

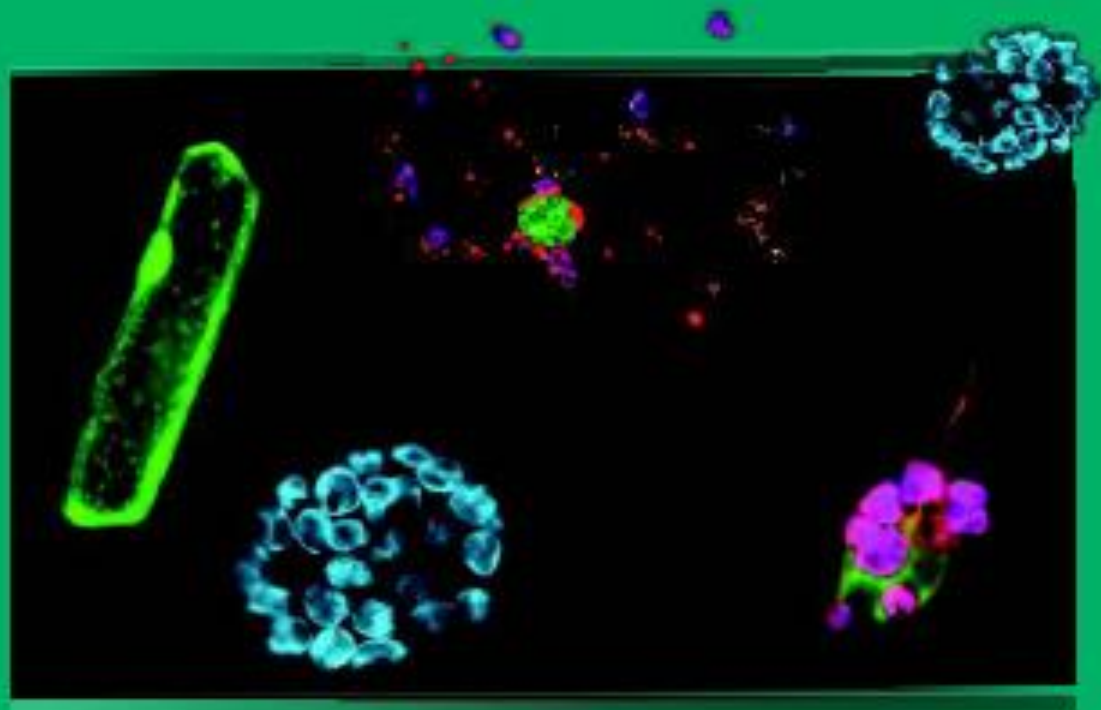
# Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II

Editores:

Gabriela Levitus, Viviana Echenique,  
Ciera Rubinstain, Esteban Hopp y Luis Mroginski

ArgenBio

El espacio argentino para la biotecnología  
y el desarrollo de la agroindustria



■ Ediciones

Instituto Nacional de  
Tecnología Agropecuaria



## ***Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II***

**Editores:**

Dra. Gabriela Levitus,  
Dra. Viviana Echenique,  
Dra. Clara Rubinstein,  
Dr. Esteban Hopp  
Ing. Agr. Luis Mroginski.

# Índice

<b>Prefacio</b> .....	6
<b>Agradecimientos</b> .....	7
<b>Lista de Autores</b> .....	7
<b>Prólogo a la Primera Edición. Dr. Francisco García Olmedo</b> .....	11
<b>Prólogo a la Segunda Edición. Dr. Francisco García Olmedo</b> .....	11
<b>Parte I: Herramientas Básicas</b> .....	15
<b>Capítulo 1: Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales.</b> Luis Mroginski, Pedro Sansberro y Eduardo Flaschland .....	17
<b>Capítulo 2: Morfogénesis.</b> Silvia Radice .....	26
<b>Capítulo 3: La citogenética molecular e inmunocitogenética en el estudio de los genomas vegetales.</b> Guillermo Seijo, Graciela I. Lavia, Germán Robledo, Aveliano Fernández y Viviana G. Solís Neffa. ....	34
<b>Capítulo 4: Herramientas básicas de ingeniería genética.</b> Ingrid Garbus, Marisa Gómez y Viviana Echenique. ....	47
<b>Capítulo 5: Marcadores moleculares.</b> María Carolina Martínez, Marcelo Helguera y Alicia Carrera. ....	70
<b>Capítulo 6: Construcción de mapas de ligamiento genético, localización de genes y regiones cromosómicas asociadas a caracteres de interés en plantas.</b> Gerardo D. L. Cervigni, Juan Pablo A. Ortiz y Sergio E. Feingold. ....	86
<b>Capítulo 7: Genómica.</b> Viviana Echenique, Juan P. Selva, Mauro Meier, Pablo Roncallo y Gustavo Schrauf. ....	100
<b>Capítulo 8: Transcriptómica.</b> Silvina Pessino y Silvina Felitti. ....	121
<b>Capítulo 9: Proteómica.</b> Paula Casati y María F. Drincovich .....	136
<b>Capítulo 10: Metabolómica.</b> Fernando Carrari, Telma E. Scarpeci, Luciano A. Abriata, Alejandro J. Vila y Estela M. Valle. ....	146
<b>Capítulo 11: Metagenómica.</b> O. Mario Aguilar y Daniel H. Grasso. ....	157
<b>Capítulo 12: Bioinformática aplicada a la biotecnología vegetal.</b> Norma Paniego, Ruth Heinz, Paula Fernández, Verónica Lia, Corina Fusari. ....	170
<b>Parte II: Métodos para generar y analizar diversidad</b> .....	183
<b>Capítulo 1: Polinización y fertilización in vitro.</b> Susana Cardone, Gladys Pérez Camargo y Aurora Picca. ....	185
<b>Capítulo 2: Hibridación somática.</b> Pablo Polci y Pablo Friedrich. ....	197

<b>Capítulo 3: Epigenética y evolución.</b> Ricardo W. Masuelli y Carlos F. Marfil .....	211
<b>Capítulo 4. Mutagénesis, TILLING y EcoTILLING.</b> Alberto Prina, Alejandra Landau, María Gabriela Pacheco y Esteban Hopp .....	217
<b>Capítulo 5: Variación somaclonal.</b> Susana Cardone, Sofía Olmos y Viviana Echenique. ....	229
<b>Capítulo 6: Aplicación de la transformación genética al mejoramiento vegetal.</b> Marina L. Díaz, Diego C. Zappacosta, Pascual M. Franzone y Raúl D. Ríos .....	243
<b>Capítulo 7: Usos del silenciamiento génico para el análisis funcional de genes candidatos.</b> Cecilia Vázquez Rovere, Ariel Bazzini, Cecilia Rodríguez, Natalia Almasia y Sebastián Asurmendi ..	259
<b>Capítulo 8: Análisis de experimentos biológicos.</b> Sofía Olmos, Miguel DiRenzo, Mercedes Ibáñez, Nélica Winzer .....	271
<b>Capítulo 9: Métodos multivariados para estimar variabilidad genética.</b> Nélica Winzer, Miguel DiRenzo, Sofía Olmos y Mercedes Ibáñez. ....	283
<b>Parte III: Métodos para acelerar programas de mejoramiento e identificación varietal</b> .....	295
<b>Capítulo 1: Obtención de plantas doblehaploides.</b> Pablo Polci, Verónica Conti y Rubén Miranda y Nicolás Gear. ....	297
<b>Capítulo 2: Aplicaciones de los marcadores moleculares.</b> Alicia Carrera, Gabriela Tranquilli, Antonio Garayalde y Marcelo Helguera. ....	311
<b>Capítulo 3: Marcadores moleculares y mejoramiento genético de cultivos.</b> Carlos Sala, Mariano Bulos, Analía Fresco y Emiliano Altieri. ....	325
<b>Capítulo 4: Identificación y registro de variedades.</b> Ana Laura Vicario, Marcelo Labarta y María Alicia Loray .....	339
<b>Parte IV: Métodos de propagación y conservación de germoplasma</b> .....	351
<b>Capítulo 1: Micropropagación.</b> Sofía Olmos, Gabriela Luciani y Ernestina Galdeano .....	353
<b>Capítulo 2: Semilla sintética.</b> Hebe Rey y Luis Mroginski .....	363
<b>Capítulo 3: Conservación de germoplasma in vitro.</b> Adriana Scocchi y Hebe Rey. ....	369
<b>Parte V: Ejemplos de aplicaciones de la biotecnología vegetal</b> .....	377
<b>Capítulo 1: Aportes de la citogenética al estudio de genomas vegetales.</b> Lidia Poggio, Graciela González, María Rosa Ferrari, Ana María García, Arturo Wulff, Eduardo Greizerstein, Pablo Tomas y Gustavo Schrauf. ....	379
<b>Capítulo 2: Mejoramiento de plantas forrajeras en la era genómica.</b> Germán Spangenberg, Mauro Meier y Viviana Echenique .....	389
<b>Capítulo 3: Caracterización molecular de la apomixis y su aplicación en la agricultura.</b> Silvana C. Pessino y Juan Pablo A. Ortiz .....	403
<b>Capítulo 4: Avances de la biotecnología en cultivos ornamentales.</b> Alejandro S. Escandón, Pablo A. Marinangeli y Mariana Pérez de la Torre. ....	421

