

*Facultad de Ciencias Agrarias
Universidad Nacional del Nordeste*

El contenido de ADN y el nivel de ploidía en relación al sistema reproductivo en *Paspalum*

Tesista: *Florencia Galdeano*
Director: *Camilo L. Quarín*

*Tesis para optar al título de Doctor de
la UNNE "Área de Recursos Naturales"*

CORRIENTES ARGENTINA
2024

A vertical watercolor splash on the left side of the page, featuring a mix of brown, tan, and light green hues with various sized dots and blotches.

“Comienza haciendo lo necesario; luego haz lo posible y de repente estarás haciendo lo imposible”.

San Francisco de Asís



Universidad Nacional del Nordeste



Facultad de Ciencias Agrarias

Facultad de Ciencias Agrarias
Universidad Nacional del Nordeste

**El contenido de ADN y el nivel de ploidía en relación al sistema
reproductivo en *Paspalum***

Ing. Agr. Florencia Galdeano

Tesis para optar al título de Doctor de la UNNE “Área de Recursos
Naturales”

Director: Ing. Agr. (Dr.) Camilo Luis Quarín

Ciudad de Corrientes, Argentina

2024

El contenido de ADN y el nivel de ploidía en relación al sistema reproductivo en

Paspalum

Florencia Galdeano

Ingeniera Agrónoma FCA-UNNE

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor de la Universidad Nacional del Nordeste en el Área de Recursos Naturales, y no ha sido previamente presentada para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE-CONICET), Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Nordeste (UNNE), bajo la dirección del Ing. Agr. (Dr.) Camilo Luis Quarín.

Ing. Agr. (Dr.) Camilo Luis Quarín_____

Ing. Agr. Florencia Galdeano_____

Fecha de defensa_____

Agradecimientos

A mi familia, a Tano por ser mi soporte, Simón quien me ayudó incondicionalmente y Ale mi gran compañero de conversaciones, ellos me alentaron, y sostuvieron en cada instante.

A Camilo, mi director, quien desde estudiante me alentó a crecer, dedicando su tiempo y voluntad para que esta tesis fuera posible, compartiendo tiempo, historias y experiencia de vida.

A Pato quien siempre estuvo dispuesta a darme una mano.

A Verena quien con total generosidad me prestó sus dibujos de las espiguillas.

A los chicos de Genética Pancho, Pato, Verena, Werfil, Augusto, Nahuel y Mapi con quienes no solo compartimos horas de trabajo, sino también vida compartida en los almuerzos e inolvidables “yabebiries”. Momentos valiosísimos que me han apoyado muchísimo para llegar hasta el final.

A Carla y Dulce quienes estuvieron dispuestas a brindarme una mano.

A Marita y Mario que confiaron en mí y nunca dejaron de alentarme.

A Edmundo y Dante que cuidan de las plantas y mantienen el invernáculo en condiciones para que podamos realizar nuestro trabajo.

A “las chicas” que me bancaron cuando estaba enloquecida.

Al Consejo Nacional de Investigación Científica y Técnica que me permitió desarrollar este trabajo de tesis.

Al IBONE y la Facultad de Ciencias Agrarias-UNNE que me permitieron desarrollar las actividades de esta tesis en sus instalaciones.

Parte de los resultados descriptos en la presente tesis fueron previamente dados a conocer en la siguiente publicación y reuniones científicas.

Publicaciones:

1. Galdeano F., Urbani M. H., Sartor M. E., Honfi A. I., Espinoza F. And Quarin C.L. 2016. Relative DNA content in diploid, polyploid, and multiploid species of *Paspalum* (Poaceae) with relation to reproductive mode and taxonomy. J. Plant Res 129: 697-710.

Otras publicaciones en las que participé como colaboradora ligadas a citometría, apomixis y *Paspalum* durante el período de la Tesis:

2. Schedler M., Reutemann A.V., Hojsgaard D.H., Zilli A.L., Brugnoli E.A., Galdeano F., Acuña C.A., Honfi A.I. and Martínez E.J. 2023. Alternative evolutionary pathways in *Paspalum* involving allotetraploidy, sexuality, and varied mating systems. Genes 14: 1137. <https://doi.org/10.3390/genes14061137>.
3. Aguilera M.P., Galdeano F, Ortiz J.P.A., Quarin CL and Espinoza F. 2022. Construction of AFLP-based cosegregation groups of tetraploid *Plicatula* species and identification of markers linked to apomixis. Rodriguésia 73. <https://doi.org/10.1590/2175-7860202273085>.
4. Novo P.E., Acuña C.A., Urbani M.H., Galdeano F, Espinoza F and Quarin C.L. 2020. Genetic transfer from several apomictic tetraploid *Paspalum* species to an elite group of sexual plants. Crop Sci. 60: 1997-2007. <https://doi.org/10.1002/csc2.20173>.
5. Colono C., Ortiz, J.P.A., Permingeat H.R., Souza Canada E.D., Siena, L.A., Spoto N., Galdeano F., Espinoza F., Leblanc O. and Pessino S.C. 2019. Gametophyte development in sexual tetraploid *Paspalum notatum* ovules. Front. Plant Sci. 10: 1-14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01566>.
6. Novo P.E., Galdeano F., Espinoza F., and Quarin C.L. 2018. Cytogenetic relationships, polyploid origin, and taxonomic issues in *Paspalum* species: inter-and intraspecific

hybrids between a sexual synthetic autotetraploid and five wild apomictic tetraploid species. *Plant Biology* 21: 267-277. <https://doi.org/10.1111/plb.12931>.

7. Delgado L., Sartor M.E., Espinoza F., Soliman M., Galdeano F and Ortiz J. P. A. 2016. Hybridity and autopolyploidy increase the expressivity of apospory in diploid *Paspalum rufum*. *Plant Syst. Evol* 302:1471-1481.

Reuniones científicas:

Galdeano F, Urbani M, Honfi A, Matzk F, Quarín C.L. (2012) Relación entre el contenido de ADN y las características biológicas en *Paspalum*. III Ciclo de Seminarios sobre Avances en la Caracterización Genética y Molecular de la Apomixis en Gramíneas Forrajeras. Ciencias Agronómicas XX: 049. Rosario.

Índice

Índice de Figuras	4
Índice de Tablas	5
Resumen	7
Abstract	9
Introducción general	11
Género <i>Paspalum</i>	11
Sistemas reproductivos	12
Reproducción sexual	13
Reproducción apomítica	17
Tipos de Apomixis	18
Embrionía adventicia	18
Apomixis gametofítica	19
Diplosporia	19
Aposporia	19
Objetivos generales	24
Capítulo 1	25
I. Introducción	25
1.1 Tamaño del genoma y sus relaciones	25
1.2 Relación entre la poliploidía y los sistemas reproductivos en <i>Paspalum</i>	26
1.3 Tamaño del genoma y el género <i>Paspalum</i>	27
II. Hipótesis	29
III. Objetivos	30

	Índice
IV. Materiales y Métodos	31
4.1 Material Vegetal	31
4.2 Determinación de sistema reproductivo	37
4.3 Modo Reproductivo	38
4.4 Contenido relativo de ADN	38
4.5 Análisis estadístico	39
V. Resultados y discusión	40
5.1 Nivel de ploidía y contenido relativo de ADN	40
5.2 Evaluación del sistema reproductivo por FCSS	50
5.3 Modo reproductivo y tamaño del genoma	52
5.4 Contenido de ADN y su relación con grupos taxonómicos infragenéricos	55
5.5 Contenido relativo de ADN y niveles de ploidía	56
VI. Conclusiones específicas	63
Capítulo 2	64
I. Introducción	64
II. Hipótesis	74
III. Objetivos	75
IV. Materiales y métodos	76
4.1 Material vegetal	76
4.2 Cruzamientos controlados	78
4.3 Porcentaje de llenado de semillas producidas por cruzamiento.	81
4.4 Análisis de semillas por citometría de flujo.	82
4.5 Análisis estadísticos	82
V. Resultados y discusión	84
5.1 Cruzamientos	84
5.2 Porcentaje de fertilidad de los cruzamientos	84
5.3 Análisis de semillas por citometría de flujo	87

VI. Conclusiones específicas	103
Conclusiones generales	104
Bibliografía	105

Índice de Figuras

Figura 1: Esquema representativo de los diferentes modos reproductivos en Angiospermas	14
Figura 2: Especies de <i>Paspalum</i> examinadas, representantes de los diferentes grupos taxonómicos y detalles de sus inflorescencias.	36
Figura 3: Histograma ilustrando el contenido relativo de ADN del valor 2C.	53
Figura 4: Gráfico de cajas representando la variación de contenido relativo de ADN por sistemas reproductivos.....	54
Figura 5: Diagrama de cajas representando el contenido relativo de ADN del subgénero <i>Anachyris</i> y los grupos Dilatata, Notata y Plicatula del género <i>Paspalum</i>	56
Figura 6: Variantes de sacos embrionarios y observación por citometría de flujo FSCC en especies sexuales y apomícticas de <i>Paspalum</i>	67
Figura 7: Cámara de niebla artificial.....	79
Figura 8: Inflorescencia de Q3664 dentro de la cámara de niebla	81
Figura 9: Porcentaje de semillas llenas y vacías según cruzamiento.	86
Figura 10: Porcentaje de semillas llenas por cruzamiento.	87
Figura 11: Proporción de descendencia apomíctica obtenida de los cruzamientos entre Q4086 y diversos genotipos paternos.....	91
Figura 12: Proporción de descendencia apomíctica producto del cruzamiento entre Q3664 y diversos genotipos paternos.....	92
Figura 13: Proporción de descendencia apomíctica en cruzamientos entre Q4023 y diferentes combinaciones paternas.	93
Figura 14: Proporción de descendencia apomíctica de las tres madres respecto de cuatro genotipos paternos.....	96
Figura 15: Análisis de la varianza de las diferentes combinaciones de cruzamientos realizados. En verde (madre Q3664), celeste (madre Q4086), y gris (madre Q4023).	97
Figura 16: Proporción de descendencia apomíctica predicha por el modelo seleccionado para cada padre y madre.....	99

Índice de Tablas

Tabla 1: Introducciones vegetales utilizadas para el estudio..	33
Tabla 2: Niveles de ploidía y entidades en las cuales los recuentos cromosómicos se reportan por primera vez.	40
Tabla 3: Números cromosómicos, contenido relativo de ADN en el núcleo del embrión.	43
Tabla 4: Test de Tukey entre niveles de ploidía de las entidades de <i>Paspalum</i> .	50
Tabla 5: Valores de contenidos relativo de ADN en el análisis de la varianza por agrupamientos taxonómicos.	55
Tabla 6: Contenido relativo de ADN en 11 citotipos de especies multiploides de <i>Paspalum</i> .	58
Tabla 7: Plantas de <i>Paspalum notatum</i> Flüge.	76
Tabla 8: Total de espiguillas polinizadas en diferentes combinaciones de cruzamientos...	84
Tabla 9: Porcentaje de semillas obtenidas en los cruzamientos realizados, número de inflorescencias polinizadas según cruzamiento.	85
Tabla 10: Diferentes combinaciones de cruzamientos realizados, número de inflorescencias polinizadas por cruzamiento y proporción de semillas obtenidas sexuales y apomícticas.	88
Tabla 11: Valoración de los modelos lineales generalizados.	99

Abreviaturas

ASGR: Apospory specific genomic region

CMM: Célula madre de las megasporas

DAPI: 4', 6-diamidino-2-fenolindol

DIC: Contraste de interferencia diferencial

FCSS: Análisis de contenido de ADN en semillas por citometría de flujo

IP: Ioduro de propidio

MZT: Transmisión materno cigótica

NBE: Número de balance endospermico

pg: Picogramos

ZGA: Activación del genoma cigótico

B_{III}: Híbrido resultado de la fertilización de la ovocélula no reducida (Nogler, 1984).

Resumen

Alrededor del 75 % de unas 350 especies reconocidas para *Paspalum* (Poaceae) son poliploides y mayoritariamente estos poliploides son apomícticos. Las especies multiploides son comunes en el género y la mayoría de ellas tienen citotipos diploides sexuales y tetraploides apomícticas o de otros niveles de ploidía. En general, se acepta que los poliploides tienen un tamaño de genoma básico reducido en lugar de valores aditivos con respecto a sus diploides relacionados. Se han informado cambios en el tamaño del genoma en correlación con varias características biológicas. Mediante citometría de flujo en un análisis semilla por semilla de 50 especies, incluidas 77 entidades diferentes, abarcando las diferentes agrupaciones taxonómicas que forman el género, se midió el contenido de ADN en el embrión y el endospermo. El contenido relativo de ADN del embrión informó el tamaño del genoma del ejemplar en estudio, mientras que la relación embrión:endospermo del contenido de ADN reveló su modo reproductivo. Los tamaños del genoma (valor 2C) variaron de 0,5 a 6,5 pg y se midieron por primera vez para 29 especies. No hubo una diferencia significativa entre los tamaños básicos medios del genoma (valores 1Cx) de 32 entidades sexuales y 45 apomícticas. No hubo patrones claros de cambios en los valores de 1Cx debido a poliploidía o sistemas reproductivos, y las variaciones existentes concuerdan con la agrupación taxonómica subgenérica. Los valores más altos de 1Cx se observaron en las especies del subgénero *Anachyris* y las del grupo *Plicatula*, y los valores más bajos de 1Cx se observaron en las especies de los grupos *Dilatata* y *Notata*.

Otro aspecto de este estudio se basó en la confluencia de diferentes hechos relacionados con la embriogénesis y formación de semillas de especies apomícticas: primero, la polinización suele ser un requisito indispensable (pseudogamia); en segundo lugar, el polen de un genotipo diferente suele ser algo más eficaz que el propio polen; y tercero, que varias especies apomícticas de *Paspalum* pueden exhibir algún potencial intrínseco variable, pero generalmente pequeño, para la reproducción sexual. Así, surgió el interrogante de si el proceso embriológico de una sola planta apomíctica (como planta madre), portadora de tal potencialidad, puede desarrollar una semilla vía apomixis o vía sexual por sí misma, o si existe alguna acción activa dependiendo del polen, introducido en

el óvulo a través del tubo polínico en el momento de la fecundación. ¿Puede el tipo de sistema reproductivo de otro genotipo actuando como polinizador, como una planta de reproducción sexual, por ejemplo, cambiar la proporción de semillas formadas por la misma planta madre por medio de procesos embriológicos apomícticos o sexuales? Mediante cruzamientos controlados se estableció si existía relación entre los sistemas reproductivos de los genotipos polinizadores y los procesos embriológicos específicos realizados hacia la formación de semillas vía apomixis o sexualidad. Se realizaron diferentes cruzamientos, todos a nivel tetraploide, entre tres genotipos apomícticos facultativos, Q3664, Q4086 y Q4023 (como progenitores femeninos) y dos tipos de progenitores masculinos, clasificados según sus sistemas reproductivos: por reproducción sexual los genotipos: C4-4x, Q4205, y Q4188; y por otro lado por los genotipos apomícticos: Q4012, Q4117, Q3775, Q3838 y N160. Se observó la influencia del tipo de polinizador en el proceso que conduce a la formación de las semillas. Los resultados indicaron que el polen de las plantas que se reproducen sexualmente conduce total o predominantemente a la producción de semillas por vía sexual (meiosis + doble fecundación). La misma madre facultativa produce semillas por apomixis (aposporia + partenogénesis + pseudogamia) cuando el polen proviene de un reproductor apomíctico. Por tanto, queda demostrado que el modo reproductivo del polinizador tiene una clara incidencia en el tipo de procesos embriológicos que se producen en los óvulos de las plantas apomícticas facultativas, determinando si las semillas se forman predominantemente por vía de apomixis o por vía sexual.

Abstract

About 75 % of around 350 species recognized for *Paspalum* (Poaceae) are polyploid and most polyploids are apomictic. Multiploid species are common with most of them bearing sexual diploid and apomictic tetraploid or other ploidy levels. It is generally accepted that polyploids have downsized basic genome size rather than additive values with respect to their related diploids. Changes in genome size have been reported in correlation with several biological characteristics. DNA content in the embryo and the endosperm was measured by flow cytometry in a seed-by-seed analysis of 50 species including 77 different entities. The relative DNA content of the embryo informed the genome size of the accession while the embryo:endosperm ratio of DNA content revealed its reproductive mode. The genome sizes (2C-value) varied from 0.5 to 6.5 pg and for 29 species were measured for the first time. There was no significant difference between the mean basic genome sizes (1Cx-values) of 32 sexual and 45 apomictic entities. There were no clear patterns of changes in 1Cx-values due to polyploidy or reproductive systems, and the existing variations are in concordance with subgeneric taxonomical grouping established by botanists mainly through morphological characteristics. The highest 1Cx-value were observed in species of subgenus *Anachyris* and those of Plicatula group, and the lowest 1Cx-values were observed in species of the Dilatata and the Notata groups.

Another aspect of this study was based on the confluence of different facts related to embryogenesis and seed formation of apomictic species: first, pollination is usually an essential requirement (pseudogamy); second, pollen from a different genotype may usually be somewhat more effective than own pollen; and third, that several apomictic species of *Paspalum* may exhibit some variable, but usually small, intrinsic potential for sexual reproduction. Thus, the question arose as to whether the embryological process of a single apomictic plant (as mother plant), bearing such potentiality, may develop a seed via apomixis or via a sexual way by itself, or if there exist some active action depending upon the sperm cell, brought into the ovule by a pollen tube at the time of reproduction. May the kind of reproductive system of other genotype acting as pollinator, as a sexual reproducing

plant for instance, to change the proportion of seeds formed by the same mother plant by way of apomictic or sexual embryological processes? Through controlled crosses, it was established if there was a correlation between the reproductive systems of pollinating genotypes and the specific embryological processes performed toward seed formation via apomixis or sexuality. Different crosses were made, all at tetraploid level, between three facultative apomictic genotypes, Q3664, Q4086 and Q4023 (as female parents) and two types of male parents, sorted out according their reproductive systems: by sexual reproducing genotypes C4-4x, Q4205, and Q4188; and on the other hand, by apomictic genotypes Q4012, Q4117, Q3775, Q3838, and N160. It was observed the influence of the pollinator type on the process that leads the formation of the seeds. The results indicated that pollen of sexually reproducing plants leads totally or predominantly toward production of seed by sexual means (meiosis + double fertilization). The same facultative mother produced seeds via apomixis (apospory + parthenogenesis + pseudogamy) when the pollen comes from an apomictic reproductive plant. Therefore, the reproductive mode of the pollinator has a clear incidence on the type of embryological processes occurring in ovules of facultative apomictic plants, determining whether the seed is formed via apomixis or via sexual means.

Introducción general

Género *Paspalum*

El género *Paspalum* pertenece a la familia de las gramíneas (Poaceae = Gramineae) y posee un importante número de especies. Se estima que contiene entre 330 y 400 especies según diferentes taxónomos especialistas en el género (Chase, 1929; Zuloaga y Morrone, 2005, Ortiz et al., 2013).

Salvo muy raras excepciones, las especies de *Paspalum* son originarias de América, desde las zonas tropicales hasta superar los 41º de latitud sur en Chile y Argentina, y hacia el norte hasta la zona central y el noreste de Estados Unidos de América. Existe dentro del género una gran variación morfológica que ha llevado a distribuir a las especies en subgéneros o en distintos “grupos” taxonómicos subgenéricos. La organización taxonómica de las especies del género *Paspalum* está dividida en tres subgéneros: *Anachyris* (Nees) Chase, *Ceresia* (Pers.) Rchb., y *Paspalum* propiamente dicho. El subgénero *Paspalum* aglomera el mayor número de especies y la más amplia variación morfológica entre ellas. La amplia diversidad de adaptaciones ecológicas exhibidas por este grupo de plantas (Chase, 1929; Parodi y Nicora, 1966; Parodi, 1969; Zuloaga y Morrone, 2005) está sustentada en la variedad de estrategias reproductivas observadas en las distintas especies de *Paspalum* (Quarin, 1992) sin dudas, con una gran influencia en el desarrollo evolutivo del género. El uso de “grupos” como categoría secundaria informal entre los rangos de género y especies fue establecido por Chase, 1929 y libremente utilizado desde entonces en la bibliografía taxonómica (ver Artículo 4 de *The international Code of Nomenclature for algae, fungi and plants-Melbourne Code*- <http://www.iapt-taxon.org/nomen/main.php> para la aceptación oficial de rangos secundarios en secuencia descendente de género y especies y por debajo del rango de especies). Cabe aclarar que, en la bibliografía taxonómica, desde hace décadas se aceptan, además de unos pocos subgéneros oficialmente descriptos como tales, los agrupamientos subgenéricos de especies por

afinidades morfológicas. Se designan como grupos subgenéricos, aunque no han sido nunca descritos formalmente como subgéneros (Zuloaga y Morrone, 2005; Rua y Speranza, 2010). A falta de una revisión exhaustiva y moderna, la gran mayoría de las especies incluidas en esos “grupos”, en realidad son mantenidas por conveniencia como pertenecientes al subgénero *Paspalum* propiamente dicho (Zuloaga y Morrone, 2005).

