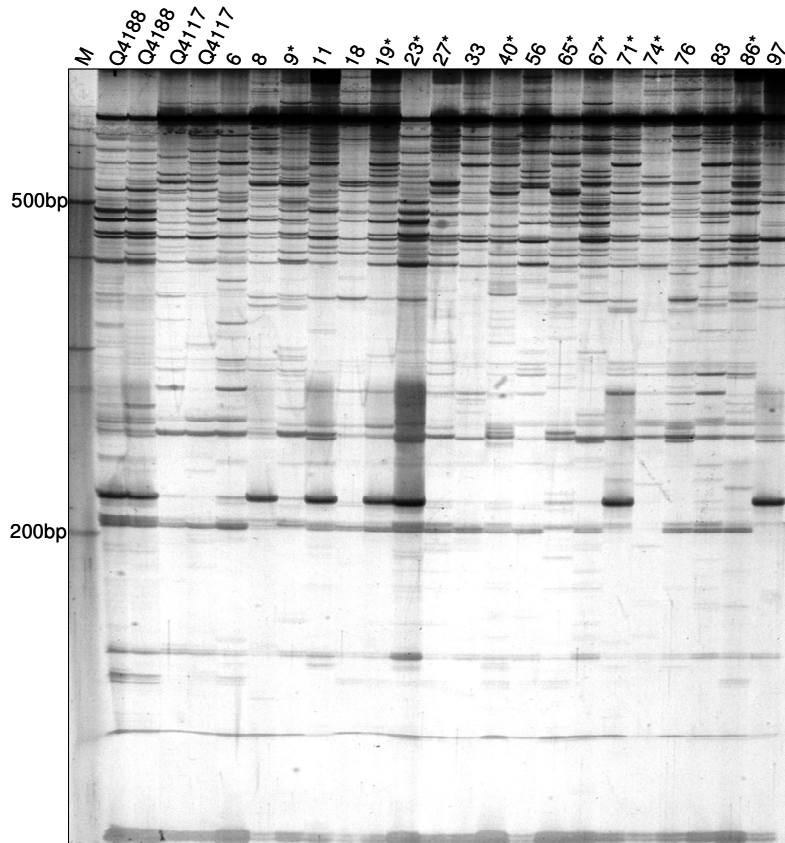
En la visualización de los productos de amplificación en geles de agarosa en todos los casos se observó un patrón de bandas muy difuso por lo que se procedió a su visualización en geles de poliacrilamida al 5 %. Como era de esperar, la resolución de los geles de poliacrilamida permitió la identificación de un gran número de bandas en todas las reacciones de amplificación. En la Figura 34 se muestra el resultado de las



amplificaciones obtenidas con las 5 combinaciones generadas a partir de la extensión 5' del marcador I3 sobre los genotipos parentales de la población segregante por el modo de reproducción y en la Figura 35 se muestra el patrón obtenido de la amplificación, sobre los genotipos parentales y 20 individuos F<sub>1</sub>, con la combinación I3F – I3\_10A\_R2, proveniente de la secuencia flanqueante 3' al marcador I3.



**Figura 34.** Amplificación de secuencias extendidas 5' del marcador I3 con 5 pares de cebadores específicos. ♀ = Q4188 (sexual); ♂ = Q4117 (apomítico)

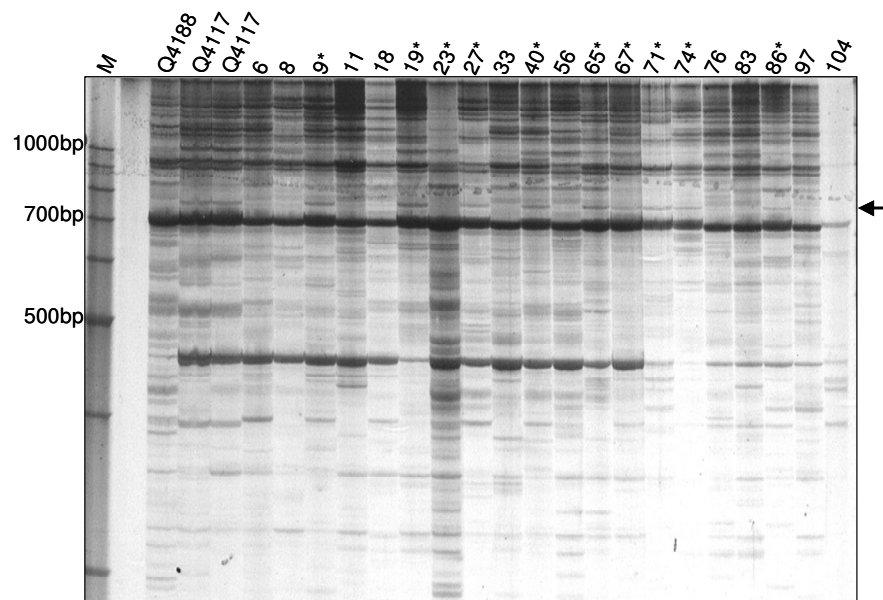


**Figura 35.** Gel de acrilamida al 5%. Validación caminata cromosomal del marcador I3. Combinación I3F – I3\_10A\_R2. \* F<sub>1</sub> apomícticos.

Los resultados obtenidos indican una naturaleza repetitiva del entorno de los marcadores de AFLP (I3 y J7) a partir de los cuales se realizó y validó el aislamiento de sus secuencias adyacentes. Aunque en algunas de las amplificaciones a partir de los genotipos parentales de la población se observó el fragmento del tamaño esperado solo en el genotipo apomíctico (Q4117), indicados con las flechas mas grandes (Figura 34), dicho polimorfismo no pudo ser asociado a la apomixis cuando se ensayaron sobre la población segregante por el modo de reproducción.

A partir de la combinación I3R - I3\_5B\_F1 se identificó una banda de 764 bp presente solo en los individuos apomícticos (Figura 36). La misma fue clonada y secuenciada. El análisis de homología de secuencia mostró homología con una región rica en AT de un clon de *Arabidopsis thaliana* (gblAC006429.4) ( $E = 7e^{-04}$ ) (NCBI) y

con una proteína expresada (At1g01690) sobre la base de datos del TIGR (Blastn) ( $E = 1.6 \times 10^{-3}$ ). En este mismo análisis sobre el genoma de arroz (Gramene) se observaron 15 hits ( $E < 0.1$ ), siendo los dos más significativos localizados en el cromosoma 12 de la especie. Con un valor de  $E = 2.9 \times 10^{-4}$ , este fragmento presentó homología con una región intrónica de una anquirina (LOC\_Os12g12810.1). Este tipo de proteínas han sido relacionadas con interacciones proteína-proteína, regulación del ciclo celular, diferenciación celular y desarrollo embrionario.



**Figura 36.** Gel de acrilamida al 5 %. Validación caminata cromosomal del marcador I3. Combinación I3 R - I3\_5B\_F1. \* F<sub>1</sub> apomíticos. La flecha indica la banda de 764 bp ligada a la apomixis en *P. notatum*.

## V DISCUSION

### V.1 Estudio global de la metilación de citosinas en el genoma de *Paspalum notatum*

#### V.1.1 Estimación de las proporciones relativas de secuencias CCGG metiladas en citotipos diploides y tetraploides de *Paspalum notatum*.

Mediante la técnica de MSAP (“*Methylation Sensitive Amplification Polymorphism*”) se investigó el estado y las proporciones relativas de los sitios CCGG metilados en el genoma de *Paspalum notatum*. Estas determinaciones se basaron en la comparación visual de los fragmentos generados a partir del par de isoesquizómeros *HpaII* y *MspI* que poseen sensibilidad diferencial a la metilación de citosinas. Estos isoesquizómeros son inhibidos por la metilación del sitio de reconocimiento. *HpaII* se inactiva si alguna de la citosinas del sitio se encuentra completamente metilada (ambas hebras), mientras que *MspI* se bloquea ante la metilación de la citosina externa. Por otro lado *HpaII*, puede restringir la hebra no metilada de una secuencia blanco hemimetilada (una sola hebra) en la citosina externa. En este caso, la eficiencia del corte es menor (Walder et al. 1983, Tardy-Planechaud et al. 1997). Por lo tanto, los fragmentos amplificados en la digestión con *EcoRI/MspI* y no amplificados en *EcoRI/HpaII*, son debidos a la metilación completa de la citosina interna y los marcadores que aparecen luego de la amplificación del producto de la digestión con *EcoRI/HpaII* y que están ausentes en *EcoRI/MspI* provienen de la hemi-metilación de citosinas externas. Un producto presente en ambas calles y con una intensidad relativamente similar fue identificado como un sitio CCGG no metilado. Esta metodología combina las ventajas de la técnica de AFLP que permite la visualización de un gran numero de marcadores por experimento y el estudio del estado de metilación de citosinas del sitio de

restricción específico de estas enzimas (CCGG), permitiendo realizar un estudio a nivel global de la metilación del ADN.

Los MSAPs han sido descriptos como marcadores altamente eficientes para la detección de metilación de citosinas a gran escala (Reyna-Lopez et al. 1997, Xiong et al. 1999). Sin embargo es importante tener en cuenta que esta técnica presenta algunas limitaciones que se relacionan con: i) la pequeña proporción de citosinas del genoma que se analizan ya que solo se estudian las citosinas de los sitios CCGG y ii) que existen estados de metilación no distinguibles por la misma. Por ejemplo no es posible diferenciar los sitios CCGG no metilados de los sitios hemi-metilados en la citosina interna ( $C^m$ CCGG), como así tampoco los sitios completamente metilados en ambas citosinas de los sitios completamente metilados en la citosina externa. Pese a todo esto, esta técnica ha demostrado ser muy eficiente para la detección a gran escala de la metilación del ADN en varias especies vegetales (Ashikawa et al. 2001, Cervera et al. 2002, Salmon et al. 2005, 2008, Marfil et al. 2009).

En nuestro estudio los patrones de metilación de cada genotipo fueron analizados cuantificando y comparando los productos de amplificación del ADN genómico luego de ambas digestiones (*EcoRI/HpaII* y *EcoRI/MspI*) sembradas una al lado de la otra. La aplicación de esta técnica reveló un importante nivel de metilación del genoma de *P. notatum*. En promedio 37,7 % del total de bandas consideradas en el análisis derivaron de sitios CCGG metilados. Este valor promedio es comparable con los observados en *A. thaliana* (35 % - 43 %) (Cervera et al. 2002), aunque menor al descrito por Salmon et al. (2008) en diferentes líneas de *Brassica oleracea* (52 % - 60 %) y mayor al encontrado en otras especies como *Spartina* (10 %) (Salmon et al. 2005), trigo (Shaked et al. 2001), arroz (16 %) (Xiong et al. 1999, Ashikawa, 2001, Takata et al. 2005) y *Elaeis guineensis* Jack. (19 %) (Jaligot et al. 2004).

Se ha observado que en función de la sensibilidad diferencial que presentan los isoesquizómeros *HpaII* y *MspI* la probabilidad de que un sitio CCGG metilado sea digerido por la enzima *HpaII* es menor que para *MspI*. De esta manera se deben esperar una mayor cantidad de fragmentos *EcoRI/MspI* en los patrones MSAP. Coincidentemente con esto, en todos los genotipos analizados se observó que la metilación completa de la citosina interna ocurre con mayor frecuencia que la hemimetilación de la citosina externa en el genoma de *P. notatum* (Tabla 2). Si bien el nivel global de metilación en ambos grupos analizados resultó semejante, la comparación del número total de bandas derivadas de sitios metilados y no metilados de los citotipos diploides y tetraploides mostró diferencias significativas (Ji: XXX  $p < 0.001$ ). Este resultado indica que existen diferencias en los niveles de metilación entre ambos citotipos, al menos en el grupo de genotipos analizados en este trabajo. Esto podría resolverse mediante el análisis de un mayor número de genotipos diploides y tetraploides, y determinando el grado de relación entre las proporciones de metilación y el nivel de ploidía.

### V.1.2 Evaluación de la variación en los citotipos diploides y tetraploides

A partir del análisis de los patrones de metilación de los genotipos pertenecientes a cada grupo se construyeron las matrices de MSP y MIP utilizando el coeficiente de *Jaccard*. Los coeficientes de asociación más utilizados para el análisis de similitud entre individuos a partir de marcadores moleculares dominantes son *Simple Matching* (SM) (Sokal y Michener 1958), *Sorensen-Dice* (SD) (Sorensen 1948, Dice 1945) y *Jaccard* (J) (Jaccard 1908). Debido a que los datos que se generan con este tipo de marcadores son de presencia/ausencia, un criterio válido es considerar que dos muestras son más parecidas cuanto mas “presencias” (unos) compartan, y que la coincidencia de “ausencias” (ceros) no aportaría a la similitud ya que no se puede asegurar exactamente

que las causas de la ausencia sean las mismas (Winzer et al. 2004). Los coeficientes de *Dice* y *Jaccard* comparten este criterio y se puede probar que *Jaccard* siempre dará un valor de asociación menor que *Dice*, salvo cuando toman el valor 0 ó 1, caso en que siempre coinciden. Más aún, ambos están relacionados mediante la ecuación  $J = D/(2-D)$  ó  $D = 2J/(1+J)$ . Esta relación tiene como consecuencia que en un análisis de agrupamiento muestren los mismos grupos, sólo que con distintos valores de asociación. Según la codificación utilizada para los marcadores MSAP (Cervera et al. 2002), el coeficiente de *Jaccard* resultó ser el mas adecuado ya que la ausencia de estos marcadores en ambas digestiones (*E/H* y *E/M*) de una dada muestra puede ser el resultado de una metilación completa del sitio CCGG o de la ausencia del sitio de restricción.

La variabilidad identificada a través de los polimorfismos sensibles a metilación y estimada a partir de los porcentaje de las distancias ( $1-J_{ep}$ ) en el grupo diploide estuvo comprendida entre un 17 % (3-Cay - 6-Cay) y un 30 % (Tifton9 – 6-Cay), mientras que en el grupo tetraploide entre un 44 % (Q4117 – N160) y un 54 % (Q4188 – N160). Estos resultados indican que el patrón de sitios CCGG metilados en este ultimo grupo es mas variable. De la misma manera, mediante la comparación de los coeficientes de similitud entre los dos grupos de plantas se observó que la similitud promedio ( $\bar{J}_{epi} = 0,76$ ) del grupo diploide resultó significativamente mayor que la del grupo tetraploide ( $\bar{J}_{epi} = 0,52$ ) ( $t = 9,06$ ,  $p_{(2\text{ colas})} = 3,9 \times 10^{-06}$ ) confirmando así que estos últimos son más diversos en cuanto a los patrones de metilación de citosinas.

De los 4 genotipos tetraploides analizados dos eran apomíticos naturales (Q4117 y N160) mientras que los otros dos eran individuos sexuales obtenidos de manera experimental (Q4188 y Q2405). A partir del análisis de agrupamiento según las similitudes de sitios metilados incluyendo ambos niveles de ploidía (Figura 8) se

observó que los individuos apomícticos agruparon con un soporte bootstrap moderado (68,4 %) indicando una posible estructura epigenética común asociada al modo de reproducción. Se ha determinado que la región genómica específica de la aposporía en *P. notatum* incluye citosinas metiladas (ver mas adelante). Sin embargo, a partir de estos resultados no es posible determinar si se trata de una metilación específica de secuencias del locus o de un cambio global en la metilación de los citotipos tetraploides apomícticos. Por otro lado, los genotipos tetraploides sexuales, Q4188 y Q4205, derivados del mismo progenitor femenino no presentaron una estructura común ya que en ninguno de los dendrogramas generados agruparon juntos. Un resultado notable es que la planta Q4205 mostró una proporción de sitios metilados que se desvía del promedio del grupo tetraploide y no difiere significativamente de las proporciones del grupo diploide. Además, cuando se llevaron a cabo los análisis de similitud a partir de los marcadores sensibles a metilación comunes a los dos niveles de ploidía, Q4205 agrupó significativamente (valor P del bootstrap 81,0 %) con los genotipos diploides (Figura 8). Este resultado indica que Q4205 no solo presenta una proporción similar de sitios metilados con los diploides sino que también comparte la estructura epigenética. Teniendo en cuenta el origen Q4205 (obtenida por autofecundación de un tetraploide altamente sexual, Figura 2) podría haber ocurrido que esta planta hubiese retenido la misma estructura epigenética que los diploides luego de la tetraploidización. Por el contrario Q4188, que derivada de un cruzamiento con un apomíctico natural (ver materiales y métodos) podría haber sufrido un cambio en el patrón de metilación generalizado como consecuencia de la aceptación de una gameta masculina derivada de este genotipo apomíctico. Por lo tanto, en esta parte del trabajo no fue posible detectar una relación directa entre la metilación y el modo de reproducción. Se deben llevar a cabo nuevos experimentos, principalmente focalizados en el estudio del estado de



metilación de la región genómica que gobierna la apomixis en la especie para determinar esta cuestión.

A partir de los marcadores sensibles a metilación ensayados en todos los genotipos (2x y 4x) se identificó un grupo de marcadores (18,9 %) que presentaban un estado de metilación específico del nivel de ploidía y que se alteraban con el cambio de la misma (en al menos un genotipo). Aunque, una variación en la secuencia nucleotídica no puede ser descartada, resultados similares fueron obtenidos con las serie experimental C4-2x y C4-4x (ver mas adelante). Este resultado podría estar indicando la modificación de secuencias específicas como consecuencia del cambio en el nivel de ploidía.

Se realizó un análisis de similitud utilizando marcadores insensibles a la metilación (MIPs). Es de destacar que el análisis de similitud realizado con estos marcadores muestra solo una fracción de la diversidad genética presente en las muestras analizadas ya que algunos de los polimorfismos que se observan pueden derivar de un origen no-genético (metilación completa de los sitios CCGG). Por lo tanto los resultados que se presentan deben analizarse como una estimación de la “mínima variación genética” presente en un grupo de genotipos. En esta parte del trabajo los resultados mostraron que en el grupo diploide los dos individuos más similares fueron 3-Cay y 6-Cay, ambos pertenecientes a la misma población natural, por lo que se espera que presenten más alelos en común que con los otros dos genotipos del grupo, uno obtenido de otra población natural ubicada a 150 km de distancia (Q4175) y el otro de EEUU (Tifton 9). Asimismo, el análisis de polimorfismos insensibles a metilación en el grupo tetraploide mostró un grupo formado por los individuos Q4117 y N160 apomícticos naturales que a su vez agruparon con la planta Q4205. Los valores de similitud “no-epigenética” promedio detectados en este trabajo resultaron similares a los

previamente identificados por Daurelio et al. (2004) y Espinoza et al. (2006) a partir de una caracterización genética detallada de un amplio grupo de razas diploides y tetraploides de la especie realizado con marcadores RAPD y AFLP. Por otro lado, estos marcadores diferenciaron los genotipos en relación al nivel de ploidía. En un trabajo realizado en papa (2x) de origen híbrido, Marfil et al. (2009) analizaron la inestabilidad fenotípica, evidenciada a través de malformaciones florales, la inestabilidad genética y la variabilidad epigenética entre estas plantas. Las bandas MSAP fueron clasificadas como “sensibles a metilación” e “insensibles a metilación” de manera de asegurarse que los polimorfismos sensibles a metilación observados fueran debidos exclusivamente a cambios en la metilación y no a cambios genéticos en el sitio de reconocimiento de los isoesquizómeros *HpaII* y *MspI*. Los polimorfismos “insensibles a metilación”, al igual que los datos del análisis de AFLP, fueron empleados para estudiar la diversidad genética entre las plantas ya que con ambos marcadores los autores obtuvieron resultados semejantes. Finalmente, con los resultados obtenidos en este trabajo de tesis se puede concluir que los marcadores MIP fueron adecuados para la determinación de las relaciones no-epigenéticas entre los genotipos, por lo que fue posible comparar los datos epigenéticos con los datos no-epigenéticos derivados del mismo sistema experimental.

Por último, resultó muy interesante que en los dos grupos analizados los individuos más similares epigenéticamente resultaron también los más similares cuando se analizaron los datos derivados de los polimorfismos insensibles a metilación (MIPs). Este resultado, basado en las distancias calculadas, indicaría que los patrones epigenéticos estarían asociados con el “fondo genético” en ambos niveles de ploidía.