<b>Capítulo 5: Aplicación de la biotecnología en la mejora y conservación de especies forestales.</b> Susana Marcucci Poltri, Leonardo Gallo, Noga Zelener, Susana Torales, Sandra Sharry .....	435
<b>Capítulo 6: Técnicas de ingeniería genética para conferir resistencia a virus en plantas.</b> Mariana del Vas, Ana Julia Distéfano, Cecilia Vázquez-Rovere, Esteban H. Hopp. ....	447
<b>Capítulo 7: Obtención de plantas resistentes a enfermedades bacterianas.</b> Adrián Vojnov, Mercedes Rivero y Diego Zappacosta .....	457
<b>Capítulo 8: Aproximaciones biotecnológicas para un manejo sustentable del estrés fúngico en la agricultura.</b> Juan Carlos Díaz Ricci; Ursula Tonello; Gustavo Martínez-Zamora; Sergio Salazar; Nadia Chalfoun; Gabriel Vellicce; Carlos Grellet; Paula Filippone; Alicia Mamani; Marta Ontivero y Atilio Pedro Castagnaro. ....	467
<b>Capítulo 9: Utilización de cultivos de tejidos para la obtención y conservación de plantas libres de enfermedades.</b> Vilma Conci. ....	481
<b>Capítulo 10: Obtención de plantas resistentes a insectos.</b> Dalia Lewi y Clara Rubinstein .....	495
<b>Capítulo 11: Aplicaciones biotecnológicas al manejo de malezas.</b> Germán Ferrari y Julio E. Delucchi. ....	507
<b>Capítulo 12: Obtención de plantas tolerantes a distintos tipos de estreses abióticos.</b> Florencia del Viso, Andrea F. Puebla, Néstor Carrillo y Raquel L. Chan .....	519
<b>Capítulo 13: Manipulación genética del metabolismo secundario en plantas.</b> Alicia Zelada, María Binaghi .....	529
<b>Capítulo 14: Mejoras de calidad en alimentos.</b> Clara Rubinstein, Gabriela Levitus .....	539
<b>Capítulo 15: Fitorremediación.</b> María Eugenia Segretín, Paula Bey y Alejandro Mentaberry .....	545
<b>Capítulo 16: Plantas como biorreactores.</b> Fernando Bravo Almonacid, Sonia Wirth, María Eugenia Segretin, Mauro Morgenfeld, Ezequiel Matías Lentz. ....	559
<b>Parte VI: Manejo responsable de la tecnología</b> .....	569
<b>Capítulo 1: Criterios científicos para la evaluación de la bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados.</b> Clara Rubinstein .....	571
<b>Capítulo 2: Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados - Marcos Regulatorios.</b> Moisés Burachik .....	583
<b>Capítulo 3: Flujo génico y su posible impacto ambiental.</b> Mónica Poverene, Soledad Ureta y Agustina Gutiérrez. ....	595
<b>Capítulo 4: Detección de OGM en la cadena agroalimentaria.</b> Florencia Longo y Ana Vicario. ....	603
<b>Capítulo 5: Manejo integrado de plagas – Programa de Refugios.</b> Viviana Confalonieri y Cecilia Roca. ....	613
<b>Capítulo 6: Resistencia de malezas a herbicidas: evolución y estrategias de manejo.</b> Daniel Tuesca, Luisa Nisensohn, Mario R. Sabbatini, Guillermo Chantre. ....	621
<b>Parte VII: Biotecnología y sociedad</b> .....	631
<b>Capítulo 1: La transformación tecnológica y los nuevos desafíos.</b> Carmen Vicién. ....	633

<b>Capítulo 2: Adopción de los cultivos genéticamente modificados en Argentina y en el mundo.</b> Gabriela Levitus .....	<b>639</b>
<b>Capítulo 3: Biotecnología en la mira: el problema de la percepción.</b> Valeria Durand .....	<b>643</b>

## V. CAPÍTULO 3

### Caracterización molecular de la apomixis y su aplicación en la agricultura

Silvina C. Pessino y Juan Pablo A. Ortiz

#### Qué es la apomixis

Algunas plantas con flores presentan un modo asexual de reproducción llamado *apomixis*. Consiste en la formación de semillas que contienen embriones genéticamente idénticos a la planta madre, sin que intervengan los procesos de meiosis y fecundación. La apomixis fue descrita por primera vez en 1841 en la planta australiana *Alchornea ilicifolia* por J. Smith. Cuando un ejemplar femenino de esta especie dioica fue llevado a los Kew Gardens de Londres desde Asia, la planta aislada floreció y produjo semillas en abundancia en ausencia de un progenitor masculino, poniendo al carácter en evidencia. Paradójicamente, los primeros experimentos con plantas apomícticas fueron realizados en forma involuntaria por Gregor Mendel, quien utilizó cruces interespecíficas de *Hieracium* para intentar confirmar los resultados obtenidos en sus famosos estudios sobre la herencia en las arvejas de jardín. Mendel atribuyó erróneamente a una supuesta "frecuente autopolinización" la falta de segregación observada en varios cruzamientos. Hoy sabemos que muchas especies del género *Hieracium* son apomícticas.

Se considera que la apomixis ha evolucionado como un sistema de reproducción alternativo a la sexualidad a través de la reformulación de sus programas de desarrollo. Por eso, para comprender mejor su funcionamiento, es necesario compararla con la reproducción sexual. 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 (micrósporas) en las anteras. En la megas-

porogénesis 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, (una serie acotada de mitosis ordenadas), esta célula desarrolla un megagametófito conocido como "saco embrionario". El saco embrionario más común es el de tipo *Polygonum*, 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 micrósporas 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 endospermo. 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.

La apomixis elude la ruta sexual evitando la reducción meiótica y la fecundación. El óvulo desarrolla una semilla cuyo embrión contiene exactamente el mismo genotipo que la planta que lo origina. Por lo tanto este carácter (también llamado *agamospermia*) ha sido definido como *reproducción asexual a través de semillas*. La apomixis fue descrita en más de 400 especies de plantas pertenecientes a 35 fami-

lias diferentes, entre las que se destacan las Gramíneas, las Compuestas, las Rosáceas y las Rutáceas. Presenta formas diversas y parece haber surgido varias veces independientemente durante la evolución. Brevemente, los embriones apomícticos pueden formarse a través de una ruta *esporofítica* o *gametofítica*.

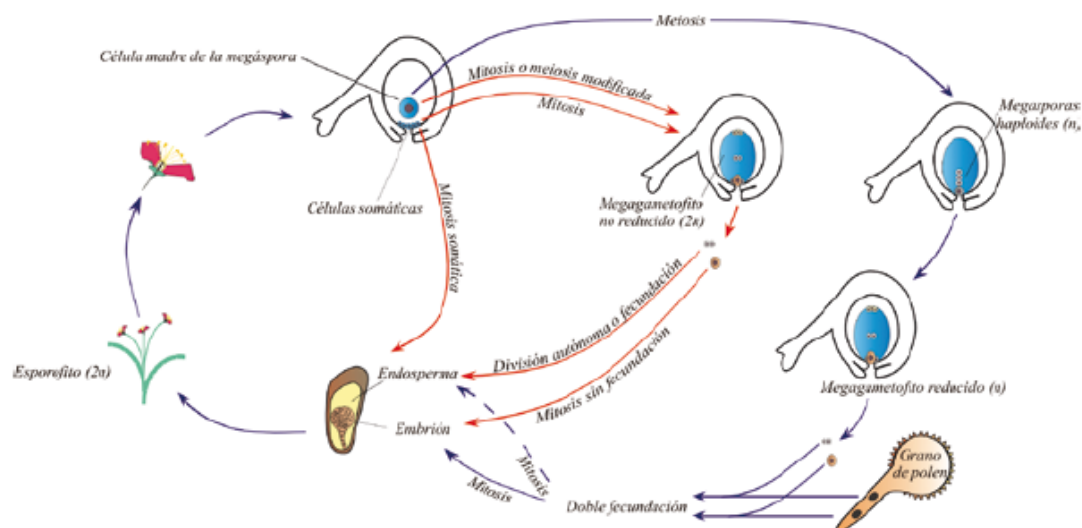
En la apomixis *esporofítica*, también llamada *embrionía adventicia*, los embriones surgen directamente de una célula somática de la nucela o de los tegumentos del óvulo. Comúnmente se forman embriones múltiples a partir de células nucelares (esporofíticas) que comparten el óvulo junto con el embrión de origen sexual y utilizan su endospermo para desarrollarse. Esta forma de apomixis aparece comúnmente en los cítricos, los cuales se convirtieron en un sistema modelo para estudiar el proceso. En la *apomixis gametofítica* se forman siempre sacos embrionarios que difieren en algunos aspectos del gametófito femenino haploide ( $n$ ) generado a partir de la megáspora funcional. Su principal diferencia es precisamente el hecho de ser diploides ( $2n$ ) ya que los núcleos que los conforman no han pasado por el proceso meiótico y por lo tanto no han reducido su contenido de ADN. Por eso se dice que estos sacos embrionarios o megagametófitos surgen por un proceso de *apomeiosis* (apo: prefijo griego de significación negativa). De acuerdo con el origen de la célula que genera al saco embrionario y al embrión, la apomixis gametofítica puede ser clasificada como: *diplosporía*, cuando el saco embrionario se origina a partir de la célula madre de la megáspora misma ya sea por mitosis o luego de una falla en la meiosis o *aposporía*, cuando el saco embrionario se origina directamente por mitosis a partir de una célula somática cercana, usualmente una célula de la nucela. Los sacos embrionarios, sean éstos apospóricos o diplospóricos, contienen un gameto femenino  $2n$ , la ovocélula, a partir de la cual se desarrolla directamente el embrión por partenogénesis sin que exista fecundación. Así, mientras en el proceso sexual la reducción meiótica se complementa con la fecundación que restaura el nivel de ploidía  $2n$ , en la apomixis gametofítica la ausencia de reducción se complementa con la partenogénesis. 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. En la Figura 1 se muestra un esquema comparativo simplificado de las vías de reproducción sexual y apomíctica en angiospermas. Los diferentes mecanismos de apomixis observados en distintos géneros en comparación con el proceso sexual de megagametogénesis, fueron esquematizados en la Figura 2.

Recordemos que en las angiospermas existe una doble fecundación. En la apomixis gametofítica la partenogénesis excluye invariablemente una de las etapas de esta doble fecundación: la unión de los gametos masculinos con los femeninos. Sin embargo, no necesariamente se anula la fecundación de los núcleos polares. Aunque en algunos casos el endospermo puede desarrollarse en forma autónoma (sin la unión de un gameto masculino con los núcleos polares del saco embrionario apospórico o diplospórico) en muchas especies apomícticas, como en la mayoría de las gramíneas tropicales, es necesario que un gameto masculino se fusione con el o los núcleos polares de la célula central del saco embrionario para formar el endospermo. A este proceso se lo llama *pseudogamia*.

Casi todos los sacos embrionarios diplospóricos (con 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, tanto en taxones diferentes como dentro de un mismo taxón (Figura 2). 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 y una célula central uninucleada y extensamente vacuolizada. 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*.