Una revisión rápida de la bibliografía sobre sistemas de reproducción en *Paspalum* indica que muchas de las especies del género son de reproducción apomíctica. Se han estudiado en este aspecto cerca de 90 especies y más de 50 de ellas se reproducen por apomixis o incluyen citotipos que son apomícticos. Es bastante frecuente que las especies de este género estén constituidas además por distintos citotipos, es decir, que, para una especie, pueden existir biotipos con distintos números de cromosomas. Generalmente estas especies son multiploides con citotipos diploides (2x) sexuales y citotipos poliploides (mayormente tetraploides) apomícticos (Quarin, 1992). Como sucede en la mayoría de las especies apomícticas de angiospermas, existe una marcada relación de la apomixis con la poliploidía.

Sistemas reproductivos

La mayoría de las angiospermas se propagan a través de semillas que surgen de un proceso de reproducción sexual. Los gametos se generan por mitosis post meiótica que se fusionan durante un proceso de doble fecundación para iniciar el desarrollo del embrión y del endospermo. Sin embargo, cerca de 400 especies de plantas pertenecientes a unas 40 familias distintas, incluyendo tanto dicotiledóneas como monocotiledóneas, se reproducen por medio de apomixis (Grossniklaus, 2001; Tucker y Koltunow, 2009). El proceso embriológico de la reproducción apomíctica no incluye ni la meiosis ni la fecundación para la formación del embrión y, de esa manera, el nuevo individuo lleva exactamente la misma información genética que la planta que le da origen. Es un sistema de clonación natural por medio de semillas.

Reproducción sexual

La variación genética está asociada a la reproducción sexual, pero ésta también implica gasto de tiempo y energía (Asker y Jerling, 1992). La recombinación genética y la creación de nuevos genotipos son una de las principales características de la reproducción sexual.

El ciclo de vida de las angiospermas se ve alternado por una generación esporofítica ($2n$) y una gametofítica (n). La alternancia de generaciones es una característica con implicancias importantes en la formación de los gametos y la embriogénesis (Gifford y Foster, 1989, Walbot, 1996). Las células madres de las megasporas y las de las microsporas, mediante un número limitado de divisiones mitóticas son responsables de desarrollar el megagametofito (saco embrionario) y el microgametofito (grano de polen), estructuras que portarán los gametos femeninos (ovocélula) y masculinos (células espermáticas), respectivamente.

Las megasporas, células con número cromosómico reducido a la mitad (n), se generan como producto del proceso denominado megagametogénesis (Maheshwari, 1950). Este proceso puede tener algunas particularidades, las que no consideraré aquí por brevedad o porque no atañe al material en estudio, pero que en general en angiospermas se inicia a partir de una célula especializada de la nucela del óvulo, el megasporocito o célula madre de las megasporas (CMM), donde ocurre división meiótica que genera cuatro células hijas haploides (n). Generalmente, tres de estas células degeneran y la restante da origen, mediante tres divisiones mitóticas sucesivas, a un saco embrionario o megagametofito. Por ser un producto de la meiosis se los denomina saco embrionario meiótico. A los sacos que se forman a partir de una sola megaspóra se los denomina monospóricos (Figura 1).

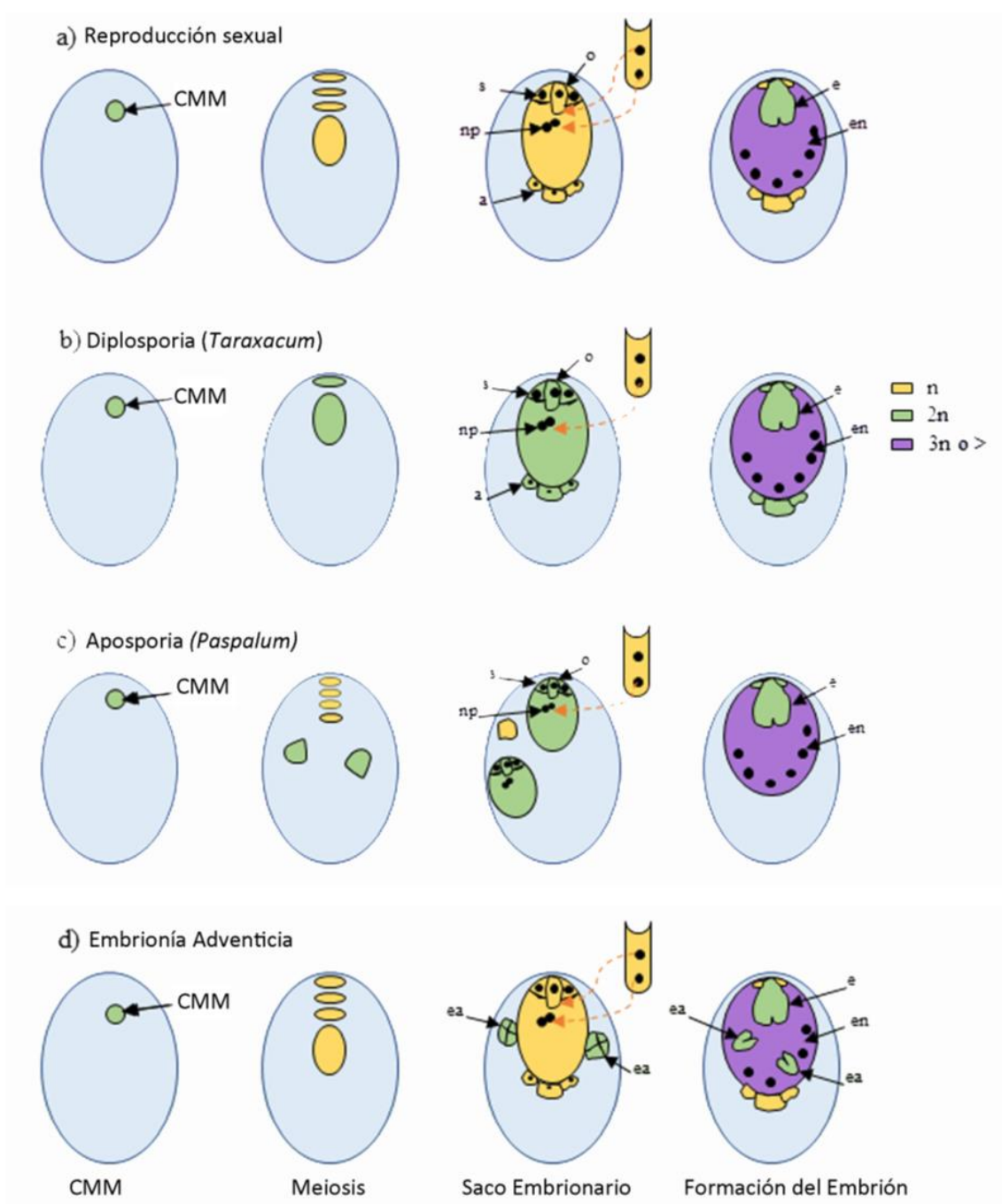


Figura 1: Esquema representativo de los diferentes modos reproductivos en Angiospermas (adaptado de Ozias-Akins y van Dijk, 2007 y Rebozzio, 2009). En celeste se representan las células de la nucela. **a) Reproducción sexual:** La CMM entra en división meiótica formando 4 células haploides, 3 degeneran y la restante da origen a un saco embrionario meiótico; la doble fecundación origina el embrión y el endospermo. **b) Diplosporia:** La CMM por un

proceso meiótico aberrante e incompleto origina 2 células diploides, de las cuales una degenera y la otra da origen, a través de divisiones mitóticas, a un saco embrionario diplospórico. Por partenogénesis la ovocélula origina el embrión, mientras que la fecundación de los núcleos polares (pseudogamia) da origen al endospermo. **c) Aposporia:** La CMM genera por meiosis 4 células que degeneran. Los sacos embrionarios apospóricos se desarrollan a partir de una célula somática de la nucela, que luego de 2 divisiones mitóticas sucesivas se originan 4 células y 5 núcleos, que forman un saco embrionario. El embrión se origina por partenogénesis, mientras que la fecundación de los núcleos polares (pseudogamia) da origen al endospermo. **d) Embrionía adventicia:** Dentro del óvulo se desarrolla un saco embrionario meiótico y a partir de células de la nucela se desarrollan embriones adventicios que luego invaden el saco embrionario donde se desarrollan. **CMM:** célula madre de la megaspora, **o:** ovocélula, **s:** sinérgidas, **a:** antípodas, **np:** núcleos polares, **e:** embrión, **en:** endospermo, **ea:** embrión adventicio.

Dentro de los denominados sacos monospóricos podemos encontrarnos con sacos embrionarios constituidos por 7 células y 8 núcleos: la ovocélula y dos sinérgidas ubicadas en la región micropilar, una célula central binucleada y tres antípodas en la región de la chalaza. A esta clase de saco embrionario se conoce como “tipo Polygonum” por haber sido descrito originalmente por Strasburger para el género *Polygonum* (Maheshwari, 1950). El saco embrionario de tipo Polygonum está presente en más del 70% de las plantas con flores y ocurre de manera exclusiva en el 53% de las familias estudiadas por Carman (1997), incluyendo familias económicamente importantes: Brassicaceae (*Arabidopsis*, *Capsella*, *Brassica*), Gramineae (maíz, arroz, trigo), Malvaceae (algodón), Leguminoseae (porotos, soja) y Solanaceae (pimiento, tabaco, tomate, papa, petunia) (Maheshwari, 1950; Willemse y Went, 1984; Haig, 1990; Huang y Russell, 1992).

En un número muy importante de gramíneas, el saco tipo Polygonum tiene la particularidad de que las antípodas se dividen muchas veces por mitosis formando una masa de células en lugar de las tres que conforman normalmente el típico saco Polygonum.

Si consideramos los eventos que llevan a la formación del embrión, debemos empezar desde el micro y el megasporangio. El microsporangio está constituido por los sacos polínicos, dentro de la antera. En cada célula madre del polen, contenida en dichos sacos se produce la meiosis que conduce a la formación de las microsporas (grano de polen) y oportunamente al gametofito masculino. Similarmente, el megasporangio es generalmente en gramíneas una célula diferenciada de la nucela del óvulo. Es allí donde a partir de la meiosis se forman las megasporas y, a partir de la megaspora funcional, se forma el gametofito femenino o saco embrionario. Luego de la fecundación se produce el embrión y el endospermo, mientras que todo el óvulo con sus estructuras se convertirá en la semilla que originará la próxima generación (Maheshwari, 1950).

Entonces, la división meiótica de las células madres del polen origina 4 microsporas haploides que formarán los granos de polen. Una primera división mitótica señala el final de estado de microspora e inicia el desarrollo del polen o gametofito masculino. La primera mitosis origina, dentro del grano de polen, una célula vegetativa y otra generativa. La célula vegetativa tiene como función primera dirigir el desarrollo del tubo polínico a través del pistilo, durante el proceso de polinización-fecundación. La célula generativa, se divide por mitosis una vez más para dar origen a dos gametos masculinos, los cuales llevan a cabo la doble fecundación que es característica de la mayoría de las angiospermas (Maheshwari, 1950). En alrededor del 70% de las angiospermas, esta última división mitótica ocurre recién después de la germinación del tubo polínico, por lo que en el momento de la dehiscencia de las anteras el grano de polen se libera en estado bicelular (Brewbaker, 1967; Knox et al., 1986). Sin embargo, en algunas especies como las gramíneas, la célula generativa se divide precozmente formando un grano de polen maduro, completando de esa manera el gametófito masculino o microgametofito, el cual contiene tres células haploides (n): la vegetativa y dos gametos masculinos (Knox, 1984).

La formación de la semilla ocurre después de producida la doble fecundación. El microgametofito deposita dos gametos haploides dentro del megagametofito a través del tubo polínico que penetra el óvulo. Un gameto (n) fecunda la ovocélula (n) y forma el cigoto

($n+n=2n$) a partir del cual se desarrolla el embrión; el otro gameto del tubo polínico (n) fecunda la célula central binucleada ($n+n$) y origina el endospermo [$(n+n)+n=3n$] (Mascarenhas, 1989). La unión de un gameto femenino con uno masculino para formar el cigoto, nuevamente implica recombinación génica en el origen de un nuevo individuo.

El proceso de reproducción sexual es un mecanismo orientado a explotar la variabilidad genética presente en los organismos. Sin embargo, el 0,1% de las especies de angiospermas exhiben modificaciones durante el desarrollo de la megaspora y del megagametofito, y en la formación del embrión y endospermo, que conducen a la producción de semillas mediante un proceso asexual denominado apomixis o agamosperma.

Reproducción apomítica

En las plantas Angiospermas, la apomixis es el sistema de reproducción asexual (agámica) a través de semillas, que genera progenies maternas cuyos individuos son normalmente copias genéticamente exactas a la planta madre (Nogler, 1984). El término apomixis deriva del griego “apo” (falta o ausencia) y “mixis” (unión o mezcla) y equivale a la antigua palabra “Agamosperma” también derivada del griego que significa: semilla-sin-gametos. Por lo tanto, apomixis hace referencia a la forma de reproducción con desarrollo del embrión sin fecundación (partenogénesis), y del endospermo sin fecundación de los núcleos de la célula central o con fecundación (pseudogamia). Es decir, no sucede la unión entre la ovocélula y el núcleo espermático como es una característica de la reproducción sexual, la consecuencia es el desarrollo del embrión por partenogénesis en la formación de la semilla.

Este sistema de reproducción fue descubierto por primera vez por J. Smith en 1841 en *Alchornea ilicifolia* (Js. Sm.) Müll. Arg. cuando un ejemplar femenino de esta especie dioica, llevado desde Asia a los Kew Gardens de Richmond cerca de Londres, se encontraba creciendo en forma aislada, floreció y produjo semillas en abundancia. De este modo puso

en evidencia a la apomixis y permitió el estudio de este tipo particular de reproducción. Rosenberg (1907) fue quien observó que la aposporia ocurre en angiospermas, a través de estudios citológicos en *Hieracium*.

En la década de 1980, se publicó una muy completa, detallada, y bien ordenada revisión bibliográfica mundial de todo lo que hasta allí habían informado destacados investigadores estudiosos de la apomixis en plantas angiospermas. En esa extraordinaria revisión de Nogler (1984) podemos encontrar información básica muy precisa de los mecanismos citoembriológicos y las consecuencias genéticas de la apomixis, incluyendo un análisis crítico de la terminología, algo dispersa, utilizada desde principios del siglo XX de la descripción de este sistema reproductivo.

A continuación, se realiza un pequeño compendio de los conocimientos básicos recopilados, ordenados y comentados por Nogler (1984) para las diferentes formas de apomixis, y eventualmente enriquecidos por autores posteriores, los que serán referidos cuando correspondiere.

Tipos de Apomixis

El proceso apomíctico se desarrolla sin reducción cromosómica, recombinación ni singamia (Hanna y Bashaw, 1987). De acuerdo a cómo y dónde se forma el embrión, la Agamospermia puede clasificarse fundamentalmente en dos formas de reproducción: apomixis esporofítica (embrionía adventicia) y apomixis gametofítica.

Embrionía adventicia

En la embrionía adventicia, el embrión, nuevo esporofito, proviene directamente de una célula somática del óvulo, usualmente de la nucela (embrión nucelar). Sólo el endospermo es producido en el saco embrionario. Esta clase puramente esporofítica de agamospermia es común que produzca poliembrionía. Generalmente se forman embriones

múltiples (esporofíticos) que comparten el ovario junto con el embrión de origen sexual y utilizan su endospermo para desarrollarse. Las células nucelares destinadas a formar embriones se diferencian morfológicamente de las otras células normales por tener un núcleo grande y el citoplasma denso (Wilms et al., 1983; Bruck y Walker, 1985). Se desconocen los mecanismos específicos por los cuales se forman embriones nucelares de sólo algunas células nucelares (Koltunow, 1993). La embrionía adventicia existe en algunas familias de angiospermas, mayormente en Rutáceas, donde es particularmente típica en varias especies del género *Citrus* (Koltunow, 1993).

Apomixis gametofítica

El gametofito femenino se forma a partir de una célula inicial del saco embrionario. Este es el tipo de apomixis más frecuente y es el que ocurre en gramíneas. Aquí cabe hacer la distinción entre diplosporia y aposporia.

Diplosporia

Nos referimos a diplosporia cuando un saco embrionario se origina de una célula generativa (célula arqueosporial femenina, célula madre de las megasporas), ya sea porque se produce un núcleo de restitución debido una meiosis anómala (tipo *Taraxacum* y tipo *Ixeris*), o ya sea porque su núcleo se divide directamente por mitosis como sucede en el tipo *Antennaria*. Si bien existen algunas variantes, en todos los casos el saco maduro es semejante a un saco de tipo *Polygonum* (Asker y Jerling, 1992, Koltunow, 1993).

Aposporia

El saco embrionario apospórico, se origina por megagametogénesis a partir de una célula somática del óvulo (generalmente de la nucela). En cada óvulo se pueden diferenciar

y desarrollar uno o más sacos apospóricos. Existe una gran variabilidad de sacos embrionarios apospóricos en angiospermas, pero falta en la bibliografía una revisión integral de este tema que permita proponer una terminología completa para clasificar esa variabilidad. No obstante, se utilizan ciertos términos que refieren a algunas formas más conocidas de sacos apospóricos. Por ejemplo, los sacos apospóricos tipo *Panicum* que surgen cuando en una primera mitosis de la megagametogénesis los dos núcleos permanecen próximos entre sí en un extremo del saco en desarrollo (división monopolar). En general, al final de este proceso apospórico, el saco embrionario no tiene antípodas y queda constituido por cuatro células no reducidas ($2n$): una ovocélula y dos sinérgidas hacia la micrópila, y una gran célula central uninucleada (Savidan, 1978). Este saco apospórico de tipo *Panicum* es característico de la gramínea *Panicum maximum* Jack.¹ y de varias especies de *Brachiaria* (especies de gramíneas que actualmente se incluyen en el género *Urochloa*).

Otra clase de saco apospórico, mencionado en algunas angiospermas, se produce a partir de una célula de la nucela del óvulo, cuando al final de la primera mitosis de una megagametogénesis bipolar, cada núcleo telofásico se ubica en polos opuestos separados por una vacuola central, como sucede en los sacos de “tipo *Hieracium*” (Rosenberg, 1907; 1930). Así, la formación del saco apospórico “tipo *Hieracium*” se produce luego de completar tres divisiones mitóticas, dando lugar a 8 núcleos distribuidos en siete células: la ovocélula, dos sinérgidas, la célula central binucleada y tres antípodas, conformando una estructura similar a los sacos tipo *Polygonum* en las especies sexuales. La diferencia reside en que los núcleos son diploides ($2n$), incluidos los dos de la célula central, mientras que en los de tipo *Polygonum* todos son haploides (n).

Sin embargo, además de la aposporia con gametofitos femeninos de tipo *Hieracium* y *Panicum* vale mencionar lo que ocurre en muchas gramíneas del género *Paspalum* L., género en que se centran los objetivos de la presente tesis. De hecho, el sistema que involucra en general a la agamospermia, y concretamente a la aposporia, tiene algunas particularidades características en este género. Por ejemplo, la meiosis femenina

¹ = *Megathyrsus maximus* (Jacq.) B. K. Simon & S.W. L. Jacobs; = *Urochloa maxima* (Jacq.) R. Webster.

generalmente sucede en los óvulos de las especies apomícticas de este género, aunque frecuentemente todos los productos de la meiosis (megasporas) abortan y, simultáneamente, del esporofito circundante (nucela) se diferencian una o varias células iniciales de aposporia, las que dan lugar a uno o más sacos apospóricos. Sin embargo, en la mayoría de las especies apomícticas de *Paspalum*, aunque en forma eventual, la meiosis puede ser funcional y en ese caso, en el mismo óvulo puede formarse un saco meiótico, el cual puede estar solo en ese óvulo, o más frecuentemente coexistir con el o los sacos apospóricos, dando lugar a un óvulo mixto (Quarin et al., 1982). En suma, una especie de *Paspalum*, o un genotipo particular de una especie, se considera de reproducción sexual cuando en el óvulo se desarrolla exclusivamente un saco embrionario meiótico. Las especies que potencialmente pueden desarrollar indistintamente óvulos con uno o más sacos apospóricos, o óvulos mixtos, o eventuales óvulos con un saco meiótico, se consideran que son apomícticas. Cuando determinamos que, en una planta, la sumatoria de los óvulos con un saco meiótico más los óvulos mixtos, es cercana o supera la mitad del total de los óvulos observados, podemos convenir que la misma es apomíctica facultativa (Quarin et al., 1982).