### V.1.3 Correlación entre las variaciones sensibles e insensibles a metilación de los citotipos diploides y tetraploides

Con el fin de determinar si las variaciones observadas en los patrones de amplificación de los marcadores sensibles a metilación (MSP) se encuentran relacionadas con la variación detectada por los marcadores insensibles a la metilación (MIP) se realizó un análisis de correlación entre las matrices MSP y MIP para cada grupo. La ausencia de correlación entre ambas matrices indicaría que estas dos variables tendrían un mecanismo de regulación independiente, mientras que correlaciones significativas podrían indicar la existencia de mecanismos comunes de regulación.

En la bibliografía existen varios trabajos en los que se realizaron comparaciones entre variabilidad genética y epigenética, pero cada uno debe ser analizado particularmente. Cervera et al. (2002) compararon las matrices de similitud MSP y MIP generadas a partir de la técnica de MSAP sobre 10 ecotipos de *A. thaliana*. Los autores no encontraron correlación ( $r = 0,17$ ;  $p > 0,15$ ) entre los polimorfismos (epigenéticos y no-epigenéticos) y postularon que los mecanismos de regulación de la metilación no estarían relacionados con la variación en la secuencia nucleotídica. De la misma manera, Salmon et al. (2008) no obtuvieron correlación significativa entre los dendrogramas (MSAP y AFLP) ( $r = 0,20$ ) a partir del análisis de 30 líneas de *Brassica oleracea* y postularon que los diferentes agrupamientos pudieron deberse a un diferente tipo de regulación o rutas de modificaciones entre estos dos tipos de polimorfismos. Mas recientemente, Li et al. (2007) estudiaron los cambios genéticos y epigenéticos debidas al cultivo de tejidos en cebada (*Hordeum brevisubulatum*) mediante la utilización de tres tipos de marcadores moleculares (AFLP, S-SAP y MSAP). Los análisis de correlación entre las inestabilidades genéticas y epigenéticas mostraron que existía una correlación significativa entre MSAP y S-SAP ( $r = 0,81$ ;  $p < 0,05$ ) mientras

que la correlación entre MSAP y AFLP no resultó significativa ( $r = 0,105$ ). Con estos resultados especulan con la posibilidad de que la correlación entre estabildades genéticas y epigenéticas existiría solo para ciertas regiones genómicas, ya que la técnica de S-SAP (“*Sequence Specific Amplified Polymorphism*”) (Waugh et al. 1997) es un sistema de marcadores basado en retrotransposones que amplifica fragmentos de restricción con secuencias LTR (“*Long tandem repeats*”). Coincidentemente, Rabinowicz et al. (2005) determinaron que en las plantas las citosinas metiladas no estarían distribuidas uniformemente a lo largo del genoma, sino que existirían regiones con transposones y retrotransposones fuertemente metiladas y regiones génicas libres de metilación. Por otro lado, Guo et al. (2007) llevaron a cabo un trabajo para determinar alteraciones específicas en la metilación del ADN debidas al cultivo de tejido en *Codonopsis lanceolata*. El objetivo principal consistió en detectar si existía alguna correlación entre las alteraciones epigenéticas detectadas por MSAP y los cambios genéticos detectados a través de marcadores RAPD e ISSR. Mediante la comparación de las matrices de similitud observaron una correlación significativa entre los tres tipos de marcadores ( $r = 0,78$ ;  $p < 0,01$  y  $r = 0,93$ ;  $p < 0,01$ ). Aunque esta información no permite identificar alguna posible relación causal entre los cambios genéticos y epigenéticos, los autores infieren a partir de estudios en animales (Suzuki et al. 2006, Kaup et al. 2006) que las alteraciones en la metilación del ADN probablemente ocurran antes y mas rápidamente que los cambios genéticos. Las alteraciones en la metilación del ADN podrían tener efectos mutagénicos. Por ejemplo, estas alteraciones podrían afectar la formación de la heterocromatina y la duración de la replicación, lo que causaría rupturas de cromosomas y con ello diferentes tipos de aberraciones. Mas específicamente, Ochogavía et al. (2009) luego de analizar la variación en los patrones de metilación (MSAP) asociada al nivel de ploidía en *Eragrostis curvula* compararon

sus resultados con datos genéticos y de expresión previamente obtenidos a partir de las mismas plantas. La comparación entre los datos genéticos y epigenéticos mostró una correlación positiva entre estos dos tipos de variaciones ( $r = 0,5$ ;  $p < 0,0001$ ).

La existencia de una correlación significativa entre la variabilidad detectada a partir de los polimorfismos sensibles a metilación y la variabilidad detectada a partir de los polimorfismos insensibles a metilación en los dos niveles de ploidía de *P. notatum* indicarían que los cambios en la metilación del ADN ocurrirían de alguna manera asociados a los cambios en la secuencia de ADN, aunque no es posible inferir una relación causal entre ambos fenómenos. El enfoque anónimo utilizado para medir la variabilidad sólo permite estimar la correlación general entre estas variables, pero no proporciona información sobre el estado genético/epigenético de cada gen activado o reprimido asociado al cambio de ploidía. En nuestro sistema experimental esta correlación podría ser consecuencia de las modificaciones epigenéticas ocurridas en los poliploides para mantener la actividad genómica a este nivel de ploidía. Se sabe que la poliploidización se encuentra asociada a cambios en los patrones de metilación de manera de preparar al genoma a un incremento en el contenido total de ADN del núcleo (Rapp y Wendel 2005, Wang et al. 2004). Este tipo de modificaciones aumentaría la variación del *epigenoma* entre los genotipos sin presentar una estructura específica asociada con el nivel de ploidía. Esto podría explicar por qué los tetraploides son más variables en cuanto a su patrón de metilación que los diploides, permitiendo modificar el *epigenoma* para adquirir nuevas funciones y mejorar su adaptación.

#### **V.1.4 Evaluación de la metilación de citosinas como resultado de la tetraploidización en *P. notatum* mediante experimentos de MSAP**

Como se ha mencionado anteriormente la metilación del ADN es un componente importante de los mecanismos epigenéticos que afectan directa o indirectamente la

expresión génica. Además de los estímulos ambientales implicados en cambios de patrones de metilación (Bond y Finnegan 2007), el estrés genómico provocado por los fenómenos de hibridación y poliploidización también pueden inducir este tipo de cambios (Adams y Wendel 2005). En *Arabidopsis*, algunos genes homólogos tanto de poliploides naturales como de poliploides recientemente generados fueron objeto de silenciamiento por mecanismos de metilación (Lee y Chen 2001, Comai et al. 2000). Los mismos se encontraban hiper-metilados y fueron reactivados luego del bloqueo de la maquinaria de metilación del ADN, lo que sugiere que la regulación epigenética estaría implicada en la expresión de genes en los genomas poliploides.

El estudio de la expresión génica en poliploides se ha incrementado notablemente en los últimos años, sin embargo la mayoría de ellos fueron llevados a cabo en alopoliploides. En estos casos la expresión génica no solo está afectada por el cambio de ploidía sino que también por la unión de dos genomas diferentes y muchas veces no es posible distinguir un efecto del otro. En alopoliploides de *Senecio* (Hegarty et al. 2006), *Brassica napus* (Albertin et al. 2007) y maíz (Auger et al. 2005) los estudios comparativos entre los híbridos y sus respectivos poliploides revelaron que la hibridación provocaba mayores efectos en la expresión génica que la duplicación genómica. De la misma manera, los cambios en los patrones de metilación tras la hibridación y aloidización son normalmente mucho más pronunciados que los que se observan luego de la duplicación genómica propiamente dicha (Salmon et al. 2005, Wang et al. 2006). Sin embargo, algunos cambios en los patrones de metilación en autopoliploides han sido observados. En *Arabidopsis*, Mittelsten Scheid et al. (1996 y 2003) observaron el silenciamiento asociado a metilación de un transgén de resistencia luego de la autotetraploidización.

Los poliploides sintéticos constituyen un excelente material genético para

análisis comparativos tanto de cambios genómicos, epigenéticos o de expresión génica en etapas tempranas de la formación de los mismos debido a que se conocen exactamente el o los progenitores (Chen y Ni 2006). En un estudio previo, las dos plantas empleadas en esta parte del trabajo de tesis C4-2x y C4-4x, fueron utilizadas para determinar las variaciones genéticas y alteraciones en la expresión de genes asociadas al cambio del nivel de ploidía en *P. notatum* (Martelotto et al. 2005, Martelotto et al. 2007). Inicialmente se realizó un estudio completo del transcriptoma de la flor a través del aislamiento de genes candidatos diferencialmente expresados entre las mismas. De aproximadamente 10.000 transcritos analizados al menos el 0,49 % de los genes sufrieron una alteración de su expresión inmediatamente después de la formación del autotetraploide (0,11 % regulados en baja y 0,38 % regulados en alta) (Martelotto et al. 2005). Los individuos C4-2x y C4-4x fueron generados mediante el tratamiento con colchicina durante el cultivo de tejido de explantos derivados de un genotipo diploide (Quarin et al. 2001). La colchicina es un agente antimitótico que impide la formación de las fibras del huso en la metafase que ha sido muy utilizada como inductor de la poliploidía en plantas. Es importante considerar si este tipo de tratamientos afecta de alguna manera la estructura del genoma y consecuentemente modifica la expresión génica. Ozkan et al. (2001) llevaron a cabo experimentos en trigo para dilucidar si las características de los poliploides sintéticos eran compartidas con la de los poliploides naturales. Al no observar diferencias significativas en el patrón de eliminación de secuencias entre los “colchiploides” y los poliploides naturales concluyeron que el cambio en la secuencias se debía a la alopoloidización y no al método de duplicación cromosómica, postulando que se trata de un fenómeno general para la estabilización de los nuevos alopoliploides. Recientemente, Lukens et al. (2006) observaron que la eliminación de secuencia ocurre con baja frecuencia en alopoliploides

de *Brassica napus* obtenidos mediante el tratamiento con colchicina y mediante duplicación espontánea. Sin embargo, observaron cambios epigenéticos (metilación CpG) cuya frecuencia y localización genómica se encontraban estrictamente reguladas. Todas estas observaciones sugieren que las modificaciones de la estructura genómica no estarían asociadas al tratamiento con colchicina y si relacionadas directamente con el cambio del nivel de ploidía. A partir de plantas diploides y tetraploides de *Hypericum perforatum*, Halusková et al. (2003) estudiaron diferencias en la expresión de los genes de ARNr manifestadas a través de cambios de metilación de los mismos. Al no identificar ninguna diferencia relacionada con la metilación del ADNr entre ambos niveles de ploidía, concluyeron que en este caso en particular el aumento de la dosis génica no provocaría silenciamiento génico asociado a metilación del ADN. Recientemente, con el fin de detectar posibles cambios genómicos y epigenéticos inducidos por la autoploidización se construyó una serie autoploidice (2x, 3x y 4x) de sandía (*Citrullus lanatus*). En estudios a nivel de todo el genoma no identificaron cambios genéticos al nivel triploide. Sin embargo, la estructura genómica del tetraploide cambió dramáticamente (40 %), con eliminaciones de secuencia como las mas predominantes (Wang et al. 2009). Por el contrario, la estimación de los niveles y patrones de metilación indicaron que los niveles de metilación del ADN no fueron significativamente diferentes entre el diploide y el autotetraploide, mientras que el autotriploide mostró una clara tendencia hacia un menor nivel de metilación. Por lo que los autores concluyeron que el nivel de metilación del ADN en los sitios de CCGG no se relaciona directamente con el nivel de ploidía en sandía.

Ochogavía et al. (2009) analizaron el estado global de metilación de una serie “4x-2x-4x” de *Eragrostis curvula* e identificaron polimorfismos sensibles a la metilación del ADN considerables durante la conversión entre los niveles de ploidía. Al



nivel diploide observaron un menor nivel de metilación y muchos de los cambios observados en la conversión 4x-2x, revertía cuando se restablecía el nivel 4x. Esto evidencia implicaría la existencia de un “epigenoma” característico de cada nivel de *ploidía* que afecta a un grupo de loci en particular en esta especie.

Recientemente, Martelotto et al. (2007) analizaron y compararon la variación de la estructura genómica luego del incremento del nivel de *ploidía* en dos sistemas diferentes de *Paspalum*. Por un lado, en genotipos tetraploides y hexaploides de *P. rufum* identificaron 15-23 % de polimorfismos asociados al cambio en el nivel de *ploidía*. Mientras que los cambios de secuencia asociados al aumento de *ploidía* en C4-2x y C4-4x (colchiploide) fue de 9,55 %. Todos estos resultados indican que poco después de la poliploidización, ya sea naturalmente o inducido por colchicina, una fracción del genoma de *Paspalum* sp. experimenta modificaciones genéticas. Otro resultado interesante, obtenido a través de hibridaciones tipo *Southern blot* con enzimas de restricción sensibles a metilación y fragmentos polimórficos entre C4-2x y C4-4x, indicó que las regiones modificadas genéticamente se encontraban metiladas. Sin embargo, los estados de metilación de esos *loci* en particular, no sufrieron ningún cambio luego de la duplicación genómica. A partir de estos resultados surge la idea de llevar a cabo una caracterización global del estado de metilación del genoma de estas dos plantas mediante la técnica de MSAP, y así poder determinar si un cambio en el nivel de *ploidía* induce metilación “*de novo*” luego de un evento de autoploidización en *Paspalum notatum*.

Los patrones de amplificación MSAP generados a partir de C4-2x y C4-4x fueron clasificados en 5 grupos diferentes. Los dos grupos monomórficos, derivados de sitios no metilados (A) como así también derivados de sitios metilados (B1 y B2) que no sufrieron ningún cambio luego de la duplicación constituyeron el 96,6 % de los

fragmentos analizados. Se puede concluir que en *Paspalum notatum* el aumento del nivel de ploidía no modificaría drásticamente la estructura de grandes regiones cromosómicas y ni la expresión genética de un gran número de genes, sin embargo si afectaría genes específicos que podrían estar asociados a la adecuación de la expresión génica en un entorno poliploide. En este trabajo de tesis fue posible observar cambios en la metilación de citosinas directamente asociados al cambio en el nivel de ploidía en *P. notatum*. Estos sitios polimórficos, pertenecientes a las clases D y H (Tabla 11), fueron generados a partir de cambios debidos a demetilaciones o hipermetilaciones respectivamente. En total representaron un 2,3 % de los sitios analizados y los más preponderantes fueron los de clase D (1,7 %) indicando que las demetilaciones ocurren con mayor frecuencia y con ellas ocurriría una mayor desrepresión génica. En general, aunque se conoce poco acerca del destino de los genes duplicados, una hipótesis generalizada indica que cada copia homóloga de los genes no contribuiría necesariamente de la misma manera al transcriptoma global generándose así la inactivación de la transcripción denominada "silenciamiento génico homólogo" (Matzke y Matzke 1995). Junto a esos resultados, es evidente que la poliploidización en *P. notatum* se encuentra asociada con cambios a nivel tanto genético como epigenético. Debido a que estas dos plantas se reproducen por sexualidad, en este caso la tetraploidización y los cambios antes mencionados no afectaron el modo de reproducción en la especie.

#### V.1.5 Análisis de las secuencias MSAP

Con el objetivo de caracterizar los fragmentos de MSAP obtenidos en esta parte del trabajo se realizaron análisis de secuencias de marcadores que presentaban distintos patrones de amplificación entre genotipos (Q4188 y Q4117 y entre el par C4-2x y C4-4x) y dentro de cada genotipo entre los isoesquizómeros (*HpaII* y *MspI*). Se incluyeron

además patrones MSAP característicos de sitios no metilados como así también sitios igualmente metilados entre los genotipos analizados. Los análisis de secuencia revelaron que los marcadores correspondieron tanto a regiones codificantes como no-codificantes. Los análisis Blast de 9 bandas MSAP que representaban diferentes patrones de metilación entre los genotipos Q4188 y Q4117 mostraron correspondencia con diferentes secuencias génicas entre las que se encuentran: At1g73600 (fosfoetanolamina N-metiltransferasa de *A. thaliana*), At4g02780 (copalyl diphosphate synthase de *A. thaliana*) y LOC\_Os12g06380 (transposon protein de *Sorghum bicolor*) (Tabla 12). Para las secuencias derivadas de los marcadores B11, C19, D3 y F18 no pudo asignarse homología con genes de función conocida, lo cual indicaría que se trata de regiones no codificantes. En particular uno de los fragmentos estudiados (secuencia E8) mostró homología con genes de elementos transposables y un alto número de copias en arroz. El patrón de amplificación de este fragmento (0011) indica que el sitio blanco de las enzimas *HpaII* y *MspI* se encuentra totalmente metilado o es inexistente en el genotipo Q4188 y que está demetilado en el genotipo Q4117. En este caso si bien la técnica empleada no permite diferenciar si este polimorfismo deriva de una causa no epigenética (ausencia de la secuencia blanco) podría representar la demetilación de un sitio repetitivo. Por otro lado un caso similar al anterior aparece en el análisis del fragmento G17 (patrón 0111). La secuencia de este marcador presentó homología con una presunta proteína de un retrotransposón y el polimorfismo entre Q4188 y Q4117 también se generó tras la demetilación de la secuencia blanco. Sorprendentemente, esta secuencia solo presenta 3 sitios homólogos en el genoma de arroz. Este resultado podría deberse a que solo una parte de la secuencia codificante ha sido secuenciada y/o el nivel de astringencia del análisis *in silico* (parámetros por defecto) resultó demasiado alto.

En los casos en donde se observó el mismo patrón de metilación en ambos

genotipos (fragmentos B11 y C19) no pudo asignarse función conocida. Por su parte, a partir de los fragmentos derivados de patrones de metilación 0100 (fragmentos F16 y F18) que podrían corresponder a secuencias hipermetiladas en el genotipo Q4117 (o a la pérdida del sitio), solo F16 presentó homología con una enzima involucrada en la biosíntesis de gibelerinas. Entre las secuencias anotadas a partir de los diferentes patrones de metilación entre los genotipos C4-2x y C4-4x, pueden citarse los genes: LOC\_Os03g39210 (retrotransposon protein, putative, unclassified), At3g04910 (protein kinase) y LOC\_Os05g12550 (retrotransposon, putative, centromere-specific) (Tabla 13). El primero de ellos proveniente de un sitio igualmente metilado en ambos genotipos (0101), mientras que la proteína quinasa y el retrotransposón de arroz específico de centrómero se encuentran demetilados en el genotipo tetraploide (0011 y 0111) y relacionados directamente con el cambio en el nivel de ploidía.

La eficiencia y confiabilidad de la técnica de MSAP ha sido verificada mediante “Southern Blot” y análisis de secuencias en arroz (Xiong et al. 1999), *Arabidopsis* (Cervera et al. 2002), colza (Guagyuan et al. 2006), *Codonopsis lanceolata* (Guo et al. 2007). Los resultados en este trabajo de tesis mostraron que todas las secuencias analizadas fueron relativamente grandes (185–484 bp). Asimismo, solo fueron tenidas en cuenta las secuencias que presentaron homologías del 95 % entre tres clones del mismo inserto y con lecturas de secuencia de alta calidad. Es conocido que la presencia de sitios internos CCGG en las secuencias de los marcadores MSAP conduce a una subestimación de los niveles de metilación detectados por la técnica (Cervera et al. 2002, Guo et al. 2007). La hipermetilación de estos sitios inhibe la restricción del ADN por ambas enzimas sensibles a metilación y por lo tanto impide la posterior amplificación con los cebadores específicos. El análisis de restricción de las secuencias caracterizadas en nuestro estudio no detectó ninguna secuencia interna de este tipo en

las 14 secuencias analizadas. Cervera et al. (2002), en su trabajo sobre 10 ecotipos de *Arabidopsis thaliana*, a partir de 7 bandas polimórficas (*EcoRI/HpaII* vs. *EcoRI/MspI*) y 5 bandas que no presentaron polimorfismos entre ambas amplificaciones, observaron una sola secuencia con sitios internos CCGG (8 %). En un trabajo dedicado a estudiar las inestabilidades genéticas y epigenéticas inducidas por el cultivo de tejido en *Hordeum brevisubulatum* se encontró que el 19 % de las bandas contenían sitios internos CCGG (Li et al. 2007). A partir del estudio de la herencia y variación de los niveles y patrones de metilación en híbridos de maíz 14 de las 66 bandas analizadas (21 %) resultaron con sitios internos CCGG (Zhao et al. 2007). Mayores cantidades de este tipo de bandas fueron identificadas en la determinación de alteraciones epigenéticas debidas al cultivo de tejidos en *Codonopsis lanceolata* (25 %) (Guo et al. 2007) y en el estudio de la estabilidad en la metilación del ADN en distintos tejidos de *Sorghum bicolor* (30 %) (Zhang et al. 2007). Estos antecedentes demuestran que existe una gran variabilidad entre las especies y no es posible hacer una generalización. Sin embargo, la ausencia de bandas con sitios internos CCGG derivadas de los experimentos de MSAP en *Paspalum* y el relativamente bajo porcentaje de este tipo de fragmentos detectados en otras especies, indicaría que una buena proporción de los sitios CCGG puede evaluarse por medio de esta técnica. Junto a esto, la ausencia de fragmentos derivados de homodigestiones *EcoRI-EcoRI*, *HpaII/MspI-HpaII/MspI* también aportaron evidencia que los niveles globales de metilación detectados por esta técnica no fueron subestimados, al menos por estas causas.