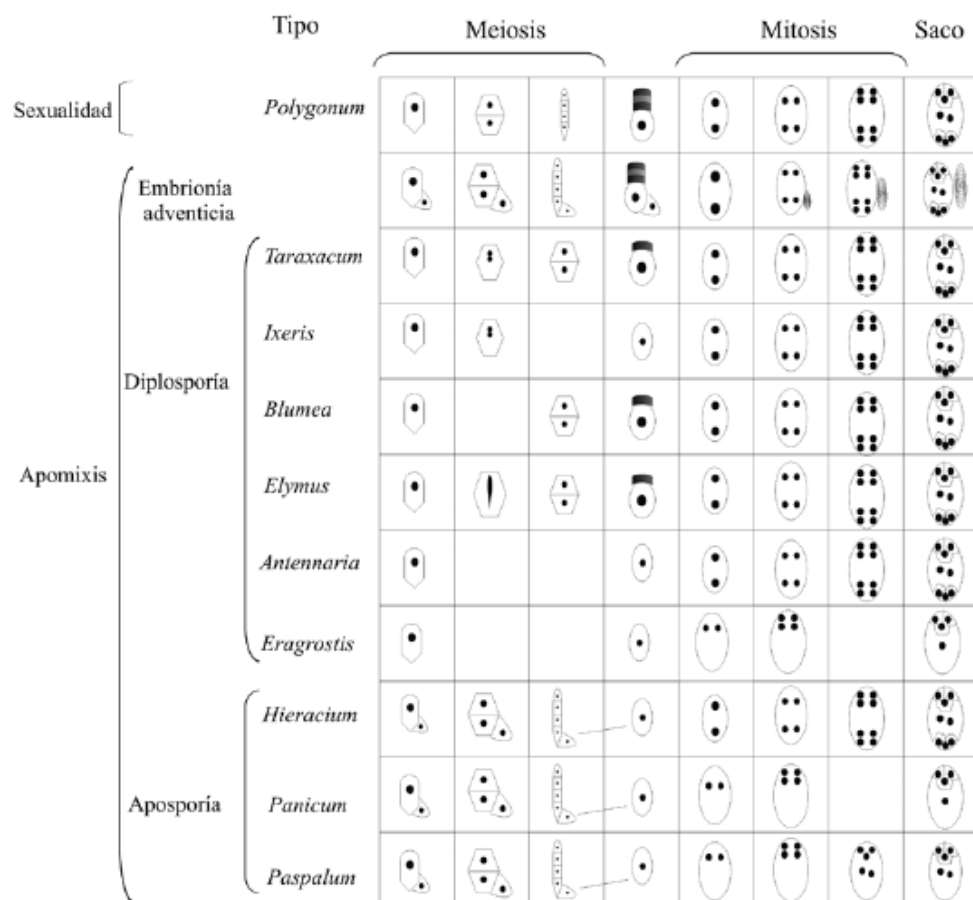


**Figura 1: Rutas biológicas de reproducción sexual y apomítica.** Durante la sexualidad una célula de la nucela del óvulo se diferencia como célula madre de la megáspora y luego de sufrir un proceso de meiosis da origen a cuatro megásporas haploides. Tres de estas megásporas degeneran y la cuarta da origen a la formación de un saco embrionario luego de una serie de mitosis, donde todos los núcleos celulares están reducidos ( $n$ ). La ovocélula y los núcleos polares del saco son fecundados por los núcleos generativos del polen para generar el cigoto y el núcleo primario del endosperma, respectivamente. El cigoto da origen al embrión a través de sucesivas mitosis. La apomixis consiste en la formación de un embrión a partir de una célula no reducida (que no ha sufrido meiosis). En la apomixis gametofítica se observa la formación de un megagametofito con células no reducidas, cuya ovocélula ( $2n$ ) genera un embrión por partenogénesis. En la embriónia adventicia el embrión es generado directamente a partir de una célula de la nucela en un proceso similar a la embriogénesis somática.

Sin embargo, en las especies apospóricas de *Paspalum*, un género también perteneciente a la tribu Paníceas igual que *Panicum*, existe una característica en la constitución de los sacos apospóricos que los diferencia netamente del tipo *Panicum*: en *Paspalum* los sacos generalmente tienen una célula central con dos núcleos polares y a veces tres (Figura 3). Esta característica es importante porque debido a la pseudogamia, la relación genómica materna/paterna del endospermo 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).

### Otros aspectos sustanciales del carácter apomixis

Hay varias características particulares de este modo de reproducción que merecen ser remarcaadas. Por una parte la apomixis usualmente no altera la formación del microgametofito y la meiosis ocurre en las anteras generando polen reducido, aunque a veces se observan tasas inferiores de viabilidad. Además, apomixis y sexualidad no son procesos mutuamente excluyentes ya que pueden aparecer simultáneamente sacos reducidos (meióticos) y no reducidos (provenientes de apomixis) en una misma planta, en una misma inflorescencia y aún en un mismo óvulo. Una planta apomítica que es capaz de generar al menos una parte de su progenie por medios sexuales se conoce como "facultativa". Por lo tanto, en los genotipos apomíticos facultativos las proge-

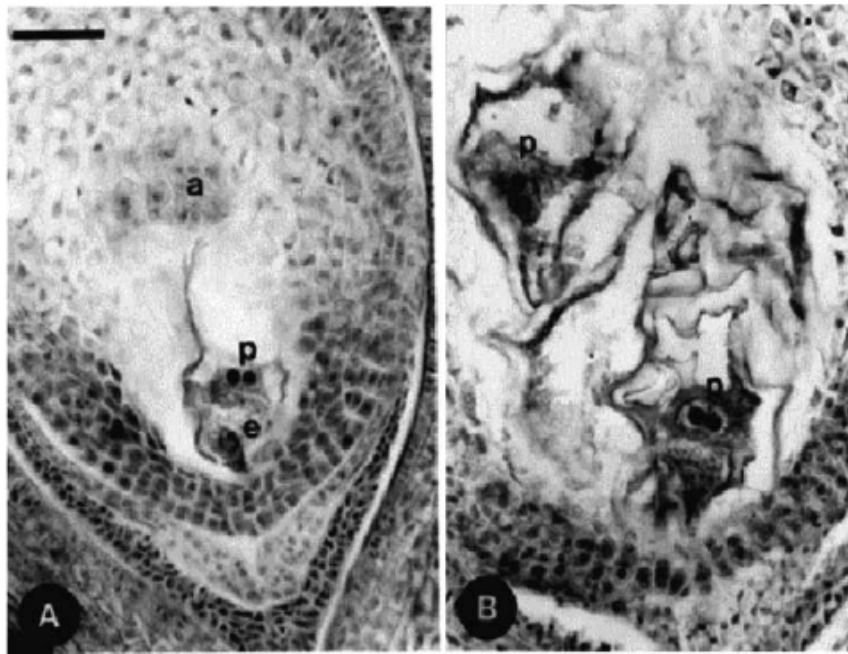


**Figura 2: Distintos tipos de sacos embrionarios formados durante el proceso de apomixis.** En la mayoría de las plantas angiospermas sexuales, la célula madre de la megáspora realiza un proceso de meiosis y genera cuatro megásporas haploides, tres de las cuales degeneran. La cuarta megáspora lleva a cabo una serie de tres divisiones mitóticas para formar un saco embrionario reducido y octanucleado. En el proceso de embrionía adventicia la formación del saco sexual es normal, pero las células nucelares adyacentes desarrollan embriones somáticos que coexisten con el embrión de origen sexual. En la apomixis diplospórica la célula madre de la megáspora realiza una serie de mitosis para generar un saco embrionario no reducido o inicia un proceso de meiosis que falla y se genera un saco embrionario no reducido. En la apomixis apospórica células de la nucela cercanas a la célula madre de la megáspora realizan varias mitosis consecutivas para generar un saco embrionario no reducido cuya característica más notable es la ausencia de antípodas.

nies segregan como clases maternas ( $2n + 0$ ) y no-maternas o aberrantes. Hay tres tipos diferentes de individuos aberrantes que pueden encontrarse en la progenie de una planta apomíctica: 1) híbridos BIII ( $2n + n$ ) que resultan de la fecundación de una ovocélula no reducida, 2) híbridos BII ( $n + n$ ) que resultan de la fe-

cundación de una ovocélula reducida y 3) haploides ( $n + 0$ ) generados por partenogénesis a partir de una ovocélula reducida.

Por otra parte, la apomixis gametofítica se relaciona fuertemente con la poliploidía. En general las especies apomícticas presentan razas de bajos niveles de ploidía (usualmente



**Figura 3: Microfotografías de secciones de óvulos de razas tetraploides de *Paspalum notatum*.** A: óvulo conteniendo un saco embrionario meiótico (las dos sinérgidas y algunas de las antípodas no se observan porque están en una sección adyacente al corte del óvulo). B: óvulo conteniendo dos sacos embrionarios apospóricos con dos núcleos polares. Referencias: a, antípodas; e, ovocélula, p, núcleos polares; barra = 30 micras

diploides) que se reproducen por sexualidad y otras de mayor nivel de ploidía (por ejemplo tri, tetra o pentaploides) que se reproducen por apomixis. Estos complejos integrados por individuos sexuales y apomícticos de distinto nivel de ploidía se conocen como “complejos agámicos” y se consideran estructuras reproductivas complejas y evolucionadas donde la sexualidad permite la generación de nuevos genotipos y la apomixis la propagación clonal muy eficiente de las combinaciones genéticas superiores. Al menos para algunas especies (por ejemplo *P. notatum* y *P. rufum*) existen evidencias que sugieren que la diversidad generada a niveles menores de ploidía puede ser impulsada hacia los niveles poliploides por medio de eventos sucesivos de hibridación  $2n + n$ . La relación de la apomixis con la poliploidía es estrecha ya que existen muy pocos casos reportados de diploides que muestran repro-

ducción apomíctica. Existen varias teorías que explican la baja frecuencia de apomixis a nivel diploide. Una fue propuesta por Nogler y sostiene que un alelo dominante A, responsable de la aposporia, no puede ser transmitido a través de gametas haploides, con lo cual la apomixis no puede ser encontrada en diploides naturales. Otra fue planteada por Mogie y sostiene la existencia de un fenómeno de dosaje génico para un alelo mutante a-, en presencia del alelo salvaje a+, para que el carácter se exprese. De acuerdo a esta teoría la ausencia de apomixis en los diploides naturales se debe más bien a una falta de expresión, en lugar de la no-transmisión propuesta por Nogler. Mogie sugiere que se necesitan dos copias del alelo a- (frecuencia mayor a 0,5) para la expresión de la apomixis. En contraste con esta teoría, Noirot propone que el alelo a+ no debería estar presente en una frecuencia mayor de 0,25.