Dependiendo de las especies, los sacos apospóricos de *Paspalum* son muy variables en cuanto a forma, número de células, tamaño, además de su ubicación, orientación y cantidad por óvulo. Por lo general, son de forma ovalada, con una ovocélula ($2n$) y una célula central binucleada muy vacuolizada con los dos núcleos polares (ambos $2n$) ubicados hacia la ovocélula. También pueden tener una o dos células sinérgidas junto a la ovocélula. En resumen, toda la variación que existe en los sacos apospóricos más comunes en especies de *Paspalum* tienen, además de la ovocélula, y como característica destacada de todas ellas: dos núcleos polares $2n$ en la célula central y carecen totalmente de antípodas. Es lo que se ha dado en llamar tipo *Paspalum* (Ortiz et al., 2013). Excepcionalmente se han mencionado sacos embrionarios apospóricos del tipo Hieracium en dos especies: *P. secans* Hitchc. & Chase (Snyder, 1957) y *P. simplex* Morong (Caponio y Quarin, 1987; Cáceres et al., 2001).

Por lo tanto, en Angiospermas, a diferencia de la diplosporia, en las plantas apospóricas es común que se desarrollen más de un saco embrionario apospórico en un

mismo óvulo. Es más, pueden coexistir el proceso sexual y el apomítico al mismo tiempo (Quarin et al., 1980a; Quarín et al., 1982; Grossniklaus et al., 2001; Naumova y Vielle-Calzada, 2001). Observaciones citológicas de diferentes especies que presentan este modo reproductivo mostraron que las células apospóricas iniciales pueden diferenciarse de la nucela próxima a las células madres de las megasporas (CMM) en cualquier estadio de la megasporogénesis o megagametogénesis. Cuanto más temprano ocurre esta diferenciación, es más probable que el proceso sexual sea inhibido (Nogler, 1984). En una proporción muy alta de especies de *Paspalum*, se puede observar la coexistencia de un saco embrionario meiótico de tipo Polygonum con uno o más sacos apospóricos en el mismo óvulo (óvulos mixtos), aunque el porcentaje de óvulos mixtos es variable en esas especies apomíticas y, en general, en la mayoría de ellas suele ser muy baja la incidencia de sacos meióticos, predominando los óvulos con exclusivamente saco/s apospórico/s.

Así como en la apomixis es importante el hecho que la diplosporia y la aposporia inhiben o de alguna manera evitan la meiosis, también son igualmente importantes los mecanismos que impiden la fecundación de la ovocélula no reducida (salvo rarísimas excepciones), y mantienen la capacidad de los óvulos de desarrollar asexualmente semillas por partenogénesis.

Mientras que, en una planta sexual, tanto la ovocélula como la célula central deben ser fecundadas para generar semilla viable, en una planta con apomixis gametofítica sólo se necesita, en general, la fecundación de la célula central, no de la ovocélula. Tanto en la aposporia como en la diplosporia, el gameto femenino no reducido inicia el desarrollo del embrión directamente por partenogénesis, sin necesidad de que la ovocélula haya sido fecundada (Savidan, 2000). El endospermo en cambio, puede iniciar su desarrollo sólo luego de la fecundación de la célula central (apomixis pseudógama), o prescindiendo de ella (apomixis autónoma) (Ford y Richards, 1985; Noyes y Rieseberg, 2000). La gran mayoría de las especies apomíticas de *Paspalum* son apospóricas y pseudógamas.

De hecho, el sistema de reproducción apomítico, con sus variantes, fue reportado para más de 500 especies (Nogler 1984; Hanna y Bashaw, 1987, Savidan, 2000), distribuidas

en 40 familias de plantas y más comúnmente en las familias de *Gramineae*, *Compositae*, *Rosaceae*, y *Rutaceae* (Hanna y Bashaw, 1987). Se considera que la apomixis ha evolucionado como un sistema de reproducción alternativo a la sexualidad en angiospermas a través de la reformulación de los programas de desarrollo del ovario (Koltunow, 1993). Este modo reproductivo es específico del gametofito femenino (Nogler, 1984), aunque existen excepciones (Pichot et al., 2001). Las tres subfamilias de Poaceae con la mayor proporción de géneros que combinan modos reproductivos apomícticos y sexuales (por ejemplo: 13,03% en Panicoideae, 8,27 % en Chloridoideae y 5,29 % en Pooideae), presentando *Paspalum* 45 especies apomícticas como mínimo, las que representan el 9% del total de especies de plantas apomícticas conocidas hasta el momento. (Ortiz et al., 2013; Galdeano et al., 2016).

Esta tesis trata dos temas específicos ligados a *Paspalum* y los sistemas reproductivos. En la introducción particular a cada tema se establecen las correspondientes hipótesis y objetivos respectivos.

En el primer capítulo, se abordó el contenido relativo de ADN de un número representativo de especies del género, abarcando ampliamente su distribución, en relación a diferentes características (ploidía, sistemas reproductivos y características morfológicas).

En el segundo capítulo, se estudió la implicancia del aporte de los gametos progenitores en la formación de semillas en cruzamientos entre genotipos reproductivamente diferentes en *Paspalum notatum*.

Objetivos generales

- Conocer el contenido relativo, y promedio de ADN por cromosoma de varias especies de *Paspalum* (aproximadamente el 10% de las que constituyen el género), considerando los distintos niveles de ploidía en cada especie y abarcando especies de diferentes grupos subgenéricos.
- Conocer cuáles son, tanto la relación de contenido genómico embrión:endospermo como la relación materno:paterna en el endospermo.

Capítulo 1

I. Introducción

1.1 Tamaño del genoma y sus relaciones

La importancia biológica y evolutiva de la variación en el contenido de ADN es aún un rompecabezas sin resolver en la biología evolutiva (Johnston et al., 2005).

La terminología al respecto del contenido de ADN, ha sido propuesta por Greilhuber et al (2005) y denominan valor C al tamaño de genoma holoploide, refiriéndose al contenido nuclear de ADN, no replicado, del complemento cromosómico completo de un organismo; mientras que el valor Cx se refiere al tamaño del genoma monoploide, es decir, el contenido de ADN del juego básico de cromosomas al que usualmente llamamos número básico de cromosomas y se representa con una x.

Se ha relacionado el tamaño del genoma con varios aspectos de la historia de vida de una especie y también de un género. Por ejemplo se ha demostrado que el tamaño del genoma está relacionado con aspectos taxonómicos de géneros, familias e inclusive categorías superiores (Ohri, 1998; Ohri y Khoshoo, 1986; Ohri et al., 1998; Chrtek et al., 2009), evolución del genoma y filogenia (Enke et al., 2011), se ha demostrado que las plantas autóгамas suelen tener menor tamaño de genoma que sus parientes alógamas (Labani y Elkington, 1987; Albach y Greilhuber, 2004), las especies anuales tienden a tener un tamaño de genoma menor al de las especies perennes relacionadas (Bennett, 1972; Rejmanek y Richardson, 1996), probablemente debido a que el ciclo de vida de plantas anuales está ligado con la autogamia (Albach y Greilhuber, 2004). También se estudiaron la relación entre tamaño de genoma y factores ecológicos, (MacGillivray y Grime, 1995; Knight et al., 2005), resistencia a heladas (MacGillivray y Grime, 1995), fitomejoramiento (Riera-Lizarazu et al., 1996), conservación (Rejmanek y Richardson, 1996), fisiología y desarrollo vegetal (Butterfass, 1995; Xia, 1995; Bharathan, 1996; Raven, 1999) Otra característica que

ha sido relacionada con el contenido de ADN y que resulta de especial interés es el modo de reproducción. Matzk et al. (2003) demostraron que en el género *Hypericum* las especies apomícticas de *Ascyreia*, tienen genomas con un mayor contenido de ADN que cualquier otra especie del género. El tamaño del genoma también ha sido relacionado con el nivel de ploidía. Independientemente de la variación que pueda existir entre distintos grupos de angiospermas, sean entre familias, géneros o agrupamientos de especies, se podría esperar que el tamaño del genoma holoploide representado con el valor C, tomado según la definición de Greilhuber et al. (2005), debería aumentar dentro de cada grupo en proporción directa con el aumento de ploidía. Sin embargo, Leitch y Bennett (2004), en una revisión de más de 3000 especies de angiospermas examinadas, concluyen que: **i)** el promedio del contenido de ADN en su valor 1C no aumenta exactamente en proporción directa con el aumento del nivel de ploidía y, **ii)** la cantidad de ADN del genoma básico (Cx) (calculado a partir de la división del valor 2C por el nivel de ploidía) tiende a decrecer con el aumento de ploidía; marcándose de esta manera una tendencia general de reducción del tamaño del genoma básico con el incremento de la ploidía.

1.2 Relación entre la poliploidía y los sistemas reproductivos en *Paspalum*

La particularidad de *Paspalum* es que la mayoría de las especies son poliploides (80% según Quarin, 1992) y la mayor parte de los poliploides son en realidad especies multiploides. Los citotipos poliploides de las especies multiploides son generalmente autotetraploides, pero también se ha podido constatar la existencia de series más complejas donde pueden intervenir, además del citotipo diploide sexual, otros niveles de autoploidía, como ser: triploides (3x), pentaploides (5x), hexaploides (6x) y heptaploides (7x). La apomixis en estos poliploides siempre es mayoritaria, aunque en todos ellos la expresión es muy elevada y la sexualidad es solo eventual (Rebozzio et al., 2011; Sartor et al., 2011; Hojsgaard et al., 2013). En el género también se han reportado especies poliploides en cuyo origen seguramente intervino tanto la hibridación interespecífica como la poliploidización, es decir, la alopoloidía (Burson et al., 1973; Burson 1978, 1983, 1991,

Rosso et al., 2022). Estas especies son menos frecuentes que los multiploides (generalmente autoploiploides) en el género. En algunos casos se trata de especies de reproducción sexual como por ejemplo *P. boscianum* Flüggé, *P. flavescens* (Rosen., B.R. Arrill. & Izag.) Speranza & G.H. Rua (4x), *P. plurinerve* Quarín, Valls & V.C. Rosso (4x), *P. urvillei* Steud. (4x), *P. regnellii* Mez (4x), *P. dasyleurum* Kunze ex Desv. (4x), *P. conspersum* Schrad. (6x), mientras que otros son apomícticos como ser: *P. dilatatum* Poir. (5x), *P. dilatatum* var. *chiru* Millot ex Speranza & G.H. Rua (6x), *P. dilatatum* var. *uruguayanense* I.L. Barreto ex Valls & G.H. Rua (6x), *P. torrense* I.L. Barreto ex Valls & V.C. Rosso (6x), *P. minus* E. Fourn. (5x), *P. pauciciliatum* (Parodi) Herter (4x) y otros.

Uno de los hechos destacados de las especies multiploides es que los citotipos diploides son generalmente alógamos debido a un sistema genético de autoincompatibilidad, mientras que los poliploides son apomícticos pseudógamos (el embrión se desarrolla por partenogénesis, pero el desarrollo del endospermo requiere la fecundación de los núcleos polares del saco embrionario por parte de un gameto masculino) y autofértiles (ver ejemplos en Norrmann et al., 1989). Si bien existen numerosos estudios enfocados en analizar la relación de la poliploidía con los sistemas reproductivos en *Paspalum*, aún no se ha profundizado en el estudio de la posible relación entre los sistemas reproductivos y el tamaño del genoma.

1.3 Tamaño del genoma y el género *Paspalum*

Para el género *Paspalum*, existen algunos antecedentes acerca del estudio del contenido de ADN en relación principalmente a la ploidía. Vaio et al. (2007), observaron que existe una disminución diferenciada en el tamaño del genoma en la transición desde la diploidía hacia la poliploidía. Como estas observaciones han involucrado solo algunas de las especies del género, es interesante establecer si esta tendencia es aplicable a todas las especies multiploides de *Paspalum*, teniendo en cuenta que las especies de *Paspalum* con que trabajaron Vaio et al. (2007) son aloploides, mientras que la autoploidía aparece como

el origen más probable de las especies de multiploides de *Paspalum*, las que a su vez son mayoría en este género (Quarin, 1992). Por otra parte, Jarret et al. (1995) establecieron la ocurrencia de niveles de variación significativos del contenido de ADN dentro y entre especies e indicaron, que la determinación del mismo podría ser útil para la caracterización e identificación de citotipos en este género, permitiendo detectar adaptaciones genómicas a variaciones ecológicas. Si bien estos estudios constituyen un antecedente del análisis de la variación en el tamaño del genoma entre las especies de *Paspalum*, los mismos no han evaluado si existe relación entre el tamaño del genoma y los sistemas reproductivos u otras características como ser aspectos taxonómicos dentro del género.

II. Hipótesis

- ✓ En las especies multiploides de *Paspalum*, el tamaño del genoma monoploide (Cx) es el mismo para el citotipo diploide que para los citotipos poliploides.
- ✓ El tamaño promedio del genoma monoploide (Cx) de las especies apomícticas de *Paspalum* es diferente, independientemente del nivel de ploidía, que el promedio de las especies sexuales.
- ✓ La variación en el tamaño de los genomas de especies de *Paspalum* está relacionada con características morfológicas que permiten realizar agrupamientos por aspectos taxonómicos.

III. Objetivos

General

- Conocer el contenido relativo, y promedio de ADN por cromosoma de varias especies de *Paspalum* (aproximadamente el 10% de las que constituyen el género), considerando los distintos niveles de ploidía en cada especie y abarcando especies de diferentes grupos subgenéricos.

Específicos

- Comparar el contenido relativo de ADN (valor Cx) de los diferentes niveles de ploidía de una misma especie multiploide.
- Relacionar el contenido relativo de ADN (valor Cx) y los sistemas reproductivos independientemente del nivel de ploidía.
- Contrastar el contenido relativo de ADN (valor Cx) con la variabilidad morfológica (agrupamientos taxonómicos subgenéricos).

IV. Materiales y Métodos

4.1 Material Vegetal

En el género *Paspalum*, por debajo del ordenamiento de especie es posible separar a las mismas en diferentes categorías: desde subespecies o variedades botánicas a diferentes citotipos (organismos que provienen de la misma especie, pero presentan diferente nivel de ploidía) o también biotipos especiales (por ejemplo híbridos experimentales, poliploides inducidos con colchicina, o colecciones incluidas en alguna especie pero que presentan características morfológicas o citológicas que difieren de la especie tipo). Teniendo en cuenta estos criterios se examinaron en total 77 entidades, de las cuales encontramos: especies (50), variedades botánicas (4), diferentes citotipos o biotipos específicos (3) (Tabla 1).

En la mayoría de las entidades se analizó un individuo. Excepcionalmente se analizó más de una introducción (individuos de la misma especie colectados en diferentes localidades). En total se analizaron 91 individuos.

Las especies del género *Paspalum* examinadas, están asignadas taxonómicamente a tres subgéneros diferentes (*Anachyris*, *Ceresia* y *Paspalum*): *Anachyris* (representado en esta tesis por 3 especies); *Ceresia* (una especie analizada) y *Paspalum* (46 especies) (Figura 2). Dentro del subgénero *Paspalum* 42 de las especies analizadas se encuentran incluidas en 16 categorías taxonómicas informales (denominadas grupos), mientras que las especies *P. durifolium* Mez, *P. equitans* Mez, *P. redondense* Swallen y *P. rufum* Nees no han sido asignadas aún a ningún grupo informal.

El uso del término “grupos” como una categoría secundaria informal entre los rangos de género y especies fue establecido por Chase (1929) y utilizada libremente por la literatura hasta la actualidad (ver el Artículo 4 de *The International Nomenclature for algae, fungi, and plants-Melbourne Code*- <https://www.iapt-taxon.org/nomen/main.php> para la aceptación oficializada de rangos secundarios en descendencia entre géneros y especies, y debajo del rango de especies).

Las muestras de semillas provinieron de colecciones vivas del invernáculo o del jardín experimental de *Paspalum* en el campus de la Facultad de Ciencias Agrarias, Corrientes, Argentina (FCA-UNNE). En la mayoría de los casos el nombre de las introducciones está compuesto por una letra y números; las letras corresponden a la inicial del colector y los números al número de ejemplar de herbario de dicha introducción. La mayoría de los ejemplares están depositados en el herbario de Corrientes (CTES). Los ejemplares que no están conservados en CTES corresponden en su mayoría a aquellas accesiones cuya identificación se ve precedida con las letras V o TK, las mismas corresponden a colecciones de J.F.M. Valls o a T. Killen y los ejemplares están depositados en Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnología – Embrapa Cenargen (CEN) o el *Smithsonian Institution* (US) herbario respectivamente (para ver el código del herbario ver: <http://sweetgum.nybg.org/science/ih/>). Rara vez el nombre de la introducción refleja el sitio de colección.

Tabla 1: Introducciones vegetales utilizadas para el estudio. Identificadas por entidades, niveles de ploidías y grupos taxonómicos al que pertenecen (especies, variedades, citotipos, y morfotipos).

Entidades y niveles de ploidías (especies, variedades, citotipos, y morfotipos)		Introducciones	Grupos infragenéricos o subgenéricos
<i>P. acuminatum</i> Raddie	4x	Q4164	Dissecta
<i>P. alnum</i> Chase	2x	Perichón	Alma
	4x	Q4165	
<i>P. arundinellum</i> Mez	4x	D&H479	Quadrifaria
	5x	Q4154	
<i>P. atratum</i> Swallen	4x	V9880	Plicatula
<i>P. buckleyanum</i> Vasey	5x	Hojs 355	Livida
	6x	Hojs 354	
<i>P. chaseanum</i> Parodi	2x	AK45457	Plicatula
	4x	ST13894	
<i>P. commune</i> Lillo	4x	IC139	Virgata
<i>P. conjugatum</i> Bergius	6x	FCA; N185	Conjugata
<i>P. conspersum</i> Schrader	6x	M.Mboi	Virgata
<i>P. cromyorrhizon</i> Trin.	2x	Q3635	Notata
	3x	Q3635nt	
	4x	Q4039	
<i>P. dasyleurum</i> Kunze ex Desv.	4x	V12112	Dilatata
<i>P. dedecae</i> Quarin	2x	V11796	Linearia
	4x	Q3807	
<i>P. densum</i> Poir	4x	Q4298	Quadrifaria
<i>P. dilatatum</i> Poir	5x	B20; AH163	Dilatata
<i>P. dilatatum</i> Poir var. <i>chiru</i> Millot ex Speranza & G.H. Rua*	6x	Q4081	
<i>P. dilatatum</i> Poir var. <i>uruguayanense</i> I.L. Barreto ex Valls & G.H. Rua*	6x	V12388	
<i>P. durifolium</i> Mez	4x	Q3947	Sin grupo
	5x	V12282	

Cap 1. Materiales y Métodos

	6x	Q4056	
<i>P. equitans</i> Mez	2x	Q3683	Sin grupo
<i>P. erianthum</i> Nees ex Trin.	8x	TK1194	Eriantha
<i>P. falcatum</i> Nees ex Steud.	2x	AH882A	Falcata
<i>P. fimbriatum</i> Kunth	2x	W37098; W36875	(Fimbriata)
<i>P. flavescens</i> (Rosen.B.R. Arrill & Izag)	4x	Q3952; Q4209	Dilatata
Speranza & G.H. Rua*			
<i>P. guenoarum</i> Arechav.	4x	TK2390	Plicatula
<i>P. humboldtianum</i> Flüggé	8x	SV2640	Subgénero <i>Ceresia</i>
<i>P. ionanthum</i> Chase	4x	Q3726; Q3777	Notata
	8x	V4294	
<i>P. kempfii</i> Killeen	4x	TK2272	(Plicatula)
<i>P. lenticulare</i> Kunth	2x	N188	(Plicatula)
	4x	TK2417; U57; V11724	
	6x	U54	
<i>P. lividum</i> Trin.	4x	Hojs 365	(Livida)
<i>P. macedoi</i> Swallen	4x	TK2323	(Plicatula)
<i>P. malacophyllum</i> Trin.	2x	V14855; V14411	Subgénero <i>Anachyris</i>
	4x	Q4080; Q4112; V11813; TK2449	
<i>P. mandiocanum</i> Trin.	5x	V12010	Corcovadensia
<i>P. millegрана</i> Schrad.	4x	Q4297	(Quadrifaria)
<i>P. minus</i> E. Fourn.	5x	V14573	Notata
<i>P. nicorae</i> Parodi	4x	Sartor 10	Plicatula
<i>P. notatum</i> Flüggé natural	4x	Q4117	Notata
Híbrido experimental	4x	Q4188	
var. <i>Saurae</i> Parodi	2x	Q4084	
Diploide tratado con colchicina	2x	C4-2x	
Tetraploide Inducido con colchicina	4x	C4-4x	
<i>P. oteroi</i> Swallen	4x	Q4095	(Plicatula)
<i>P. ovale</i> Nees ex Steud.	8x	Q4083	Linearia
<i>P. palustre</i> Mez	4x	Bord 110	Plicatula
<i>P. plicatulum</i> Michx	2x	Honfi 14	Plicatula
	4x	Hojs 388	

	var. <i>intumescens</i>	4x	Q4087	
<i>P. plurinerve</i> Quarin, Valls & V.C.		4x	Q2960	Dilatata
Rosso*				
<i>P. procurrens</i> Quarin		4x	Q4094	Subgénero <i>Anachyris</i>
<i>P. redondense</i> Swallen		2x	V11370R	Sin grupo
<i>P. regnellii</i> Mez		4x	V10121; V4040; V11900; AH130	Virgata
<i>P. rojasii</i> Hackel		4x	AK40732	(Plicatula)
<i>P. rufum</i> Nees		2x	Q3754	Sin grupo
		4x	Q3785	
<i>P. simplex</i> Morong		2x	Q4109	Subgénero <i>Anachyris</i>
		3x	U36	
		3x	U45	
		4x	Q4126	
<i>P. torrense</i> I.L. Barreto ex Valls & V.C.		6x	Q4259	Dilatata
Rosso*				
<i>P. umbrosum</i> Trin.		2x	V11828	Paniculata
<i>P. unispicatum</i> (Scribn. & Merr.) Nash		2x	U15	Decumbentes
		3x	Q4211	
		4x	Q4265	
<i>P. urvillei</i> Steud.		4x	Q4111	Dilatata
<i>P. sp.nov. (P.urvillei × P. mandiocanum?)</i>		5x	V8009	(Dilatata)
<i>P. virgatum</i> L.		4x	BAA23248	Virgata



Figura 2: Especies de *Paspalum* examinadas, representantes de los diferentes grupos taxonómicos y detalles de sus inflorescencias. A y B) Especies pertenecientes al grupo Notata. A) *P. cromyorrhizon*, Q3665, en el detalle se observan la inflorescencia: a la izquierda Q3635 (2x) y a la derecha Q4039 (4x). B) *P. notatum*, N160 C) Subgénero *Anachyris* *P. malacophyllum* TK2449, D) Grupo Dilatata *P. dilatatum* var. *chiru* Q4081 y E) Sin grupo *P. rufum*. Q3785.