Teniendo en cuenta todas las secuencias analizadas, derivadas tanto de la comparación de patrones Q4188/Q4117 como de C4-2x/C4-4x se observó que las homologías de secuencias derivadas de fragmentos monomórficos no metilados (patrón A, Tablas 12 y 13) y metilados (patrones B y C, Tablas 12 y 13) incluyeron dos

proteínas y un retrotransposón (At1g73600, ref|XM\_002440910.1| y LOC\_Os03g39210). Por otro lado, las secuencias diferencialmente metiladas (patrones D, E, F y G, Tablas 12 y 13) también presentaron homologías con proteínas (At4g02780 y At3g04910), elementos repetitivos, transposones y retrotransposones (ORSiTEM00100011, LOC\_Os12g06380 y LOC\_Os05g12550.1). Por último, los fragmentos derivados del patrón G (0111) (Tablas 12 y 13), indicativo de una demetilación en los genotipos Q4117 y C4-4x se observaron asociaciones solo con transposones.

Las plantas protegen sus genes mediante la metilación de los elementos transponibles (Zilberman y Henikoff, 2004), ya que los mismos son secuencias de ADN con la capacidad de moverse a diferentes lugares del genoma. Se asume que en el genoma de las mismas, a diferencia de los genes, estos elementos se encuentran hipermetilados y con ello epigenéticamente silenciados (Martienssen 1998, Rabinowicz et al. 2003). En algunas especies de plantas, los patrones de metilación cambian dramáticamente durante la formación de poliploides (Shaked et al. 2001, Madlung et al. 2002). En poliploides de trigo recién sintetizados se observaron muchos cambios de metilación a lo largo del todo el genoma, principalmente demetilaciones de retrotransposones (Shaked et al. 2001). Estas demetilaciones pueden activar los elementos móviles que se encontraban inactivos a nivel transcripcional o incluso transposicional (Liu y Wendel 2003). Como los mismos suelen tener un elevado número de copias y están distribuidos a lo largo de todo el genoma, su activación puede generar un impacto significativo en el transcriptoma de los poliploides. Parte de estos fenómenos fueron observados en *P. notatum*. Es de destacar que varios fragmentos demetilados mostraron homología con elementos móviles. Una activación de los mismos puede llevar a cambios genéticos y a modificar la estructura del transcriptoma

en los tetraploides para mejorar su adaptación al ambiente.

### **V.1.6 Localización de marcadores MSAP en el genoma de *Paspalum notatum***

Los mapas de ligamiento de *P. notatum* obtenidos previamente por Stein et al. (2007) constituyen los primeros mapas marco genéticos disponibles de razas tetraploides de la especie. Los mismos fueron utilizados para un estudio preliminar de la distribución de marcadores epigenéticos en el genoma de esta especie. A diferencia de los mamíferos, en las plantas la metilación de citosinas se hereda a través de las generaciones (Kakutani 2002). Los alelos epigenéticos o “epialelos” se definen como secuencias nucleotídicas idénticas que difieren en el número o distribución de sus nucleótidos metilados. En las plantas los diferentes “epialelos” pueden originar distintos fenotipos (Kalisz y Purugganan 2004). En general, son mitóticamente y meióticamente estables (Kakutani 2002). La replicación de las secuencias de ADN metiladas resulta en la producción de cadenas hijas hemi-metiladas. La metilación completa de las dos hebras ocurre posteriormente ya que las células poseen la maquinaria necesaria para metilar los nucleótidos basándose en el estado de metilación de la hebra complementaria. Este sería básicamente el mecanismo para la herencia de los patrones de metilación ya sea al nivel de célula o de organismo (revisado en Kalisz y Purugganan 2004). Los epialelos pueden ser alterados (activados o silenciados) en respuesta a varios estreses genómicos y ambientales, incluyendo la poliploidización (revisado en Finnegan 2002). En *A. thaliana*, Mittelsten Scheid et al. (2003) describieron un epialelo de un locus transgénico generado tras un fenómeno de tetraploidización. Las plantas diploides transgénicas portando el gen marcador de resistencia a higromicina (HPT) mostraron una transmisión estable del mismo a lo largo de muchas generaciones. Sin embargo, los individuos tetraploides generaron progenie con este gen “establemente” silenciado.

Recientemente, Baubec et al. (2010) denominaron a este fenómeno “silenciamiento génico transcripcional asociado a la poliploidía o *paTGS*” y demostraron que dos marcas epigenéticas, metilación del ADN y metilación de histonas, cooperan para dar lugar a un doble bloqueo sobre el silenciamiento de la expresión génica. Este estado epigenético extremadamente estable podría ser una característica general del “*paTGS*” y explicaría por que los poliploides que generan nuevos “epialelos” representan estados muy estables que no revierten fácilmente (Eckardt 2010).

En este trabajo se llevó a cabo la localización de cinco “epialelos” y seis marcadores insensibles a metilación en el genoma de *P. notatum*. La escasa cantidad de marcadores que fueron incluidos en este análisis se debió a que además de identificar marcadores diferencialmente metilados entre los individuos parentales de la población, los mismos deben segregarse en una relación 1:1 en la población de mapeo. Este requerimiento sería la principal limitante de este tipo de estudios tanto en *Paspalum* como en otras especies. Sin embargo en los pocos casos evaluados se observó que estos epialelos se heredan como marcadores genéticos mendelianos y que se distribuyeron en distintos lugares del genoma (cromosomas F1a, F5a, M3b y M9a). En un trabajo muy completo en arroz se estudió la herencia de los patrones de metilación específicos de cultivar a través de las generaciones (Ashikawa et al. 2001). El mismo fue llevado a cabo mediante experimentos MSAP y análisis de RFLPs con los fragmentos MSAP utilizados como sondas. Específicamente relacionado a la herencia de estos polimorfismos, y con el fin de detectar si el estado de metilación se transmite de una manera alelo-específica, utilizaron 56 líneas BC<sub>1</sub>F<sub>5</sub> de unas BILs (“*Backcross Inbred Lines*”) derivadas de una retrocruza entre los cultivares Nipponbare y Kasalath. Los autores concluyeron que el estado de metilación de los sitios CpGs en el genoma de arroz es heredado a través de las generaciones en forma más o menos estable. Esto



coincidió con la herencia de estos polimorfismos epigenéticos en *A. thaliana* (Finnegan et al. 1996, Kakutani et al. 1999). Finalmente, para estudiar la distribución de los polimorfismos epigenéticos en los cromosomas de arroz, mapearon diferentes tipos de sondas utilizando las BILs de arroz como población de mapeo e identificaron que las sondas provenientes de una metilación diferencial entre los parentales se ubicaron en 5 cromosomas diferentes (Ashikawa et al. 2001). Recientemente, Duan et al. (2009) construyeron un mapa de ligamiento genético basado marcadores MSAP y SSR en *Sorghum bicolor* (L.). Los autores realizaron el análisis de los marcadores MSAP a partir de las digestiones *EcoRI/HpaII* y *EcoRI/MspI* por separado. Utilizaron 84 combinaciones selectivas de cebadores pero solo 26 de ellos revelaron polimorfismos entre los parentales de la población F<sub>2</sub> de mapeo. El mapa incluyó 11 grupos de ligamiento, y fue construido con 151 loci, de los cuales 122 fueron los marcadores MSAP (89 a partir de la digestión *EcoRI/MspI* y 33 de la digestión *EcoRI/HpaII*). El número de estos marcadores por cromosoma varió entre 0 y 33.

Debido a que *HpaII* y *MspI* presentan una sensibilidad diferencial a la metilación del sitio de reconocimiento, el agrupamiento de estos marcadores en los diferentes grupos de ligamiento representaría regiones donde el estado de la metilación del ADN variaría para inducir o suprimir la expresión génica. A pesar de que la técnica MSAP resultó poco útil para revelar polimorfismos epigenéticos entre los parentales de la población de mapeo, y considerando la existencia de nuevas técnicas (conversión con bisulfito y posterior secuenciación), la incorporación de estos marcadores a los mapas genéticos de las especies ayudaría a conectar la información sobre los sitios metilados con sus mapas físicos, lo que aceleraría el estudio de la epigenética y la heterosis en la especie. Las bases moleculares de la heterosis siguen sin ser comprendidas, y el posible

rol de la metilación del ADN sobre este fenómeno ha sido reportado para diferentes especies (Dong et al. 2006, Zhao et al. 2008).

En algodón, Zhao et al. (2008) estudiaron las diferencias en los patrones de metilación entre híbridos (heteróticos/no-heteróticos) y sus progenitores. Además, incluyeron la determinación del nivel de metilación en función del estado del desarrollo. Los autores identificaron que el número de *loci* demetilados fue mayor en los híbridos altamente heteróticos, y que el nivel de metilación en estado de plántula fue mayor que en la etapa de floración. Confirmaron los patrones de metilación en regiones genómicas mediante análisis tipo *Southern* e identificaron 39 fragmentos con patrones diferentes de metilación entre híbridos y padres, por lo que sugieren que estos genes podrían tener un papel importante en el desarrollo de heterosis. Con el objetivo de mapear genes que controlaban la variación en la concentración de proteínas de grano en *Hordeum vulgare*, la enzima sensible a metilación *HpaII*, demostró evitar el agrupamiento de marcadores de tipo AFLP sobre regiones heterocromáticas, altamente metiladas y con supresión de la recombinación. De esta manera los autores identificaron una distribución más uniforme de los marcadores a lo largo de los siete grupos de ligamiento (See et al. 2002). En *Carica papaya* L., Ma et al. (2004) compararon la distribución de marcadores de AFLP *EcoRI/MseI* con los generados a partir de la digestión con *PstI/MseI*. *PstI* reconoce la secuencia 5'-CTGCAG-3' y es una enzima sensible a metilación por lo que los fragmentos generados representaban regiones menos metiladas. Los autores observaron que los marcadores *PstI* no se localizaron en los distintos grupos de ligamiento con la misma frecuencia que los marcadores *EcoRI*, y más específicamente en el grupo conteniendo el locus determinante del sexo. Dicho locus presentó una muy baja frecuencia de marcadores *PstI* en comparación con los marcadores *EcoRI*, indicando que las citosinas alrededor del mismo se encontraban metiladas.

A pesar de haber analizado hasta el momento un bajo número de marcadores MSAP, el hecho de que los polimorfismos, sensibles e insensibles a metilación detectados en este trabajo, estén distribuidos en distintas regiones del genoma de *P. notatum*, sugiere que los mismos no se originan en regiones particulares como por ejemplo, los centrómeros, telómeros, regiones codificantes o islas CpG.

La identificación de regiones altamente metiladas ligadas a genes de interés proporcionaría una mayor comprensión del funcionamiento de estos genes. Por otro lado, estos mapas epigenéticos aumentarían la posibilidad de encontrar marcadores polimórficos en cualquier región genómica y sobre cualquier *background* genético, algo muy importante para poblaciones derivadas de genotipos muy relacionados genéticamente.

## **V.2 Estudio del estado de metilación de la región responsable de la aposporía en *Paspalum notatum***

### **V.2.1 Experimentos de RFLP con enzimas sensibles a metilación y sondas específicas de la región apo**

Con el fin de evaluar el estado de metilación del ADN en secuencias específicas del locus que controla la aposporía en *P. notatum* se llevaron a cabo experimentos de RFLP utilizando enzimas sensibles a metilación y 2 clones que generan marcadores específicos de esa región genómica. El hecho de que se dispone de un mapa de las razas tetraploides de *P. notatum* donde fue localizado la región responsable de la aposporía (Stein et al. 2007), y la disponibilidad de 1 clon de RFLP (C1069) y un marcador de AFLP (M3) específicos del mismo permitieron analizar específicamente la región genómica responsable de la apomixis en la especie. El clon M3, deriva de un marcador de AFLP que presenta homología con un retrotransposón de arroz perteneciente a la

superfamilia de retrotransposones LTR («*long terminal repeats*»). La hibridación de este clon con el ADN genómico digerido con las enzimas sensibles e insensibles a metilación presentó un patrón de bandas característico de una secuencia repetitiva aunque se observaron polimorfismos entre Q4188 y Q4117 con estas últimas. Sin embargo, no se obtuvieron diferencias en la hibridación cuando el ADN fue digerido con *HpaII* y *MspI*. En especial, la hibridación con el clon C1069, mostró polimorfismos generados a partir de diferencias en la metilación entre Q4188 y Q4117. Los mismos representaron una demetilación de algunos marcadores del locus detectado en el parental apomítico.

Para determinar si estos marcadores epigenéticos se encuentran ligados a la aposporia en *P. notatum* se utilizó la estrategia de Análisis de Segregantes en Grupo (*Bulk Segregant Analysis* o BSA) (Paran y Michelmore 1993). Este método ha sido empleado para la identificación de marcadores ligados a la reproducción apomítica en otras especies de gramíneas como *Trypsacum* (Leblanc et al. 1995), *Brachiaria* (Pessino et al. 1997 y 1998), *Pennisetum ciliare* (Gustine et al. 1997), *Pennisetum squamulatum* (Ozias-Akins et al. 1998) y *Poa* (Barcaccia et al. 1998). La hibridación con el clon C1069 mostró tres sitios diferencialmente metilados y asociados al modo de reproducción, de los cuales solo dos fueron finalmente asociados a la aposporia. En el patrón de hibridación incluyendo todas las plantas que constituyeron cada grupo (*debulk*) se observó un patrón bien diferenciado entre los genotipos de reproducción sexual y apomítica (Figura 22). La reciente asociación de muchos elementos transponibles a las regiones conteniendo el locus que confiere apomixis en diferentes especies (Labombarda et al. 2002, Akiyama et al. 2004, Calderini et al. 2006, Conner et al. 2008) sugiere una asociación entre el estado de metilación del ADN y la expresión de la apomixis. En este trabajo se observó la demetilación de un marcador

completamente ligado al carácter cuya homología de secuencia lo identificó como un componente funcional de los elementos transponibles. Como se mencionó anteriormente, este tipo de elementos se mantienen inactivos/metilados durante el crecimiento y desarrollo normal de las plantas. La observación de al menos una demetilación parcial de este locus en las plantas apomícticas estaría indicando una cierta actividad transposicional en la región, lo cual fue confirmado a través de los polimorfismos revelados con las enzimas insensibles a metilación. A pesar de que todavía no se sabe exactamente si la actividad de los transposones tiene alguna significancia funcional para el desarrollo apomíctico, se especula que en las plantas apomícticas los mismos podrían insertarse en reguladores epigenéticos claves de la reproducción sexual, desregulando así la expresión del desarrollo sexual en tiempo y espacio (Rodrigues y Koltunow 2005, Ozias-Akins 2006). Los resultados presentados en este trabajo aportan evidencias en este sentido. La demetilación de algunas secuencias del locus que controla la aposporía podría estar relacionada con la expresión del carácter y por lo tanto ser un componente fundamental de la reproducción apomíctica en la especie.

### **V.3 Identificación de factores genéticos relacionados físicamente con la aposporía**

Los marcadores AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (Vos et al. 1995) constituyen una herramienta poderosa para el análisis de genomas de cualquier origen y complejidad. Estos marcadores combinan la especificidad de las enzimas de restricción con la practicidad de detección del polimorfismo mediante PCR. Los mismos permiten la evaluación simultánea de muchos sitios potencialmente polimórficos por lo que han sido ampliamente utilizados en la determinación de la

identidad de una muestra específica o de las relaciones genéticas entre muestras, como así también en la generación de marcadores moleculares para la construcción de mapas de ligamiento e identificación de marcadores ligados a características fenotípicas y/o loci genéticos (Rajapakse et al. 2001, Albertini et al. 2003, Zhong et al. 2004). Dado que la técnica de AFLP implica la digestión con enzimas de restricción seguido de la unión de los adaptadores a los fragmentos restringidos, la amplificación por PCR y la resolución y visualización de los fragmentos amplificados en geles de poliacrilamida, presenta una serie de desventajas cuando se quiere trabajar en forma rápida y económica. Todo esto sumado a su naturaleza dominante, que impide la discriminación de los individuos homo y heterocigotas, limita su aplicación a gran escala por ejemplo, en programas de mejoramiento asistido por marcadores moleculares. Una de las posibilidades tecnológicamente disponible es la conversión de bandas de AFLP en marcadores moleculares del tipo SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*) (Paran y Michelmore 1993). Estos marcadores pueden ser generados en forma sencilla y son fáciles de analizar. Asimismo son especialmente adecuados para adaptarse a estudios en poblaciones y a la automatización. Esta metodología consiste en la caracterización del marcador ligado y el diseño de cebadores locus-específicos, que permite trabajar en condiciones de mayor rigurosidad de anillado. Los marcadores SCAR han sido desarrollados con éxito en una serie de trabajos a partir de marcadores RAPD (Barret et al. 1998, Hernández et al. 1999, Cairo et al. 2002) y AFLP (Bradeen y Simon 1998, Negi et al. 2000, Xu et al. 2001, Ashutosh et al. 2007).

En el caso específico del trabajo realizado en esta tesis, los marcadores moleculares de AFLP ligados a la aposporía que se disponía, se encontraban en el rango de tamaño de 90 a 300 pb. El diseño de cebadores específicos sobre las secuencias de los mismos y la amplificación por PCR a partir del ADN genómico de los genotipos

parentales de la población segregante, en la mayoría de los casos, no reveló polimorfismos. Esto demostró la incapacidad de transferirlos directamente como marcadores tipo SCAR. Resultados similares se han observado en papa por De Jong et al. (1997). Sin embargo, sobre la base del marcador de AFLP M3 fue posible el desarrollo directo de dos marcadores SCAR, SPNA1 y SPNA2. La utilización de un juego de cebadores específicos de este fragmento sobre el ADN genómico de Q4188 y Q4117 permitió la amplificación de 2 marcadores presentes en Q4117 y ausentes en Q4188. Noguera et al. (2005) desarrollaron un marcador co-dominante SCAR directamente a partir del clonado y secuenciación de un marcador de AFLP relacionado con la monoecia en melón. Mediante la identificación de 6 marcadores de AFLP completamente ligados al locus *Rf*, supresor de la esterilidad masculina en *Brassica napus*, Hong et al. (2006) lograron la conversión directa en marcadores tipo SCAR a partir de 3 de ellos.