La demostración del carácter dominante del alelo determinante de la apomixis en muchas especies apospóricas contradice estas últimas hipótesis. Sin embargo, en el género *Paspalum* se demostró que debe existir cierto efecto de dosaje relacionado con la poliploidía, ya que la sola duplicación cromosómica con colchicina de diploides sexuales indujo, al menos en algunos casos, la obtención de tetraploides apomícticos. En base a esas observaciones, Quarín y colaboradores postularon que el determinante genético responsable de la apomixis existiría a nivel diploide, pero que su expresión estaría condicionada por uno o varios genes adicionales sujetos a efectos de dosaje. Una hipótesis alternativa podría ser que una condición epigenética asociada con la poliploidía posibilitara la expresión del alelo determinante del carácter. Así, a nivel diploide el alelo determinante de la apomixis estaría eventualmente presente, pero sólo sería capaz de expresarse en forma apreciable en entornos poliploides que provean un paisaje epigenético propicio.

#### **Mejoramiento genético de especies naturalmente apomícticas**

Algunas especies apomícticas tienen un valor agronómico muy importante, como es el caso de varias gramíneas forrajeras, los cítricos, el mango y las fresas. Hasta el presente, sólo se dispone de programas de mejoramiento avanzados en algunas gramíneas forrajeras entre las que se encuentran especies de los géneros *Brachiaria*, *Cenchrus*, *Eragrostis*, *Panicum*, *Paspalum*, *Pennisetum* y *Poa*. En principio, las plantas apomícticas facultativas pueden ser mejoradas por metodologías de cruzamiento convencionales, ya que producen al menos algunos sacos embrionarios meióticos que posibilitan la hibridación y selección. En cambio en los apomícticos obligados (que se reproducen completamente o casi completamente en forma clonal), la hibridación y el análisis de segregación son impracticables. Las progenies de tales plantas exhiben siempre el fenotipo materno o pueden ocasionalmente aparecer variantes que probablemente surjan de mutaciones más que de segregación sexual. Por ello, la disponibilidad de individuos sexuales o con algún grado de sexualidad

(apomícticos facultativos), del mismo nivel de ploidía en el cual se expresa la apomixis es un requisito fundamental para el mejoramiento de estas especies. Estos individuos presentan un cierto grado de variabilidad como para aumentar las posibilidades de supervivencia frente a cambios ambientales y aportan asimismo germoplasma útil para el mejoramiento.

Uno de los principales requisitos para llevar adelante un programa de mejoramiento de una especie apomíctica es la colección de germoplasma diverso desde las fuentes de origen. Una buena colección posibilita ampliar la base genética disponible y eventualmente identificar introducciones sexuales o altamente sexuales (apomícticas facultativas con alta expresión de sexualidad). La evaluación de especies relacionadas es también una alternativa importante cuando no se dispone de plantas sexuales de la especie de interés. Ejemplos de cruzamientos interespecíficos e incluso intergenéricos empleados como punto de partida en programas de mejoramiento se encuentran en *Brachiaria*, *Zea x Tripsacum* y *Pennisetum*, entre otros.

El adecuado conocimiento de la biología floral, citogenética y modo de reproducción de los materiales disponibles es un requisito fundamental para cualquier estrategia de mejoramiento. Como se verá más adelante, los estudios realizados para determinar la base genética de la apomixis en varias especies de gramíneas indican que el carácter presenta un tipo de herencia relativamente simple, haciendo posible entonces su utilización en programas de mejoramiento una vez que son detectados individuos sexuales o apomícticos facultativos. En estos casos los genotipos apomícticos obligados con características deseables pueden ser usados como dadores de polen. Debido a que los gametos masculinos son reducidos y que la mayoría de las especies apomícticas son altamente heterocigotas, los cruzamientos entre individuos sexuales (utilizados como progenitores femeninos) y apomícticos (empleados como dadores de polen) pueden conducir a la generación de progenies  $F_1$  variables donde es posible seleccionar. Hay que tener en cuenta que si bien son necesarios individuos sexuales o con adecuada expresión de sexualidad

para realizar las cruzas, en el momento de la selección habrá que usar el criterio contrario, es decir, seleccionar los mejores fenotipos que contengan un alto grado de expresión de la apomixis. Esto conducirá a la obtención de nuevas variedades genéticamente estables. El objetivo final de un programa de mejoramiento de una especie apomíctica en el cual ha sido posible obtener recombinación genética es la identificación en la población segregante de los genotipos superiores, con reproducción completamente (o casi completamente) apomíctica que puedan ser transformados en cultivares mediante su multiplicación por semillas. El camino no es sencillo porque en cada generación es necesario distinguir en la progenie, cuáles son los individuos generados por sexualidad y cuáles por apomixis. Dentro de los generados por sexualidad, habrá que seleccionar los que al mismo tiempo posean las mejores características agronómicas y presenten un alto grado de expresión de la apomixis. Otro aspecto a tener en cuenta es el nivel de ploidía de los progenitores que serán empleados en los cruza-mientos. Los primeros estudios de hibridación indicaron la necesidad de realizar cruzas entre especies sexuales y apomícticas con el mismo nivel de ploidía ya que varios intentos realizados entre diploides sexuales y poliploides (en general tetraploides) apomícticos condujeron a la generación de progenies estériles.

En las gramíneas tropicales y subtropicales se ha hecho un buen uso del carácter en el mejoramiento, especialmente en la domesticación de algunas especies. Tres líneas de trabajo han sido llevadas adelante en estos programas: 1) la selección de los mejores genotipos naturales partiendo de una amplia colección de *germoplasma* y estudiando características como la productividad de biomasa, calidad de forraje, adaptabilidad al cultivo y a distintas condiciones ambientales, capacidad de producción de semilla, persistencia al pastoreo, y otras. Hay numerosos ejemplos de cultivares de pastos forrajeros apomícticos que se mejoraron usando este tipo de selección. Así se obtuvieron variedades apomícticas de *Paspalum*, *Bracharia*, *Panicum*, *Themeda*, *Eragrostis* y *Melinis*. Tomando como ejemplo al género *Paspalum*, en primer lugar se seleccionaron algunas es-

pecies como *P. notatum* (apomíctico, 4X), *P. dilatatum* (apomíctico, 5X), *P. plicatulum*, *P. atratum*, y luego se eligieron algunos ecotipos por sus cualidades agronómicas y su adaptabilidad al cultivo. En el sur de los Estados Unidos se han popularizado algunas variedades tetraploides apomícticas de *P. notatum* (Argentine, Paraguay, Paraguay 22, Wilmington, Tifton 7 y otras). También se cultivan algunas variedades apomícticas de Dallisgrass (*P. dilatatum*) seleccionadas de la misma manera. En nuestro país se cultivaron durante mucho tiempo dos variedades apomícticas de *P. guenoarum*: el Pasto Rojas y el Pasto Ramírez, seleccionadas por este método en Paraguay. Recientemente se han inscripto otras dos variedades que han sido seleccionadas en la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Nordeste: el Pasto Cambá (*P. atratum*) y el Pasto Chané (*P. guenoarum*). Otro ejemplo es el de *Eragrostis curvula* (pasto llorón), cuyos cultivares provienen de selecciones practicadas sobre materiales nativos de Tanzania y Sudáfrica. El pasto llorón fue introducido en Argentina aproximadamente en 1930 en una estancia de la provincia de San Luis. De ahí, en 1947, semillas del cultivar *Tanganyika* (primer cultivar adaptado) fueron remitidas a la Estación Experimental INTA Anguil, donde fueron multiplicadas constituyendo la base de la intensificación del cultivo en nuestro país; 2) la segunda posibilidad de mejoramiento, en la que aún se ha avanzado poco, consiste en realizar cruzamientos con genotipos sexuales poliploides naturales, que son muy raros. Un buen ejemplo de esto son las variedades Nueces y Llano de Buffelgrass (*Pennisetum ciliaris*) desarrolladas en EEUU en la década del 70 a partir de cruzamientos entre una rara planta 4x sexual (natural) por plantas apomícticas 4x (que son las comunes en esta especie). También se pueden conseguir plantas 4X sexuales por duplicación cromosómica de una planta diploide sexual. Mediante este tipo de tratamientos se han obtenido plantas tetraploides sexuales en *B. ruziziensis*, *E. curvula*, *P. simplex*, *P. notatum* y *P. hexastachium*. La disponibilidad de estas plantas, además de facilitar los planes de cruzamientos, permitió la realización de estudios detallados de la herencia del carácter apomixis en algunas de estas

especies. Actualmente, poblaciones segregantes de *P. notatum* obtenidas a partir del cruzamiento entre individuos tetraploides sexuales (generados experimentalmente) y apomícticos naturales están siendo evaluadas en pruebas a campo en Florida, EEUU. 3) Una tercer estrategia de mejoramiento consiste en la obtención de variantes somaclonales a partir del cultivo *in vitro* de tejidos. Esta metodología se basa en la aparición de variaciones heredables en las plantas regeneradas *in vitro* (conocidas como variantes somaclonales) que pueden utilizarse en el mejoramiento. Por ejemplo, en el laboratorio de Genética del Departamento de Agronomía de la Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina, se obtuvieron varios somaclones de pasto llorón (*Eragrostis curvula*), entre ellos una línea tetraploide apomíctica registrada como cultivar Don Luis (RC9191, 2006-2026) en honor al Ing. Luis A. Mroginski, uno de los pioneros en el desarrollo del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales en nuestro país. Don Luis se distingue de los otros materiales de *Eragrostis curvula* por su número cromosómico ( $2n = 64$ ), el ancho de sus hojas, el color azul de las mismas y su resistencia a bajas temperaturas. En estado reproductivo se diferencia por el mayor tamaño de las panojas en relación a otros cultivares.