5.2 Nivel de ploidía

Los niveles de ploidía para muchas de las introducciones fueron determinados con anterioridad y reportados en diferentes publicaciones por el grupo de investigadores de *Paspalum* de la FCA-UNNE. Para el resto de las accesiones el número cromosómico se determinó en puntas de raíces con la técnica descrita por Norrmann et al. (1994).

4.2 Determinación de sistema reproductivo

Para el análisis de las semillas por la técnica de citometría de flujo (FCSS), se utilizaron los siguientes citómetros de Flujo: Partec Flow Cytometer CA, perteneciente al IPK, Gatersleben, Alemania y Partec PA II del Instituto de Botánica del Nordeste, Corrientes, Argentina. Se utilizó el kit CyStain UV Precise P[®] (05-5002) de Partec.

La preparación de las muestras y la interpretación de los histogramas se realizó siguiendo las técnicas descritas por Matzk et al. (2000). Una vez escarificadas las semillas, los cariopses fueron colocados en una caja de Petri, en la cual se adicionó 0,5 ml del buffer de extracción y se trituró finamente el material con una hoja de afeitar. Dejando reposar en el buffer de extracción por 1 minuto aproximadamente, luego la muestra fue filtrada a través de una malla de 30 μm y pasada a un tubo para su medición, al cual se le adicionó 1,5 ml de buffer de tinción con DAPI (4', 6-diamidino-2-fenolindol). Esta mezcla fue incubada durante 1 minuto en frío y oscuridad, y luego analizada a través del citómetro de flujo con el detector operando a 350 nm. Las mediciones de intensidad de fluorescencia de los núcleos teñidos se realizaron en escala linear, se examinaron aproximadamente 3000 núcleos por muestra y un $\text{CV} \leq 8\%$.

Se examinaron aproximadamente entre 15-25 semillas por cada entidad, con la intención de analizar el modo reproductivo y de establecer el contenido relativo de ADN correspondiente a cada entidad. El protocolo propuesto por (Matzk et al., 2000) permite el análisis de semillas en grupos ("bulks") o semillas individuales. Para este trabajo se

analizaron las semillas de forma individual, procedimiento que permitió revelar más claramente la existencia de apomixis facultativa que si el análisis se hubiese realizado en “bulks”.

4.3 Modo Reproductivo

En el FCSS se siguió la forma presentada por Matzk et al. (2000), el cual permite discriminar aquellas semillas originadas por sexualidad de las que fueron originadas por vía apomixis mediante la comparación del contenido de ADN del embrión con el contenido de ADN del endospermo. Por ello (en particular en las especies de género *Paspalum*) la fórmula 2C+3C corresponde a semillas que se originan por sexualidad, mientras que una relación 2C+5C corresponde a aquellas semillas que se originan por apomixis.

4.4 Contenido relativo de ADN

Para el cálculo de contenido relativo de ADN, algunas mediciones se analizaron en el IPK (Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research) Gatersleben, Alemania; el contenido relativo de ADN se realizó con mediciones con DAPI, usando como patrón interno *Hypericum maculatum* subsp. *maculatum* (1C relativo = 2,0 pg; (Matzk et al., 2000 y 2003). En Argentina las mediciones las realicé en el Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE) utilizando al diploide de *Paspalum notatum* var. *saurae* como patrón interno (1C relativo = 1,2 en comparación con *Hypericum maculatum* subsp. *maculatum*). El contenido relativo de ADN (2C) se calculó a través de la siguiente fórmula:

$$\left(\frac{\text{Promedio del pico de la muestra}}{\text{Promedio del pico del patrón}} \right) \times 2C \text{ contenido relativo de ADN del patrón (pg.)}$$

En ambas instituciones se utilizó un citómetro de Partec PA II y el programa utilizado para analizar los histogramas fue Flo Max 2.4d.

4.5 Análisis estadístico

Se realizó el test de Tukey para el análisis de comparación de pares (ANOVA) para ello se utilizó el programa InfoStat versión 2014 (Di Rienzo et al., 2014).

El paquete “tidyverse” (Wickham et al., 2019) fue utilizado para la construcción y análisis de los modelos lineales generalizados, y la construcción de los gráficos.

V. Resultados y discusión

5.1 Nivel de ploidía y contenido relativo de ADN

Los números cromosómicos de las 47 especies utilizadas en esta tesis varían desde $2n=12$ en el citotipo diploide de *P. alium* Chase hasta $2n=80$ en el citotipo octoploide de *P. erianthum* Nees ex Trin., *P. humboldtianum* Flügge, *P. ionanthum* Chase y *P. ovale* Nees ex Steud.. Se realizaron recuentos cromosómicos en 32 introducciones (Tabla 2), mientras que los recuentos de las introducciones restantes fueron realizados en trabajos previos. Tal como se puede observar en la tabla 2 todas las especies demostraron un juego básico de cromosomas (monoploide) $x=10$ a excepción de *P. alium* cuyo número básico es $x=6$.

Tabla 2: Niveles de ploidía y entidades en las cuales los recuentos cromosómicos se reportan por primera vez.

Entidades y niveles de ploidías (especies, variedades, citotipos, y morfotipos)		Introducciones	2n
<i>P. accuminatum</i>	4x	Q4164	40
<i>P. alium</i>	2x	Perichón	12
	4x	Q4165	24
<i>P. arundinellum</i>	4x	D&H479	40
	5x	Q4154	50
<i>P. atratum</i>	4x	V9880	40
<i>P. buckleyanum</i>	5x	Hojs 355	50
	6x	Hojs 354	60
<i>P. chaseanum</i>	2x	AK45457	20
	4x	ST13894	40
<i>P. dedeccae</i>	2x	V11796	20
<i>P. densum</i>	4x	Q4298	40
<i>P. durifolium</i>	5x	V12282	50
<i>P. fimbriatum</i>	2x	W37098;	20
		W36875	20

<i>P. lenticulare</i>	4x	TK2417;	40
		U57;	40
		V11724	40
	6x	U54	60
<i>P. millegrana</i>	4x	Q4297	40
<i>P. minus</i>	5x	V14573	50
<i>P. oteroi</i>	4x	Q4095	40
<i>P. ovale</i>	8x	Q4083	80
<i>P. palustre</i>	4x	Bord 110	40
<i>P. redondense</i>	2x	V11370R	20
<i>P. regnellii</i>	4x	V10121;	40
		V4040;	40
		V11900;	40
		AH130	40
<i>P. rojasii</i>	4x	AK40732	40
<i>P. umbrosum</i>	2x	V11828	20
<i>P. sp.nov. (P. urvillei × P. mandiocanum?)</i>	5x	V8009	50

El valor 2C de los embriones varía desde 0,5 pg. en el diploide *P. fimbriatum* Kunth hasta 6,5 pg en el octoploide de *P. erianthum* Nees ex Trin.. El contenido relativo de ADN promedio por cromosoma observado en las especies que presentan $x = 10$ varía de 0,026 pg en *P. fimbriatum* (valor $1Cx = 0,257$ pg) a 0,100 pg en el citotipo diploide de *P. malacophyllum* Trin. y en *P. simplex* Morong (valor $1Cx = 1,000$ pg); mientras que el citotipo diploide de *P. alnum* Chase presentó un promedio de 0,125 pg y el tetraploide 0,129 pg por cromosoma con valores de $1Cx$ de 0,750 y 0,775 pg respectivamente. Esta especie es interesante ya que presenta un número básico de cromosomas $x=6$ y tiene un contenido de ADN por cromosoma mayor que cualquiera de las otras especies que tienen $x= 10$.

Los valores obtenidos en el tamaño del genoma son nuevos para 29 de las 50 especies analizadas. Veinte de las 29 especies están representadas en esta tesis por un citotipo, cinco por dos citotipos y cuatro incluyen tres niveles de ploidía (ver Tabla 3), las 18 especies restantes fueron reportadas con anterioridad por Jarret et al., 1995 y Bennett y Leitch, 2010. Los valores de tamaño de genoma de 35 especies de *Paspalum* publicados por

Jarret et al. (1995) son comparables con los que obtuve en esta tesis ya que en ambos casos se utilizó DAPI como fluorocromo. Si bien en el trabajo de Jarret et al. (1995) no están indicados los números cromosómicos de las especies e introducciones con que trabajó, es posible extrapolar los niveles de ploidías, ya que la presencia de aneuploides no es frecuente en especies de *Paspalum*. De todos modos, el rango de variación en los valores de contenido de ADN observados entre las accesiones de las mismas especies hace que sea incierta cualquier inferencia acerca del verdadero nivel de ploidía de algunas introducciones.

Tabla 3: Números cromosómicos, contenido relativo de ADN en el núcleo del embrión (valores en pg de 2C y 1Cx), relación observada de valores 1C entre los núcleos de embrión y endospermo, sistema reproductivo determinado a través de FCSS y reportes de estudios embriológicos previos para 50 especies de *Paspalum* incluyendo 77 entidades con un total de 91 introducciones.

Entidades (especies, variedades, citotipos y morfotipos)	Nivel de ploidía	Introducciones	2n	Contenido relativo de ADN del embrión ^a		Valores C observados embrión + (endospermo)	Modos de reproducción			Grupos o Subgéneros taxonómicos infragenéricos ^(d)
				2C (ES)	1Cx		Esta Tesis FCSS ^b	Estudios previos ^c	Referencias	
<i>P. acuminatum</i> Raddi ^e	4x	Q4164	40	2,2±0,065	0,550	2C+(3C)	sex ^f	-	-	Dissecta
<i>P. alnum</i> Chase	2x	Perichón	12	1,5±0,054	0,750	2C+(3C)	sex	sex	Quarin y Hanna 1980a sub <i>P. hexastachyum</i>	Alma
	4x	Q4165	24	3,1±0,077	0,775		ap	ap	Bashaw et al., 1970	
<i>P. arundinellum</i> Mez ^e	4x	D&H479	40	2,6±0,063	0,650	2C+(6C); 4C+(6C)	ap+umg; B _{III} +umg	ap	Bashaw et al., 1970	Quadrifaria
	5x	Q4154	50	3,1±0,074	0,620	2C+(6C)	ap+umg	-	-	
<i>P. atratum</i> Swallen ^e	4x	V9880	40	3,2±0,057	0,800	2C+(5C)	ap	ap	Quarin et al., 1997	Plicatula
<i>P. buckleyanum</i> Vasey ^e	5x	Hoj355	50	2,4±0,085	0,480	2C+(5C); 2C+(3C)	fap	ap	Burson 1997; Sartor et al., 2011	Livida
	6x	Hoj354	60	3,0±0,083	0,500	2C+(5C); 2C+(3C)	fap	ap	Sartor et al., 2011	
<i>P. chaseanum</i> Parodi ^e	2x	AK45457	20	1,8±0,062	0,900	2C+(3C)	sex	sex	Espinoza y Quarin 1997	Plicatula
	4x	ST13894	40	3,7±0,072	0,920	2C+(5C)	ap	ap	Novo et al., 2013	
<i>P. commune</i> Lillo	4x	IC139	40	2,4±0,067	0,600	2C+(5C)	ap ^f	-	-	Virgata
<i>P. conjugatum</i> Bergius	6x	FCA N185	60 60	3,2±0,057	0,530	2C+(5C)	ap ^f	-	-	Conjugata
<i>P. conspersum</i> Schrad.	6x	M.Mboi	60	3,9±0,058	0,650	2C+(3C)	sex	sex	Quarin y Hanna 1980b	Virgata
<i>P. cromyorrhizon</i> Trin.	2x	Q3635	20	1,4±0,054	0,700	2C+(3C)	sex	sex+res apy	Quarin et al., 1982	Notata
	3x	Q3635nt	30	2,0±0,063	0,667	2C+(~5C); ~2.6C+(~5C); 1.3C+(2C) to 2C+(3C);	fap (ap+vmg; B _{III} +vmg; sex+vfg+vmg)	fap	Quarin et al., 1984	

	4x	Q4039	40	2,7±0,075	0,675	2C+(5C); 2C+(3C)	fap	fap	Quarin et al., 1982	
<i>P. dasypleurum</i> Kunze ex Desv.	4x	V12112	40	1,9±0,076	0,475	2C+(3C)	sex	sex	Quarin y Caponio 1995	Dilatata
<i>P. dedeccae</i> Quarin ^e	2x	V11796	20	1,5±0,057	0,750	2C+(3C)	sex ^f	-	-	Linearia
	4x	Q3807	40	3,0±0,079	0,750	2C+(5C); 2C+(3C)	fap	ap	Quarin y Burson 1991	
<i>P. densum</i> Poir. ^e	4x	Q4298	40	2,6±0,076	0,650	2C+(3C)	sex ^f	-	-	Quadrifaria
<i>P. dilatatum</i> Poir	5x	B20	50	2,6±0,056	0,520	2C+(~5C)	ap	ap	Smith 1948; Hayman 1956; Bashaw	Dilatata
		AH163	50						y Holt 1958	
<i>P. dilatatum</i> var. <i>chiru</i> Millot ex Speranza & G.H. Rua	6x	Q4081	60	3,4±0,057	0,567	2C+(5C); 2C+(3C)	fap	fap	Burson et al., 1991	
<i>P. dilatatum</i> var. <i>uruguaiense</i> I.L. Barreto ex Valls & G.H. Rua	6x	V12388	60	3,4±0,075	0,567	2C+(~5C); 3C+(5C)	ap+vmg; B _{III}	ap	Burson et al., 1991	
<i>P. durifolium</i> Mez ^e	4x	Q3947	40	2,9±0,067	0,725	2C+(3C)	sex	sex+res apy	Quarin 1994	Sin grupo
	5x	V12282	50	3,4±0,054	0,680	>2C+(~3C); 2C+(~5C)	fap (sex+vfg+vmg; ap+vmg) ^f	-	-	
	6x	Q4056	60	4,2±0,064	0,700	2C+(5C)	ap	ap	Burson 1985	
<i>P. equitans</i> Mez ^e	2x	Q3683	20	1,4±0,054	0,700	2C+(3C)	sex	sex+res apy	Quarin y Norrmann 1987	Sin grupo
<i>P. erianthum</i> Nees ex Trin. ^e	8x	TK1194	80	6,5±0,053	0,812	2C+(5C); 2C+(3C)	fap ^f	-	-	Eriantha
<i>P. falcatum</i> Nees ex Steud. ^e	2x	AH882A	20	1,6±0,074	0,800	2C+(3C)	sex ^f	-	-	Falcata
<i>P. fimbriatum</i> Kunth ^e	2x	W37098	2020	0,5±0,063	0,257	2C+(3C)	sex ^f	-	-	(Fimbriata)
		W36875								
<i>P. flavescens</i> (Rosen., B.R. Arrill. & Izag.) Speranza & G.H. Rua	4x	Q3952	40	2,1±0,075	0,520		sex	sex	Bashaw y Holt 1958	Dilatata
		Q4209	40							
<i>P. guenoarum</i> Arechav.	4x	TK2390	40	3,6±0,054	0,900	2C+(5C)	ap	ap	Burson y Bennett 1971a; Espinoza et al., 2001	Plicatula
<i>P. humboldtianum</i> Flügge	8x	SV2640	80	3,8±0,057	0,475	2C+(4C)	aap ^f	-	-	Subg. <i>Ceresia</i>



<i>P. ionanthum</i> Chase	4x	Q3726	40	2,7±0,068	0,675	2C+(3C)	sex	sex+res apy	Quarin y Norrmann 1987; Burson y	Notata
		Q3777	40						Bennett 1970b sub <i>P. guaraniticum</i>	
	8x	V4294	80	5,2±0,066	0,650	2C+(5C); 2C+(3C)	fap	ap	Burson y Bennett 1970b	
<i>P. kempffii</i> Killeen ^e	4x	TK2272	40	3,9±0,064	0,975	2C+(5C)	ap ^f	-	-	(Plicatula)
<i>P. lenticulare</i> Kunth ^e	2x	N188	20	1,5±0,078	0,750	2C+(3C)	sex	sex	Espinoza et al., 2001 sub <i>P.</i>	(Plicatula)
									<i>limbatum</i> Henr.	
	4x	TK2417	40	3,0±0,74	0,750	2C+(5C); 3C+(5C)	ap, B _{III}	ap; fap	Espinoza et al., 2001	
		U57	40							
		V11724	40							
	6x	U54	60	4,5±0,069	0,750	2C+(5C); 2C+(3C); 3C+(5C)	fap, B _{III} ^f	-	-	
<i>P. lividum</i> Trin.	4x	Hoj365	40	2,7±0,084	0,675	2C+(5C); 2C+(3C)	fap	fap	Burson y Bennett 1971a; Sartor et al., 2011	(Lívada)
<i>P. macedoi</i> Swallen ^e	4x	TK2323	40	3,1±0,076	0,775	2C+(5C)	ap ^f	-	-	(Plicatula)
<i>P. malacophyllum</i> Trin.	2x	V14855	20	2,0±0,078	1,000	2C+(3C)	sex	sex+res apy	Hojsgaard et al., 2008	Subg. <i>Anachyris</i>
		V14411	20							
	4x	Q4080	40	3,4±0,075	0,850	2C+(5C); 2C+(3C)	fap	fap	Burson y Hussey 1998; Hojsgaard et al., 2008	
		Q4112	40							
		V11813	40							
		TK2449	40							
<i>P. mandiocanum</i> Trin,	5x	V12010	50	2,6±0,075	0,520	2C+(6C); 4C+(6C)	ap+umg; B _{III} +umg ^f	-	-	Corcovadensia
<i>P. millegrana</i> Schrad. ^e	4x	Q4297	40	3,1±0,057	0,775	2C+(3C)	sex ^f	-	-	(Quadrifaria)
<i>P. minus</i> E. Fourn. ^e	5x	V14573	50	3,2±0,078	0,640	2C+(6C)	ap+umg	ap (dy+apy)	Bonilla y Quarin 1997	Notata
<i>P. nicorae</i> Parodi	4x	Sartor 10	40	3,3±0,055	0,825	2C+(5C); 2C+(3C)	fap	ap	Burson y Bennett 1970a; Sartor et al., 2011	Plicatula
<i>P. notatum</i> Flügge var. <i>notatum</i>	4x	Q4117	40	2,2±0,056	0,550	2C+(5C)	ap	ap; fap	Burton 1948; Martínez et al., 2001	Notata
Experimental hybrid	4x	Q4188	40	2,1±0,057	0,525	2C+(3C)	sex	sex	Martínez et al., 2001,	

var. <i>saurae</i> Parodi	2x	Q4084	20	1,2±0,082	0,600	2C+(3C)	sex	sex	Burton 1948	
Colchicine-treated diploid	2x	C4-2x	20	1,2±0,075	0,600	2C+(3C)	sex	sex	Quarin et al., 2001	
Colchicine-induced tetraploid	4x	C4-4x	40	2,4±0,069	0,600	2C+(3C)	sex	sex	Quarin et al., 2001,	
<i>P. oteroi</i> Swallen ^e	4x	Q4095	40	3,0±0,067	0,750	2C+(5C)	fap ^f	-	-	(Plicatula)
<i>P. ovale</i> Nees ex Steud. ^e	8x	Q4083	80	5,5±0,058	0,687	2C+(5C)	ap ^f	-	-	Linearia
<i>P. palustre</i> Mez ^e	4x	Bord 110	40	2,4±0,075	0,600	2C+(5C)	ap ^f	-	-	Plicatula
<i>P. plicatulum</i> Michx.	2x	Honfi 14	20	2,0±0,078	1,000	2C+(3C)	sex	sex	Espinoza y Quarín 1997	Plicatula
	4x	Hoj388	40	2,8±0,075	0,700	2C+(5C)	ap	ap	Pritchard 1970; Bashaw et al., 1970; Burson y Bennett 1971b	
var. <i>intumescens</i> Döll	4x	Q4087	40	3,4±0,074	0,850	2C+(5C); 2C+(3C)	fap ^f	-	-	
<i>P. plurinerve</i> Quarín, Valls & V.C. Rosso	4x	Q2960	40	2,1±0,073	0,520	2C+(3C)	sex	sex	Caponio y Quarín 1987	Dilatata
<i>P. procurrens</i> Quarín ^e	4x	Q4094	40	3,2±0,064		2C+(5C)	ap	fap	Hojsgaard et al., 2008	Subg. <i>Anachyris</i>
<i>P. redondense</i> Swallen ^e	2x	V11370R	20	1,2±0,054	0,600	2C+(3C)	sex ^f	-	-	Sin grupo
<i>P. regnellii</i> Mez ^e	4x	V10121	40	2,5±0,063	0,625	2C+(3C)	sex	sex	Norrmann 1981	Virgata
		V4040	40							
		V11900	40							
		AH130	40							
<i>P. rojasii</i> Hackel ^e	4x	AK40732	40	3,5±0,078	0,875	2C+(5C)	ap	ap	Bashaw et al., 1970 Burson y Bennett 1971b	(Plicatula)
<i>P. rufum</i> Nees ^e	2x	Q3754	20	1,5±0,068	0,750	2C+(3C)	sex	sex+res apy	Norrmann et al., 1989	Sin grupo
	4x	Q3785	40	3,0±0,084	0,750	2C+(5C)	ap	ap; fap	Burson 1975 Norrmann et al., 1989	
<i>P. simplex</i> Morong ^e	2x	Q4109	20	1,5±0,081	0,750	2C+(3C)	sex	sex	Espinoza y Quarín 1997	Subg. <i>Anachyris</i>
	3x	U36	30	2,5±0,067	0,833	1.3C+(2C) to 2C+(3C)	sex+vfg+vmg	sex	Urbani et al., 2002	
	3x	U45	30	2,6±0,082	0,867	2C+(~5C)	ap+vmg	ap	Urbani et al., 2002	
	4x	Q4126	40	3,0±0,072	0,750	2C+(5C); 2C+(3C)	fap	ap	Caponio y Quarín 1987	
<i>P. torrense</i> I.L. Barreto ex Valls & V.C. Rosso	6x	Q4259	60	3,0±0,065	0,500	2C+(6x); 2C+(~5C)	ap+umg or vmg	ap	Burson et al., 1991	Dilatata