Los marcadores SPNA1 y SPNA2, generados a partir de la misma combinación de cebadores, resultaron muy específicos y generaron bandas muy claras sólo en las progenies  $F_1$  apomícticas derivadas de Q4188 x Q4117. Con el fin de estudiar la eficiencia de estos marcadores SCAR en cuanto a su utilización en diferentes fondos genéticos, los marcadores SPNA 1 y 2 fueron utilizados sobre 13 genotipos de *P. notatum* colectados en una amplia región geográfica de América que abarca desde Cuba hasta el Sur de la Provincia de Buenos Aires (Rebozzio et al. comunicación personal) previamente clasificadas como apomícticos facultativos (Espinoza et al. 2006). Junto a este material se incluyeron los genotipos parentales de la población segregante por el modo de reproducción (Q4188 y Q4117) y entre 3 a 7 progenies  $F_1$  sexuales y apomícticas, como controles negativos y positivos respectivamente. El patrón de amplificación generado coincidió exactamente con el observado en la población de

mapeo y distinguió perfectamente los genotipos apospóricos de los sexuales. La amplificación de las bandas del tamaño esperado solo en los genotipos apomícticos confirmaron el fuerte ligamiento de estos marcadores SCAR con el locus responsable de la aposporía en la especie. Estos marcadores servirán para una identificación temprana entre plantas apomícticas y sexuales y podrán utilizarse en el futuro para el escrutinio de bibliotecas de cDNA y/o de BACs de la especie. La presencia de ambos marcadores en los distintos ecotipos ensayados indica que la “región genómica responsable de la aposporía” de razas tetraploides de *P. notatum* está altamente conservada. Esta característica fortalece la idea de que dicha región es una gran región genómica que se mantiene invariable por una restricción en la recombinación (Stein et al. 2004) y que este bloque genético podría incluir varios genes asociados por función que deben actuar conjuntamente para expresar la apomixis. Curiosamente, parte de la secuencia de ambos marcadores mostró homología con una secuencia repetitiva de arroz correspondiente a un retrotransposón. Sin embargo, la especificidad de los cebadores permitió la amplificación de bandas discretas solo en los individuos con reproducción apomíctica. Por otra parte, un segmento de SPNA2 (que incluía el cebador *reverse*) mostró un sitio único de homología en el genoma del arroz, en la región de pericentromérica del cromosoma 12. Se han localizado varios marcadores moleculares del cromosoma 12 de arroz asociados a la aposporía en diferentes especies de *Paspalum* sp. (Pupilli et al. 2001, Pupilli et al. 2004, Martínez et al. 2003 y Stein et al. 2004). En *P. notatum*, el locus conteniendo los factores determinantes de la aposporía estaría ubicado en un cromosoma conteniendo marcadores localizados en los cromosomas 2 y 12 de arroz (Martínez et al. 2003, Pupilli et al. 2004, Stein et al. 2007, Laspina et al. 2008). Los resultados presentados en esta parte del trabajo de tesis refuerza la hipótesis que el locus



aposporía estaría incluido en un cromosoma híbrido formado por segmentos de los cromosomas 2 y 12 de arroz.

Cuando se ensayó el marcador M3, el fragmento amplificado resultó de mayor tamaño que la banda de AFLP correspondiente ligada 100 % a la apomixis. Esto podría haber resultado de la amplificación de regiones repetitivas en donde los extremos se mantienen conservados.

Se han realizado diversos trabajos relacionados con el desarrollo y utilización de marcadores SCAR asociados a la apomixis. Albertini et al. (2001) desarrollaron dos marcadores SCAR asociados con el modo de reproducción en *Poa pratensis*. Los cebadores fueron diseñados directamente a partir de las secuencias de los marcadores de AFLP co-segregantes con la partenogénesis en la especie. En un trabajo más reciente Dwivedi et al. (2007) desarrollaron un marcador SCAR específico de plantas apospóricas de *Cenchrus ciliaris* a partir de marcadores RAPD en combinación con la estrategia de “análisis de segregantes en grupo o BSA”. Algo muy interesante llevado a cabo por estos autores fue ensayar si estos cebadores SCAR funcionaban en otras especies apomícticas. Aunque fue demostrado que los marcadores SCAR desarrollados estaban conservados en las especies apomícticas no obtuvieron ningún tipo de amplificación en genotipos de *Pennisetum pedicellatum*, *Dichanthium annulatum* y *Panicum maximum*. Existen ejemplos de marcadores moleculares ligados a aposporía que se conservan a través de las diferentes especies. Por ejemplo, el marcador RAPD, OPC4-600, se encuentra ligado a la apomixis en *Pennisetum* (Ozias-Akins et al. 1998), *Brachiaria* (Pessino et al. 1997) y *C. ciliaris* (Jessup et al. 2002). Del mismo modo, un marcador de RFLP (*ugt 197*), más tarde convertido en STS, resultó estar conservado en 11 especies apomícticas y ausente en 8 especies sexuales de *Pennisetum* (Lubbers et al. 1994). Este marcador también resultó estrechamente ligado a aposporía en *C. ciliaris*

(Jessup et al. 2002). Sin embargo, en el trabajo realizado por Dwivedi et al. (2007), OPC-04 y ugt 197 no mostraron patrones de amplificación polimórficos entre los genotipos sexuales y apomícticas. Los autores postulan que esta secuencia estaría presente en las otras especies apomícticas pero que la misma ha variado en el curso de la evolución. Martínez et al. (2007) utilizaron análisis citoembriológicos y marcadores moleculares ligados al apo-locus para la identificación de plantas apomícticas de *Paspalum notatum* y *Paspalum simplex*. En el primer caso la identificación fue mediante dos marcadores RAPD (Martínez et al. 2003) y para *P. simplex* se empleó el marcador SCAR previamente desarrollado por Calderini et al. (2006) derivado de una de las primeras caracterizaciones de un clon de BAC ligado a la apomixis en la especie.

Uno de los principales inconvenientes para la conversión directa de marcadores de AFLP en marcadores tipo SCAR es el pequeño tamaño de mismos. El tamaño promedio de los fragmentos de AFLP ligados a la aposporía utilizados en este trabajo fue de 150 bp, por lo cual es poco probable que los cebadores diseñados sobre los extremos de los fragmentos revelen polimorfismos entre los genotipos parentales. Consecuentemente, fue necesario considerar un enfoque diferente basado en el aislamiento de las regiones flanqueantes de estos marcadores. Para ello se utilizó la estrategia de caminata cromosomal mediante PCR. Si bien en otros trabajos se ha utilizado con el mismo fin la técnica de PCR inversa (Hartl y Ochmann 1996), varios autores consideran a la caminata cromosomal como la mejor opción (Devic et al. 1997) ya que permite aislar fragmentos “extendidos” de mayor tamaño. Además, no existe ningún tipo de interferencia por parte de las regiones flanqueantes o sitios de restricción, como así también no se requiere la optimización para cada experimento (Negi et al. 2000). Mediante una combinación de análisis segregantes en grupos (“BSA”) y la técnica de AFLP Negi et al. (2000) identificaron marcadores ligados al color de la testa

de la semillas en *Brassica juncea*. Debido a que estos marcadores no se adaptaban a una aplicación a gran escala emplearon la tecnología de caminata cromosomal para aislar las secuencias adyacentes vinculadas a uno de estos marcadores de AFLP. En base a la secuencia del fragmento extendido diseñaron cebadores específicos que les permitieron detectar un claro polimorfismo entre los parentales de la población segregante para el carácter. Asimismo, Hong et al. (2006) adoptaron la tecnología de caminata cromosomal en *Brassica napus*, con el fin de aislar las secuencias flanqueantes de los 3 marcadores de AFLP que no pudieron convertir directamente. La técnica de caminata cromosomal se basa en dos reacciones de PCR sucesivas, con dos pares de cebadores distintos, de tal modo que los cebadores utilizados en la segunda PCR (*PCR interna*) flanqueen una región genómica amplificada en la primera reacción (*PCR externa*). En este trabajo, la estrategia de caminata cromosomal a partir de los marcadores I3 y J7 permitió aislar secuencias flanqueantes a ambos marcadores e identificar los primeros genes candidatos relacionados físicamente con el apo locus en *P. notatum*. La estrategia fue validada mediante el clonado y secuenciación de los fragmentos extendidos.

El análisis de 12 secuencias derivadas de las distintas bibliotecas mostró la presencia de los cebadores específicos y la formación de *contigs* con las secuencias de AFLP originales. Estos resultados confirmaron la identidad de los amplicones obtenidos y su homología con los marcadores de AFLP utilizados como punto de partida, aunque no pudo confirmarse en esta etapa el ligamiento genético con el locus apo.

Los fragmentos extendidos hacia el extremos 5' del marcador I3 mostraron homología con una proteína rica en glicina (5B, Tabla 19) (LOC\_Os06g21210.1) y un retrotransposón de arroz (3B, Tabla 19) (LOC\_Os07g30070.1). El dominio rico en glicina fue originalmente identificado en proteínas que desempeñaban un papel estructural en la pared celular (Ringli et al. 2001). Sin embargo, proteínas conteniendo

este motivo han sido asociadas a diversos procesos fisiológicos ya que este dominio fue encontrado en muchas otras proteínas con perfiles de expresión altamente específicos y con variados patrones de localización subcelular (Mousavi y Hotta 2005). Por otro lado, a partir de la caminata cromosomal en sentido 3' del marcador I3 se obtuvieron fragmentos más grandes y con ello homologías de secuencia más significativas. Dentro de las mismas se identificó un factor de elongación (gbIEEF44417.1) de la síntesis proteica y una enzima asociada a la metilación de especies de ARN en eucariotas (reflNM\_001154411.1) (8A). La enzima N6-adenosine-methyltransferase MT-A70 regula la entrada de las células diploides en la meiosis al elevar los niveles de ARNm a través de un mecanismo pos-transcripcional desconocido (Clancy et al. 2002). En *A. thaliana*, el homólogo de MT-A70 fue previamente designado como “*Embryo-Defective 1706*” luego de un estudio general sobre mutantes de este tipo (Tzafrir et al. 2003) y posteriormente Zhong et al. (2008) demostraron que una disrupción en la expresión del mismo provocaría una letalidad embrionaria. La localización *in silico* de este fragmento en el genoma de arroz en los cromosomas 2 y 12, coincidiría asimismo con la sintenia previamente descrita entre esta región y la región que controla la apomixis en especies de *Paspalum* y *Brachiaria* (Pessino et al. 1998, Martínez et al. 2003, Pupilli et al. 2004, Stein et al. 2007, Laspina et al. 2008). Este fragmento es de gran interés para estudios posteriores debido a su estrecha relación en cuanto a su localización genómica en arroz y su función en etapas del desarrollo embrionario en maíz y *A. thaliana*.

Dos secuencias extendidas hacia el extremo 3' del marcador I3 (9A y 10A, Tabla 19) mostraron homología con genes de una proteína quinasa, una proteína expresada y una polimerasa dependiente de ARN (mop1) (gbIDQ417753.1). El control del ciclo celular es un proceso complejo mediado en gran medida por proteínas de tipo *quinasas*, que activan proteínas con funciones específicas (Grossniklaus et al. 2001).

Albertini et al. (2004) identificaron varias quinasas diferencialmente expresadas entre genotipos apomícticos y sexuales de *Poa pratensis*. Algunas de estas proteínas estarían relacionadas con el programa de activación mediado por GTPasa, respuesta a estrés osmótico y división celular. Posteriormente, el mismo grupo aisló y caracterizó dos posibles genes candidatos para la apomixis en esta especie (Albertini et al. 2005). Uno de ellos, *PpSERK* (*Somatic Embryogenesis Receptor-Like Kinase*) resultó similar al identificado previamente en mutantes meióticos de *Arabidopsis* y asociado con la adquisición de competencia embriogénica de células somáticas (Schmidt et al. 1997, Hecht et al. 2001). Los autores propusieron que la activación de este gen en las células de la nucela de los genotipos apomícticos derivaría en el desarrollo de sacos embrionarios no reducidos en este tejido (Albertini et al. 2005). Por otro lado, el fragmento 9A mostró homología con genes *mop1* los cuales han sido asociados al mantenimiento del nivel de ARN repetitivo que actuaría en *trans* para establecer y mantener los diferentes estados de la cromatina asociados con el fenómeno de paramutación (Alleman et al. 2006). La anotación funcional (Blastx) de estas secuencias resultó en una fuerte homología con retrotransposones LTRs (“*Long Terminal Repeats*”) y genes asociados. Las terminaciones LTRs de los retrotransposones de clase I contienen las secuencias promotoras así como reguladoras de la terminación de la transcripción. Estos elementos contienen al menos dos genes, denominados *gag* y *pol* que se transcriben y traducen en forma de poliproteína, luego fragmentada en distintos péptidos funcionales. El orden de estos dominios proteicos dentro de la secuencia de ADN es lo que define dos grupos de retrotransposones, los tipo Ty1-*copia* y los tipo Ty3-*gypsy*. Estos retrotransposones tienen un mecanismo de transposición replicativo que los convierte en elementos potencialmente muy invasivos (SanMiguel et al. 1996). Por este motivo, el control de la distribución y número de copias en que se encuentran

es crucial para minimizar los posibles efectos deletéreos en el genoma huésped. En general los genomas parecen haber desarrollado mecanismos para reducir la actividad de estos elementos y así controlar su capacidad mutagénica, siendo los mecanismos de silenciamiento los más generales y efectivos. Por ello, la mayor parte de los retrotransposones LTR de plantas están silenciados en la mayoría de tejidos vegetales durante el desarrollo. Existen evidencias acerca de una especial presencia de retrotransposones y transposones de ADN en la región que controla la apomixis en diversas especies, retrotransposones del tipo *Opie-2* en *Pennisetum* (Akiyama et al. 2004, Conner et al. 2008), tipo Ty1-*copia* y Ty3-*gypsy* en *P. simplex* (Calderini et al. 2006) y *P. notatum* (Stein, comunicación personal). Esto, sumado a la supresión de la recombinación en la región que dificulta el clonado basado en estrategias de mapeo ha llevado a algunos autores a proponer que el mapeo físico de una región tan extensa (aprox. 50 Mbp) solo se lograría con una mayor saturación de la región (Huo et al. 2009) implementando técnicas que aprovechan las características intrínsecas de los retrotransposones LTRs como la SSAP (“*Sequence Specific Amplified Polymorphism*”) o TD (“*Transposon Display*”).

Luego de la caracterización de los fragmentos extendidos por medio de la caminata cromosomal, se procedió a determinar su localización en el genoma de la especie y su ligamiento genético con el locus apo. Idealmente, los fragmentos extendidos a partir de una secuencia anclada deberían corresponder a la misma región genómica, sin embargo dado el tamaño de los fragmentos utilizados como punto de partida, el carácter repetitivo de varias de estas secuencias y la naturaleza poliploide del material en estudios, es necesario realizar la corroboración de la localización de los fragmentos extendidos por medio de estudios de ligamiento. La mayoría de las reacciones de amplificación con los cebadores específicos no permitieron la

identificación de los fragmentos del tamaño esperado asociados al modo de reproducción. Más aún, su visualización en geles de poliacrilamida indicó que dichos cebadores estarían amplificando más de un locus e inclusive sectores repetitivos. Sin embargo, a partir de la combinación de cebadores I3R y I3\_5B\_F1, diseñados para amplificar una extensión 5' del marcador I3, se identificó una banda de 764 bp que co-segregó estrictamente con la aposporía. El análisis de secuencia de la misma contenía ambos cebadores utilizados para la amplificación pero no mostró solapamiento con el marcador original (I3) a partir del cual fueron diseñados. Este nuevo marcador confirmaría la naturaleza repetitiva de los marcadores presentes en esta región. En *Pennisetum squamulatum*, Roche et al. (2002) desarrollaron dos marcadores SCAR completamente ligados a la aposporía que luego utilizaron para aislar los correspondientes clones de BAC. Sorprendentemente, los mismos resultaron no solapados, por lo que los autores indicaron que la construcción de un *contig* conteniendo el locus de la apomixis requerirá “múltiples” pasos de caminata cromosomal. Es de destacar que este nuevo marcador asociado a la aposporía en *P. notatum* presentó homología de secuencia con una región no codificante de una proteína con repeticiones de anquirina (*ankyrin protein kinases* - APK). En 1987, Breeden y Nasmyth describieron la presencia de unas secuencias de 33 aminoácidos repetidas en tándem en dos proteínas reguladoras del ciclo celular de levaduras y en la proteína *Notch* de *Drosophila*. Posteriormente, se descubrieron 24 copias de esta repetición en una proteína humana denominada anquirina relacionada con el citoesqueleto que fue la que le dio el nombre a la Repetición de Anquirina (APK) (Lux et al. 1990). Estas repeticiones se encuentran involucradas en las interacciones proteína-proteína y se han identificado en numerosas proteínas con funciones muy diversas (revisado en Huang et al. 2009). En animales y levaduras, algunas proteínas APK juegan un papel importante

en el control del ciclo celular, la regulación transcripcional, la integridad del citoesqueleto y la transducción de señales (Sedgwick y Smerdon 1999). Hasta el momento no se han caracterizado muchas proteínas APK en plantas y de la mayoría de ellas no se conoce su función a nivel molecular. En *Arabidopsis*, AKR (“*ankyrin repeat gene*”) fue asociado a los procesos de diferenciación celular asociados a la luz (Zhang et al. 1992). Chinchilla et al. (2003) describieron APKs (“*ankyrin protein kinases*”) en *Medicago* como respuesta a un stress osmótico. En *Arabidopsis*, “*EMB506*” resultó ser una proteína con repeticiones de anquirina necesaria para el correcto desarrollo embrionario (Albert et al. 1999). Albertini et al. (2004) en su trabajo de identificación de genes candidatos para la apomixis en *Poa pratensis*, caracterizaron un EST con expresión diferencial entre individuos sexuales y apomícticos que presentaba homología con una proteína quinasa con repeticiones de anquirina. Los autores interpretaron que los cambios provocados por los óvulos malformados desencadenarían la partenogénesis en un grupo de células, y que la expresión diferencial de los genes identificados por ellos (incluida la anquirina) estarían involucrados en la ruta de formación de semillas apomícticas. Estos antecedentes hacen necesario profundizar los estados de este nuevo marcador en *P. notatum* debido a su asociación física con el locus que controla la apomixis y su posible función en el desarrollo de semillas apomícticas en la especie.



## VI CONCLUSIONES

Los resultados experimentales obtenidos durante este trabajo de Tesis han aportado conocimientos sobre aspectos genéticos y epigenéticos que conforma el complejo agámico de *Paspalum notatum* y se relacionan con el modo de reproducción. Estos resultados pueden extrapolarse a otras especies del género como así también contribuir en forma general a la comprensión del mecanismo en otras gramíneas. Mediante la realización de experimentos de MSAP en citotipos diploides y tetraploides fue posible realizar una caracterización general del estado de metilación de sitios CCGG en ambos citotipos. Los resultados obtenidos indicaron que los citotipos diploides y tetraploides analizados en este trabajo presentaron niveles globales de metilación en un rango del 23,5 y 42,4 %. El análisis del total de sitios metilados y no metilados mostró diferencias significativas entre ambos grupos confirmando una de las hipótesis postuladas inicialmente. Por otro lado, los individuos tetraploides exhibieron una mayor variación en los patrones de metilación que los diploides. Esto puede ser debido a la metilación al azar de genes duplicados luego de la poliploidización que les permite modificar su epigenoma para adquirir nuevas funciones y mejorar su capacidad adaptativa. Asimismo, fue posible determinar cambios en los patrones de metilación exclusivamente debidos a la poliploidización en los genotipos C4-2x y C4-4x. Por otro lado, no se observó un patrón característico de metilación asociada al modo de reproducción. A pesar de que existe evidencia de que la región genómica que contiene al locus responsable de la aposporía contiene citosinas metiladas, esto no representaría un cambio global del estado de metilación de las plantas apomícticas sino que estaría restringido a secuencias particulares de la región. Los análisis de similitud realizados con los marcadores clasificados como polimorfismos insensibles a metilación (MIPs), aunque representan una fracción de la diversidad genética presente en las muestras,

confirmaron las relaciones filogenéticas de los grupos estudiados. Utilizando ambos tipos de marcadores (MSP y MIP) se determinó la existencia de correlación entre las matrices MSP y MIP en ambos grupos, indicando un posible mecanismo común de regulación para las dos variables. Los análisis de las secuencias de los polimorfismos sensibles a metilación revelaron que se encuentran afectadas tanto secuencias codificantes como no codificantes, incluyendo dentro de este último grupo elementos repetitivos. Por otro lado, los experimentos de hibridación con sondas homólogas y heterólogas completamente ligadas al locus responsable de la aposporía en *P. notatum* en combinación con enzimas sensibles a metilación reveló que la región se encuentra metilada. Desconocemos aún si esta metilación es la consecuencia de un cambio global del segmento genético involucrado (que podría expandirse por alrededor de 36 Mpb, Stein et al. 2007) o está restringida a secuencias específicas dentro del fragmento. La demetilación de un componente funcional de los elementos transponibles asociado previamente a la aposporía en ésta y otras especies, identificada en los genotipos de reproducción apomítica indicaría una actividad transposicional asociada al locus apo en la especie.