### **Usos potenciales de la apomixis en el mejoramiento de plantas naturalmente sexuales**

La ausencia de recombinación durante la megagametogénesis y de fecundación de la ovocélula por un gameto masculino posibilita la generación de embriones que presentan una constitución genética idéntica a la de la planta madre. La apomixis es un carácter utilizable en el mejoramiento de plantas y la producción de alimentos, ya que puede constituir una herramienta ventajosa para la estabilización de genotipos superiores y la fijación de combinaciones híbridas. La perspectiva más atractiva que representa la apomixis para la agricultura es la posibilidad de obtener y propagar, por semillas, nuevos híbridos interespecíficos e intergenéricos, permitiendo el desarrollo de genotipos mejor adaptados a los distintos ambientes y con altos rendimientos. En teoría cualquier

combinación genética que lleve los factores determinantes de la apomixis podría ser mantenida y multiplicada como una réplica exacta por innumerables generaciones vía semillas. Esto posibilitaría el uso del carácter para propagar especies que actualmente se clonan vegetativamente o *in vitro*. La perspectiva de reproducir híbridos superiores vía semillas podría representar una ayuda importante para los productores agropecuarios de los países en desarrollo, permitiéndoles sostener altos rendimientos año tras año usando parte de la cosecha sin pérdidas en la producción debidas a la segregación o endogamia. Entre otras ventajas, la expresión de la apomixis reduciría al mínimo el aislamiento físico requerido para preservar líneas genéticas homocigotas. Asimismo facilitaría el uso de transformantes considerando que una planta transgénica apomíctica fijaría inmediatamente el nuevo carácter y se convertiría en un cultivar luego de su multiplicación. En un planeta con una demanda creciente de alimentos, que deberá duplicar su producción en los próximos 50 años utilizando una superficie de siembra igual o menor a la actual, esa opción resulta de crucial importancia. Se calcula que solamente para la producción de arroz híbrido y con una tasa moderada de aceptación por parte de los agricultores, esta tecnología brindaría beneficios globales por unos 2 a 4 billones de dólares anuales. Las ventajas enumeradas y muchas otras no mencionadas aquí hacen que este carácter represente un beneficio potencial enorme para la agricultura y que se hayan comparado los incrementos potenciales en la producción a través del uso de esta tecnología con aquellos derivados de la revolución verde a partir de los años 60.

### **El control genético de la apomixis**

La apomixis es un carácter heredable, pero su control genético no fue aún completamente esclarecido. Tradicionalmente se consideró que sus determinantes básicos podrían haberse originado por mutación y que la mayoría de los otros genes involucrados en su expresión son similares a los de la sexualidad. A pesar de su amplia distribución en las angiospermas, el carácter no es muy común en los cultivos mayores o en sistemas modelos. Esta condición

forzó a que los estudios en este campo deban ser realizados en especies silvestres que son poliploides, altamente heterocigotas y con una pobre caracterización genética. La disección de las bases genéticas del carácter es por lo tanto dificultosa y compleja. Los estudios de herencia sólo son posibles si pueden cruzarse progenitores completamente sexuales y apomícticos y la progenie  $F_1$  segregante puede ser examinada por métodos citoembriológicos o por análisis de progenies en busca de variaciones con respecto al fenotipo materno. El análisis de progenies usando marcadores moleculares puede ser usado como un indicador de la proporción de progenies apomícticas de un determinado individuo. En las cruas de este tipo (que pueden ser intra o interespecíficas) se utiliza un poliploide sexual natural o generado artificialmente como planta madre, mientras que un genotipo apomíctico contribuye como dador de polen.

El modo de clasificación de las progenies en apomícticas y sexuales fue motivo de controversia durante varias décadas entre los investigadores dedicados al estudio de la apomixis. Mientras algunos proponían tener en cuenta su grado de expresividad, considerándolo como un carácter cuantitativo, otros consideraban que era más conveniente tratarlo como un carácter cualitativo, y proponían clasificar a una planta como apomíctica siempre y cuando llevase al menos un saco embrionario no reducido. El primer modo de clasificación resultaría adecuado si la diferente expresividad de la apomixis se originase en la necesidad de la acción conjunta de varios genes mayores que determinarían el carácter o estuviese influida por la presencia de modificadores, mientras que la segunda aproximación sería más apropiada si el carácter estuviese controlado por un gen simple cuya expresividad dependiese de factores epigenéticos asociados. Se sabe que el ambiente puede afectar el grado de apomixis en algunas especies, lo que sugiere que efectivamente puede haber tanto genes modificadores como factores epigenéticos jugando un rol en la expresividad del carácter. Por otra parte, se demostró que en híbridos de *Penisetum*, plantas pertenecientes a diferentes progenies todas ellas portadoras de la misma

región que controla la apomixis, presentan diferente expresividad, lo que refuerza la idea de que deben existir modificadores o alteraciones epigenéticas afectando al carácter. En ningún caso el efecto de esos modificadores o la naturaleza del posible control epigenético han sido estudiados en detalle. Como veremos, en los últimos años se impuso mayoritariamente el modelo cualitativo de clasificación, ya que casi todos los estudios de mapeo han considerado una planta como apomíctica si se observa en ella al menos un saco embrionario no reducido, independientemente del grado de expresividad del carácter. El hecho de que en casi todas las especies apomícticas los marcadores ligados a la apomeiosis mapean en una única región genómica hace pensar que aplicar el modelo cualitativo es esencialmente correcto, aunque permanece pendiente el estudio de cuáles son los factores que afectan la expresividad del carácter.

La apomixis esporofítica se hereda en forma simple como un carácter dominante. En el único estudio de mapeo reportado hasta ahora en *Citrus* el carácter presentó una segregación simple con una relación de segregación de 3:1. Sin embargo la aplicación del mapeo de QTLs resultó en la identificación de 6 loci mayores con efectos positivos o negativos, un patrón más complejo que el anticipado. Actualmente se están llevando a cabo estudios genéticos y moleculares adicionales en *Citrus* y géneros relacionados así como también en otras especies que se reproducen por embrionía adventicia.

La aposporia parece estar controlada por un único locus en donde un gen mayor dominante o un grupo de genes ligados y coadaptados (que funcionan como una sola unidad genética a causa de una fuerte supresión de la recombinación) son los responsables de la expresión del carácter. En la mayoría de las gramíneas forrajeras estudiadas el "apo locus" aparece como una región genómica compleja, que contiene numerosos genes que son transmitidos a la progenie como un bloque. Es importante notar que la palabra "locus" es utilizada aquí para denotar una región del genoma que puede incluir uno o varios genes. Este único "locus" en algunas especies segrega en forma Mendeliana.

na y en otras, muestra una fuerte distorsión de la segregación. El modelo del locus único se aplica a casi todas las especies apospóricas estudiadas (*Pennisetum squamulatum*, *Pennisetum ciliare*, *Panicum maximum*, *Brachiaria sp.*, *Paspalum notatum*, *Ranunculus sp* y *Hieracium sp*), Supone que la constitución genética de las plantas sexuales sería del tipo nuliplexo (aaaa) mientras que los individuos apomícticos serían uniplexos (Aaaa), siendo A el alelo dominante determinante de la aposporia. Los cruzamientos de individuos de este tipo generarían progenies F<sub>1</sub> que segregan en sexuales y apomícticos con relaciones de segregación aproximadas al 1:1, aunque en algunos casos se observan fuertes desviaciones en esta relación. Las distorsiones en la segregación en *P. notatum* han sido atribuidas a un efecto pleiotrópico letal del gen/es determinantes de la apomixis, o a un ligamiento parcial con un gen letal. Por otro lado en *Poa pratensis* está claramente documentado que existe recombinación entre la aposporia y la partenogénesis, lo cual indica un control independiente para cada uno de estos componentes. Además no se observa supresión de la recombinación en la región. En esta especie la partenogénesis puede evaluarse fácilmente en ausencia de fertilización por el desarrollo de embriones luego del tratamiento con auxina. Cuando este carácter se analizó en forma cualitativa se demostró que involucra a un único gen. Posteriormente se postuló para *Poa* un modelo genético más complejo que incluye genes simples, no ligados para la iniciación de la aposporia, la prevención de la aposporia, la iniciación de la partenogénesis, la prevención de la partenogénesis y el desarrollo de la megáspora. Este último modelo es sostenido por la observación de clases discretas con diferente expresividad del carácter apomixis, que podrían ser explicadas mejor con un modelo de 5 genes.

El modelo del gen único, aplicado a numerosas especies apospóricas, deja sin solucionar varias cuestiones, además de la ya mencionada respecto a la diferente expresividad. Por ejemplo en el caso de *Panicum maximum* (que es una especie apomíctica facultativa, o sea forma algunos de sus descendientes por sexualidad) si bien se postula que las plantas

apomícticas son uniplexas (Aaaa) hasta ahora no se han encontrado en la naturaleza plantas completamente sexuales (aaaa). Esta situación se repite en otras especies apomícticas. Tampoco se puede explicar el hecho de que siempre que se utilizó como polinizador a una planta apomíctica, ésta resultó ser un genotipo Aaaa. ¿Cómo es posible que el genotipo uniplexo sea el único existente en las poblaciones apomícticas facultativas? Estas cuestiones plantean la posibilidad de que la herencia de la apomixis no pueda ser explicada únicamente en base a la constitución genética, sino que también deba tenerse en cuenta el entorno epigenético asociado y la estrecha relación de ambas condiciones con la poliploidía. La demostración reciente de que ocurren modificaciones genéticas y epigenéticas específicas, recurrentes y reproducibles durante los eventos de alo y auto poliploidización plantea posibilidades novedosas respecto al origen de la región que contiene a locus apo y su funcionamiento en relación con la poliploidía.