<i>P. umbrosum</i> Trin. ^e	2x	V11828	20	1,0±0,063	0,500	2C+(3C)	sex	sex	Bashaw et al., 1970	Paniculata
<i>P. unispicatum</i> (Scribn. & Merr.) Nash	2x	U15	20	1,1±0,076	0,550	2C+(3C)	sex ^f	-	-	Decumbentes
	3x	Q4211	30	1,7±0,075	0,567	2C+(5C)	ap ^f	-	-	
	4x	Q4265	40	2,3±0,052	0,575	2C+(5C)	ap	fap	Burson 1997	
<i>P. urvillei</i> Steud.	4x	Q4111	40	2,1±0,054	0,525	2C+(3C)	sex	sex	Brown y Emery 1958	Dilatata
<i>P. sp.nov.</i> (<i>P. urvillei</i> × <i>P. mandiocanum</i> ?) ^e	5x	V8009	50	2,5±0,064	0,500	2C+(6x); 4C+(6C)	ap+umg; B _{III} +umg ^f	-	-	(Dilatata)
<i>P. virgatum</i> L.	4x	BAA23248	40	2,3±0,072	0,575	2C+(3C)	sex	sex	Burson y Quarin 1982	Virgata

a) Contenido relativo de ADN referido al ADN de *Hypericum maculatum ssp. maculatum* o del diploide de *Paspalum notatum var. sauræ*. Valor de *H. maculatum* 2x=2,0 pg, y *P. notatum var. sauræ* 2x=1,2 pg (patrones internos).

b) Abreviaciones relacionadas con los arreglos observados en los sistemas reproductivos por FCSS: **aap**: apomixis autónoma (partenogénesis del embrión y desarrollo autónomo del endospermo); **ap**: apomíctica con contenidos de ADN exclusivamente 2C+(5C) en la relación embrión+(endospermo); **B_{III}**: algunas semillas con relación embrión:endospermo 3C+(5C) o 4C+(6C) debido a la doble fertilización de un saco embrionario apomíctico (apospórico o diplospórico) con un gameto masculino reducido o no reducido, respectivamente; **fap**: apomíctica facultativa donde la relación de contenido de ADN que predomina es 2C+(5C), aunque también puede ser 2C+(3C); **sex**: sexual con una relación 2C+(3C) embrión+(endospermo); **umg**: gameto masculina no reducido con un valor de contenido 2C en especies en las cuales falló el apareamiento de los cromosomas durante la división meiótica seguido por la formación de núcleos de restitución en todos los meiocitos; **vfg**: gametos femeninos con número cromosómico variable con ganancia o pérdida de contenido de ADN en el valor C debido a meiosis irregular en poliploides sexuales con niveles de ploidías impares; **vmg**: gametos masculinos con número cromosómico variable debido a meiosis irregular en algunos poliploides sexuales o apomícticos.

- ^{c)} Abreviaciones adicionales acerca de procesos reproductivos acorde con la literatura sobre reproducción: **apy**: aposporía; **dy**: diplosporía; **res apy**: aposporía residual (habilidad de especies usualmente sexuales que ocasionalmente desarrollan un saco embrionario apospórico al lado del saco sexual regular).
- ^{d)} De acuerdo con la revision taxonómica del género para Sudamérica austral (Zuloaga and Morrone, 2005). Las especies que no han sido consideradas en dicha revision, fueron asignadas al grupo correspondiente por C.L. Quarín y se encuentran entre paréntesis. El grupo *Linearia* ha sido considerado siguiendo el criterio original propuesta por Chase (1929, 1939).
- ^{e)} Especies cuyo contenido relativo de ADN ha sido determinado por primera vez en esta tesis.
- ^{f)} Sistemas reproductivos reportados por primera vez.

Obtener información sobre el número de cromosomas en el género *Paspalum* es necesario ya que muchas de sus especies son multiploides, es decir, especies con diferentes niveles de ploidía (Ortiz et al., 2013) o en otras palabras citotipos diferentes dentro de la misma especie.

Vaio et al., (2007) determinaron contenidos absolutos de ADN estimados por citometría de flujo, utilizando como fluorocromo IP (ioduro de propidio) en especies de *Paspalum* de nivel de ploidía conocido que pertenecen al grupo Dilatata (mayoritariamente alopoliploides) y en algunos ancestros de diploides putativos. Algunas de las especies analizadas en esta tesis coinciden con la lista de Vaio et al. (2007).

En general, a lo largo de las estimaciones de esta tesis se observaron valores un poco menores de contenido de ADN (valor 2C) para las mismas especies tratadas por Vaio et al. (2007). Esto se atribuye al hecho de que para esta tesis se utilizó DAPI como fluorocromo, IP se caracteriza por teñir pares de bases de la doble cadena de ADN con muy poca o sin especificidad de bandas, mientras que DAPI tiñe bandas en regiones A-T preferentemente (Johnston et al., 1999). Los valores obtenidos con DAPI en esta tesis no se alejan demasiado de los valores reales medidos en picogramos. De hecho, la determinación de *P. plurinerve* (= *P. dilatatum* Virasoro en Vaio et al., 2007) en mediciones con DAPI como fluorocromo fue de $2C = 2,10$ pg, mientras que Vaio et al. (2007) reportaron un valor de $2C = 2,29$ pg, es decir, 9% mayor para el mismo clon, en introducciones de especies sexuales autóгамas coleccionadas en la misma población natural, o en sitios similares. En *P. dilatatum* var *uruguaianense*, se observó $2C = 3,4$ pg mientras que Vaio et al. (2007) (sub *P. dilatatum* Uruguaiana) obtuvieron valores 8,5% mayores ($2C = 3,69$ pg), siendo que ambos materiales provienen de la misma población natural.

Del test de Tukey realizado para determinar la variación del contenido de ADN entre los diferentes niveles de ploidía se observó (Tabla 4) que no existen diferencias significativas cuando se analiza el contenido relativo de ADN de acuerdo al nivel de ploidía.

Tabla 4: Test de Tukey entre niveles de ploidía de las entidades de *Paspalum*.

Niveles de ploidía	N° de entidades	Valor Cx relativo	
		Rango (promedio)	Significancia*
2x	16	0,50-1,00 (0,74)	a
3x	4	0,57-0,87 (0,74)	a
4x	37	0,48-0,98 (0,70)	a
5x	7	0,48-0,68 (0,57)	a
6x	7	0,50-0,75 (0,60)	a
8x	4	0,48-0,81 (0,66)	a

*Letras iguales no presentan diferencias estadísticamente significativas ($p=0,05$). $F=2,68$.

5.2 Evaluación del sistema reproductivo por FCSS

En general se observó coincidencia con el modo de reproducción observado en trabajos realizados en estudios embriológicos reportados previamente y el trabajo realizado en esta tesis en base al análisis de la relación de contenido relativo de ADN del embrión: endospermo (Tabla 3).

La clasificación de cada especie, subespecie, citotipo o cepa previamente clasificada como sexual o apomíctica a través de estudios embriológicos fue confirmada por FCSS, con algunas variaciones particulares que fueron detectadas en cuanto al grado de expresión del carácter de la apomixis. Es decir, algunos taxones que habían sido identificados como apomícticos en estudios previos, a través de la técnica de FCSS han sido reclasificados como apomícticos facultativos o viceversa (Tabla 3).

Obtuve información sobre el modo reproductivo para 17 nuevas especies y una variedad botánica de *Paspalum* a través de la relación del contenido relativo de ADN embrión: endospermo (Tabla 3).

Se proporciona también mayor información al respecto del modo reproductivo de otras 10 especies que conciernen a citotipos diferentes a los que ya han sido estudiados con anterioridad. El FCSS es un método muy simple y eficiente para determinar el modo reproductivo en especies del género *Paspalum*. Se observaron histogramas con picos 2C + (3C) en todas las especies que han sido reportadas con reproducción por la vía sexual. Así también, los histogramas que presentan picos 2C + (5C) u otra constitución de picos característicos del desarrollo apomítico fueron observados en todas las especies o citotipos que han sido reportados como apomíticos. De todos modos, se encontraron diferencias significativas en el modo de reproducción de algunas especies, como ser *P. nicorae*, una especie considerada como apomítica obligada en estudios citoembriológicos anteriores (Burson y Bennet 1970a). Observaciones recientes de Sartor et al. (2011) demostraron que la mayoría de las semillas analizadas manifestaban picos 2C + (5C), característicos de desarrollo apomítico, pero una pequeña proporción manifestaba picos 2C + (3C) lo cual indicaría reproducción sexual. Estas observaciones me permitieron considerar a la especie como apomítica facultativa ya que mayoritariamente se reproduce por partenogénesis y pseudogamia, aunque con algún potencial residual para la reproducción sexual.

Se observaron exclusivamente picos 2C + (3C) en todas las especies diploides analizadas. De todos modos, estudios previos en embriología demostraron que algunos diploides de algunas especies multiploides desarrollan en cada óvulo el típico saco embrionario meiótico (citológicamente reducido), pero ocasionalmente en alguno de esos óvulos, también se desarrolla algún saco embrionario apospórico junto al saco meiótico (Quarin et al., 1982; Caponio y Quarin, 1993; Norrmann et al., 1989; Hojsgaard et al., 2008; Delgado et al., 2014). La ausencia de semillas 2C:5C en la relación embrión: endospermo en citotipos diploides era lo esperado en nuestro estudio ya que trabajé con semillas provenientes de polinización abierta. Estos diploides de especies multiploides son muy diferentes entre sí debido al sistema de autoincompatibilidad que presentan (Quarin, 1992). El funcionamiento de los ocasionales sacos apospóricos fue demostrado por Siena et al. (2008) cuando indujeron la autopolinización con cargas mixtas de polen propio y polen

heteroespecífico (polen mentor) o bien con polen propio combinado con polen de su conespecífico tetraploide. De todos modos, cuando la polinización involucra a otro genotipo de la misma especie diploide, la progenie se forma de manera exclusiva por sexualidad (Siena et al., 2008). En consecuencia, se espera principalmente que las semillas diploides presenten una relación de embrión:endospermo 2C:3C en FCSS ya que las semillas son originadas a partir de polinización abierta.

5.3 Modo reproductivo y tamaño del genoma

Setenta y siete entidades fueron analizadas teniendo en cuenta la clasificación en especies, variedades botánicas, citotipos (diferentes ploidías) y morfotipos (biotipos con características morfológicas que difieren en menor o mayor medida alguna de las características típicas de las descritas para la especie) (Figura 3). De estas 77 entidades, 32 se reproducen por sexualidad y 45 por la vía apomíctica (facultativa u obligada). Con la idea de eliminar el efecto de los diferentes niveles de ploidía, se consideró el contenido relativo de ADN del set de cromosomas monoploide (valor 1Cx) en vez del valor 1C. En las entidades sexuales el valor 1Cx varió de 0,257 pg en *P. fimbriatum* diploide a 1 pg en citotipos sexuales de *P. malacophyllum* y *P. plicatulum*. Mientras que en las apomícticas el rango de variación del 1Cx fue de 0,475 pg en *P. humboldtianum* a 0,925 pg en el citotipo tetraploide de *P. chaseanum*. El promedio de contenido relativo de ADN del valor 1Cx de las entidades sexuales fue 1Cx= 0,680 pg, mientras que el valor promedio de las entidades apomícticas fue 1Cx=0,700 pg.

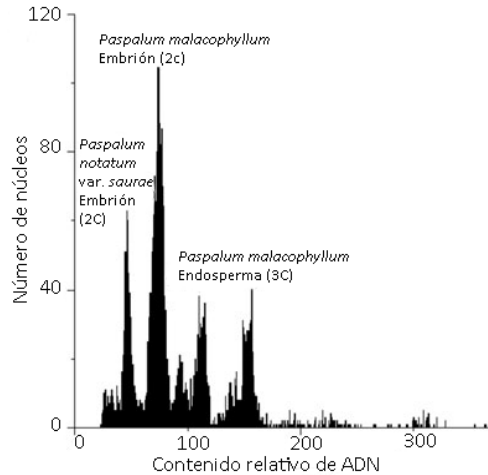


Figura 3: Histograma ilustrando el contenido relativo de ADN del valor 2C del patrón interno *Paspalum notatum* var. *sauræ* y el valor (2C) + (3C) del diploide de *Paspalum malacophyllum* (V14855) obtenido por FCCS. El pico (3C) correspondiente al endospermo del patrón interno se solapa con el pico (2C) de *Paspalum malacophyllum*. Los restantes picos que se observan se corresponden con el G2 de cada embrión respectivamente.

Los resultados muestran un escenario diferente en cuanto a tamaño de genoma y modo reproductivo en el género *Hypericum* (Clusiaceae), situación estudiada por Matzk et al (2003). Varias especies apomícticas fueron identificadas en este género, y con la excepción de *H. scabrum*, todas las especies son apomícticas facultativas y pseudógamas que producen gametos masculinos reducidos, mientras *H. scabrum* es una apomíctica pseudógama obligada, que produce gametos masculinos no reducidos. Las apomícticas facultativas pertenecen a dos secciones diferentes del género: La sección filogenética más joven *Hypericum* y la evolutivamente más ancestral *Ascyreia*. Dentro de la sección *Hypericum* el tamaño del genoma de las especies apomícticas es de aproximadamente el doble del de las sexuales, pero el ADN aumenta exclusivamente debido a la poliploidía, porque el valor 1Cx de las especies sexuales no difiere significativamente del contenido de ADN de las apomícticas. De todos modos, en la sección *Ascyreia* las especies apomícticas presentan valores 1Cx significativamente mayores que las especies sexuales de la misma sección como así también, del total de la variación en el contenido de ADN del género, el

85% se encuentra en esta sección. En contraste, las secciones infragenéricas de *Paspalum* analizadas en esta tesis, la mayoría son apomícticas, pero no se encontró relación directa entre el sistema reproductivo y el contenido de ADN del valor 1Cx, ya que se observaron importantes rangos de variación en el contenido de ADN del valor 1Cx tanto en entidades sexuales como apomícticas, esto dio como resultado que los valores promedio no presentaran diferencias significativas para ambas categorías (sexual/apomícticas) (Figura 4). La historia de la evolución del modo reproductivo en *Paspalum* no debería ser considerado como un parámetro que afecte el tamaño del genoma en el género.

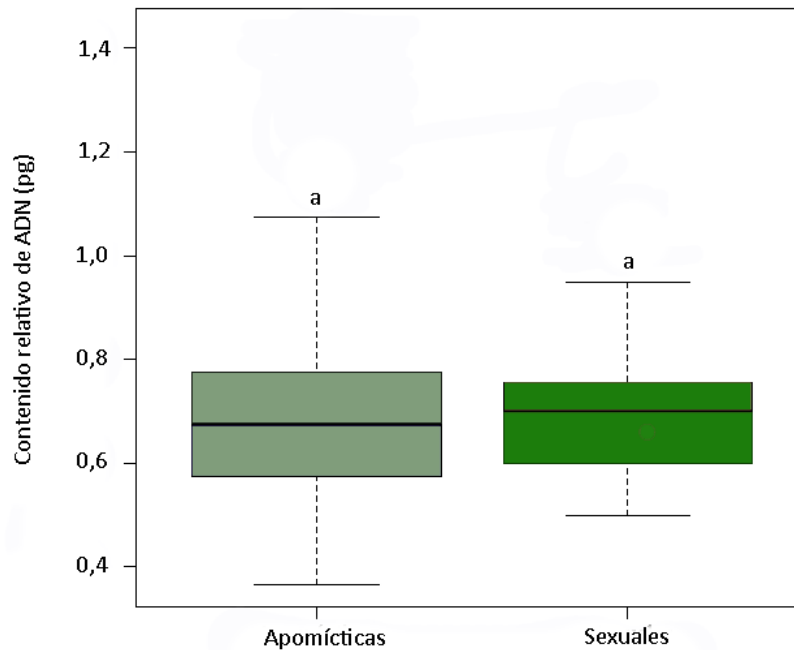


Figura 4: Gráfico de cajas representando la variación de contenido relativo de ADN por sistemas reproductivos entre las especies de *Paspalum* estudiadas en esta tesis. Test de Tukey. Letras iguales no se observan diferencias significativas ($p=0,05$). $F = 0,26$.

5.4 Contenido de ADN y su relación con grupos taxonómicos infragenéricos

Se analizó a lo largo de este trabajo un amplio rango de variación en el género, de todos modos, muchos grupos taxonómicos infragenéricos son representados por pocas especies. Por esto tuvimos en cuenta cuatro categorías infragenéricas, las cuales están representadas por lo menos por siete especies con la intención de correlacionar estos grupos taxonómicos con el contenido relativo de ADN. Las categorías seleccionadas y el número de entidades representada por cada una de ellas fue: subgénero *Anachyris* (11), grupo Dilatata (10), grupo Notata (11) y grupo Plicatula (16). Los resultados muestran que los valores promedio de contenido relativo de ADN (valor 1Cx) varían entre los grupos infragenéricos (ver Tabla 5, Figura 5).

Tabla 5: Valores de contenidos relativo de ADN en el análisis de la varianza por agrupamientos taxonómicos. Test de Tukey (diferencias significativas indicadas con letras diferentes. ($p=0,05$). $F = 27,15$.