Mediante análisis de secuencia y diseño de cebadores específicos fue posible desarrollar marcadores alelo específico tipo SCAR ligado a la apomixis en la especie para una identificación temprana entre plantas apomíticas y sexuales. Este marcador fue validado en una serie de plantas sexuales y apomíticas de *P. notatum* y demostró su estricta correlación con el carácter. Esto supone una alta conservación del fragmento detectado en las distintas accesiones de la especie. Además, utilizando una estrategia de caminata cromosomal fue posible aislar las secuencias flanqueantes de marcadores 100 % ligados a la aposporía en *P. notatum*, varios de los cuales mostraron homología con

genes relacionados con la síntesis proteica, metilación de especies de ARN, retrotransposones y proteínas de tipo quinasa.

Los resultados presentados en esta tesis demuestran que tanto factores genéticos como epigenéticos están asociados a la expresión del carácter apomixis en *Paspalum*. Como resultado del trabajo de caracterización genética y molecular del locus responsable de la apomixis en *P. notatum* llevado a cabo durante los últimos 10 años por nuestro grupo de trabajo y a partir de los resultados obtenidos en este trabajo de tesis, es posible plantear un modelo hipotético de la estructura molecular del locus responsable de la aposporía en la especie. El mismo estaría representado por un sector cromosómico de gran tamaño con distorsión en la segregación, fuerte supresión de la recombinación e imposibilidad de transferencia a través de gametas monoploides. Por otro lado la presencia de elementos repetitivos, genes involucrados en cascadas de transducción de señales y demetilación del ADN indicaría que el carácter en la especie se encuentra bajo un control complejo en donde probablemente intervengan múltiples factores genéticos y epigenéticos asociados, así como mecanismos de regulación y/o silenciamiento que influyen sobre su expresión.

**VII REFERENCIAS**

- Adams KL y Wendel JF (2005) Novel patterns of gene expression in polyploid plants. *Trends Genet.* 21: 539–543.
- Akiyama Y, Conner JA, Goel S, Morishige DT, Mullet JE, et al. (2004) High-resolution physical mapping in *Pennisetum squamulatum* reveals extensive chromosomal heteromorphism of the genomic region associated with apomixis. *Plant Physiol.* 134: 1733-41.
- Albert S, Després B, Guillemintot J, Bechtold N, Pelletier G, Delseny M y Devic M. (1999) The EMB 506 gene encodes a novel ankyrin repeat containing protein that is essential for the normal development of Arabidopsis embryos. *Plant J.* 17(2): 169-79.
- Albertin W, Karine Alix K, Balliau T, Brabant P, Marlène Davanture M, Malosse C, Valot B y Thiellement H (2007) Differential regulation of gene products in newly synthesized *Brassica napus* allotetraploids is not related to protein function nor subcellular localization. *BMC Genomics* 8:56 (doi:10.1186/1471-2164-8-56).
- Albertini E, Andrea Porceddu A, Gianpiero Marconi G, Gianni Barcaccia G, Pallottini L y Falcinelli M (2003) Microsatellite-AFLP for genetic mapping of complex polyploids. *Genome* 46: 824–832.
- Albertini E, Barcaccia G, Porceddu A, Sorbolini S y Falcinelli M (2001) Mode of reproduction is detected by *Parth1* and *Sex1* SCAR markers in a wide range of facultative apomictic Kentucky bluegrass varieties. *Mol. Breed.* 7: 293-300.
- Albertini E, Marconi G, Barcaccia G, Raggi L y Falcinelli M. (2004) Isolation of candidate genes for apomixis in *Poa pratensis* L. *Plant Mol Biol* 56: 879–94.
- Albertini E, Marconi G, Reale L, Barcaccia G, Porceddu A, et al. (2005) SERK and APOSTART. Candidate genes for apomixis in *Poa pratensis*. *Plant Physiol.* 138: 218-99.
- Allard RW, Garcia P, Saenz-de-Miera LE y Perez de la Vega M (1993) Evolution of multilocus genetic structure in *Avena hirtula* and *Avena barbata*. *Genetics* 135: 1125–1139.

- Alleman M, Sidorenko L, McGinnis K, Seshadri V, Dorweiler JE, et al. (2006) An RNA-dependent RNA polymerase is required for paramutation in maize. *Nature* 442: 295–298.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW y Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.
- Ashikawa I (2001) Surveying CpG methylation at 5'-CCGG in the genome of rice cultivars. *Plant Mol. Biol* 45: 31-39.
- Ashutosh, Sharma PC, Prakash S y Bath SR (2007) Identification of AFLP markers linked to the male fertility restorer gene of CMS (*Moricandia arvensis*) *Brassica juncea* and conversion to SCAR marker. *Theor Appl Genet.* 14: 385-392.
- Asker SE y Jerling L (1992) Apomixis in plants. CRC Press, Boca Raton.
- Auger DL, Gray AD, Ream TS, Kato A, Coe EH y Birchler JA (2005) Nonadditive gene expression in diploid and triploid hybrids of maize. *Genetics* 169:389–397.
- Barcaccia G, Mazzucato A, Albertini E, Zethof J, Gerats A, et al. (1998) Inheritance of parthenogenesis in *Poa pratensis* L.: auxin test and AFLP linkage analyses support monogenic control. *Theor. Appl. Genet.* 97: 74-82.
- Barret P, Delourme R, Foisset N y Renard M (1998) Development of a SCAR sequence characterized amplified region) marker for molecular tagging of the dwarf BREIZH (Bzh) gene in *Brassica napus* L. *Theoretical and Applied Genetics* 97: 828–833.
- Baubec T, Dinh HQ, Pecinka A, Rakic B, Rozhon W, Wohlrab B, von Haeseler A y Mittelsten Scheid O (2010) Cooperation of multiple chromatin modifications can generate unanticipated stability of epigenetic states in Arabidopsis. *Plant Cell* 22: 34–47.
- Baurens FC, Bonnot F, Bienvenu D, Causse S y Legavre T (2003) Using SD-AFLP and MSAP to Assess CCGG Methylation in the Banana Genome. *Plant Mol Biol Rep.* 21: 339–348
- Bender J (2002) Plant Epigenetics. *Current Biol.* 12: 412-414.
- Bennett HW y Bashaw EC (1966) Interspecific hybridization with *Paspalum* spp. *Crop. Sci.* 6: 52-54.
- Berger SL, Kouzarides T, Shiekhhattar R y Shilatifard A (2009) An operational definition of epigenetics. *Gernes Dev.* 23: 781-783.
- Bhat V, Dwivedi KK, Khurana JP y Sopory SK (2005) Apomixis: An enigma with potential applications. *Current Science* 89(11): 1879-1893.

- Bicknell RA y Bicknell KB (1999) Who will benefit from apomixis? *Biotechnol. Dev. Mon.* 37: 17–21.
- Bicknell RA y Koltunow AM (2004) Understanding apomixis: recent advances and remaining conundrums. *Plant Cell* 16: S228–S245.
- Bicknell RA, Borst NK y Koltunow AM (2000) Monogenic inheritance of apomixis in two *Hieracium* species with distinct developmental mechanisms. *Heredity* 84: 228-237.
- Blakeslee AF y Avery AG (1937) Methods of inducing doubling of chromosomes in plants by treatment with colchicine. *J Hered* 28: 393–411.
- Bond DM y Finnegan EJ (2007) Passing the message on: inheritance of epigenetic traits. *Trends in Plant Science* Vol.12 No.5 (doi:10.1016/j.tplants.2007.03.010).
- Bonilla JR y Quarin CL (1997) Diplosporous and aposporous apomixis in a pentaploid race of *Paspalum minus*. *Plant Sci.* 127: 97-104.
- Bradeen JM y Simon PW (1998) Conversion of an AFLP fragment linked to carrot Y2 locus to a simple, codominant, PCR-based marker form. *Theor. Appl. Genet.* 97: 960–967.
- Breedon L y Nasmyth K (1987) Similarity between cell-cycle genes of budding yeast and fission yeast and the Notch gene of *Drosophila*. *Nature* 329: 651-654.
- Burton GW (1940) A cytological study of some species in the genus *Paspalum*. *J. Agric. Res.* 60: 193-197.
- Burton GW (1946) Bahiagrass types. *J. Am. Soc. Agron.* 38: 273-281.
- Burton GW (1948) Artificial fog chamber facilitates *Paspalum* emasculation. *J Am Soc Agron.* 40: 281-282.
- Burton GW (1955) Breeding Pensacola bahiagrass, *Paspalum notatum*: I. Method of reproduction. *Agron. J.* 47: 311-314.
- Burton GW (1967) A search for the origin of Pensacola bahiagrass. *Econ. Bot.* 21: 379-382.
- Burton GW (1974) Recurrent restricted phenotypic selection increases forage yields of Pensacola Bahiagrass. *Crop Sci.* 14: 831-835.
- Burton GW y Forbes I (1960) Genetic and manipulation of obligated apomixis in common bahiagrass (*Pasaplum notatum* Flugge.). In: *Int. Grassland Congr., Proc. 8th* (University of Reading) England. pp 66-71.

- Cairo CA, Stein J, Delgado L, Guelman SA, Bortolotti S, Ortiz JPA y Morandi (2002) Tagging the juvenile locus in soybean (*Glycine max* (L.), Merr.) with molecular markers. *Euphytica* 124 (3): 387-395.
- Calderini O, Chang S, de Jong H, Busti A, Paolucci F, et al. (2006) Molecular cytogenetics and DNA sequence analysis of an apomixis-linked BAC in *Paspalum simplex* reveal a non pericentromere location and partial microcolinearity with rice. *Theor. Appl. Genet.* 112: 1179-91.
- Caponio I y Quarin CL (1987) El sistema genético de *Paspalum simplex* y de un híbrido interespecífico con *P. dilatatum*. *Kurtziana* 19: 35-45.
- Caponio I y Quarin CL (1993) Cytology and reproduction of *P. densum* and its genomic relationship with *P. intermedium* and *P. urvillei*. *The Journal of Heredity* 84: 220-222.
- Carman JG (1997) Asynchronous expression of duplicate genes in angiosperms may cause apomixis, bispory, tetraspory, and polyembryony. *Biol. J. Linn. Soc.* 61: 51-94.
- Cervera MT, Ruiz-García L y Martínez-Zapater JM (2002) Analysis of DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* based on methylation-sensitive AFLP markers. *Mol. Genet. Genomics* 268: 543-552.
- Chase A (1929) The North American species of *Paspalum*. *Contr. U. S. Natl. Herb.* 28: 1-310.
- Chaudhury AM, Koltunow A, Payne T, Luo M, Tucker MR, Dennis ES y Peacock WJ (2001) Control of early seed development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17: 677-699.
- Chen ZJ (2007) Genetic and Epigenetic Mechanisms for Gene Expression and Phenotypic Variation in Plant Polyploids. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58: 377-406.
- Chen ZJ y Ni Z (2006) Mechanisms of genomic rearrangements and gene expression changes in plant polyploids. *BioEssays* 28: 240-252.
- Chen ZJ y Pikaard CS (1997) Epigenetic silencing of RNA polymerase I transcription: a role for DNA methylation and histone modification in nucleolar dominance. *Genes Dev.* 11: 2124-2136.
- Chiang PK, Gordon RK, Tal J, Zeng GC, Doctor BP, Pardhasaradhi K y McCann PP (1996) S-Adenosylmethionine and methylation. *The FASEB Journal* 10: 471-480

- Chinchilla D, Merchan F, Megias M, Kondorosi A, Sousa C y Crespi M (2003) Ankyrin protein kinases: a novel type of plant kinase gene whose expression is induced by osmotic stress in alfalfa. *Plant Molecular Biology* 51 (4): 555-566.
- Cidade FW, Dall'Agnol M, Bered F y Teixeira de Souza-Chies T (2008) Genetic diversity of the complex *Paspalum notatum* Flugge (Paniceae: Panicoideae). *Genetic Resources and Crop Evolution*. 55: 235-246.
- Clancy MJ, Shambaugh ME, Timpte CS y Bokar JA (2002) Induction of sporulation in *Saccharomyces cerevisiae* leads to the formation of N6-methyladenosine in mRNA: a potential mechanism for the activity of the IME4 gene. *Nucleic Acids Res.* 30: 4509-4518.
- Clark SJ, Harrison J, Paul CL y Frommer M (1994) High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Res.* 22: 2990-2997.
- Clark SJ, Statham A, Stirzaker C, Molloy PL y Frommer M (2006) DNA methylation: bisulphite modification and analysis. *Nat. Protoc.* 1: 2353-2364.
- Comai L (2000) Genetic and epigenetic interactions in allopolyploid plants. *Pl. Mol. Biol.* 43: 387-399.
- Comai L (2005) The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nature Reviews Genetics* 6: 836-846.
- Conner JA, Goel S, Gunawan G, Cordonnier-Pratt MM, et al. (2008) Sequence Analysis of Bacterial Artificial Chromosome Clones from the Apospory-Specific Genomic Region of *Pennisetum* and *Cenchrus*. *Plant Physiology* 147: 1396-1411.
- Darlington CD (1939) *The evolution of genetic systems*. Cambridge University Press, London.
- Daurelio DL, Espinoza, F, Quarín CL y Pessino SC (2004) Genetic diversity in sexual diploid and apomictic tetraploid populations of *Paspalum notatum* situated in sympatry or allopatry. *Plant Systematics and Evolution* 244(3-4): 189-199.
- De Jong W, Forsyth A, Leister D, Gebhardt C y Baulcombe DC (1997) A potato hypersensitive resistance gene against potato virus X maps to a resistance gene cluster on chromosome 5. *Theor Appl Genet.* 95 : 246-252.
- de Wet JMJ (1968) Diploid-tetraploid-haploid cycles and the origin of variability in *Dichanthium* agamospecies. *Evolution* 22: 394-397.
- de Wet JMJ y Harlan JR (1970) Apomixis, polyploidy, and speciation in *Dichanthium*. *Evolution* 24: 270-277.



- Devic M, Albert S, Delseny M y Roscoe TJ (1997) Efficient PCR walking on plant genomic DNA. *Plant Physiol Biochem.* 35: 331–339.
- Dice LR (1945) Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology* 26: 297-302.
- do Valle CB, Glienke C y Leguizamón GOC (1994) Inheritance of apomixis in *Brachiaria*, a tropical forage grass. *Apomixis Newsl.* 7: 42-43.
- Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, Baker K y Mattick JS (1991) "Touchdown" PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res.* 19: 4008.
- Dong ZY, Wang YM y Zhang ZJ (2006) Extent and pattern of DNA methylation alteration in rice lines derived from introgressive hybridization of rice and *Zizania latifolia* Griseb. *Theor. Appl. Genet.* 113: 196–205.
- Doyle JJ, Flagel LE, Paterson AH, Rapp RA, Soltis DE, Soltis PS y Wendel JF (2008) Evolutionary Genetics of Genome Merger and Doubling in Plants. *Annu Rev Genet* 1: 443-461.
- Duan Y, Qian J, Sun Y, Yi Z y Yan M (2009) Construction of Methylation Linkage Map Based on MSAP and SSR Markers in *Sorghum bicolor* (L.). *IUBMB Life*, 61(6): 663–669.
- Dwivedi KK, Bhat SR, Bhat V, Bhat BV y Gupta MG (2007) Identification of a SCAR marker linked to apomixis in buffelgrass (*Cenchrus ciliaris* L.). *Plant Science* 172: 788–795.
- Eckardt NA (2010) A Double Lock on Polyploidy-Associated Epigenetic Gene Silencing. *The Plant Cell* 22:3 (10.1105/tpc.110.220112).
- Espinoza F y Quarín CL (1997) Cytoembryology of *Paspalum chaseanum* and sexual diploid biotypes of two apomictic *Paspalum* species. *Aust. J. Bot.* 45: 871-877.
- Espinoza F, Daurelio DL, Pessino SC, Valle EM y Quarín CL (2006) Genetic characterization of *Paspalum notatum* accessions by AFLP markers. *Plant Syst Evol.* 258: 147–159.
- Feldman M, Liu B, Segal G, Abbo S, Levy AA y Vega JM (1997) Rapid elimination of low-copy DNA sequences in polyploid wheat: a possible mechanism for differentiation of homoeologous chromosomes. *Genetics* 147: 1381–1387.
- Felsenstein J (1985) Confidence limites on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783–791.

- Finnegan EJ, Genger RK, Peacock WJ y Dennis ES (1998) DNA methylation in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol.Biol.* 49: 223–247.
- Finnegan EJ, Peacock WJ y Dennis ES (1996) Reduced DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* results in abnormal plant development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:8449–8454.
- Flagel L, Udall JA, Nettleton D y Wendel JF (2008) Duplicate gene expression in allopolyploid *Gossypium* reveals two temporally distinct phases of expression evolution. *BMC Biol.* 6:16 (doi:10.1186/1741-7007-6-16).
- Forbes I y Burton GW (1961) Cytology of diploids, natural and induced tetraploids, and intraspecific hybrids of bahiagrass, *Paspalum notatum* Flugge. *Crop Sci.* 1: 402-406.
- Gates RN, Quarin CL y Pedreira CGS (2004) Bahiagrass. In Moser LE, Burson BL & Sollenberger LE (Eds.) *Warm-Season (C4) Grasses*. pp. 651-680. ASA, CSSA, and SSSA, Madison, WI.
- Grant V (1981) *Plant Speciation*. New York: Columbia University Press.
- Grattapaglia D y Sederoff R (1994) Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla* using a pseudo-testcross mapping strategy and RAPD markers. *Genetics* 137: 1121-1137
- Grimanelli D, Leblanc O, Espinosa E, Perotti E, Gonzáles de León D y Savidán Y (1998a) Mapping diplosporous apomixis in tetraploid *Tripsacum*: one gene or several genes?. *Heredity* 80: 33-39.
- Grimanelli D, Leblanc O, Espinosa E, Perotti E, Gonzalez de Leon D y Savidan Y (1998b) Non-Mendelian transmission of apomixis in maize-*Tripsacum* hybrids caused by a transmission ratio distortion. *Heredity* 80: 40-47.
- Grimanelli D, Leblanc O, Perotti E y Grossniklaus U (2001) Developmental genetics of gametophytic apomixis. *Trends in Genetics* 17: 597-604.
- Grossniklaus U, Spillane C, Page DR y Köhler C (2001) Genomic imprinting and seed development: endosperm formation with and without sex. *Curr. Opin. Plant Sci.* 4: 21–27.
- Guangyuan LU, Xiaoming WU, Biyun C, Guizhen G, Kun XU y Xiangzhi L (2006) Detection of DNA methylation changes during seed germination in rapeseed (*Brassica napus*). *Chinese Science Bulletin* 51 (2): 182-190.
- Guo M, Davis D y Birchler JA (1996) Dosage effects on gene expression in a maize ploidy series. *Genetics* 142: 1349–1355.

- Guo WL, Wu R, Zhang YF, Liu XM, Wang HY, Gong L, Zhang ZH y Liu B (2007) Tissue culture-induced locus-specific alteration in DNA methylation and its correlation with genetic variation in *Codonopsis lanceolata* Benth. et Hook. F. *Plant Cell Rep.* 26:1297–1307.
- Gustafsson A (1947a) Apomixis in higher plants. Part II. The causal aspect of apomixis. *Lunds Univ. Arsskr. N. F. Avd. 2*, 43: 71-178.
- Gustafsson A (1947b) Apomixis in higher plants. Part III. Biotype and species formation. *Lunds Univ. Arsskr. N. F. Avd. 2*, 43: 183-370.
- Gustine DL, Sherwood RT y Huff DR (1997) Apospory-linked molecular markers in buffelgrass. *Crop Sci.* 37: 947-951.
- Halusková J, Liub B y Ludger Beerhuesb L (2003) rDNA Methylation in *Hypericum perforatum* Diploids and Tetraploids. *Z Naturforsch* 58 (11-12): 895-7.
- Hanna WW (1995) Use of apomixis in cultivar development. *Adv. Agron.* 54: 333-350.
- Hanna WW y Bashaw EC (1987) Apomixis: its identification and use in plant breeding. *Crop Sci.* 27: 1136-1139.
- Hartl DL y Ochman H (1996) Inverse polymerize chain reaction. In: Harwood A (ed) *Methods in molecular biology*, vol. 58: basic DNA and RNA protocols. Humana Press, Totowa, N.J., pp 293–301.
- Hecht V, Vielle-Calzada JP, Hartog MV, Schmidt EDL, Boutilier K, Grossniklaus U y de Vries SC (2001) The Arabidopsis SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1 gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. *Plant Physiol.* 127: 803–816.
- Hegarty MJ y Hiscock SJ (2008) Genomic clues to the evolutionary success of polyploid plants. *Curr Biol* 18: R435–R444.
- Hegarty MJ, Barker GL, Wilson ID, Abbott RJ, Edwards KJ y Hiscock SJ (2006) Transcriptome shock after interspecific hybridisation in *Senecio* is ameliorated by genome duplication. *Curr. Biol.* 16: 1652–1659.
- Hegarty MJ, Jones JM, Wilson ID, Barker GL, Coghill JA, Sanchez-Baracaldo P, Liu G, Buggs RJA, Abbott RJ, Edwards KJ, et al. (2005) Development of anonymous cDNA microarrays to study changes to the *Senecio* floral transcriptome during hybrid speciation. *Mol. Ecol.* 14: 2493–2510.
- Henderson IR y Jacobsen SE (2007) Epigenetic inheritance in plants. *Nature* 447: 418-424.