La diplosporia, a diferencia de la aposporia, parece estar controlada por dos o más genes que segregan en forma independiente, responsables de la apomeiosis, la partenogénesis y la formación autónoma del endospermo, cuando esta última existe. El ligamiento entre el desarrollo del saco embrionario diplospórico y la partenogénesis puede ser eliminado en al menos dos taxones de *Asteraceae*: *Erigeron* y *Taraxacum*. En cruza de diploides sexuales y triploides apomícticos de *Taraxacum* muchos híbridos 3x y 4x forman semillas en ausencia de polinización, mientras que el endospermo se desarrolla autónomamente, tal como se esperaría en *Taraxacum* apomícticos. Sin embargo, varios híbridos 3x no forman semillas si no se los poliniza, aunque uno de ellos produjo embriones 2n+n (derivados de la fecundación de sacos embrionarios no reducidos) cuando fue polinizado con un diploide. Este genotipo realiza apomeiosis (ausencia de reducción de la gameta) pero es incapaz de hacer partenogénesis. La independencia entre la diplosporia y la partenogénesis fue luego confirmada en otras cruza. El desarrollo autónomo del endospermo también segregó en forma separada de la partenogénesis. Curiosamente, la región



que determina la diplosporía en *Taraxacum* no presenta reducción de la recombinación, constituyéndose (junto al caso de la apospórica *Poa pratensis*) en uno de los pocos ejemplos de recombinación en la región genómica que determina la formación apomeiótica de un saco embrionario. Similarmente, las progenies originadas a partir de cruza entre diploides sexuales y poliploides apomícticos de *Erigeron annuus* mostraron que varias plantas diplospóricas no formaban embriones, sugiriendo que se había eliminado el componente de la partenogénesis. Se demostró claramente que las dos características segregaban en forma independiente. La región que lleva el locus DIP (que determina la diplosporía) también presenta restricción de la recombinación (como en el caso de la región APO en la mayoría de las especies apospóricas estudiadas), pero no así la región responsable de la partenogénesis. Otra especie diplospórica extensamente estudiada es *Tripsacum dactyloides*, debido a que es un pariente lejano del maíz y presenta potencial para la transferencia del carácter a esta especie por mejoramiento convencional. En esta especie la diplosporía se hereda de manera simple. Varios marcadores del cromosoma 6 de maíz cosegregan estrictamente con el carácter. Aunque la región presenta una fuerte supresión de la recombinación en las razas apomícticas, en las cruza de diploides sexuales se detecta una recombinación considerable entre los mismos marcadores. La localización de la apomixis en una translocación cromosomal en híbridos de maíz –*Tripsacum* también reforzó la conclusión de que un único cromosoma de *Tripsacum* transmite la apomixis.

#### **Transferencia del carácter apomixis a especies de interés agronómico**

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. Por ello la transferencia del carácter a las especies cultivadas ha sido perseguida desde hace tiempo. Básicamente se consideran tres grupos

generales de procedimientos para transferir la apomixis a especies sexuales: i) hibridación clásica entre una planta sexual y un pariente apomíctico natural; ii) iniciación de la expresión de la apomixis por experimentos de bloqueo de genes (mutantes T, etiquetado transposicional, mutagénesis) y iii) transformación de cultivares sexuales con genes que controlan la expresión del carácter. Las dos primeras aproximaciones ya fueron intentadas, aunque hasta el momento los proyectos no han sido del todo exitosos. La tercera opción todavía continúa siendo hipotética.

Los primeros experimentos dirigidos a introducir la apomixis a través de cruzamientos fueron realizados hace unos 40 años por D. F. Petrov, quien realizó hibridaciones entre maíz y razas tetraploides de *Tripsacum dactyloides* (una especie diplospórica también perteneciente a la tribu de la Andropogoneas igual que el maíz). Posteriormente otros grupos de investigación produjeron híbridos interespecíficos de maíz-*Tripsacum* que se reproducen por apomixis. Sin embargo, como los genotipos obtenidos luego de una serie de retrocruzas con maíz son completamente macho-estériles, el progreso en la recuperación del genoma de esta especie está fuertemente asociado con la capacidad de generar híbridos con algún grado de reproducción sexual (apomícticos facultativos). La imposibilidad de generar este tipo de individuos es la principal dificultad que enfrenta este sistema. Una dificultad adicional es el fuerte requerimiento de una relación 2:1 en el número de genomas haploides maternos y paternos que contribuyen a la formación del endospermo en maíz. Estos problemas han demorado el progreso en la introducción de la apomixis en maíz en los últimos años. La transferencia de la apomixis al mijo perla (*Pennisetum glaucum*) desde *P. squamulatum* por un programa de mejoramiento iniciado al final de los 70 es considerado el más avanzado de su tipo. En este esquema las retrocruzas con *Pennisetum glaucum* han avanzado hasta la generación BC<sub>7</sub>, mediante la selección de grandes progenies para identificar individuos apomícticos parcialmente macho fértiles. Estas plantas son morfológicamente muy parecidas al mijo perla, aunque producen un bajo número de

semillas viables. Este hecho estaría vinculado a la formación del endospermo y es un inconveniente que aún resta resolver. En resumen, la factibilidad de la transferencia está aún por demostrarse. Los principales obstáculos son: equilibrar el balance endospermico y lograr la expresión de la apomixis a nivel diploide. Aquí se debería lograr, seguramente a través de un esfuerzo multidisciplinario internacional, un conocimiento profundo de la relación entre la expresión de la apomixis y la poliploidía, especialmente de la autoploidía. En gramíneas de la subfamilia Panicoideas (*Paspalum*, *Panicum*, *Tripsacum*, *Brachiaria*, *Melinis* y otras) es posible que el sistema apomítico difiera del que existe en Pooideas (*Poa*, *Elymus* y otras). Son necesarios conocimientos básicos más profundos de la embriología de especies silvestres con sistemas apomíticos, para determinar qué género o qué especie son los más adecuados para obtener los genes que podrían utilizarse en futuras transformaciones genéticas que permitan usar la apomixis en los cereales.

Los intentos para generar mutantes apomíticas inactivando genes de la sexualidad por etiquetado transposicional o mutagénesis no han tenido éxito aún en recrear el carácter pero permitieron la identificación de varios genes involucrados en el control de etapas particulares de su desarrollo, como la proliferación del endospermo en ausencia de fertilización o la generación de sacos no reducidos que por fecundación produjeron híbridos BIII. La transformación genética de cultivares sexuales con genes que controlan el inicio del carácter es aún hipotética.

### **Caracterización molecular de la región genómica que gobierna la apomixis**

En los últimos años la tecnología de marcadores moleculares y los procedimientos de biología molecular han generado una cantidad considerable de conocimientos nuevos sobre las bases moleculares de la apomixis. Los géneros de gramíneas para los cuales se dispone de más datos acerca de la estructura molecular de la región genómica asociada a la apomixis son hasta el momento *Pennisetum* y *Paspalum*. En *Pennisetum ciliare* y *Pennisetum squamulatum* la región que determina la apomixis

es un sector no recombinante de tamaño calculado en unos 50 Mpb. Se aislaron 99 clones de BAC conteniendo marcadores moleculares que mapean en esta región. Algunos de estos clones fueron utilizados para realizar estudios de FISH (hibridización fluorescente *in situ*; del inglés *fluorescent in situ hybridization*) sobre cromosomas de estas especies. En *P. squamulatum* los experimentos de FISH confirmaron que la región asociada a la aposporia (ASGR) es físicamente muy grande (más de 50 Mpb) y que está localizada cerca del telómero sobre el brazo corto del cromosoma portador. También demostró que la ASGR es hemigota y de naturaleza heterocromática. Se encontró una señal proveniente de una repetición centromérica en el extremo distal de la ASGR, lo que sugiere que el cromosoma portador sufrió una inversión. En *Pennisetum ciliaris* el cromosoma portador es 20 Mpb más largo que sus presuntos homeólogos, y la ASGR se localiza cerca del centrómero, en una región hemigota y heterocromática. En ambas especies (*P. squamulatum* y *P. ciliaris*) la ASGR contiene una región de alrededor de 13 Mpb de bajo número de copias. La región de baja copia es flanqueada a ambos lados por regiones de alto número de copias o repetitivas. En *P. squamulatum* la señal de alta copia se localiza únicamente en la ASGR, mientras que en *P. ciliare* puede ser identificada en todos los demás cromosomas también. Se encontró que un retrotransposón *Opie-2-like* puede mimetizar la señal de alta copia generada por los clones de BAC. Una comparación del orden de los genes en los BACs correspondientes a la región de baja copia entre las dos especies de *Pennisetum* demostró que aunque la región está invertida, mantiene el orden relativo en la posición de genes en un fragmento relativamente grande del cromosoma (es macrosinténica) en ambas especies. La macrosintenia aparentemente no se mantiene fuera de la ASGR. En una escala menor, segmentos con un orden de genes similar existen entre las dos especies apomíticas, y estos segmentos pueden ser hallados múltiples veces dentro de la ASGR en ambas especies. Inicialmente se identificaron regiones sinténicas con el cromosoma 11 de arroz, pero luego se demostró que dentro de la región

existen múltiples sectores más pequeños que comparten *sintenia* con distintos cromosomas de arroz (cromosomas 1, 2, 4, 6, 7, 8, 10 y 11). Un sector que representa 2.5 Mpb (~2 % de la región) fue secuenciado, y los genes incluidos se conocen. Entre ellos están 4 copias de genes homólogos a *baby-boom*, que fueron estudiados detalladamente como posibles candidatos a controlar alguna etapa de la apomixis en la especie. *Baby-boom* había sido identificado inicialmente en *Brassica napus*, inducido en cultivos de micrósporas que realizaban embriogénesis somática. La sola sobreexpresión de *baby-boom* en *Arabidopsis thaliana* induce la formación de embriones somáticos ectópicos en hojas y es suficiente para provocar embriogénesis somática espontánea. También se determinó la presencia de retrotransposones *Opie-2-like*, CACTA y helitrones en la región ASGR de *Pennisetum*.

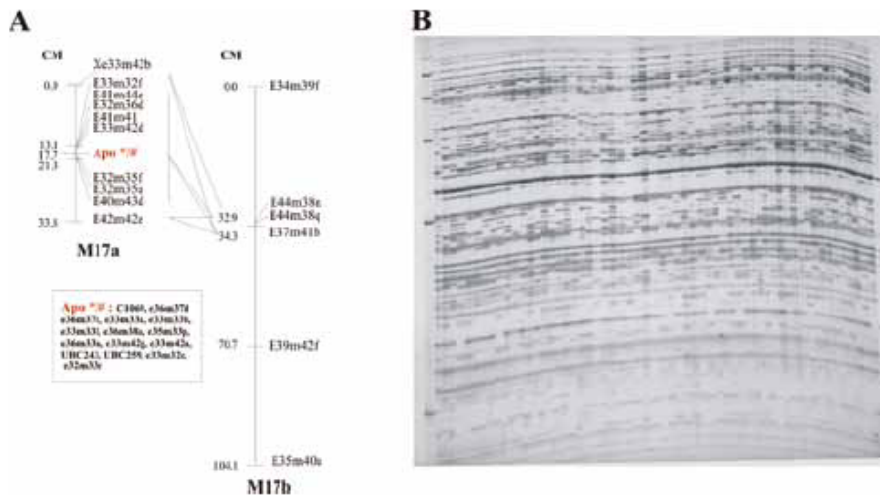
La caracterización por mapeo genético del locus apo en especies de *Paspalum* determinó una alta conservación de la región entre *P. notatum*, *P. simplex* y *P. malacophyllum*. En *P. notatum* se observa homología (*sintenia*) con segmentos de los cromosomas 12 y 2 de arroz, mientras que en *Paspalum simplex* y *Paspalum malacophyllum* sólo con el cromosoma 12 de arroz. Dado que también en *Brachiaria brizantha*, varias sondas que mapean en el cromosoma 2 de arroz fueron asociadas al locus apo, es posible entrever una cierta conservación del mecanismo de control de la aposporia para algunas especies de gramíneas. Por otro lado, a partir de una genoteca en BAC de *P. simplex* se aisló un clon (346H10) que contiene secuencias 100% ligadas a la aposporia en *P. simplex* y *P. notatum*. Experimentos de FISH con el clon 346H10 determinaron que el locus apo se encuentra en regiones no pericentroméricas del genoma de *P. simplex*. La secuenciación de 346H10 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 inducción de la formación de embriones somáticos en zanahoria y con la formación de los sacos

embrionarios apospóricos en *Poa*.