Grupos taxonómicos	Sistema reproductivo	N° entidades	Valor Cx (Contenido relativo de ADN)	
			Rango (promedio)	Significancia
<i>Anachyris</i>	Sexual	4	0,75-1,00 (0,86)	c
	Apomíctica	7	0,75-0,87 (0,82)	c
Dilatata	Sexual	5	0,48-0,52 (0,51)	a
	Apomíctica	5	0,50-0,57 (0,52)	a
Notata	Sexual	6	0,52-0,75 (0,63)	b
	Apomíctica	5	0,60-0,76 (0,67)	b
Plicatula	Sexual	3	0,75-1,00 (0,88)	c
	Apomíctica	13	0,60-0,92 (0,80)	c

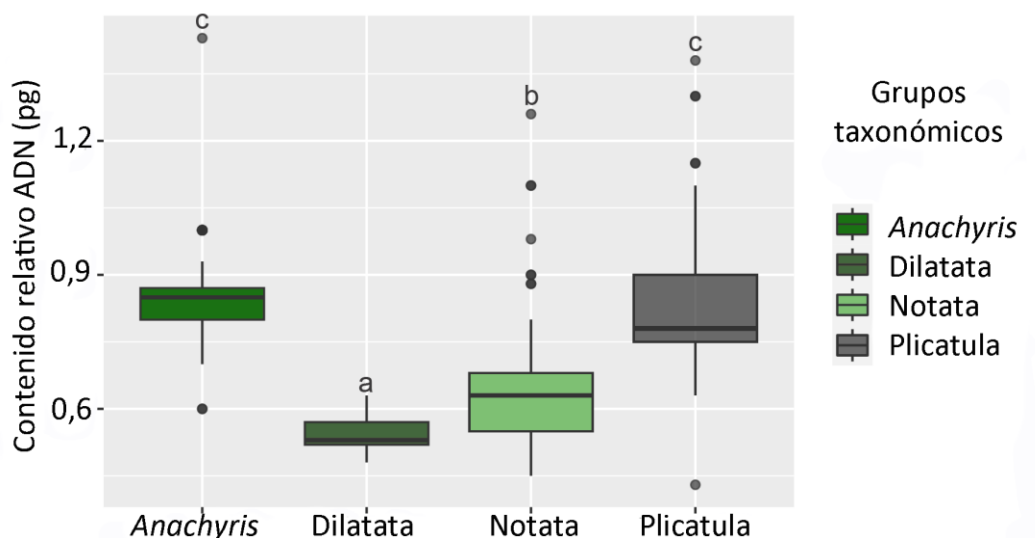


Figura 5: Diagrama de cajas representando el contenido relativo de ADN del subgénero *Anachyris* y los grupos Dilatata, Notata y Plicatula del género *Paspalum*. Test de Tukey. Letras diferentes indican diferencias significativas. ($p=0,05$). $F = 27,15$.

5.5 Contenido relativo de ADN y niveles de ploidía

La relación entre el tamaño del genoma básico y los niveles de ploidía fueron analizados por dos vías: primero, se analizó el promedio de valor $1Cx$ de todas las entidades diploides en relación con el promedio de tamaño básico del genoma de los poliploides en sus diferentes niveles de ploidía, y luego se relacionó a los diploides de todas las especies multiploides con los correspondientes citotipos poliploides de cada una de ellas.

El género *Paspalum*, a diferencia de muchos otros géneros de angiospermas, ofrece la posibilidad de abordar el análisis del contenido de ADN en diferentes niveles de ploidía conespecíficos porque muchas especies que componen el género son multiploides. Once de las 47 especies que se analizaron en este estudio estaban representadas por citotipos diploides y poliploides (generalmente el citotipo tetraploide). Esta circunstancia me permitió comparar los valores intraespecíficos de $1Cx$ entre diploides y sus homólogos poliploides conespecíficos (Tabla 6). Las diferencias observadas en los valores $2C$ entre citotipos conespecíficos muestran un incremento en concordancia con los niveles de ploidía. Se observó también que no hay variación o por lo menos la misma no es significativa

en el valor de 1Cx entre citotipos conespecíficos de algunas de las especies, en otras se observó un incremento en el valor 1Cx de los poliploides, y en las restantes el valor 1Cx disminuyó en poliploides comparados con su contraparte diploide. Es necesario remarcar que en las especies el mismo valor de 1Cx fue observado en citotipos diploides y tetraploides de *P. dedecae*, *P. rufum*, *P. simplex*, *P. notatum* (para las introducciones diploides Q4084 y C4-2x y la introducción tetraploide C4-4x); para las introducciones diploides y triploides de *P. unispicatum*; y para los citotipos diploide, tetraploide y hexaploide de *P. lenticulare*. Además, el tamaño básico del genoma fue apenas mayor o menor en citotipos poliploides que en sus conespecíficos diploides, pero esta diferencia no es significativa en el tetraploide de *P. alium* (+3,33%), el tetraploide de *P. chaseanum* (+2,2%), el tetraploide de *P. unispicatum* (+1,7%) y del triploide y tetraploide de *P. cromyorrhizon* (-4,28%). Por otro lado, incrementos importantes fueron observados en los triploides de *P. simplex*: 12 % en el citotipo sexual de U36 y 16 % en U45 citotipo apomítico, mientras que la introducción tetraploide *P. simplex* mostró el mismo valor 1Cx que la introducción diploide. Una drástica reducción del tamaño de genoma básico (-15%) fue observado en *P. malacophyllum* y en el tetraploide *P. plicatulum* (-29%) en relación con el citotipo conespecífico diploide.

Un caso especial se observó en *P. notatum*: el tetraploide natural Q4117 presentó un valor Cx menor que el diploide natural Q4084 (-8,3%), mientras que el tetraploide inducido con colchicina C4-4x presentó el mismo tamaño que la planta diploide C4-2x a partir de la cual se obtuvo la planta C4-4x. En el tetraploide Q4188, citotipo particular obtenido a partir de tratamientos experimentales que incluyeron duplicación de cromosomas, hibridación y ciclos de cruzamientos y posterior selección, se observó una disminución importante del tamaño del genoma del diploide natural (-13%).

Tabla 6: Contenido relativo de ADN en 11 citotipos de especies multiploides de *Paspalum*.

Espece	Ejemplar de estudio	Ploidía	Valor Cx (pg)	F	Porcentaje de aumento (+) o disminución (-) del contenido de ADN respecto del nivel 2x.
<i>P. alnum</i>	Perichón	2x	0,750 ^a	0,93	
	Q4165	4x	0,775 ^a		+3,33
<i>P. chaseanum</i>	AK45457	2x	0,900 ^a	4,09	
	ST13894	4x	0,920 ^a		+2,20
<i>P. cromyorrhizon</i>	Q3635	2x	0,700 ^a	0,35	
	Q3635nt	3x	0,670 ^a		-4,28
	Q4039	4x	0,670 ^a		-4,28
<i>P. dedecae</i>	V11796	2x	0,750 ^a	0,03	
	Q3807	4x	0,750 ^a		0
<i>P. lenticulare</i>	N188	2x	0,750 ^a	0,04	
	TK2417	4x	0,750 ^a		0
	U54	6x	0,750 ^a		0
<i>P. malacophyllum</i>	V14855	2x	1,000 ^b	8122,33	
	TK2449	4x	0,850 ^a		-15,00
<i>P. notatum</i>	Q4084	2x	0,600 ^b	17,99	
	C4-2x	2x	0,600 ^b		
	C4-4x	4x	0,600 ^b		0

	Q4117	4x	0,550 ^a		-8,30
	Q4188	4x	0,520 ^a		-13,00
<i>P. plicatulum</i>	AH14	2x	1,000 ^b	74,67	
	Hoj388	4x	0,710 ^a		-29,00
<i>P. rufum</i>	Q3754	2x	0,750 ^a	0,53	
	Q3785	4x	0,750 ^a		0
<i>P. simplex</i>	Q4109	2x	0,750 ^a	4,70	
	U36	3x	0,840 ^{ab}		+12,00
	U45	3x	0,870 ^b		+16,00
	Q4126	4x	0,750 ^a		0
<i>P. unispicatum</i>	U15	2x	0,570 ^a	9,08	
	Q4211	3x	0,570 ^a		0
	Q4265	4x	0,580 ^a		+1,70

Letras diferentes representan diferencias significativas test Tukey (p=0,05).

Teniendo en cuenta las entidades analizadas en esta tesis, sólo cuatro categorías se encuentran bien representadas y consideradas para el análisis de relación entre tamaño de genoma y agrupamientos taxonómicos: El subgénero *Anachyris* y los grupos Notata, Dilatata y Plicatula del subgénero *Paspalum*. Los mayores valores de 1Cx fueron observados en especies del subgénero *Anachyris* y en el grupo Plicatula, estas especies se caracterizan por ser nativas de regiones tropicales de América, y algunas de ellas distribuidas en los subtrópicos, aunque existen raras excepciones como pueden ser *P. plicatulum* del grupo Plicatula y *P. simplex* del subgénero *Anachyris*, especies cuyas distribuciones llegan hasta zonas templadas.

En contraste, los menores valores de $1Cx$ fueron observados en las especies analizadas de los grupos Dilatata y Notata, los cuales son muy abundantes en toda la región subtropical y templada de regiones de América del Sur en el sur de Brasil, Uruguay y centro y noreste de Argentina hacia el delta del río Paraná e incluso más al sureste en la provincia de Buenos Aires y suroeste de Sudamérica en la región de Araucanía, Chile, donde es nativa la especie más austral del género, *P. dasyleurum*, perteneciente al grupo Dilatata.

Varias de las especies de estos grupos han sido introducidas y naturalizadas en muchas regiones del mundo, entre ellas encontramos a *P. dilatatum*, *P. urvillei* y *P. notatum*.

En general, se observó que el genoma básico de las especies multiploides de *Paspalum* es igual o muy similar en los diferentes citotipos de las mismas especies. Estos resultados no siguen la tendencia general observada por Leitch y Bennett (2004) en aproximadamente más de 3000 especies de angiospermas, quienes postulan que la disminución del tamaño del genoma es un fenómeno frecuente en las angiospermas poliploides. Es más, se observó un resultado opuesto a esta tendencia en entidades triploides de *P. simplex*, con un alto valor relativo promedio de tamaño de genoma. Leitch y Bennet (2004) excluyen de su trabajo todas las especies con niveles impares de ploidía porque estos datos son disponibles para muy pocas especies. El fenómeno de ploidías impares, en especial triploides, bastante poco frecuentes en la mayoría de las angiospermas, podrían jugar un papel muy importante como puente en los procesos de poliploidización y evolución de los géneros como *Paspalum*, en los cuales la apomixis y la autoploidía son muy frecuentes (Quarin, 1992; Yamauchi et al., 2004). Si consideramos esta situación, se puede entender que la relación entre los triploides y el tamaño del genoma requiere mayores investigaciones, especialmente en especies multiploides de *Paspalum*.

Finalmente, este trabajo analizó el tamaño básico del genoma en relación con la poliploidización. Las plantas individuales C4-2x y C4-4x pertenecen a la especie *P. notatum* diploide y tetraploide respectivamente, ambas obtenidas a partir de callos cultivados in-vitro de porciones de inflorescencias jóvenes de un diploide natural y posterior tratamiento con colchicina (Quarin et al., 2001). Se observó el mismo valor $1Cx$ para la planta C4-4x

autotetraploide inducido que el observado en la planta diploide C4-2x. Este resultado da sustento a la teoría de que los citotipos poliploides de especies multiploides han sido originados a través de la autoploidización de los diploides (Quarin, 1992). La mayoría de las especies diploides y sus contrapartes tetraploides conespecíficas presentan el mismo o significativamente diferente valor de $1Cx$. De todos modos, existen algunas excepciones en las cuales los citotipos tetraploides tienen un valor de $1Cx$ mucho menor que sus contrapartes diploides, por ejemplo, *P. notatum*, especie que presenta diferentes biotipos morfológicos en el nivel tetraploide. En este caso, el citotipo tetraploide podría haberse originado por autoploidía, el biotipo tetraploide (identificado taxonómicamente como una variante conespecífica) con menor valor de $1Cx$, podría haberse visto envuelto en aloploidía segmentaria, debido a hibridaciones ocasionales con especies relacionadas que tienen menor tamaño básico del genoma. Dahmer et al. (2008) analizaron las asociaciones cromosómicas en 34 introducciones diferentes de *P. notatum* tetraploide; la mayoría mostró un número variable de asociaciones cuadrivalentes (esto permite sugerir un origen autoploide), pero algunas introducciones mostraron exclusivamente la presencia de 20 bivalentes o raramente un cuadrivalente en la metafase I, comportamiento característico en la meiosis de los aloploides o aloploides segmentarios. En esta tesis, se observó el menor valor de $1Cx$ en el genotipo particular de esta especie Q4188 (ver pedigrí de Q4188 en Quarin et al., 2003). Se trata de un híbrido experimental, tetraploide y sexual obtenido por cruzamiento controlado entre la madre Q3664, un genotipo tetraploide obtenido experimentalmente, apomíctico facultativo con alto grado de sexualidad, por el ecotipo Q3853, un tetraploide de reproducción apomíctica sin indicios de sexualidad originario de la región entre Capivari y Osorio, Rio Grande do Sul, Brasil. Si bien nunca se llegó a estudiar la meiosis de este tetraploide natural, es interesante señalar que en el trabajo de Dahmer et al. (2008) estudiaron la meiosis de ocho colecciones de la región Capivari y solo dos de ellas tienen un importante número de cromosomas reunidos en asociaciones cuadrivalentes que hacen suponer un origen autotetraploide, mientras que en dos de las colecciones los 40 cromosomas forman 20 bivalentes y muy ocasionalmente 18 bivalentes más un cuadrivalente y en las cuatro colecciones restantes se asocian siempre

formando 20 bivalentes, comportamiento típico de alotetraploides. Esto hace suponer, que el tetraploide apomíctico Q3853, que ya no existe en la colección de la FCA -UNNE, podría haber tenido ese comportamiento meiótico típico de los aloploides como esas colecciones de Capivari, y al ser el progenitor masculino haber influenciado en el contenido Cx de ADN de Q4188.

Además de este caso especial en *P. notatum*, se observaron disminuciones importantes en el contenido de ADN en dos tetraploides con respecto a su contraparte intraespecífica diploide: *P. malacophyllum* (-13%) y *P. plicatum* (-29%) (ver tabla 6). De todos modos, esto podría atribuirse a problemas taxonómicos provenientes de identificaciones dudosas. De hecho, en un estudio reciente sobre la diversidad genética en el subgénero *Anachyris* que involucra marcadores microsatélites y características morfológicas, sugieren que la introducción de *P. malacophyllum* V14855 podría tratarse de una nueva especie, mientras que la introducción TK2449 quedaría incluida en el clado de *P. malacophyllum* (Zilli et al., 2014). Del mismo modo, las introducciones AH14 (diploide) y Hoj388 (tetraploide) fueron ubicadas bajo el nombre de *P. plicatum*. La duda al respecto es debido a que Hoj388 presenta rizomas escamosos más largos que lo usual para la especie, aunque en general se parecen a *P. plicatum*. En ambas especies tanto las diferencias en las características morfológicas como el contenido de ADN entre los citotipos diploides/tetraploides sugieren que las planta tetraploides no han sido originadas por autoploidía exclusivamente, sino también por algún evento ocasional de hibridación interespecífica.

VI. Conclusiones específicas

- Se acepta la tercera hipótesis que establece que el tamaño del genoma está relacionado con las diferentes agrupaciones taxonómicas del género *Paspalum*.
- El promedio del tamaño del genoma básico (valor Cx) para los diferentes citotipos de las especies multiploides es el esperado.

Capítulo 2

I. Introducción

Otro aspecto de esta tesis tiene que ver con dos hechos muy particulares de las especies apomícticas de *Paspalum* y con la interacción que puede ocurrir entre ambos en el momento de la reproducción. Se trata de la existencia de reproducción apomíctica facultativa descrita hace ya tiempo en algunas especies del género (Bennett y Burson, 1971; Quarin y Hanna, 1980a; Quarin y Hanna, 1980b), y delicados balances requeridos para la normal formación de semillas: balance genómico entre el embrión y el endospermo y relación entre el aporte genómico materno respecto al paterno en el endospermo.

En *Paspalum*, la principal forma de apomixis es la aposporia, aunque existen algunas pocas especies que son diplospóricas y al menos un caso donde aposporia y diplosporia coexisten en una misma especie (Bonilla y Quarin, 1997).

La diplosporia ocurre cuando en el megasporocito (célula madre de las megasporas) la meiosis no sucede o sufre grandes modificaciones de tal manera que se desarrolla un saco embrionario citológicamente no reducido, donde luego por partenogénesis se forma el embrión (Savidan, 2000). Esto significa que las alternativas son dos y se excluyen mutuamente: o se desarrolla un saco embrionario de una megaspóra surgida de meiosis donde luego la fecundación formará un nuevo embrión por vía sexual, o se desarrolla un saco diplospórico donde por partenogénesis se formará un embrión.

De una manera sustancialmente diferente, la aposporia implica el desarrollo de sacos embrionarios a partir de células somáticas, usualmente del nucelo (Nogler, 1984). Al surgir de células somáticas, los núcleos de los sacos apospóricos, incluido el de la ovocélula, no están reducidos citológicamente. Luego el embrión se origina por partenogénesis a partir de la ovocélula $2n$. Al mismo tiempo, en estas especies apospóricas, la meiosis puede o no suceder en el megasporocito. El megasporocito puede degenerar y abortar sin producir la meiosis. Sin embargo, la meiosis generalmente acontece y todas las megasporas producidas

degeneran, aunque también puede suceder que la megaspora calazal se mantenga funcional y forme un saco embrionario de origen meiótico; eso puede ocurrir independientemente de que en el mismo óvulo se desarrolle uno o más sacos apospóricos, o no se forme ninguno (Quarin y Hanna, 1980a; Quarín et al., 1982; Grossniklauss, 2001; Naumova y Vielle-Calzada, 2001). De esta manera, y como consecuencia de estas posibilidades, un óvulo de una especie apomíctica facultativa puede contener un saco meiótico citológicamente reducido, típico de cualquier especie sexual, uno a varios sacos embrionarios apospóricos citológicamente no reducidos o un saco meiótico acompañado de uno o más sacos apospóricos. Potencialmente, un ovario con óvulo mixto podría generar semillas ya sea como producto de doble fecundación del saco meiótico, o como producto de partenogénesis y pseudogamia de un saco apospórico. Por tanto, el potencial de sexualidad de una planta apomíctica facultativa sería igual a la proporción de óvulos con un saco meiótico más los óvulos mixtos. El potencial de apomixis sería igual a la proporción de óvulos con sacos apospóricos sumados a los óvulos mixtos.

Generalmente, la aposporia está acompañada de pseudogamia (Asker y Jerling, 1992). Esto significa que en un saco apospórico, el embrión surge por partenogénesis de la ovocélula no reducida ($2n$), sin participación de un gameto masculino ($2n + 0$), mientras que el endospermo surge de la unión de los dos núcleos polares diploides ($2n$) de la célula central con uno de los gametos masculinos haploides (n) del tubo polínico ($2n+2n+n = 5n$). De esta manera se origina una semilla en la que el embrión $2n$ es producto de la partenogénesis de la ovocélula, y, por tanto, genéticamente idéntico a la madre, mientras que el endospermo es $5n$. Esto plantea una situación poco común en las angiospermas. Por lo general, en un sistema de reproducción sexual, existe un equilibrio genómico entre el embrión y el endospermo que es 2:3. En términos de tamaño del genoma, el embrión sería $2C$ y el endospermo $3C$. Si ese equilibrio se rompe, por ejemplo, en cruzamientos que involucren diferentes ploidías de los padres, la formación de semillas puede resultar fallida u ocurrir muy raramente (Norrman et al., 1994). Un claro ejemplo de eso es el de varias especies multiploides de *Paspalum*, que contienen dos citotipos: diploide ($2x$) y tetraploide ($4x$). Cuando se usa el citotipo $2x$ de madre y el $4x$ de polinizador, la producción de híbridos

interpoides es nula o inferior al 0,03% (según los casos reportados para especies del género). Eso se debe al aborto del endospermo en los primeros días luego de la polinización (Norrman et al., 1994). Algunas especies de gramíneas son capaces de mantener en los individuos apomícticos la misma relación 2:3 embrión:endospermo que tienen los individuos de reproducción sexual. Es el caso de la especie *Megathyrsus maximus* (Jacq.) B.K. Simon & S.W.L. Jacobs (basónimo = *Panicum máximum* Jacq.) en la cual las plantas apomícticas forman sacos embrionarios apospóricos con un solo núcleo polar ($2n$) en la célula central (Savidan, 1982). De esa manera, en las plantas sexuales, el saco embrionario meiótico tiene una ovocélula haploide (n) y dos núcleos polares haploides ($n+n$) en la célula central. La doble fecundación desarrolla una semilla con una relación embrión:endospermo 2:3. En los sacos apospóricos de las plantas apomícticas, la partenogénesis del gameto femenino no reducido ($2n+0$) origina el embrión $2n$, mientras la pseudogamia origina un endospermo $3n$ ($2n$ del único núcleo polar del saco embrionario, unido al gameto masculino n del tubo polínico). De esa manera se mantiene la relación 2:3 del embrión y el endospermo. Por el contrario, en las especies apomícticas apospóricas de *Paspalum*, los sacos embrionarios contienen generalmente dos núcleos polares no reducidos ($2n$) y por lo tanto la pseudogamia engendra un endospermo $5n$. Así la semilla se forma con una relación embrión:endospermo de 2:5 (Figura 6).