- Hernández P, Martín A, Dorado G (1999) Development of SCARs by direct sequencing of RAPD products: a practical tool for the introgression and marker-assisted selection of wheat. *Mol Breed.* 5:245–253.
- Hitchcock AS (1927) The grasses of Ecuador, Perú and Bolivia. *Contrib. U. S. Natl. Herb.* 24: 435.
- Hong D, Wan L, Liu P, Yang G y He Q (2006) AFLP and SCAR markers linked to the suppressor gene (*Rf*) of a dominant genetic male sterility in rapeseed (*Brassica napus* L.). *Euphytica* 151:401–409.
- Huang J, Zhao X, Yu H, Ouyang Y, Wang L y Zhang Q (2009) The ankyrin repeat gene family in rice: genome-wide identification, classification and expression profiling. *Plant Mol Biol.* (DOI 10.1007/s11103-009-9518-6)
- Huo H, Conner JA y Ozias-Akins P (2009) Genetic mapping of the apospory-specific genomic region in *Pennisetum squamulatum* using retrotransposon-based molecular markers. *Theor Appl Genet.* (DOI 10.1007/s00122-009-1029-y)
- InfoStat (2001). InfoStat, versión 2001. Manual del Usuario. Grupo Infostat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba. Primera Edición, Editorial Brujas Argentinas. 314 pp.
- Iwamasa M, Ueno I y Nishlura M (1967) Inheritance of nucellar embryony in Citrus. *Bull. Hort. Res. Sta. Jpn. Ser. B* 7: 1–8.
- Jaccard P (1908) Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull Soc Vaud Sci Nat.* 44: 223-270.
- Jaligot E, Beulé T, Baurens FC, Billote N y Rival A (2004) Search for methylation-sensitive amplification polymorphisms (MSAPs) associated with the « mantled » variant phenotype of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Genome* 47: 224-228.
- Jeddeloh JA, Bender J y Richards EJ (1998) The DNA methylation locus *DDMI* is required for maintenance of gene silencing in *Arabidopsis*. *Genes & Dev.* 12: 1714–1725.
- Jeddeloh JA, Stokes TL y Richards EJ (1999) Maintenance of genomic methylation requires a SWI2/SNF2-like protein. *Nat. Genet.* 22: 94–97.
- Jefferson RA y Bicknell RA (1995) The potential impacts of apomixis: A molecular genetics approach. In *The Impact of Plant Molecular Genetics*, B.W.S. Sobral, ed (Boston, MA: Birkhäuser), pp. 87–101.
- Jenuwein T y Allis CD (2001) Translating the histone code. *Science* 293: 1074–1080.

- Jessup RW, Burson BL, Burow GB, Wang Y-WCC, Li Z, et al. (2002) Disomic inheritance, suppressed recombination, and allelic interactions govern apospory in buffelgrass as revealed by genome mapping. *Crop Sci.* 42: 1688-94.
- Johanson U, West J, Lister C, Michaels S, Amasino R, Dean C (2000) Molecular analysis of FRIGIDA, a major determinant of natural variation in *Arabidopsis* flowering time. *Science* 290: 344–47.
- Kakutani T (2002) Epi-Alleles in Plants: Inheritance of Epigenetic Information over Generations. *Plant and Cell Physiology* 43(10): 1106-1111.
- Kakutani T, Jeddelloh JA, Flowers S, Munakata K y Richards EJ (1996) Developmental abnormalities and epimutations associated with DNA hypomethylation mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 12406–12411.
- Kakutani T, Munakata K, Richards EJ y Hirochika H (1999) Meiotically and mitotically stable inheritance of DNA hypomethylation induced by *ddm1* mutation of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 151: 831-838.
- Kalisz S y Purugganan MD (2004) Epialleles via DNA methylation: consequences for plant evolution. *Trend Ecol Evol* 19: 309–314.
- Kankel MW, Ramsey DE, Stokes TL, Flowers SK, Haag JR, Jeddelloh JA, Riddle NC, Verbsky ML y Richards EJ (2003) *Arabidopsis* MET1 cytosine methyltransferase mutants. *Genetics* 163: 1109–1122.
- Kashkush K, Feldman M y Levy AA (2003) Transcriptional activation of retrotransposons alters the expression of adjacent genes in wheat. *NatGenet.* 33: 102–106.
- Kato M, Miura A, Bender J, Jacobsen SE y Kakutani T (2003) Role of CG and non-CG methylation in immobilization of transposons in *Arabidopsis*. *Current Biology* 13: 421–426.
- Kaup S, Grandjean V, Mukherjee R, Kapoor A, Keyes E, Seymour CB, Mothersill CE y Schofield PN (2006) Radiation-induced genomic instability is associated with DNA methylation changes in cultured human keratinocytes. *Mutat Res/Fundam Mol Mech Mutagen* 597:87–97.
- Koltunow AM (1993) Apomixis: embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules *The Plant Cell* 5: 1425-1437.
- Koltunow AM y Grossniklaus U (2003) Apomixis: a developmental perspective. *Annu Rev Plant Biol* 54: 547–574.

- Koltunow AM, Bicknell RA y Chaudhury AM (1995) Apomixis: Molecular strategies for the generation of genetically identical seeds without fertilization. *Plant Physiol.* 108: 1345-1352.
- Koltunow AM, Johnson SD y Bicknell RA (2000) Apomixis is not developmentally conserved in related, genetically characterized *Hieracium* plants of varying ploidy. *Sexual Plant Reproduction* 12: 253–266.
- Kosambi DD (1944) The estimation of map distance from recombination values. *Ann. Eugen.* 12: 172-175.
- Labombarda P, Busti A, Caceres ME, Pupilli F y Arcioni S (2002) An AFLP marker tightly linked to apomixis reveals hemizygoty in a portion of the apomixis-controlling locus in *Paspalum simplex*. *Genome* 45: 513-19.
- Lander ES, Green P, Abrahamson J, Barlow A, Daly MJ, Lincoln SE y Newburg L (1987) MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1: 174-181.
- Larson SR, Waldron BL, Monsen SB, John LSt, Palazzo AJ, McCracken CL y Harrison RD (2001) AFLP variation in agamospermous and dioecious bluegrass of western North America. *Crop Sci.* 41: 1300–1305.
- Laspina NV, Vega T, Seijo JG, González AM, Martelotto LG, Stein J, Podio M, Ortiz JP, Echenique VC, Quarín CL y Pessino SC (2008) Gene expression analysis at the onset of aposporous apomixis in *Paspalum notatum*. *Plant Molecular Biology* 67: 615-628.
- Leblanc O, Grimanelli D, Gonzalez-de-Leon D y Savidan Y (1995) Detection of the apomictic mode of reproduction in maize-Tripsacum hybrids using maize RFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* 90: 1198-1203.
- Lee HS y Chen ZJ (2001) Protein-coding genes are epigenetically regulated in *Arabidopsis* polyploids. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98:6753–6758.
- Leitch IJ y Bennett MD (1997) Polyploidy in Angiosperms, *Trends Plant Sci.* 2: 470–476.
- Levy AA y Feldman M (2002) The Impact of Polyploidy on Grass Genome Evolution, *Plant Physiol.* 130: 1587–1593.
- Levy AA y Feldman M (2004) Genetic and epigenetic reprogramming of the wheat genome upon allopolyploidization. *Biol J Linn Soc* 82: 607–613.

- Li X, Yu X, Wang N, Feng Q, Dong Z, Liu L, Shen J y Bao Liu (2007) Genetic and epigenetic instabilities induced by tissue culture in wild barley (*Hordeum brevisubulatum* (Trin.) Link). *Plant Cell Tiss Organ Cult* 90: 153–168.
- Li YG, Dewald CL y Sims PL (1999) Genetic relationships within *Tripsacum* as detected by RAPD variation. *Ann. Bot.* 84: 695–702.
- Lippman Z, Gendrel A-V, Black M, Vaughn MW, Dadhla N, McCombie W R, Lavine K, Mittal V, May B, Kasschau K D, Carrington J C, Doerge, R W, Colot V y Martienssen R (2004) Role of transposable elements in heterochromatin and epigenetic control. *Nature* 430: 471-476.
- Liu B y Wendel JF (2003) Epigenetic phenomena and the evolution of plant allopolyploids. *Mol Phylogenet Evol* 29: 365–379.
- Liu B, Brubaker CL, Mergeai G, Cronn RC y Wendel JF (2001) Polyploid formation in cotton is not accompanied by rapid genomic changes. *Genome* 44: 321–330.
- Liu B, Vega JM y Feldman M (1998) Rapid genomic changes in newly synthesized amphiploids of Triticum and Aegilops II. Changes in low-copy coding DNA sequences. *Genome* 41: 535–542.
- Liu ZW, Jarret RL, Duncan RR y Kresovich S (1994) Genetic relationships and variation among ecotypes of seashore paspalum (*Paspalum vaginatum*) determined by random amplified polymorphic DNA markers. *Genome* 37: 1011–1017.
- Lubbers EL, Arthur L, Hanna WW y Ozias Akins P (1994) Molecular markers shared by diverse apomictic *Pennisetum* species. *Theor. Appl. Genet.* 89: 636–642.
- Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF y Richmond TJ (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389(6648): 251-60.
- Lukens LN, Pires JC, Leon E, Vogelzang R, Oslach L y Osborn T (2006) Patterns of sequence loss and cytosine methylation within a population of newly resynthesized *Brassica napus* allopolyploids. *Plant Physiol.* 140: 336–348.
- Lux SE, John KM y Bennett V (1990) Analysis of cDNA for human erythrocyte ankyrin indicates a repeated structure with homology to tissue-differentiation and cell-cycle control proteins. *Nature* 344: 36–43.
- Ma H, Moore PH, Liu Z, Kim MS, Yu Q, Fitch MMM, Sekioka T, Paterson AH y Ming R (2004) High density linkage mapping revealed suppression of recombination at the sex determination locus in papaya. *Genetics* 166: 419-436.

- Madlung A, Masuelli RW, Watson B, Reynolds SH, Davison J y Comai L (2002) Remodeling of DNA methylation and phenotypic and transcriptional changes in synthetic *Arabidopsis* allotetraploids. *Plant Physio.* 1129: 733–46.
- Madlung A, Tyagi AP, Watson B, Jiang H, Kagochi T, Doerge RW, Martienssen R y Comai L (2005) Genomic changes in synthetic *Arabidopsis* polyploids. *Plant J* 41: 221–230.
- Mantel N (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res* 27: 209-220.
- Marfil CF, Camadro EL y Masuelli RW (2009) Phenotypic instability and epigenetic variability in a diploid potato of hybrid origin, *Solanum ruiz-lealii*. *BMC Plant Biology* 9 (DOI: 10.1186/1471-2229-9-21).
- Martelotto LG, Ortiz JPA, Stein J, Espinoza F, Quarín CL y Pessino SC (2005) A comprehensive analysis of gene expression alterations in a newly synthesized *Paspalum notatum* autotetraploid. *Plant Science* 169: 211-220.
- Martelotto LG, Ortiz JPA, Stein J, Espinoza F, Quarín CL y Pessino SC (2007) Genome rearrangements derived from autopolyploidization in *Paspalum* sp. *Plant Science* 172: 970–977.
- Martienssen RA (1998) Functional genomics: probing plant gene function and expression with transposons. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 95 (5): 2021-2026.
- Martínez EJ, Acuña CA, Hojsgaard DH, Tcach MA y Quarín CL (2007) Segregation for Sexual Seed Production in *Paspalum* as Directed by Male Gametes of Apomictic Triploid Plants. *Annals of Botany* 100: 1239–1247.
- Martínez EJ, Espinoza F y Quarín CL (1994) BIII progeny (2n+n) from apomictic *Paspalum notatum* obtained through early pollination. *J Hered.* 85: 295-297.
- Martínez EJ, Hopp E, Stein J, Ortiz JPA y Quarín CL (2003) Genetic characterization of apospory in tetraploid *Paspalum notatum* based on the identification of linked molecular markers. *Molecular Breeding* 12 (4): 319-327
- Martínez EJ, Urbani MH, Quarín CL y Ortiz JPA (2001) Inheritance of apospory in bahiagrass, *Paspalum notatum*. *Hereditas* 135: 19-25.
- Matzke MA y Matzke AJM (1995) How and why do plants inactivate homologous (trans)genes. *Plant Physiol.* 107:679–85.



- McClelland M, Nelson M y Raschke E (1994) Effect of site-specific modification on restriction endonucleases and DNA modification methyltransferases. *Nucleic Acids Res.* 22: 3640-3659.
- McClintock B (1984) The significance of responses of the genome to challenge. *Science* 226: 792–801.
- Mecchia MA, Ochogavía A, Selva JP, Laspina N, Felitti S, Martelotto LG, Spangenberg G, Echenique V, Pessino SC (2007) Genome polymorphisms and gene differential expression in a ‘back-andforth’ ploidy-altered series of weeping lovegrass (*Eragrostis curvula*). *J Plant Physiol.* 164(8): 1051–1061.
- Michener CD y Sokal RR (1957) A quantitative approach to a problem of classification. *Evolution*, 11: 490–499.
- Miles JW (2007) Apomixis for Cultivar Development in Tropical Forage Grasses. *Crop Sci.* 47: 238-249.
- Mittelsten Scheid O, Afsar K y Paszkowski J (2003) Formation of stable epialleles and their paramutation-like interaction in tetraploid Arabidopsis. *Nat. Genet.* 34: 450–454
- Mittelsten Scheid O, Jakovleva L, Afsar K, Maluszynzka J y Paszkowski J (1996) A change in ploidy can modify epigenetic silencing. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 7114-7119.
- Morgante M y Olivieri AM (1993) PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant J.* 3: 175–182.
- Mousavi A y Hotta Y (2005) Glycine-rich proteins. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 120: 169–174.
- Nagamura Y, Antonio BA y Sasaki T (1997) Rice molecular genetic map using RFLPs and its applications. *Plant Mol. Biol.* 35: 79–87.
- Naumova TN, Hayward MD y Wagenvoort M (1999) Apomixis and sexuality in diploid and tetraploid accessions of *Brachiaria decumbens*. *Sex and Plant Reprod* 12: 43-52.
- Negi MS, Devic M, Delseny M y Lakshmikumaran M (2000) Identification of AFLP fragments linked to seed coat colour in *Brassica juncea* and conversion to a SCAR marker for rapid selection. *Theor Appl Genet.* 101:146–152.
- Nogler GA (1982) How to obtain diploid apomictic *Ranunculus auricomus* plants not found in the wild state. *Botanica Helvetica* 92:13-22.

- Nogler GA (1984) Gametophytic apomixis. In: Johri BM (ed). Embryology of angiosperms. Springer-Verlag, Berlin, pages 475-518.
- Noguera FJ, Capel J, Alvarez JI y Lozano R (2005) Development and mapping of a codominant SCAR marker linked to the andromonoecious gene of melon. *Theor Appl Genet.* 110: 714–720.
- Norrmann GA, Bovo OA y Quarin CL (1994) Postzygotic seed abortion in sexual diploid X apomictic tetraploid intraspecific *Paspalum* crosses. *Austr. J. Bot.* 42: 449-456.
- Norrmann GA, Quarin CL y Burson BL (1989) Cytogenetics and reproductive behaviour of different chromosomes races in six *Paspalum* species. *J. Hered.* 80: 24-28.
- Ochogavía AC, Cervigni G, Selva JP, Echenique VC y Pessino SC (2009) Variation in cytosine methylation patterns during ploidy level conversions in *Eragrostis curvula*. *Plant Mol Biol.* 70: 17-29.
- Ortiz JPA, Pessino SC y Quarin CL (2004) Manipulación de la Apomixis y su Aplicación en la Agricultura. En: Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. Ed. INTA. pp 283-292
- Ortiz JPA, Pessino SC, Bhat V, Hayward MD y Quarin CL (2001) A genetic linkage map of diploid *Paspalum notatum*. *Crop Sci.* 41: 823-830.
- Ortiz JPA, Pessino SC, Leblanc B, Hayward MD y Quarín CL (1997) Genetic fingerprinting for determining the mode of reproduction in *Paspalum notatum*, a subtropical apomictic forage grass. *Theor. Appl. Genet.* 95: 850-856.
- Osborn TC, Pires JC, Birchler JA, Auger DL, Chen ZJ, Lee HS, Comai L, Madlung A, Doerge RW, Colot V y Martienssen RA (2003) Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids. *Trends Genet.* 19: 141–147.
- Otto SP y Whitton J (2000) Polyploid incidence and evolution. *Annual Review of Genetics* 34: 401–437.
- Ozias-Akins P (2006) Apomixis: developmental characteristics and genetics. *Crit Rev Plant Sci.* 25: 199–214.
- Ozias-Akins P y van Dijk PJ (2007) Mendelian genetics of apomixis in plants. *Annu Rev Genet.* 41: 509–537.
- Ozias-Akins P, Roche D y Hanna WW (1998) Tight clustering and hemizyosity of apomixis-linked molecular markers in *Pennisetum squamulatum* implies genetic

- control of apospory by a divergent locus that may have no allelic form in sexual genotypes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95: 5127-5132.
- Ozkan H, Levy AA y Feldman M (2001) Allopolyploidy-induced rapid genome evolution in the wheat (*Aegilops-Triticum*) group. Plant Cell 13: 1735–1747.
- Ozkan H, Tuna M y Galbraith DW (2006) No DNA loss in autotetraploids of *Arabidopsis thaliana*. Plant Breed 125: 288–291.
- Paran I y Michelmore RW (1993) Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. Theor. Appl. Genet. 85: 985-993.
- Pessino SC y Ortiz JPA (2009) Caracterización molecular de la apomixis y su aplicación en la agricultura. In press.
- Pessino SC, Espinoza F, Martínez EJ, Ortiz JPA, Valle E y Quarín CL (2001) Isolation of cDNA clones differentially expressed in flowers of apomictic and sexual *Paspalum notatum*. Hereditas 134: 35-42.
- Pessino SC, Evans C, Ortiz JPA, Armstead I, do Valle CB y Hayward MD (1998) A genetic map of the apospory-region in Brachiaria hybrids: identification of two markers closely associated with the trait. Hereditas 128: 153-158.
- Pessino SC, Ortiz JPA, Leblanc O, do Valle CB, Evans C y Hayward MD (1997) Identification of a maize linkage group related to apomixis in Brachiaria. Theor Appl Genet. 94: 439-444.
- Pikaard CS (2000) The epigenetics of nucleolar dominance. Trends in Genetics 16: 495–500.
- Pozzobon MT y Valls JFM (1997) Chromosome number in germoplasma accessions of *Paspalum notatum* (Gramineae). Braz J Genetics 20: 29.34.
- Pupilli F, Caceres ME, Quarín CL y Arcioni S (1997) Segregation analysis of RFLP markers reveals a tetrasomic inheritance in apomictic *Paspalum simplex*. Genome 40: 822-828.
- Pupilli F, Labombarda P, Caceres ME, Quarín CL y Arcioni S (2001) The chromosome segment related to apomixis in *Paspalum simplex* is homoeologous to the telomeric region of the long arm of rice chromosome 12. Mol. Breed 8: 53–61.
- Pupilli F, Martínez EJ, Busti A, Calderini O, Quarín CL y Arcioni S (2004) Comparative mapping reveals partial conservation of synteny at the apomixis locus in *Paspalum* spp. Mol. Genet. Genom. 270: 539-48.