En *P. notatum* (como en *Pennisetum squamulatum*) también se postuló la existencia de una inversión genética en la región del APO locus, en base a observaciones citogenéticas y a evidencias provenientes del mapeo. Los datos derivados de mapeo genético indican que la región asociada a la apomixis en *P. notatum* es un sector extenso de 36 Mpb, que presenta una fuerte supresión de la recombinación y apareamiento preferencial de cromosomas (ver Figura 4). Experimentos de MSAP (polimorfismo de amplificación sensible a metilación; del inglés *Methylation Sensitive Amplification Polymorphisms*) y RFLP (polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción, del inglés *Restriction Fragment Length Polymorphisms*) con enzimas sensibles a metilación y la secuenciación de clones provenientes de la ASGR permitieron determinar que se trata de una región metilada extensivamente y que contiene abundantes transposones y retrotransposones. En resumen, los estudios realizados en *Paspalum* indican que, en forma similar al caso de *Pennisetum squamulatum*, la ASGR es una región extensa, que podría haber sufrido una inversión y que presenta todas las características de la heterocromatina: supresión de la recombinación, metilación extensiva, abundancia de elementos transponibles y apareamiento preferencial de cromosomas. Además se detectó que varios genes de esta región están silenciados en las razas apomícticas respecto a las sexuales (ver siguiente sección).

### **Expresión de genes durante el desarrollo apomíctico**

Una serie de trabajos recientes enfocados en estudiar la expresión de genes en plantas apomícticas y sexuales, han informado el aislamiento de transcritos de ARNm específicos del desarrollo apomíctico. En el año 1996 se publicó un trabajo pionero en la realización de estos perfilados del transcriptoma, allí los autores informaron que un gen (*Pcs-2*) se expresa sólo en ovarios sexuales mientras otros dos (*Pca-2* y *Pca-3*) lo hacen exclusivamente en ovarios apomícticos de buffelgrass (*Pennisetum ciliare*). Estos transcritos no presentaron homología con genes incluidos en los

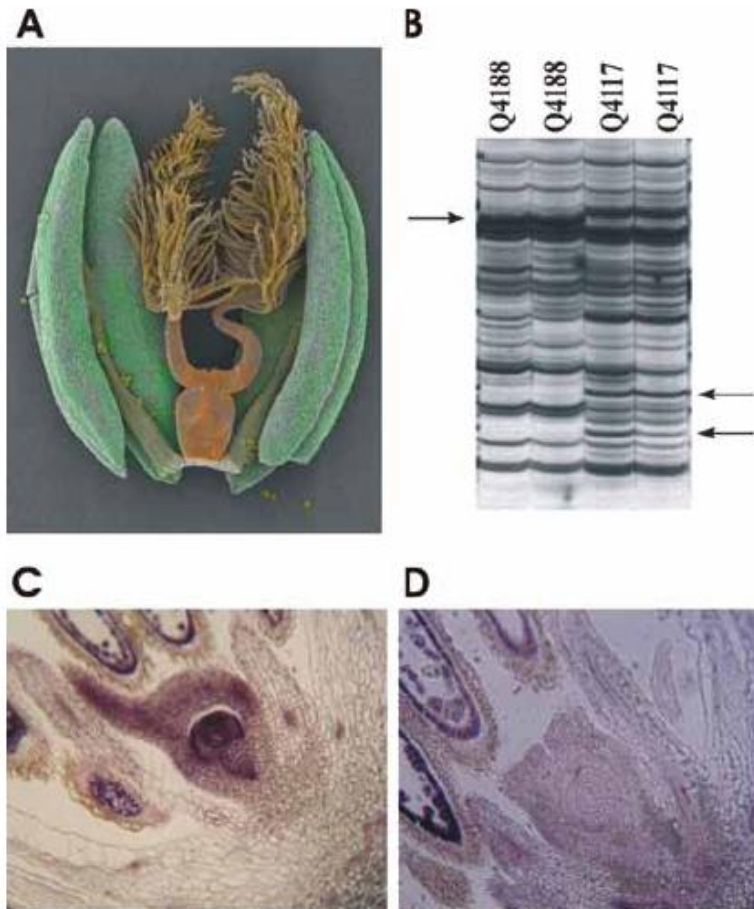


**Figura 4:** Localización de la región que controla la aposporia en *Paspalum notatum* por medio de marcadores moleculares. Panel A: grupo de ligamiento M17a del mapa genético de *Paspalum notatum*, que contiene a la región apo. El cuadro de abajo muestra un grupo de marcadores que están ligados 100% a la apomixis. Nótese la supresión de la recombinación en el locus. El grupo M17a está ligado en repulsión al grupo M17b. Panel B: gel de AFLP obtenido durante la construcción de un mapa genético de *Paspalum notatum*.

bancos de datos. Más adelante otros autores informaron la expresión de *asg1* (gen específico de la apomixis 1) en primordios florales de una accesión apomíctica de guineagrass (*Panicum maximum*) asociada temporalmente con la aparición de las células iniciales de la aposporia. La secuencia de *asg1* es similar a varios genes específicos de la semilla o el embrión de diferentes especies vegetales, entre ellos *rd22* (un gen expresado en semillas e inducido por sequía en *A. thaliana*), *grp* (un gen que codifica una proteína rica en glicina de la pared celular de ovarios de *Phaseolus vulgaris*), *usp* (un gen que codifica a una proteína de semilla de *Vicia faba*), *plyg1* (un gen que codifica a un precursor de la cadena beta de poligalacturonasa de *Lycopersicon esculentum*) y *adr6p* (un gen regulado negativamente por auxina de *Glycine max*). La homología de secuencia con todos estos genes es altamente significativa por lo que los autores interpretaron que *asg1* podría cumplir una función nueva dentro del complejo de formación del embrión y la semilla, relacionada con la aparición de las iniciales de la

aposporia. También se comparó la expresión de genes en flores de genotipos sexuales y apomícticos de *P. notatum* y se identificó al gen *arp1*, que es homólogo a la cinesina katD de *A. thaliana*. Se identificaron 6 genes de expresión diferencial en ovarios de plantas apomícticas y sexuales de *Brachiaria brizantha*, entre ellos un gen homólogo a una proteína quinasa (familia MAP quinasa, del inglés *mitogen-activated protein*).

Recientemente una caracterización más extensa del transcriptoma fue completada para las especies apospóricas *Poa pratensis* y *Paspalum notatum*. La misma permitió el aislamiento de centenares de genes de expresión diferencial en flores de genotipos sexuales y apospóricos (Figura 5). Varios genes comunes fueron identificados en ambas especies, y muchos de los restantes pertenecen a las mismas vías funcionales. Los genes identificados se inscriben dentro de unas pocas clases ontológicas: transducción de señales, proteólisis, control del ciclo celular, control de la transcripción, estructura de la cromatina y actividad de



**Figura 5: Análisis de expresión diferencial de genes en inflorescencias de plantas apomícticas y sexuales.** Panel A. Imagen de los órganos reproductivos de *Paspalum notatum* captada por microscopía electrónica de barrido y coloreada artificialmente. En el centro se observa el ovario rodeado por las anteras que han liberado algunos granos de polen (gentileza de la Dra. Ana María González, IBONE, CONICET). Panel B. Geles de *display diferencial* mostrando la expresión de transcritos en los órganos reproductivos de una planta apomíctica (Q4117) y otra sexual (Q4188) de *Paspalum notatum*. Las flechas indican los transcritos que presentan expresión diferencial. Paneles C y D: a partir de los geles se aislaron fragmentos de genes que fueron utilizados como sondas en experimentos de hibridación *in situ* de tejidos reproductivos de *Paspalum notatum*. En el panel C se muestra la hibridación del transcrito N22 con los órganos reproductivos de la planta sexual Q4188. En el panel D se muestra la hibridación del mismo transcrito N22 con los órganos reproductivos de la planta apomíctica Q4117. En el óvulo se observa la clara expresión diferencial del gen blanco (gentileza del Dr. Guillermo Seijo, IBONE, CONICET).

transposones. Muchos de los genes aislados son idénticos a otros cuya expresión es afectada en inflorescencias por un cambio en el nivel de ploidía, lo que evidencia a nivel molecular el alto grado de relación entre la apomixis y la po-

liploidización. Asimismo, los genes afectados durante los cambios de ploidía pertenecen claramente a las mismas clases funcionales que los controlados durante la apomixis.

Entre los genes activados o silenciados du-

rante el desarrollo apospórico se encuentran numerosos representantes de una cascada de transducción de señales de tipo ERK (quinasa regulada por señales extracelulares, del inglés *extracellular receptor kinase*). Por ejemplo receptores LRR (regiones ricas en repeticiones de leucinas), Ras, proteínas de unión a activadores de Ras, proteínas ancladas a GPI (glicosilfosfatidil inositol), MAP quinasa, fosfolipasa C, fosfatidilinositol quinasa, serin-treonin fosfatasa, serin-treonin quinasa, proteínas de interacción con PRIP y otros genes asociados. Asimismo numerosos genes relacionados con el recambio de proteínas (proteínas ribosomales, serin proteinasas, ubiquitina, factores de elongación). También se detectó la expresión diferencial de elementos transponibles entre plantas apomícticas y sexuales, pero restaría comprobar si ésta se mantiene en otros genotipos y si realmente podría estar cumpliendo un rol relacionado con el carácter.