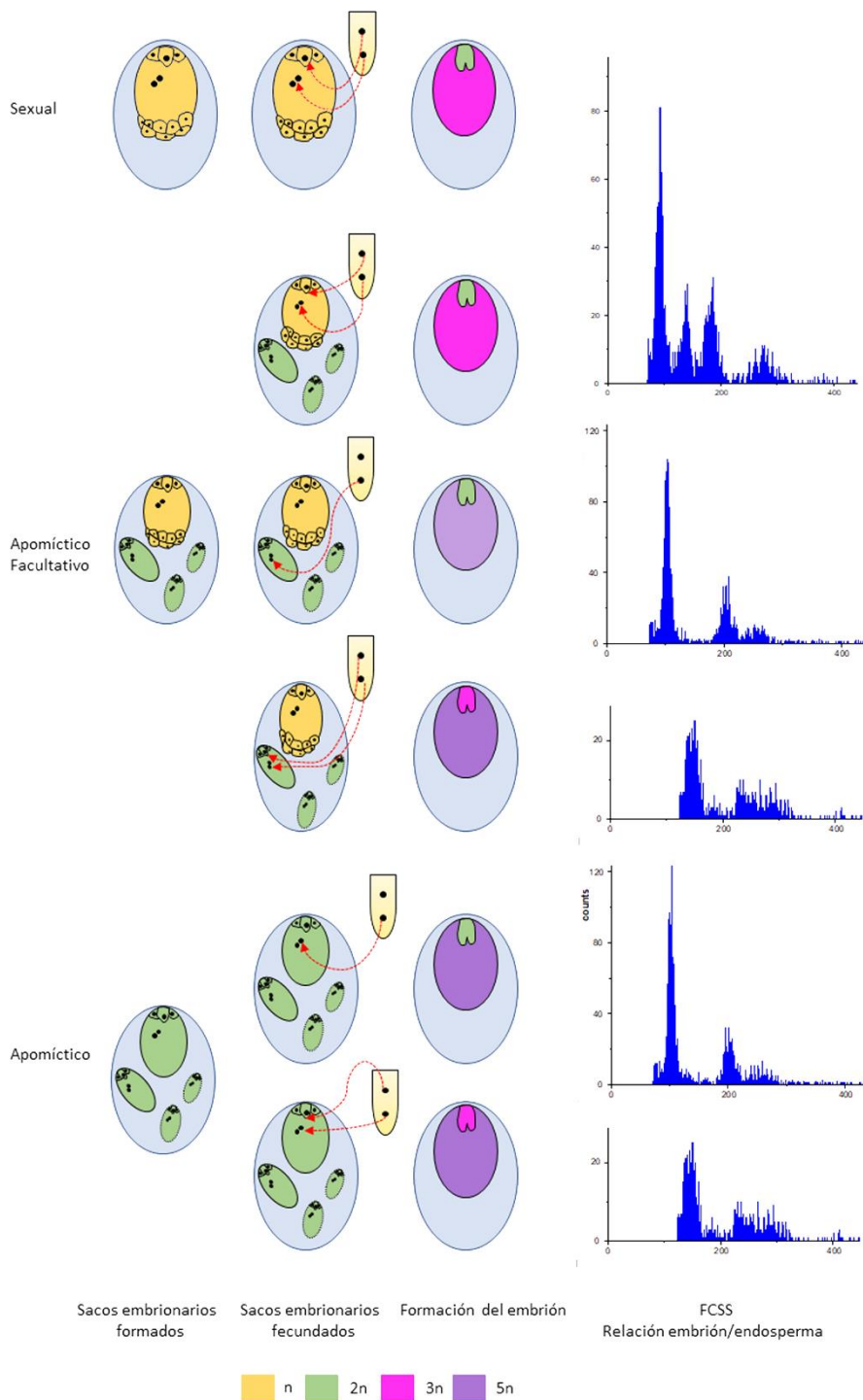


Figura 6: Variantes de sacos embrionarios y observación por citometría de flujo FSCS en especies sexuales y apomícticas de *Paspalum*.

Además de este equilibrio genómico 2:3 entre embrión y endospermo, se ha propuesto que para que el endospermo se desarrolle requiere que el aporte femenino duplique al masculino (Johnston, 1980). En general, cuando el cruzamiento es entre dos individuos de la misma ploidía, como ser $2x \times 2x$ o $4x \times 4x$, el aporte genómico materno:paterna para constituir el endospermo está en relación 2:1 porque los dos núcleos polares haploides (n) del saco embrionario se unen a un gameto masculino también haploide (n) para formar el endospermo ($3n$). Es más, como en algunos cruzamientos interploides, especialmente en el género *Solanum*, la relación 2:1 en el aporte materno:paterno para la formación del endospermo parece no funcionar, se ha propuesto y se ha comprobado que existe un número de balance endospermico (NBE) (Johnston, 1980). Este NBE es específico y permite predecir cuáles cruzamientos interploides pueden ser exitosos porque de acuerdo a ese NBE la relación materno:paterna puede ser de todas maneras 2:1 (Johnston y Hanneman, 1980; Johnston et al., 1980). Sin embargo, de acuerdo a Quarin (1999), este NBE es válido solamente en la reproducción sexual en especies de *Paspalum*. Sus cruzamientos experimentales involucraron una planta apomíctica tetraploide (con aposporia, partenogénesis y pseudogamia) polinizada con citotipos conespecíficos con diferentes niveles de ploidía, y en todos los casos se recuperaron espiguillas que formaron grano. Eso indicaba que la pseudogamia y el desarrollo del endospermo eran indiferentes al aporte de genomas que hacían los padres, o a algún determinado NBE.

En el pasado, la apomixis y la reproducción sexual se consideraban dos procesos distintos que tenían poco en común. Ernst (1918) postuló que la apomixis podría ser el resultado de la hibridación de especies relacionadas basándose en la observación de que los apomícticos examinados en ese momento eran poliploides y altamente heterocigóticos. Los estudios pioneros de Nogler (1984) y Savidan (1982) demostraron que la apomixis está bajo control genético, aunque los modificadores genéticos o las condiciones ambientales pueden afectar su expresividad (Nogler, 1984; Savidan, 2000). La subsiguiente confirmación de que relativamente pocos loci controlan diferentes modos de apomixis y que la mutagénesis puede inducir componentes aparentes de apomixis en plantas sexuales ha

brindado más sustento a la hipótesis de que la apomixis y la reproducción sexual podrían compartir elementos comunes (Tucker et al., 2003).

Otro nivel de regulación génica a tener en cuenta en la discusión sobre el desarrollo del endospermo es el “imprinting” (Ehlenfeldt y Hanneman, 1988). El término “imprinting” fue introducido por Crouse (1960), quien estableció la hipótesis de que los cromosomas llevaban una marca o huella de su origen parental, y que la misma se transmitía a través de las divisiones celulares. El “imprinting” o impronta genómica es un fenómeno epigenético que marca diferencialmente las copias maternas y paternas de genes en el genoma y asegura su expresión monoalélica dependiendo de su origen parental (Sazhenova y Lebedev, 2021). De acuerdo con Morison y Reeve (1998), si bien se conoce de hace mucho tiempo, la descripción del fenómeno de “imprinting” en plantas y mamíferos es más reciente. Existen antecedentes de estudios realizados en mamíferos placentarios y en plantas con flores donde se ven afectados genes individuales y grupos de genes estableciéndose una marca epigenética o “imprinting” antes de la fertilización que sirve para dirigir el silenciamiento asimétrico de los alelos (Sazhenova y Ledevyev, 2021). El concepto actual de “imprinting” comenzó a tomar forma como resultado de experimentos genéticos en maíz, que demostraron que el gen de pigmentación R se expresa preferentemente cuando se hereda de la madre (Kermicle, 1970).

La hipótesis que posiblemente ha sido más difundida, es la del conflicto parental, (Haig y Westoby, 1989), también conocida como “Kinship theory” (Haig, 2000). Esta hipótesis postula que la impronta génica se favorece evolutivamente cuando los intereses de los alelos parentales en la descendencia difieren entre sí, lo que da como resultado la expresión de cualquier alelo que se favorezca para expresarse (Haig, 2014). Coincidentemente, la hipótesis se formuló originalmente para cubrir la inversión materna en la descendencia de plantas con flores (Haig y Westoby, 1989). La hipótesis de la dosificación diferencial extiende la hipótesis del conflicto parental a una gama más amplia de interacciones parentales que conducen a la expresión diferencial de los alelos parentales, en lugar de estados binarios de activación o desactivación (Dilkes y Comai,

2004). No obstante, ambas hipótesis se refieren a la misma presión selectiva, es decir, los óptimos contrastantes en los niveles de expresión génica entre los alelos maternos y paternos en la descendencia.

En organismos de desarrollo multicelular, la transición de la madre a la expresión génica del cigoto es fundamental de acuerdo con los trabajos realizados por Anderson et al. (2017), quienes dilucidaron el tiempo y la contribución parental en la activación del genoma cigótico (ZGA) en arroz. La ZGA ocurre en el cigoto unicelular con una contribución parental desigual donde la mayoría de los genes que se expresan provienen del genoma materno.

La transición cigótica, desde la fertilización del huevo hasta la formación del embrión, es central tanto en la reproducción de animales como en plantas. Los embriones animales dependen de factores proporcionados por la madre hasta la ZGA. En las plantas, la sincronización y las contribuciones del genoma parental a la ZGA son fuertemente asimétricas y aún tienen aristas de discusión (Anderson et al., 2017).

La transición materno-cigótica (MZT) es la primera gran transición de desarrollo en el ciclo de vida en plantas y animales (Baroux y Grossniklaus, 2015; Tadros y Lipshitz, 2009). Define una fase de desarrollo durante la cual el embrión se emancipa progresivamente de un control de desarrollo que depende en gran medida de la información materna. La MZT es una lectura funcional de dos procesos: la eliminación de la información derivada de la madre y la expresión de nuevo de los alelos parentales heredados, habilitados por la ZGA. En las plantas, durante muchos años el debate sobre si el MZT existe se centró solo en el ZGA. Sin embargo, varios estudios recientes proporcionan evidencia de un alivio progresivo del control materno sobre la embriogénesis que se correlaciona con una ZGA gradual, un proceso que en sí mismo está controlado por la madre. Sin embargo, varios ejemplos de genes cigóticos que se expresan y/o se requieren funcionalmente temprano en la embriogénesis demuestran cierta flexibilidad en la dinámica y cinética de la MZT entre especies de plantas y también entre híbridos intraespecíficos (Baroux y Grossniklaus, 2015).

La transcripción cigótica proviene primeramente del genoma materno e incluye genes para procesos celulares básicos. La transcripción del genoma paterno es altamente restringida, pero a la vez inesperadamente incluye genes que codifican la pluripotencialidad putativa de factores expresados en el inicio de ZGA. De este modo, las actividades transcripcionales distintivas que son exhibidas por los genomas parentales durante el inicio de la embriogénesis, presumiblemente se derivan de estados transcripcionales precigóticos divergentes establecidos en los gametos (Anderson et al., 2017).

Estudios recientes han llegado a conclusiones contradictorias sobre el momento y cómo actúan las contribuciones de los padres en la ZGA en las plantas (Autran et al., 2011; Del Toro-De León et al., 2014; Nodine y Bartel, 2012; Zhao y Sun, 2015). A partir del análisis del transcriptoma de los primeros embriones de *Arabidopsis*, utilizando la activación de los alelos paternos como sustituto de ZGA, se concluyó que la ZGA es gradual, con una expresión mayoritariamente de alelos maternos en el embrión de 2-4 células (Autran et al., 2011). Posteriormente, un estudio del transcriptoma diferente en *Arabidopsis* encontró contribuciones equiparentales en la etapa embrionaria de 1-2 células, lo que implica una ZGA muy temprana con activación simultánea de ambos genomas parentales (Nodine y Bartel, 2012), y la confiabilidad de algunos estudios del transcriptoma de embriones en *Arabidopsis* ha sido impugnada (Schon y Nodine, 2017). Un estudio fenotípico que evaluó 49 mutantes embrionarios defectuosos en *Arabidopsis* concluyó que la ZGA ocurre gradualmente, activando diferentes etapas hasta que se activa completamente en la etapa globular; sin embargo, la activación transcripcional no se midió directamente (Del Toro-De León et al., 2014). Debido a las dificultades técnicas para aislar cigotos de las plantas, los estudios profundos de transcriptomas de las etapas más tempranas de la embriogénesis de las plantas han sido un desafío, y los cambios en la expresión génica de todo el genoma después de la fertilización no se ha caracterizado fehacientemente.

Debemos tener en cuenta que *Arabidopsis* es un material modelo para estudios genéticos en vegetales, especialmente de genética molecular, ampliamente reconocido, y de reproducción sexual. La presente tesis se basa en materiales del género *Paspalum*, en el

cual un porcentaje muy alto de sus especies tienen reproducción apomítica; y en algunos casos apomítica facultativa, donde pueden coexistir en el mismo óvulo un saco embrionario de origen sexual (doble fecundación y meiosis) y sacos embrionarios apospóricos (aposporia + partenogénesis + pseudogamia). Por otra parte, no se puede afirmar que el mecanismo genético que gobierna la apomixis está totalmente esclarecido, ni desde la visión de la genética clásica, ni mucho menos desde los mecanismos moleculares que provocan las particularidades de la existencia y la expresión en una especie apomítica.

La disponibilidad de materiales tetraploides apomíticos facultativos pertenecientes a la especie multiploide *Paspalum notatum* brindan una excelente oportunidad para analizar experimentalmente la incidencia de la relación genómica embrión: endospermo en la reproducción sexual en comparación con la apomítica dentro de una misma especie, ya que presenta plantas que son apomíticas netamente facultativas, algunas 4x de reproducción sexual, pero también plantas 4x apomíticas que son las más comunes en la especie. Esto permite hacer una diagramación experimental para conocer de qué factores depende el menor o mayor grado de reproducción vía sexual o vía apomítica en una planta apomítica facultativa.

En estas plantas 4x, aunque sean apomíticas facultativas, la meiosis produce microsporocitos haploides (n) y por lo tanto los tubos polínicos aportan gametos masculinos haploides. Es decir, las plantas apomíticas, sean obligadas o facultativas, producen gametos masculinos haploides, de la misma manera que lo hacen las plantas de reproducción sexual. Cuando se poliniza o se autofecunda una planta 4x apomítica facultativa y pseudógama pueden producir semillas por distintas vías, a saber:

1. fecundación del saco embrionario meiótico (n) × polen haploide (n) = embrión (n+n = 2n), endospermo [(n+n)+n = 3n]: semilla de origen sexual; relación genómica embrión: endospermo 2:3; aporte materno: paterno en la formación del endospermo igual a 2:1.

2. partenogénesis en saco embrionario apospórico ($2n$) + pseudogamia con polen haploide (n) = embrión ($2n+0=2n$), endospermo [$(2n+2n)+n = 5n$]: semilla de origen apomíctico; relación genómica embrión:endospermo 2:5; aporte materno:paterno en la formación del endospermo igual a 4:1.
3. fecundación eventual de saco apospórico ($2n$) × polen haploide (n) + pseudogamia con polen haploide (n) = embrión ($2n+n=3n$), endospermo [$(2n+2n)+n = 5n$]: semilla híbrido B_{III} ($2n+n$) (Rutishauser, 1948) producto de aposporia + sexualidad (fecundación, con aumento del nivel de ploidía. Relación genómica embrión:endospermo 3:5; aporte materno:paterno en la formación del endospermo igual a 4:1.

Teniendo en cuenta que la citometría de flujo actual permite determinar el contenido relativo de ADN en una semilla, es posible estimar la relación genómica embrión:endospermo mediante el contenido de ADN de ambos tejidos. Eso permite diferenciar cuál fue el origen de cada semilla de una planta $4x$ apomíctica facultativa. Si, además, usamos como fuente de polen una planta $4x$ sexual y alternativamente una planta $4x$ apomíctica, podríamos comprobar si existe algún control del polen sobre la vía reproductiva a través del cual la planta $4x$ apomíctica facultativa forma sus semillas. Es decir, el sistema reproductivo del polinizador podría influir en la proporción de apomixis o sexualidad que finalmente exprese una planta apomíctica facultativa. Con el mismo planteo, y tomando plantas con niveles de ploidía diferentes como fuentes de polen, será factible establecer qué relaciones embrión:endospermo son eficaces en la producción de semillas.

II. Hipótesis

Las hipótesis planteadas en este caso son las siguientes:

- ✓ En una planta tetraploide apomítica facultativa, el desarrollo de semillas por las vías sexual o apomítica, depende exclusivamente del potencial de sexualidad de la madre.
- ✓ En una planta tetraploide apomítica facultativa, el desarrollo de semillas por vía sexual, cuando recibe polen de un genotipo tetraploide, depende tanto del potencial de sexualidad de la madre como del sistema reproductivo de la planta que aporta el polen.

III. Objetivos

General

- Conocer cuáles son, tanto la relación de contenido genómico embrión:endospermo como la relación materno:paterna en el endospermo.

Específico

- Demostrar si el aporte del polen es determinante o no en la vía de formación de semillas en relación al sistema reproductivo del progenitor masculino.

IV. Materiales y métodos

4.1 Material vegetal

El material vegetal utilizado en este estudio pertenece a la colección viva de *Paspalum notatum* que se conserva conjuntamente en el IBONE (Instituto de Botánica del Nordeste), y en la FCA-UNNE (Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Nordeste), Corrientes, Argentina. Si no se indica lo contrario, todas estas plantas fueron mantenidas por multiplicación vegetativa (clonal), en macetas o en pequeñas parcelas, en instalaciones de la FCA-UNNE desde su origen, ya sea desde cuando fueron introducidas como plantas individuales a la Institución, o desde que fueron producidas experimentalmente como se indica en cada caso particular (Tabla 7).

Tabla 7: Plantas de *Paspalum notatum* Flügge. Se indican las identificaciones, origen, sitios de colección del material utilizado, modo reproductivo y referencia bibliográficas.

N° identificación	Origen	Lugar de colección o forma de origen experimental	Modo reproductivo	Referencia
Q4086 (=C28)	Experimental	Proceso de obtención: tratamiento con colchicina de una semilla de la población diploide Q4084, originaria de Cayastá, Santa Fe, Argentina.	Apomíctica facultativa	(Quarin et al., 2001)
Q4023	Natural	Brasil, Mato Grosso do Sul, 30 Km al E de Ponta Porá.	Apomíctica facultativa	(Martínez et al., 2001)
Q3664 (=SWSB)	Experimental	Proceso de obtención: duplicación con colchicina en Tifton, Georgia, USA, a partir del citotipo diploide sexual, Pensacola Bahiagrass ($2n=2x=20$ <i>P. notatum</i> var. <i>saurae</i> Parodi) seguido de hibridación con citotipo 4x apomíctico natural, una variante de Bahiagrass común, pero de estigmas blancos; seguido de generaciones de	Apomíctica facultativa	(Quarin et al., 1984; Ortiz et al., 1997)

		polinización libre. Planta elegida por sus estigmas blancos y alto grado de sexualidad. Un clon de la misma fue introducido a FCA-UNNE en 1979, y siempre multiplicado en forma vegetativa.		
C4-4x (=Q4260)	Experimental	Proceso de obtención: Autotetraploide inducido con colchicina en callo obtenido por cultivo de tejido de inflorescencia joven del citotipo diploide sexual (población Q4084).	Sexual	(Quarin et al., 2001)
Q4117 (=Guaiba 673)	Natural	Brasil, Rio Grande do Sul, localidad desconocida.	Apomíctica	(Martínez et al., 2001) (Ortiz et al., 1997)
Q4205	Experimental	Planta obtenida experimentalmente por autofecundación de la planta Q3664 en la FCA-UNNE.	Sexual	(Quarin et al., 2003)
Q4012 (=V11743)	Natural	Brasil, Mato Grosso do Sul, Tres Lagoas.	Apomíctica	(Espinoza et al., 2006)
N160	Natural	Paraguay, Dpto Amambay. 25 km N de Pedro Juan Caballero.	Apomíctica	(Espinoza et al., 2006)
Q3775		México, Tamaulipas, Municipio de Gómez, cultivado en FCA-UNNE a partir de semillas del ejemplar de herbario (R.A. Carranco 617, en Herbario CTES)	Apomíctica facultativa	(Martínez et al., 2001)
Q3838		Argentina, Corrientes, 15 km S de ciudad de Corrientes, arroyo Riachuelo. Planta N° 2	Apomíctica	(Martínez et al., 2001)
Q4188 (=F131)		Híbrido experimental entre Q3664 y Q3853. F ₁ N° 31	Sexual	(Quarin et al., 2003 Ortiz et al., 1997)

4.2 Cruzamientos controlados

Se realizaron cruzamientos controlados para la obtención de distintas progenies utilizadas en este estudio. Se utilizaron tres plantas 4x apomícticas facultativas de Q4086, Q3664 y Q4023 que obraron como madres en los cruzamientos programados y repetidos por cuatro años. Como polinizadores se utilizaron diferentes genotipos del citotipo 4x, algunos sexuales como C4-4x, Q4205 y Q4188, otros determinados como apomícticos Q4117, Q4012, N160, Q3775 y Q3838 (Quarin et al., 1984; Quarín et al., 2001; Martínez et al., 2001; Quarín et al., 2003; Espinoza et al., 2006) y otras apomícticas facultativas Q3664, Q4086 y Q4023 (estos últimos utilizados para ser autopolinizados) en diferentes combinaciones.