- Qu L y Hancock JF (1995) Nature of 2n gamete formation and mode of inheritance in interspecific hybrids of diploid *Vaccinium darrowianum* and tetraploid *V. corymbosum*. *Theor Appl Genet.* 91: 1309-1315.
- Quarin CL (1992) The nature of apomixis and its origin in Panicoid grasses. *Apomixis Newsletter* 5: 8-15.
- Quarin CL y Lombardo EP (1986) Niveles de ploidía y distribución geográfica de *Paspalum quadrifarium* (Gramineae). *Mendeliana* 7: 101-107.
- Quarin CL y Norrmann GA (1987) Relaciones entre el número de cromosomas, su comportamiento en la meiosis y el sistema reproductivo del género *Paspalum*. En: *Anales del IV Congreso Latinoamericano de Botánica*, Bogotá, Colombia 3: 25-35.
- Quarin CL, Burson BL y Burton GW (1984) Cytology of intra and interspecific hybrids between two cytotypes of *Paspalum notatum* and *P. Cromeorrhizon*. *Bot. Gaz.* 145: 420-426.
- Quarin CL, Espinoza F, Martínez EJ, Pessino SC y Bovo OA (2001) A rise of ploidy level induces the expression of apomixis in *Paspalum notatum*. *Sex Plant Reprod.* 13: 243-249.
- Quarin CL, Hanna WW y Fernández A (1982) Genetic studies in diploid and tetraploid *Paspalum* species. *J. Hered.* 73: 254-256.
- Quarin CL, Norrmann GA y Urbani MH (1989) Polyploidization in aposporous *Paspalum* species. *Apomixis Newsl.* 2: 44-46.
- Quarin CL, Urbani MH, Blount AR, Martínez EJ, Hack CM, Burton GW y Quesenberry KH (2003) Registration of Q4188 and Q4205, sexual tetraploid germplasm lines of Bahiagrass. *Crop Sci.* 43: 745-746.
- Rabinowicz PD, Citek R, Budiman MA, Nunberg A, Bedell JA, Lakey N, O'Shaughnessy AL, Nascimento LU, McCombie WR, Martienssen RA (2005) Differential methylation of genes and repeats in land plants. *Genome Res.* 15: 1431-1440.
- Rabinowicz PD, Palmer LE, May BP, Hemann MT, Lowe SW, McCombie WR y Martienssen RA (2003) Genes and transposons are differentially methylated in plants, but not in mammals. *Genome Res* 13:2658-2664.
- Rabinowicz PD, Schutz K, Dedhia N, Yordan C, Parnell LD, Stein L, McCombie WR y Martienssen RA (1999) Differential methylation of genes and retrotransposons facilitates shotgun sequencing of the maize genome. *Nat. Genet.* 23: 305-308.

- Rajapakse S, Byrne DH, Zhang L, Anderson N, Arumuganathan K y Ballard RE (2001) Two genetic linkage maps of tetraploid roses. *Theor Appl Genet.* 103: 575–583.
- Ramsey J y Schemske DW (1998) Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. *Ann Rev Ecol Syst.* 29: 467–501.
- Rapp AR y Wendel JF (2005) Epigenetics and plant evolution. *New Phytologist* 168: 81-91.
- Reyna-López GE, Simpson J y Ruiz-Herrera J (1997) Differences in DNA methylation patterns are detectable during the dimorphic transition of fungi by amplification of restriction polymorphisms. *Mol Gen Genet.* 253: 703-710.
- Richards AJ (1986) *Plant Breeding systems.* George, Allen and Unwin, London. p. 403-456.
- Riddle NC y Richards EJ (2002) The control of natural variation in cytosine methylation in *Arabidopsis*. *Genetics* 162: 355–363.
- Rieseberg LH (2001) Chromosomal rearrangements and speciation. *Trends in Ecology and Evolution* 16: 351–358.
- Ringli C, Keller B y Ryser U (2001) Glycine-rich proteins as structural components of plant cell walls. *Cell Mol Life Sci.* 58: 1430-1441.
- Ritter E, Gebhardt C y Salamini F (1990) Estimation of recombination frequencies and construction of RFLP linkage maps in plants from crosses between heterozygous parents. *Genetics* 125: 645-654.
- Roche D, Chen Z, Hanna WW y Ozias-Akins P (2001a). Non-mendelian transmission of an apospory-specific genomic region in a reciprocal cross between sexual pearl millet (*Pennisetum glaucum*) and an apomictic F1 (*P. glaucum* x *P. squamulatum*). *Sex Plant Reprod.* 13: 217-223.
- Roche D, Conner JA, BudimanMA, Frisch D, Wing R, HannaWW, Ozias-Akins P (2002) Construction of BAC libraries from two apomictic grasses to study the microlinearity of their apospory-specific genomic regions. *Theor Appl Genet* 104: 804–812.
- Roche D, Hanna WW y Ozias-Akins P (2001b). Is supernumerary chromatin involved in gametophytic apomixis of polyploid plants? *Sex Plant Reprod.* 13: 343–349.
- Rodrigues JCM y Koltunow AMG (2005) Epigenetic aspects of sexual and asexual seed development. *Acta Biol Cracov Ser Bot.* 47: 37-49
- Rohlf FJ (2000) NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, ver. 2.1. Exeter software, Setauket.

- Saghai-Marouf MA, Soliman KM, Jorgensen RA y Allard RW (1984) Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proc Natl Acad Sci.* 81: 8014-8018.
- Salmon A, Ainouche ML y Wendel JF (2005) Genetic and epigenetic consequences of recent hybridization and polyploidy in *Spartina* (Poaceae). *Mol Ecol.* 14: 1163–1175.
- Salmon A, Cloutault J, Jenczewski E, Chable V y Manzanares-Dauleux MJ (2008) *Brassica oleracea* displays a high level of DNA methylation polymorphism. *Plant Science* 174: 61-70.
- Sambrook J, Fritsch EF y Maniatis T (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* 2nd. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- SanMiguel P, Tikhonov A, Jin YK, Motchoulskaia N, Zakharov D, Melake Berhan A, Springer PS, Edwards KJ, Avramova Z y Bennetzen JL (1996) Nested retrotransposons in the intergenic regions of the maize genome. *Science* 274: 765-768.
- Savidan Y (1981) Genetics and utilization of apomixis for the improvement of Guineagrass (*Panicum maximum* Jacq). *Proc. XIV Intl. Grassland Congr.* Lexington Ky, pp.182-184.
- Savidan Y (2000) Apomixis: Genetics and Breeding. In: *Plant Breeding Reviews*, volume 18. J. Janick (Ed.). John Wiley & Sons, Inc. London.
- Savidan Y y Pernès J (1982) Diploid-tetraploid-dihaploid cycles and the evolution of *Panicum maximum* Jacq. *Evolution* 36: 596–600.
- Saze H, Mittelsten Scheid O y Paszkowski J (2003) Maintenance of CpG methylation is essential for epigenetic inheritance during plant gametogenesis. *Nat Genet* 34: 65-69.
- Schmidt EDL, Guzzo F, Toonen MAJ, de Vries SC (1997) A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. *Dev.* 124: 2049-2062.
- Sedgwick SG y Smerdon SJ (1999) The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework. *Trends Biochem Sci.* 24(8): 311-6.
- See D, Kanazin V, Kephart K y Blake T (2002) Mapping genes controlling variation in barley grain protein concentration. *Crop Science* 42: 680–685.

- Shagai-Marroof MA, Soliman KM, Jorgensen RA y Allard RW (1984) Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal locations, and populations dynamics. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 8014-8018.
- Shaked H, Kashkush K, Ozkan H, Feldman M y Levy AA (2001) Sequence elimination and cytosine methylation are rapid and reproducible responses of the genome to wide hybridization and allopolyploidy in wheat. *Plant Cell* 13: 1749–1759.
- Sharbel TF y Mitchell-Olds T (2001) Recurrent polyploid origins and chloroplast phylogeography in the *Arabis holboellii* complex (*Brassicaceae*). *Heredity* 87 59–68.
- Sharbel TF, Voigt ML, Corral JM, Thiel T, Varshney A, Kumlehn J, Vogel H y Rotter B (2009) Molecular signatures of apomictic and sexual ovules in the *Boechera holboellii* complex. *Plant J* 58: 870–882.
- Siena LA, Sartor ME, Espinoza F, Quarín CL y Ortiz JPA (2008) Genetic and embryological evidences of apomixis at the diploid level in *Paspalum rufum* support recurrent auto-polyploidization in the species. *Sex Plant Reprod.* 21: 205–215
- Sokal RR y Michener CD (1958) A statistical method for evaluating systematic relationships. *Univ. Kans. Sci. Bull.* 38: 1409-1438.
- Song K, Lu P, Tang K y Osborn TC (1995) Rapid genome change in synthetic polyploids of *Brassica* and its implications for polyploid evolution. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92: 7719–7723.
- Sorensen T (1948) A method of establishing groups of equal amplitude in plant sociology based on similarity of species content and its applications to analysis of the vegetation on Danish commons. *Biological Skr.* 15:201-293.
- Southern EM (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol.* 98: 503-517.
- Stebbins GL (1971) Chromosomal evolution in higher plants. Addison-Wesley, New York.
- Stein J, Pessino SC, Martínez EJ, Rodríguez MP, Siena L, Quarín CL y Ortiz JPA (2007). A genetic map of tetraploid *Paspalum notatum* Flugge (bahia grass) based on single-dose molecular markers. *Molecular Breeding* 20: 153-166.
- Stein J, Quarín CL, Martínez EJ, Pessino SC y Ortiz JPA (2004) Tetraploid races of *Paspalum notatum* show polysomic inheritance and preferential chromosome pairing around the apospory-controlling locus. *Theor Appl Genet.* 109: 186-191.

- Stupar RM, Bhaskar PB, Yandell BS, Rensink WA y Hart AL (2007) Phenotypic and transcriptomic changes associated with potato autopolyploidization. *Genetics* 176: 2055–67.
- Suzuki K, Suzuki I, Leodolter A, Alonso S, Horiuchi S, Yamashita K y Perucho M (2006) Global DNA demethylation in gastrointestinal cancer is age dependent and precedes genomic damage. *Cancer Cell* 9:199–207.
- Takata M, Kishima Y y Sano Y (2005) DNA methylation Polymorphism in Rice and Wild Rice Strains: Detection of Epigenetic Markers. *Breeding Sciences* 55: 57–63.
- Tardy-Planechaud S, Fujimoto J, Lin SS y Sowers LC (1997) Solid phase synthesis and restriction endonuclease cleavage of oligodeoxynucleotides containing 5-(hydroxymethyl)-cytosine. *Nucleic Acids Res.* 25: 553–558.
- Tariq M y Paszkowski J (2004) DNA and histone methylation in plants. *Trends Genet* 20: 244–251.
- Tian L, Fong MP, Wang JJ, Wei NE, Jiang H, Doerge RW y Chen ZJ (2005) Reversible histone acetylation and deacetylation mediate genome-wide, promoter-dependent and locus-specific changes in gene expression during plant development. *Genetics* 169: 337–345.
- Tischler CR y Burson BL (1995) Evaluating different bahiagrass cytotypes for heat tolerance and leaf epicuticular wax content. *Euphytica* 84: 229–235.
- Tucker MR y Koltunow AM (2009) Sexual and asexual (apomictic) seed development in flowering plants: molecular, morphological and evolutionary relationships. *Functional Plant Biology* 36: 490–504.
- Tucker MR, Araujo ACG, Paech NA, Hecht V, Schmidt EDL, Rossell JB, de Vries SC, y Koltunow AMG (2003) Sexual and apomictic reproduction in *Hieracium* subgenus *Pilosella* are closely interrelated developmental pathways. *Plant Cell* 15: 1524–1537.
- Turner BM (2000) Histone acetylation and an epigenetic code. *Bioessays* 22: 836–845.
- Tzafrir I, Dickerman A, Brazhnick O, Nguyen Q, McElver J, Frye C, Patton D, y Meinke D (2003) The Arabidopsis SeedGenes Project. *Nucleic Acids Res.* 31: 90–93.
- Vielle-Calzada JP, Crane CF y Stelly DM (1996) Apomixis: The asexual revolution. *Science* 274: 1322–1323.



- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Lee TV, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M y Zabeau M (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23: 4407-4414.
- Walder RY, Langtimm CJ, Catterjee R y Walder JA (1983) Cloning of the *MspI* modification enzyme. *J. Biol. Chem.* 258: 1235-1241.
- Wang CG, Li H, Xue ZY, Chen CB, Gu Y, Sun DL y Song WQ (2009) Marker-based analysis of genome structure and DNA methylation in a watermelon (*Citrullus lanatus*) ploidy series. *Botanical Studies* 50: 389-402.
- Wang J, Tian L, Lee H-S, Wei NE, Jiang H, Watson B, Madlung A, Osborn TC, Doerge RW, Comai L y Chen ZJ (2006) Genomewide nonadditive gene regulation in *Arabidopsis* allotetraploids. *Genetics* 172: 507-517.
- Wang J, Tian L, Madlung A, Lee H-S, Chen M, Lee JJ, Watson B, Kagochi T, Comai L y Chen ZJ (2004) Stochastic and epigenetic changes of gene expression in *Arabidopsis* polyploids. *Genetics* 167: 1961-1973.
- Waugh R, McLean K, Flavell AJ, Pearce SR, Kumar A, Thomas BBT y Powell W (1997) Genetic distribution of Bare-1-like retrotransposable elements in the barley genome revealed by sequence-specific amplification polymorphisms (S-SAP). *Mol Gen Genet.* 253: 687-694.
- Wessler SR, Bureau TE y White SE (1995) LTR-retrotransposons and MITEs: important players in the evolution of plant genomes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 5: 814-821.
- Winge O (1917) The chromosomes: their number and general importance. In: Jackson RC, Hauber D, editors. *Stroudsbery, PA: Hutchinson Ross. Polyploidy.* pp131-275.
- Winkler H (1916) Über die experimentelle Erzeugung von Pflanzen mit abweichenden Chromosomenzahlen. *Zeitschr f Bot* 8: 417-531.
- Winzer N, Di Renzo M y Olmos S (2004) Métodos para estimar variabilidad genética. En: *Biología y Mejoramiento Vegetal.* Ed. INTA. pp 199-210.
- Wu KK, Burnquist W, Sorrells ME, Tew TL, Moore PH y Tanksley SD (1992) The detection and estimation of linkage in polyploids using single-dose restriction fragments. *Theor. Appl. Genet.* 83: 294-300.
- Xiong LZ, Xu CG y Saghai Maroof MA (1999) Patterns of cytosine methylation in an elite rice hybrid and its parental lines, detected by methylation-sensitive polymorphism technique. *Mol Gen Genet* 261:439-446.

- Xu ML, Huaracha E y Korban SS (2001) Development of sequence-characterized amplified regions (SCARs) from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers tightly linked to the *Vf* gene in apple. *Genome* 44: 63-70.
- Xu ML, Li X y Korban SS (2000) AFLP-Based detection of DNA methylation. *Plant Mol. Biol. Rep.* 18: 361-368.
- Yap IV y Nelson RJ (1996) Winboot: a program for performing bootstrap analysis of binary data to determine the confidence limits of UPGMA-based dendrograms. *Manual*.
- Zhang H, Scheirer DC, Fowle WH y Goodman HM (1992) Expression of Antisense or Sense RNA of an Ankyrin Repeat-Containing Gene Blocks Chloroplast Differentiation in Arabidopsis. *The Plant Cell* 4(12): 1575-1588.
- Zhang MS, Yan HY, Zhao N, Lin XY, Pang JS, Xu KZ, Liu LX, Liu B (2007) Endosperm-specific hypomethylation, and meiotic inheritance and variation of DNA methylation level and pattern in sorghum (*Sorghum bicolor* L.) inter-strain hybrids. *Theor Appl Genet.* 115: 195–207.
- Zhang X, Yazaki J, Sundaresan A, Cokus S, Chan SW-L, Chen H, et al. (2006) Genome-wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in arabidopsis. *Cell* 126: 1–13.
- Zhang X, Clarenz O, Cokus S, Bernatavichute YV, Pellegrini M, et al. (2007) Whole-Genome Analysis of Histone H3 Lysine 27 Trimethylation in Arabidopsis. *PLoS Biol* 5(5): e129 (doi:10.1371/journal.pbio.0050129).
- Zhang X (2008) The epigenetic landscape of plants. *Science.* 320 (5875): 489-92.
- Zhao XX, Chai Y y Liu B (2007) Epigenetic inheritance and variation of DNA methylation level and pattern in maize intraspecific hybrids. *Plant Sci.* 172: 930–938.
- Zhao Y, Yu S, Xing C, Fan S y Song M (2008) Analysis of DNA Methylation in Cotton Hybrids and Their Parents. *Molecular Biology* 42 (2): 169–178.
- Zhong D, Pai A y Yan G (2004) AFLP-Based Genetic Linkage Map for the Red Flour Beetle (*Tribolium castaneum*) *Journal of Heredity* 95: 53-61.
- Zhong S, Li H, Bodia Z, Button J, Vespa L, Herzog M y Fray RG (2008) MTA Is an *Arabidopsis* Messenger RNA Adenosine Methylase and Interacts with a Homolog of a Sex-Specific Splicing Factor. *The Plant Cell* 20: 1278-1288.
- Zilberman D y Henikoff S (2007) Genome-wide analysis of DNA methylation patterns. *Development* 134: 3959-3965.

Zuloaga FO y Morrone O (2005) Revisión de las especies de *Paspalum* para América del Sur Austral (Argentina, Bolivia, Sur de Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay). Hollowell VC (Ed.). Missouri Botanical Garden Press, St. Luis, Missouri, USA.

## VIII ANEXOS

## Anexo A. Oligonucleótidos utilizados en las técnicas de MSAP y AFLP

Cebador	Secuencia (5'- 3')
Adaptador <i>EcoRI upper</i> <sup>1</sup>	CTCGTAGACTGCGTACC
Adaptador <i>EcoRI lower</i> <sup>1</sup>	AATTGGTACGCAGTC
Adaptador <i>MseI upper</i> <sup>1</sup>	GACGATGAGTCCTGAG
Adaptador <i>MseI lower</i> <sup>1</sup>	TACTCAGGACTCAT
Adaptador <i>HpaII/MspI upper</i> <sup>2</sup>	GACGATGAGTCTAGAA
Adaptador <i>HpaII/MspI lower</i> <sup>2</sup>	CGTTC TAGACTCATC
<b>Cebadores pre-selectivos</b>	
<i>EcoRI</i> + A <sup>1</sup>	GACTGCGTACCAATTCA
<i>MseI</i> + A <sup>1</sup>	GATGAGTCCTGAGTAAA
<i>HpaII/MspI</i> + A <sup>2</sup>	GATGAGTCTAGAACGGA
<b>Cebadores selectivos</b>	
E31 <sup>1</sup>	<i>EcoRI</i> + A + AA
E32 <sup>1</sup>	<i>EcoRI</i> + A + AC
E33 <sup>1</sup>	<i>EcoRI</i> + A + AG
E34 <sup>1</sup>	<i>EcoRI</i> + A + AT
E35 <sup>1</sup>	<i>EcoRI</i> + A + CA
E36 <sup>1</sup>	<i>EcoRI</i> + A + CC
E37 <sup>1</sup>	<i>EcoRI</i> + A + CG
E38 <sup>1</sup>	<i>EcoRI</i> + A + CT
E40 <sup>1</sup>	<i>EcoRI</i> + A + GC
E42 <sup>1</sup>	<i>EcoRI</i> + A + GT
E44 <sup>1</sup>	<i>EcoRI</i> + A + TA
M32 <sup>1</sup>	<i>MseI</i> + A + AC
M33 <sup>1</sup>	<i>MseI</i> + A + AG
M37 <sup>1</sup>	<i>MseI</i> + A + CG
M42 <sup>1</sup>	<i>MseI</i> + A + GT
M43 <sup>1</sup>	<i>MseI</i> + A + TA
HM2 <sup>3</sup>	<i>HpaII/MspI</i> + A + AT
HM4 <sup>3</sup>	<i>HpaII/MspI</i> + A + GT
HM5 <sup>3</sup>	<i>HpaII/MspI</i> + A + GC
HM6 <sup>3</sup>	<i>HpaII/MspI</i> + A + CA
HM7 <sup>3</sup>	<i>HpaII/MspI</i> + A + CT

<sup>1</sup> Tomados de la serie KeyGene, AFLP Protocol for Public Release, Version 2.0, Netherlands, 1994. <sup>2</sup> Tomados de Xu et al. (2000). <sup>3</sup> Esta Tesis.