En el caso de *P. notatum*, se observa un fenómeno interesante. Muchos de los genes silenciados en las plantas apomícticas respecto a las sexuales cuentan con secuencias homólogas en la porción distal del cromosoma 2 de arroz, una región que fue asociada con el locus apo en esta especie. Más aún, cuando algunos de estos genes silenciados fueron localizados en la propia especie, resultaron asociados al locus apo. Este grupo de genes comprende: la proteína LunaPark B, un homólogo de la proteína *checkpoint* CHK1, una proteína anclada a GPI, una proteína similar a extensina, una MAP3K, poliubiquitina, un receptor LRR, una proteína hipotética y un retrotransposón. La ubicación de estos genes en cercanías del apo locus, junto con su expresión diferencial en plantas apomícticas y sexuales, los convierten en candidatos interesantes para el control de la apomixis. Los genes incluidos en la región apo parecen estar silenciados en plantas apomícticas respecto a las sexuales. Se ha postulado que en *P. notatum* podría haber ocurrido una inversión de un sector sinténico con los cromosomas 2 y 12 de arroz, seguida de una invasión de heterocromatina en la región, la proliferación de retrotransposones y la modificación local de la expresión génica. ¿Podría esta modificación de la expresión ser la causa de la

apomixis? ¿Cuál o cuáles genes de la región serían responsables de disparar el carácter? La diferente expresividad de la apomixis que observamos en numerosas especies, ¿es consecuencia directa del grado de modulación epigenética que afecta a la región? Aunque se ha avanzado mucho en la caracterización de las bases moleculares del carácter, estas y otras preguntas permanecen sin respuesta.

También se realizaron estudios de expresión de transcritos en inflorescencias inmaduras en genotipos apomícticos y sexuales de diferentes ploidías de la especie diplospórica *Eragrostis curvula*. Los estudios realizados demostraron que para un grupo numeroso de genes los perfiles de expresión de un genotipo tetraploide apomíctico (4x apo) y un diploide sexual (2x sex) resultaron casi idénticos entre sí y a la vez diferentes en comparación con un genotipo tetraploide sexual (4x sex). La casi totalidad de los genes implicados se hallan silenciados en los genotipos 2x sex y 4x apo. Estos resultados son inesperados, ya que estos individuos (2x sex y 4x apo) presentan diferencias tanto en su ploidía como en su modo de reproducción. Para explicar estos resultados los autores formularon la hipótesis de que una falla parcial en el reacomodamiento de la expresión de algunos genes durante la poliploidización en esta especie culminaría en el disparo molecular de la diplosporía. O sea, ante un cambio de ploidía un grupo numeroso de genes debería activar su expresión para lograr mantener la sexualidad. Una falla en esta activación daría como resultado un fenotipo apomíctico. Este modelo coincide con la evidencia experimental de *Paspalum* en el hecho de que la apomixis podría estar causada por un silenciamiento de la expresión génica. Genéticamente la aposporia y la diplosporía no parecen tener el mismo origen, ya que los disparadores de ambos procesos han sido asociados a regiones sinténicas de arroz con diferente localización. Sin embargo, varios de los genes expresados durante el desarrollo diplospórico son los mismos o tienen relación con los de la aposporia (de hecho las mismas clases funcionales parecen afectadas) por lo que parece haber una relación molecular evidente entre ambos tipos de apomixis. La expresión diferencial de genes fue estudiada

también en especies diplospóricas de *Boechera* (Brassicaceae). En *Boechera microphylla* y *B. lignifera* (apomícticas) y *B. formosa* (sexual) se detectaron 4500 genes diferencialmente expresados utilizando microarreglos. Entre los genes identificados se encuentran algunos relacionados con la organización de la estructura del genoma como genes del grupo polycomb (PcG) y factores de transcripción de tipo MADS box. Los autores postularon que los genes del grupo PcG, sobreexpresados en plantas apomícticas, podrían estar produciendo la alteración en la expresión de los genes de tipo MADS box, concluyendo en el desarrollo de apomixis, aunque se ignora si éste es el factor causal del disparo del carácter a nivel de control genético en estas especies.

Otros estudios de mucha importancia para la elucidación de las bases moleculares de la apomixis informaron la caracterización de mutantes en las especies modelo, que sin ser apomícticas, presentaron fenotipos similares a algunas etapas particulares de su desarrollo. Entre ellas debemos citar: 1) las mutantes partenogenéticas *fie*, *fis*, *fis2*, *medea* y *medicis* de *Arabidopsis thaliana*; 2) la mutante apomeiótica *dyad* de *Arabidopsis thaliana*; 3) una mutante LRR de arroz que da origen a células análogas a las iniciales de aposporia y 4) la mutante embriogénica somática *SERK* de zanahoria (*SERK* es un receptor de tipo LRR). Particularmente en el caso de la interesante mutante apomeiótica *dyad* de *A. thaliana*, se ha confirmado que la inactivación de un gen responsable de la cohesión de las cromátides hermanas y organización del centrómero durante la meiosis de células germinales (*DYAD/SWITCH1*) es capaz de generar un fenómeno similar a la apomeiosis en dichas células, llevando luego de la fertilización por polen y a la producción de híbridos BIII. La baja tasa de producción de sacos no reducidos y la ausencia de partenogénesis en esta mutante es un indicador más de que aunque la región genómica que controla el carácter es única, hay más de un gen o quizás una condición epigenética compleja involucradas en la regulación de la apomixis.

### Perspectivas

A pesar de que aún es necesario responder numerosas cuestiones sobre la acción de ge-

nes, la función y la regulación de la apomixis, se vislumbra para el futuro un escenario promisorio. Nuestro entendimiento de las bases moleculares de la apomixis se ha incrementado notablemente a causa del desarrollo de técnicas poderosas de biología molecular y al creciente interés en el tema despertado en las instituciones científicas e investigadores. Por otra parte, con el advenimiento del análisis genómico a gran escala se dispone de nuevas herramientas para el descubrimiento de genes y los análisis de expresión. Es de esperar que en los próximos años este aumento del conocimiento de las bases genéticas y moleculares del carácter permita controlar su expresión con fines de mejoramiento. Solamente a través de una comprensión profunda del mecanismo biológico responsable de la apomixis y de las implicancias evolutivas derivadas de su utilización podrá concretarse su transferencia exitosa a las especies de gran cultivo. Para esto se requerirá un fuerte apoyo financiero a los estudios básicos sobre el tema. Por otra parte, dado que la problemática del carácter es muy compleja será indispensable fortalecer la cooperación internacional ya existente para mantener un espacio de discusión y de intercambio de materiales e información.

### Lecturas recomendadas

- Albertini E, Marconi G, Barcaccia G, Raggi L, Falcinelli M . 2004. Isolation of candidate genes for apomixis in *Poa pratensis*. *Plant Mol Biol*, 56, 879-894.
- Asker SE and Jerling L . 1992. Apomixis in plants. CRC Press, London.
- Bicknell R and Koltunow A . 2004. Understanding Apomixis: Recent Advances and Remaining Conundrums. *The Plant Cell*, 16, S228-S245.
- Calderini O, Chang SB, De Jong H, Busti A, Paolucci F, Arcioni S, de Vries S, Abma-Henkens MHC, Klein Lankhorst RM, Donnison IS, Pupilli F . 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, 1179-1191.
- Cervigni GDL, Paniago N, Pessino S, Selva JP, Díaz M, Spangenberg G and Echenique V . 2008. Gene expression in diplosporous and sexual *Eragrostis curvula* genotypes with differing ploidy

- levels. *Plant Mol Biol*, 67, 11–23.
- Crane CF. 2001. Classification of apomictic mechanisms. In: *Flowering of Apomixis: From Mechanisms to Genetic Engineering*, Y. Savidan, J.G. Carman, and T. Dresselhaus, eds (Mexico: CIMMYT, IRD, European Commission DG VI), pp. 24–34.
- Do Valle CB and Miles JW . 2001. Breeding of apomictic species. In: Savidan Y, Carman JG and Dresselhaus T (eds.) 2001. *The flowering of apomixis: from mechanisms to genetic engineering*. Mexico DF. CIMMYT, IRD, European Commission DG VI (FAIR). pp. 137-152.
- Grimanelli D, Leblanc O, Perotti E, Grossniklaus U .2001. Developmental genetics of gametophytic apomixis. *Trends in Genetics*, 17, 597-604.
- Koltunow AM, Bicknell RA, Chaudhury AM . 1995. Apomixis: molecular strategies for the generation of genetically identical seeds without fertilisation. *Plant Physiol*, 108, 1345-1352.
- Laspina NV, Vega T, Seijo JG, González AM, Martelotto LG, Stein J, Podio M, Ortiz JPA, Echenique VC, Quarin CL, Pessino SC. . 2008. Gene expression analysis at the onset of aposporous apomixis in *Paspalum notatum*. *Plant Mol Biol*, 67, 615-628.
- Nogler GA . 1984. Gametophytic Apomixis. In: Johri BM (ed) *Embryology of Angiosperms*. Springer-Verlag, Berlin.
- Ozias-Akins P . 2006. Apomixis: Developmental Characteristics and Genetics. *Critical Reviews in Plant Science*, 25, 199-214.
- Pessino SC, Ortiz JPA, Hayward MD, Quarin CL . 1999. The molecular genetics of gametophytic apomixis. *Hereditas*, 130, 1-11.
- Pupilli F, Martínez EJ, Busti A, Calderini O, Quarin CL, Arcioni S . 2004. Comparative mapping reveals partial conservation of synteny at the apomixis locus in *Paspalum* spp. *Mol. Gen. Genomics*, 270, 539-548.
- Ravi M, Marimuthu MP, Siddiqi I . 2008. Gamete formation without meiosis in *Arabidopsis*. *Nature*, 451, 28.
- Savidan Y . 2000. Apomixis: Genetics and Breeding. In: *Plant Breeding Reviews*, volume 18. J. Janick (Ed.). John Wiley & Sons, Inc. London.
- Smith J. 1841. Notice of a plant which produces seeds without any apparent action of pollen. *Transactions of the Linnaean Society of London* (meeting of June 18 1839), 18.
- Stein J, Pessino SC, Martínez EJ, Rodríguez MP, Siena L, Quarin CL, Ortiz JPA . 2007. A genetic map of tetraploid *Paspalum notatum* Flugge (bahiagrass) based on single-dose molecular markers. *Molecular Breeding*, 20, 153-166.
- Vielle-Calzada J-P, Crane CF, Stelly DM . 1996. Apomixis: The Asexual Revolution. *Science*, 274, 1322-1323.