**Anexo B.** Secuencias derivadas de la técnica de MSAP en *P. notatum* (5' – 3')

A7	ATTTGACCAATGTAATGAAAAAGGTATACGTTTTTCAGTTATATTATACTTTATTTCA CTTATAAAGTTGTACATCATTTATTTTTAAAAAGCTATTTATAATTTTCTGAAATTCAAA TATTATTTAGCCATTATCATATCATGGCAATGCTACATGCCAGAACTACTACAAATGC AAGTCAAGCCAAGGTTCGAAAAGAGAAGCTGTTTAAATGGTTGAGAGTGTAAAAGAAGT CTAGTTTTATATCTGAAAGATAAAAAGGTGGACCTAGAGGGAGTTAGTAATAATATTT GAGGAGTCTAGTTTTATATTTGAGGTTTCAGTACCGCAACTGCAATTAAGGCATAAC ATTCTGATAGTTAACACCCCAATCAATTAGTACTAGCCTATTGTACCTAGACATCCG CCAGCTGACTACTAGTACATTGATCTTTAGCCCGCTAACCATTACCTATGGTTTAAAA AATAAAAAATTAGTTTGAGCCTAC
A23	AGCAATCTTTAATTATATTTATGATTA AAAACAAGAATTACCTTAATATTGAAGAAGTG AAGTTCAAAATCTTTGAGTCTATGGTGGCATCATCTTTTTCTTTGGAATGCCATGATTG CATGCACCATCAAGTGTGGGGAAGAATACTTGTCTTTCCCGAAATTCAGCTTTCCTT ATTCTATCCCTTTAGTAATTCGACAATAACTCCCACATCTGAAGTCCAAATATGCCAA TCCGACTCTATCTTGAAGAGCTCGAAACTATCTACAACCTTTGGTATGTGGACTTTCT TCATTTAACATCATTAAGGTC TTCGAATCGGCCCCACAAGGTGTTGCTGTCTTGAATT GGTACGCAGTCA
B11	ATGAATACTGGTGCTTCGTTTGGAACTGGAGTAATAAGAAGATCTGTCTCTATATATT CATTTTACATTTCTTTCACAGAAGACTTCACCACTCAAAAATTCCTCCTATTTTGGAA GTTCCCTTGCACTTTTATGTTGGAGGCAATGCATTTACAATGGTGCATGTTTCGTGTGT TATTTCCGCTCATTAAACACTACCCTGCGAGGAAAACGGATACTGTTATGGAACTAG TGGTGGACCCAGCTTTCACACATAGGGTATGCCAGGAGAAAACAATAGCAAAAAAA AGGTCTACAACAGGATTCGAACTCAGGCCTCGAAGTATAGAGCAGCACTCCGTCACT CCTAACCACTAGGATAAGCATTGTTTTGTGTTCTTAGGGTATGC
B26	GCGTCCGTTTCCGCGTGGGCTGCTCCTGCAGTCTGAATTGGAGTCACGCGTGTATGGC CTGTTTTGAAAATTCCTGTTGACTGCAAAAAGAAATTTACGGTGATGTCAATTGATATG GAAATATTATCATTTTAGCTTTCCATCGATATATAGAACGTCGAAACAGTGTCCATAT GCGACCAGAGCGTCCGTTTTCCGCTGGGCTGCCCTGCCATCCGAATTGGAATCGCA CGTGTATGGCTAGTCCCGCAAGCCATATTTGTGAGATGACGGACCAAGAAATTTTAT TCTTTTAAATATTAGGTACAGATTAGG
C19	ATCGTGTCAAGGAGACAGGAAACGCACATCTCAAGACTTGGATTGCAGTGCCAGTCCG CATTCGTGGTAGGGAGGGCAATGTGCGCCGTCCACGATTCAGAACGTGCTGTTTGTCT CATGATTGTGACAATGCACGATTCAGGACGTA CTGTGGCTGGTGGATGACCAAACCC CAAAAAAAAAGGC
D3	GCTAATAAAATCAAATAATATATAAAAAAACACTCAAGCAAAACATCTGGATCTTTG TTATCATTTGCATTATCCACCTCCAGGCAGGGCATA GTGCGGGGAAGCAAGCCTGGT GCGGTTGCAACAACCAAAACAACCGCTT GAGTTAAAGTGGCCGTTCTCTGCCGCGTA CATGTATTTGTACATAACTACCACATCTTCCGTCATTCCCTATGATTCTACCAGGTTG AATCTGAGGTGGATTGTAAAATTAATGGATCTTTAGGCTTAAACTCAAATTGGATCCAT ATAAATATGGATTAGTTCTAACTAATATGCAATTAGACAAGGCAGTAGGTAATATGT AAAAACTGCGGCAAAATGTATTGTTTCATTTGAACATTAACAAATAAAATCAACAC AT
E8	AACTAACTATTTTCATTGTGTCATGTCATCTATCGTGTAGAACGGTATGAAATAGTGT GAAACAGGATCAAAATCTTCAAATGCCAATCCTTCTTAAGGATAGCCTAGAGGGTAT TTGGATTTGGAGGCTAAAATTTAGCCAACGTCACATCGGATGTTTGGATGGTAGTTA GAAATATTAACATGGTTAAATTA AAAA ACTAATTACATGGTTCGAGGAGTAAACGGT GAGACGAATTTATTAAGCCTCGCGTTTACTCCTCATCTATGTAATTAGTTTTATAAT TAGACTATATTTAATACTTCTATCTAGCGTCGAAACATGCTATGTGAGGGGGTTAAAT TTGACCAGATGATCCAAACACCACTAGCTACTCCAG

E32	GCCTTAAAATGCACTTAAGTATATGGATAAGTAGTTTGAAGGATTATTTGACGAGTTT AATCCGTTTCCATAGGATTTCCATAATCCCCGATTTTCCCCAAATTTCCAGGGCTGT TTTTCTTCTAAATCGGCTTGAATGTGTTTGAAGGCACTTTCTTGGCAAATTTCT AGTTTTTGTTCATTTTCAATATGTCTCGCTCAGTGCTACTAGACCTTTTGTGCTAAA GTTGATTTGTAGTGAATATAGTAATATTTTGAATTG
F16	ATCCTTTGGTCTAAAGGGACACATAGGAAAATTTCTGTAGGATTTGAATTATACCA AACCTCCGTTTCATCCCTTTCAAAGGAGGTGCTAAGCTCATAAAGGGGCATTGTGTT GGTTACATGTATATTTAGCATCTTGGCCAAAGGAGGTGCTCATGCTTGTGCATCAAGC CGTGAATCTGCAACCTCCAATTACCTATTGCACACCGACTGACGGTACAAGCAACGA TGGAAAAATAAAACAAAGTCGTGTCACTGTATTTAACAATGGTTTCTGTTTGC
F18	ATAAAAAGTTTACCACAATACAAAAACTTTGTACGTCAGTTAAATAACTTTTGAATG TTCAATCAAAAAGTTTACAGATATAAACTTTCTACGGCACTTTTCGACGAATGCGACAT CGAGATATCGTATAGGTACCCTAAGAGTAGAGAGAAGCGTAGAAATGTGGGTTACTA TCGCTATGATCGGTGGAACCTCAGTGACTCAGGAGGTTTAGAGAGGTTTCGGGCCAAC CTGGGGGTGTAACACTCTACAAGCTGAGTGCCCCAAGACTTGATGCTCAGACGAGTT GAGAGGCTAAAACCTGCCATTCAGAACCCCTCCCCCTGTGATGC
G17	ATGAAGCCTGGGCAATGATGCATCATGAGTGTGGCATGCAGGAAAGCCAGTGGCTTA CTGATCTGTATCAGCAGAGGCATAAATGGTGCACAGCTCTTCATAAGGATGCGTTTG ATGGTGGGATCGAATTGATGGTTAAGAGTGAGGGTTTAAACCATGTTGTGAGCAGCT TTGATGATGAACCAACTTCACTCACCCTTTTGTCTTGTAGCTGGATAAAATTATAGG GAATTGGCGTACAAATGAGACTTCAGAGGACATTCGGTGCAACCATGCTGC
G43	CGATACATACTGACTGGAGAGGGAAAAATTTCTCATTTTCAGCTAGCACCAAATTGAAG CAAGTGAGAGCTCGCATCACATCGCATGCCGAGAGTTGTTCGCTTTGTTCAAATGTTT TTTATCTACCGCACGCTATGAATGGAGCAACTAATAAAGAGAGCGAGCATTTTTCTA TGTAGGCATTTGTTAAATATAGCACTTTTGGTCTGCTTCATAGCCTTGGGATCGTGAT GGAAGACATCTATATAACCCTCTAATGTTTATACAGGTGCATACATCACCTTCGCCTC TAACAACAGGTTTGTATGCACTTTTAAAAAAAATTAATAAATGAATTGTGGGACCC TCACCATGCATTTGCTCAAGTTGCGTTGGAATGTGAGCCCCAGCTACACCACATTCAT CAAAACACTCAGACAACGCCTAGAGAGTTATTTG
G44	CACGTGGTACATGTTTCGATGCTGACTTTTCCTCCTTGCCCCGGTGCATCATCATCTGC AACCCTTTCTTCGGGCTCAGGCATCTTCTCCTGCTCTTTACCTGCACGGCTAGGAGAT GGAGGGTCTGTGTGGACTTTCCACCCCTAGCCGTTACTGCATTTATGTGCTCCTTG GGAGGAGCTTCAGGTTGCCCTGGCAGTTTACCTGGATTTGTGTTAGGTAAGCAGCA GCCAACTAAGCTATTTGAGTTTCAAGCATTTTGTGTTGAAGCTAAGTTGGTTTTTCATAG CACTATTCAAAGTTTCCATTTGTAAATATATAGACTCAAACATCCTATCATTAGCAGC GAACTTTTTACTAATGCTATTATTCACAGCTTTCTGATCAAAAGTGAATTACTCTTA GGAAATTGCTGCGAATTTGAAGAGTTACCTTGCCCAGAGAAAGGGAGATGTGGTCTG

Anexo C. Secuencia de los marcadores de AFLP ligados a la aposporía en *P. notatum*

Marcador	Combinación Cebadores AFLP	Secuencia (5' – 3')
<b>J5</b>	e33m42e* (eAAG/mAGT)	GAATTC AAGAATCATTAGGGAAGCATGACAATTACC TTGAAAACACTAATTGCTCAGGGGTGGTATGCGCC GAGAGAAGTTGGAGACAATCCGCTGCTAGGGAACGT ATATCGTCGGTTTATTACATAGAACATAGGTACATAT TTATAGTCCGAAGACTTGGACAACAAGTCCGACTATT TCTATATCTAAAACCTACTTTAA
<b>J7</b>	e33m42g* (eAAG/mAGT)	TTAAAGTCTTAAAGTTGTAGGTACTAGGTAGTATGTA TATGAAATTCATAGGTGTATACTTGC GCACTGTATG TATTCATAGCTAGCGCCTATATACTAGTACTACTTGA ATTC
<b>U14</b>	e35m43n* (eACA/mATA)	TTAAAAGA ACTCACCAATCAAGCGTAATATTGATCCT ATTGACAGCCCATCACTCAGAGCACATTGCTTGTCTA CTAATCTCTGTGAATTC
<b>U16</b>	e35m43p* (eACA/mATA)	TTAAAAGGTCAAAACGGAGCGAGGCAGGCAGCACTC GAAAGAAAAGGTGATTAAGTCTAATAATGT CAGTG GAAAGATTCTAAAGGTCCACATGCCTAATCAGAAGC ACATCGAACCTACTGTGAATGCAACTGAAGTCCAAG AAACCAAGAAGATACCTGTAGTATGTGAATTC
<b>M3</b>	e36m37c* (eACC/mACG)	GAATTCACCAAGTCAGTCAACGTGCGGTTTTTCCTCT CGGCAATCCCGTTAGACTTGGGTGAATAAGATCAGA CCTAAGGCGTTTAA
<b>C5</b>	e32m33e* (eAAC/mAAG)	GAATTC AACAATCATCAAAGACTATATAACCTTTCAG GGCACAATCTATCTATGTATTTTGTCCAGCCCTACTG AAANCATGCTTCAACCTTTTAA
<b>I3</b>	e33m32c* (eAAG/mAAC)	GAATTC AAGCAACCAATCGGACCCCTAGTGCATTTCAC TGGAACGTCCGACGCCTGCATTTTGCATGCGGTGCGCT CATTCTTCTTCTGCGCCTTCTGTCTAGTTAGTGATC CCCAGACCGTTTCGATATGTGTAATATGCATCGGATCT TGATCTTCATTTGCGGCAATCTTCTCACCGGACCGTC CCNTGTGCATCACCGGATTGTTTGGTACGTGCAAAAA TTCGGCTTACGGCATTGGTCATTGATGCCTTGGGTC TTCTTTATACGTTTTAA

**Anexo D.** Secuencias extendidas por caminata cromosomal sobre los marcadores de AFLP ligados a la aposporía en *P. notatum*. En negrita se muestra el cebador específico externo y subrayados los cebadores diseñados a partir de las mismas.

Marcador	Extensión	Nombre	5'-3'
<b>I3</b>	5'	2B	<b>CTAGGGGTCCGATTGGTTGCTTGAATTCAGCTAGTCTGT</b> CATGTATTTAACCTACCAACCCTACCCCTACAATCACTACT CAATCACGACCTCCTGCATTGCTACCATATATCACATTTCCAAATCATATC
		3B.1	<b>CTAGGGGTCCGATTGGTTGCTTGAATTGAGTGTGGGGA</b> GGGAGACAGTGAGGTGAGGACACTAACCAACACCCCGGG TGTGGAGTAAATAAAGGCTTTCCG
		3B.2	<b>CGACGGCCCCGGGCTGGTCTGTGCAACAATTCAAGCAACC</b> <b>AATCGGACCCCTAGA</b>
		4B	<b>CTAGGGGTCCGATTGGTTGCTTGAATTGGGGCAGTTCTT</b> <b>GAGTTCTTCTGGCCTTCTGGTGGGCTTTTACCAGCCCGGGC</b> CGTCG
		5B	<b>CGACGGCCCCGGGCTGGTATCTAGCAGCTCAAGGCAAAACA</b> <b>GCATGTTCAAGCACATCTATCATAGCATGATTAATTC AAG</b> <b>CAACCAATCGGACCCCTAGA</b>
	3'	8A.1	ATCTTATGTCCTAATCAAAATACATGTTTGGCCTTCAGTTT TCAAAAGCTCTGAATCGCTTCCAAAAGGAGGATCCTACTTT CCGTGTGGGTTTGGATCCGGAGAGTGGCCAGGTTTGTATC TCATCCATTTCAATTTCAAGTTGTATGTTTGCAGTACTCA ATACATTATATTTGCTTGTAGACAATTTTCAGGGATGGG TGAGCTATATTTGGATATATATGTTGAACGTATAAGAGAA <b>GACCAAGGCATCA</b>
		8A.2	CGACGGCCCCCTCGGAATCCATCCTGAAGTTTCGAATGTCAC AGTTAATCCATTGAGATTCTCCAAGCTCTATTTCTGNNNAA ATTCAGCTCTCTGGGGCTTTATTTGCCTAGGTGGTGCAACA AGGGCACCAGCCATCATTGGAGGTACATCTGGTGTGTTGAT CAAGCTCGTAGTGGACATATTTGCAAGTCTAGAGATTGTA CAATGCATGTAAGATAAAAAATAGCCAAACAGATACTTGAC AGGCAGTATATGAAAAGAAAGAATACTGTGATCACCTTG TGTGACGGCATGTATCCAGGAAAGAGCAATCTCCCAAGTT TGTATCAGTATGTGGAGCAATAATACGCCGAAAGTGGACC TGCTTGCAGTGAAACAGAACATAATGATTACATGTCATGT GATAAAAAACAACGTATAAGAGAAGACCAAGGCATCA
		9A	ATANGGCACGCGTGGTTCGACGGCCNNNTGGTCTGGAAC ATGATGCGCTCTGAACCTCTCGGTGAACCTCCTGCCAGGTAA TGGTGTGGGGTTGTTATGAGCCAAGCGGTACGATCCAC CATTGTTGAGCGGCACCCCGTAGCTGATGAGGGCCGTAGA GAACTTTCTCCTGGTCCGTGACTGAGCGACGTCCAGCTCC CGTTCTATTGCGCGGAGCCAGTCTTCTGCATCCATAGGATC GGCAGAGTGAGTGAACACAGGTGGGTGTCCCTTCTAAAT TCTGCGCTCTGCTCGCGGTTGAGGCGGTGGTGGCGGGG GTGGTTGCTGCTGCGCCTGGTGCATGACTGCCACTCTTGAC



			CAAGAGCTTGTATCACTTGGGTCTGGTTCATGATCAGTTGT TCCATAGTCATTGGCGGTGTTGGATTTGGGAGTCCTCCGTC TCCGCGACCTCCTTACCTCCGCGGCCACGACCACGTCCAT GTCCTGTACTCATCTGATGGACCAAATATACCATTAGTACT TATTTCCGACCATACATCTCATTCAACATTANNAACCANGA CAGATGAGATAAAAGATCTGAACGTATAAGAGAAGACCC <b>AAGGCATC</b>
		10A	<b>GATGCCTTGGGTCTTCTCTTATACGTT</b> CAGATCTTTATCT CATCTGTCTTGGTACTAATGTTGAATGAGATGTATGGCCG GAAATAAGTACTAATGGTATAATTTGGTACATCAGATGAGT ACAGGACGTGGACGTGGTCGTGGCCGTGGAGGTAGAGGA GATCGCGGAGGCGGAGGACTCCCAA <u>TCCACCACCGCCAA</u> <u>TGACTATGGAACA</u> ACTGATCATGAACCAGACCCAAAGTGAT ACAAGCTCTTGGTCAAGCAGTGGCAGCCATGCACCAGGCG CAGCAGCAACCACCCCGCCACCACCGCCTCAACC GCGAG ACAGGCGCGCAGAATTTATGAAGGGACACCCACCTGTGTT CACTCACTCTGTTCGATCCTATGGATGCAGAAGACTGGCTCC GCGCAATAGAACGGGAGCTGGACGTCGCTCAGTGCACCGA CCAGGAGAAAGTCTCTACGGCCCTCACCAGTTACGGGGT GCTGCTCAACAATGGTGGGAATCGTACCGCTTGGCTCATA ACAACCCCAACACCATACCTGGCAAGAGTTCACCGAGAG GTTCAAGAGCGCATCATGTTCCAGCTGGTGTGATGTCACTGA AGAAAGAAGAGTTCCTGGCACTCACCAGGGNNCCATGAC CGTCAGTGAGTATCGAGACAAGTTCCTACAGCTGTCCCGCT ACTGTCCCGAGGAGGTTAACACCGACCCCAAGAAGCAGTA CCGNTTTCCTCAAAGGCTTGGTCGATCCACTCAGGTACCGC TTATGAACCATACTTTTCCTAACTGCCAGCATCTGATAGAC CGAGCTATCGTGACGGANAAT
		11A	ATCCACAGTCAACCTCTGAAAAAAAAAATCTAACACTCTTG ATTGTTTTTGACCGATGCTGGTCAAATGACCAAAAGTAA <b>CGTATAAGAGAAGACCCAAGGCATCA</b>
		12A	<b>GATGCCTTGGGTCTTCTCTTATACGTT</b> GCCCTGTCTGAG TAGCCAAGATCACAAAGGATCCCCAACTCGAGGTGCTGA CTCAACCACGCGTGCCCTATAGT
<b>J7</b>	3'	3D	ACNNNNNNGNACGCGTGGTTGCCACACAAGGTGGTAATGT ATGAGCATGCATTCTTCTGCAGGTACACTAACCATGTGCGA AAATTAAGAACGACTAGAGGACGACTAGTTGCATTAGAGA GAGACGTGCATATGTGTCACCAAGATGTCGTTAGCTATAT ATAATGTACATAGGGGTGTAATGTGAGAACGAATAGGACG AATCATGCATCATGACACTCATGCTTCGTC AATCTACATCT TAAGTTTGCTTTTCT <u>ACCAATTATGGTCTTT</u>