Para la realización de los cruzamientos, antes de la antesis se recolectaron cañas de la planta junto con una porción de rizoma de la base de la misma e inflorescencias inmaduras próximas a la antesis. Las mismas fueron mantenidas en frascos con agua y ensobradas mientras duraron los cruzamientos. En el caso de los progenitores masculinos también se eligieron cañas con inflorescencias a punto de iniciar la antesis o con pocas espiguillas abiertas, las mismas se extrajeron con una porción de rizoma y se mantuvieron en frascos con agua, en un sector aislado (para evitar contaminaciones y pérdidas de polen) y húmedo del invernáculo de la Cátedra de Genética de la Facultad de Ciencias Agrarias, mientras produjeran polen para realizar los cruzamientos.

Los cruzamientos se realizaron en una cámara de niebla artificial donde las espiguillas se abren al momento de la antesis, pero se demora la dehiscencia de las anteras debido al alto nivel de humedad ambiental (Figura 7). Esto permitió eliminar las anteras antes que se libere el polen y luego aplicar sobre los estigmas el polen del padre elegido previamente para cada experimento. Los detalles de esta técnica de cruzamiento fueron descritos por Burton (1948).



Figura 7: Cámara de niebla artificial. A) Detalle de cámara cerrada. B) Casilla adosada a la cámara conteniendo el humidificador, generador de niebla artificial, y tablero de comando. C) Detalle de cámara abierta, unida a la casilla que contiene el humidificador, se observa tubo de ingreso de niebla artificial. D) Porción de planta en recipiente con agua y soporte para mantener erecta la inflorescencia preparada para ser polinizada dentro de la cámara.

Por la tarde las inflorescencias femeninas fueron colocadas en la cámara de niebla artificial. *Paspalum notatum* se caracteriza por florecer temprano a la mañana, aproximadamente 5:30 horas, por lo que la cámara de niebla artificial fue programada para encenderse una hora antes del horario de la antesis (aproximadamente a las 4:30 horas), con la intención de que produzca una humedad de saturación. La elevada humedad ambiental que existe al momento de producirse la antesis, demora la dehiscencia de las anteras, por lo que éstas permanecen cerradas evitando la caída del polen.

Al día siguiente, a la mañana temprano se realizó la colecta del polen que sería utilizado como progenitor masculino, en sobres de papel sulfito. Con una pinza de punta fina se procedió a la emasculación de las anteras de las inflorescencias colocadas en la cámara de niebla artificial y se polinizó con el polen cosechado en los sobres de papel sulfito. Una vez realizado este proceso se ensobró con papel sulfito las inflorescencias polinizadas y se extrajeron las plantas utilizadas como progenitores femeninos de la cámara de niebla artificial y se colocaron en un sector del invernáculo, ensobradas, para evitar se contaminen con cualquier otro polen que pudiera encontrarse en el invernáculo. Esta operación se repitió diariamente hasta polinizar la última espiguilla de la inflorescencia. Una vez culminado el cruzamiento se retiraron las plantas a un sector apartado y protegido del invernáculo (para evitar que las cañas se quiebren). Así se conservaron hasta la madurez de las semillas, aproximadamente 30-40 días, momento en que se cosecharon las inflorescencias. Las semillas obtenidas en cada uno de los cruzamientos fueron utilizadas en este estudio (Figura 8).



Figura 8: A y B) Inflorescencia de Q3664 dentro de la cámara en el momento de la polinización, A) Inflorescencia con las anteras expuestas, pero no dehiscentes listas para ser emasculadas y B) Inflorescencia emasculada. C) Planta en antecámara del invernáculo, conservada en recipiente con agua e inflorescencia ensobrada y sostenida con soporte hasta momento de cosechar las semillas.

4.3 Porcentaje de llenado de semillas producidas por cruzamiento.

Se procedió a la cosecha de las inflorescencias polinizadas, considerándose cada inflorescencia como una repetición de cada cruzamiento por lo que fueron analizadas cada una por separado. Las mismas fueron secadas en estufa a 37 °C durante 24 horas y luego manualmente se separaron las espiguillas y se clasificaron como llenas o vacías utilizando un soplador de semillas (Seedburo Equipment Company 1022W. Jackson Blvd. Chicago. IL 60607 1-800-284-5779). El soplador permitió separar por un lado espiguillas llenas y por el otro las espiguillas vacías, y de esta manera se conoció la fertilidad del cruzamiento, es decir, el porcentaje de semillas llenas de cada cruzamiento realizado.

4.4 Análisis de semillas por citometría de flujo.

Para el análisis del modo reproductivo se utilizó la técnica de análisis de semillas por citometría de flujo (FCSS), de manera individual, propuesto por Matzk et al., (2000). El mismo ha sido explicado en materiales y métodos del capítulo 1 de esta tesis. El citómetro utilizado fue CyFlow Space de Sysmex del Instituto de Botánica del Nordeste. Los datos fueron analizados con el paquete informático Flo Max 2.4d proporcionado por el fabricante del citómetro.

4.5 Análisis estadísticos

El diseño experimental consistió en la realización de cruzamientos con todas las combinaciones de progenitores disponibles al momento de la floración, se consideró cada inflorescencia utilizada en cada combinación genotípica como una repetición. El número de repeticiones estuvo supeditado a la disponibilidad de inflorescencias femeninas y masculinas de cada combinación, en algunos casos el número de repeticiones fue mayor para lograr obtener un n similar en los cruzamientos realizados y que la disponibilidad al momento de la floración lo permitiera.

El análisis o comparaciones se limitó a aquellos progenitores que eran afines a los progenitores femeninos, con el fin de evitar incluir en el mismo (“ruidos”) a la relación existente entre los distintos genotipos y el carácter de la semilla.

Se realizó el análisis de la varianza a través del test de Tukey ($p=0,05$) (Di Rienzo et al., 2020) para analizar la variación existente entre las diferentes combinaciones por progenitor femenino.

Se construyeron y analizaron modelos lineales generalizados (GLM por sus siglas en inglés) para analizar la posible asociación que existe entre el modo reproductivo presentado

por los parentales y la formación de las semillas por vía de un proceso sexual (meiosis + doble fecundación) o por la vía apomíctica (aposporia + partenogénesis + pseudogamia).

Se analizó la sobredispersión de los residuos del modelo utilizando los test de sobredispersión y la simulación de residuos presentes en el paquete DHARMA (Hartig, 2022) con distribución betabinomial y una función de enlace de tipo link=logit (Brooks et al., 2017). Se seleccionaron los modelos comparando valores de probabilidad a través de pruebas X^2 . Se tomaron como significativos todos los valores de probabilidad menores a 0,05. A su vez, se realizaron los contrastes entre las distintas categorías de las variables predictivas utilizando el paquete emmeans (Lenth, 2023).

Los análisis se realizaron utilizando el programa de análisis estadísticos R (R Core Team, 2023). Los paquetes “tidyverse” (Wickham et al., 2019) y ggeffects (Lüdecke, 2018) fueron utilizadas para la construcción y análisis de los modelos lineales generalizados, y la construcción de los gráficos.

V. Resultados y discusión

5.1 Cruzamientos

La combinación de cruzamientos (Tabla 8) se hicieron en función de las inflorescencias disponibles, y las combinaciones no siempre se repitieron con todos los progenitores.

Tabla 8: Total de espiguillas polinizadas en diferentes combinaciones de cruzamientos.

Cruzamientos		Sexual			Apomíctica					Apomictica Facultativa			
Madre/Padre	C4-4x	Q4205	Q4188	Q4117	Q4012	N160	Q3775	Q3838	Q3664	Q4086	Q4023	Polin. abierta	
Q4023	860	131		690	352	265	265	295		94	582	631	
Q4086	630	262	396	756	553		392	232		836	302		
Q3664	270		291	620			463		535				
TOTAL	1766	393	687	2066	905	265	1120	527	535	930	884	631	

5.2 Porcentaje de fertilidad de los cruzamientos

De acuerdo con los datos presentados en la Tabla 9 y Figura 9 del total de cruzamientos realizados, se observa la fertilidad del cruzamiento a través de la relación de semillas llenas y vacías obtenidas por cruzamiento. En los cruzamientos que involucraron a Q4023 como madre el porcentaje de semillas llenas varió de 22,9% cuando fue autopolinizada, hasta 54,6 % al cruzarse por Q3838. Cuando intervino Q4086 como progenitor femenino los porcentajes variaron entre 4,3% cuando fue cruzado por Q3775 hasta 41,8% al cruzarse con Q4012, mientras que cuando Q3664 actuó como madre se observaron porcentajes de semillas llenas que variaron entre 18,1% al cruzarse con Q3775 y 50,5% al cruzarse con Q4117 (Figura 10).

Tabla 9: Porcentaje de semillas obtenidas en los cruzamientos realizados, número de inflorescencias polinizadas según cruzamiento.

Cruzamiento	Número Inflorescencias	Total de Espiguillas cruzadas	Semillas		% Semillas llenas
			Llenas	Vacías	
Q4023 x C4-4x	11	860	307	553	35,7
x Q4205	2	131	38	93	29,0
x Q4023	6	582	133	449	22,9
x Q4086	2	94	28	66	29,8
x Q4117	8	690	218	472	31,6
x Q4012	4	352	114	238	32,4
x N160	4	265	71	194	26,8
x Q3775	4	260	99	161	38,1
x Q3838	3	295	161	134	54,6
Q4086 x C4-4x	6	630	232	398	36,8
x Q4188	3	396	128	268	32,3
x Q4205	2	262	88	174	33,6
x Q4086	6	836	274	562	32,8
x Q4023	4	302	85	217	28,2
x Q4117	8	756	176	580	23,3
x Q4012	5	553	231	322	41,8
x 3775	6	392	17	375	4,3
x Q3838	3	232	82	150	35,3

Q3664 x C4-4x	4	463	212	251	45,8
x Q4188	3	291	86	205	29,6
x Q3664	2	535	133	402	24,9
x Q4117	4	412	208	204	50,5
x Q3775	4	392	71	321	18,1

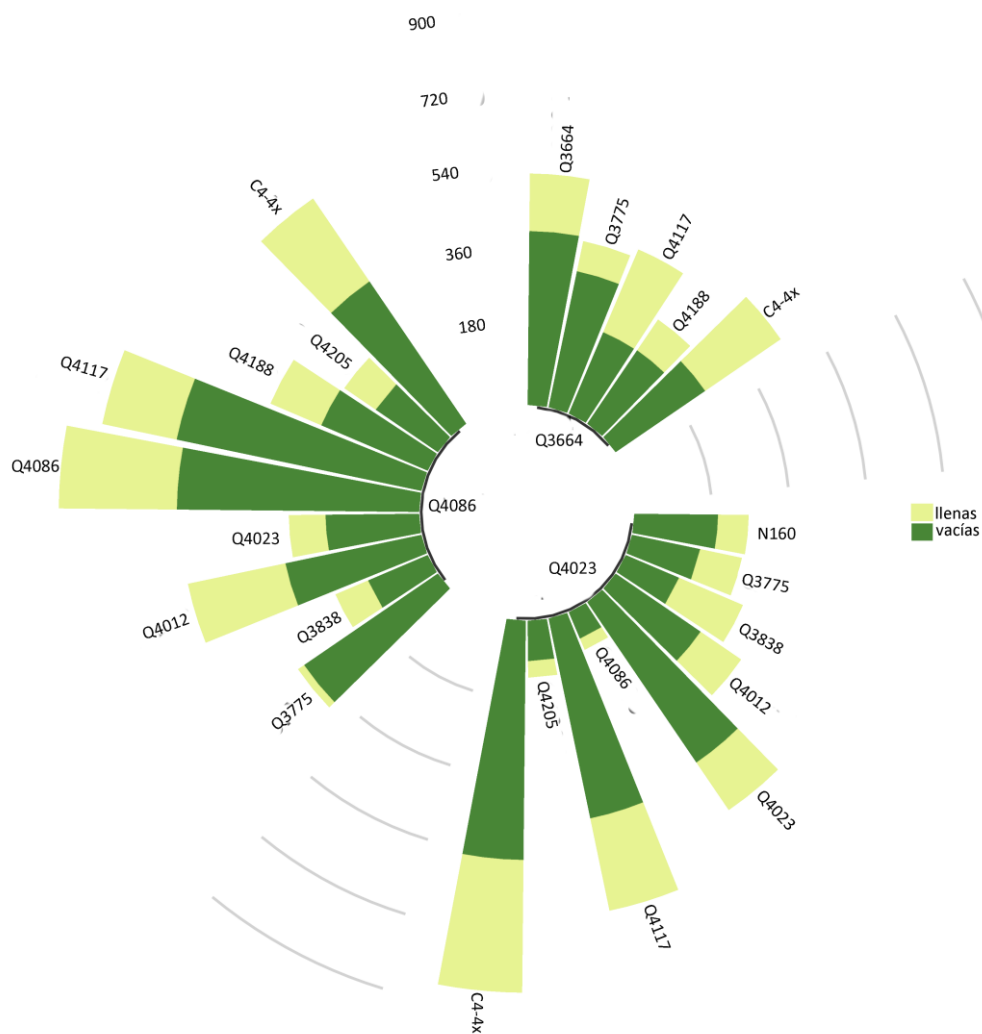


Figura 9: Porcentaje de semillas llenas y vacías según cruzamiento.

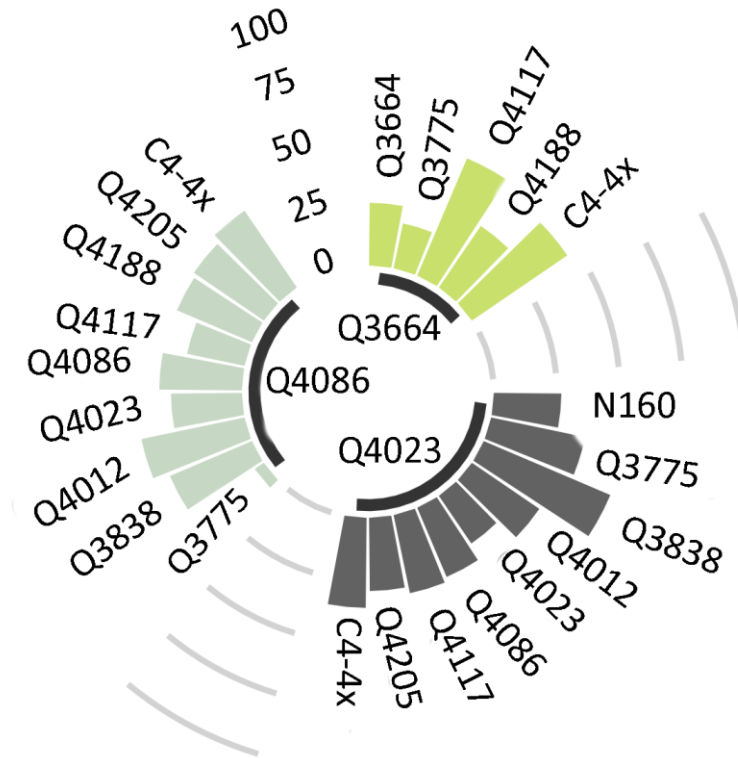


Figura 10: Porcentaje de semillas llenas por cruzamiento.

5.3 Análisis de semillas por citometría de flujo

De acuerdo con la metodología detallada en materiales y métodos para el análisis FCSS por citometría de flujo (Matzk et al., 2000). Se determinó así que todas aquellas semillas cuyos histogramas manifestaban una relación de contenido de ADN embrión/endospermo de 2C:3C es porque habían tenido un origen por vía sexual (meiosis + doble fecundación). Por su parte, todas las semillas en las que se observó una relación 2C:5C fueron consideradas que se originaron por vía apomíctica (aposporia + partenogénesis y pseudogamia).

Los resultados obtenidos de los cruzamientos (Tabla 10) muestran una clara diferencia en la producción de cariopses vía sexual cuando las tres plantas madres, genotipos Q4023, Q4086 y Q3664, de reproducción facultativa (sexual o apomíctica) fueron

polinizadas por plantas sexuales (C4-4x, Q4205 y Q4188), en comparación con cariopses formados por vía de apomixis cuando esas mismas tres madres fueron polinizadas por plantas clasificadas como apomícticas (Q4117 y Q3775, o también N160, Q3838 y Q4012). Los valores de esas diferencias son estadísticamente significativos según los genotipos que intervinieron en los cruzamientos. Este resultado experimental y su significancia indican que existe una influencia positiva del genotipo de los polinizadores en la “decisión” del proceso que forma los cariopses en las madres.

Tabla 10: Diferentes combinaciones de cruzamientos realizados, número de inflorescencias polinizadas por cruzamiento y proporción de semillas obtenidas sexuales y apomícticas.

Cruzamiento	N° Inflor.	2C:3C Sexuales	2C:5C Apomícticas	Relación S/A	Porcentaje S/A
Q4023 x C4-4x	1	30	1	288/1	99,7/0,3
	2	12	-		
	3	21	-		
	4	44	-		
	5	22	-		
	6	7	-		
	7	8	-		
	8	23	-		
	9	40	-		
	10	50	-		
	11	31	-		
Q4023 x Q4205	1	19	-	30/0	100/0
	2	11	-		
Q4023 x Q4117	1	5	37	23/236	8,9/91,9
	2	-	56		
	3	1	16		
	4	2	3		
	5	2	7		
	6	3	5		
	7	9	19		
	8	1	93		
Q4023 x Q4012	1	12	30	39/99	28,3/71,7
	2	9	18		

	3	9	9		
	4	9	3		
Q4023 x N160	1	1	5		
	2	1	14	9/57	13,6/86,4
	3	5	22		
	4	2	16		
Q4023 x Q3775	1	6	19		
	2	7	13	27/71	27,6/72,4
	3	3	14		
	4	11	25		
Q4023 x Q3838	1	1	34		
	2	6	58	19/141	11,9/88,1
	3	12	49		
Q4023 x Q4023	1	52	-		
	2	11	-		
	3	4	13	101/39	72,1/27,9
	4	16	1		
	5	15	17		
	6	3	8		
Q4023 x Q4086	1	15	1	26/1	99,3/0,7
	2	11	-		
Q4086 x C4-4x	1	31	-		
	2	22	-		
	3	37	-		
	4	36			
	5	24	-	295/0	100/0
	6	56	-		
	7	9	-		
	8	48	-		
	9	24	-		
	10	8	-		
Q4086 x Q4188	1	58	-		
	2	38	-	110/3	97,3/2,7
	3	14	3		
Q4086 x Q4205	1	57	-	71/0	100/0
	2	14	-		
Q4086 x Q4117	1	4	14	41/154	21,0/79,0
	2	7	20		

	3	12	21		
	4	3	26		
	5	6	29		
	6	5	31		
	7	4	13		
Q4086 x Q4012	1	15	17		
	2	4	1		
	3	2	-		
	4	8	14	67/74	47,5/52,5
	5	10	21		
	6	14	19		
	7	14	2		
Q4086 x Q3775	1	4	5		
	2	4	4	8/9	47,5/52,5
Q4086 x Q3838	1	3	8		
	2	8	27	21/52	28,8/71,2
	3	10	17		
Q4086 x Q4086	1	21			
	2	45			
	3	97	2	208/5	97,7/2,3
	4	25	-		
	5	6	-		
	6	14	3		
Q4086 x Q4023	1	8	4		
	2	15	1		
	3	7	6	51/21	70,8/29,2
	4	7	10		
Q3664 x C4-4x	1	13	-		
	2	45	-		
	3	65	-		
	4	58	-	211/0	100/0,0
	5	12	-		
	6	18	-		
Q3664 x Q4188	1	11	1		
	2	7	-	39/3	92,9/7,1
	3	21	2		
Q3664 x Q4117	1	2	30		
	2	3	15	21/125	14,4/85,6

	3	12	59		
	4	4	21		
Q3664 x Q3775	1	2	20	2/20	9,1/90,9
Q3664 x Q3664	1	23	-		
	2	47	17	87/17	83,7/16,3
	3	17	-		

Tomando individualmente los resultados de cada uno de los tres genotipos con tipo de reproducción facultativo (sexual/apomíctico) vemos que en la madre Q4086, entre el 97,3 y 100% de los cariopses se formaron por la vía sexual cuando el polen provino de los genotipos sexuales C4-4x, Q4205 y Q4188, mientras que la misma madre Q4086 formó cariopses mayoritariamente por vía apomíctica (entre el 52,5 y 79%) cuando se cruzó con polen de los genotipos Q4117, Q3775, Q4012 y Q3838 que son apomícticos (Figura 11).

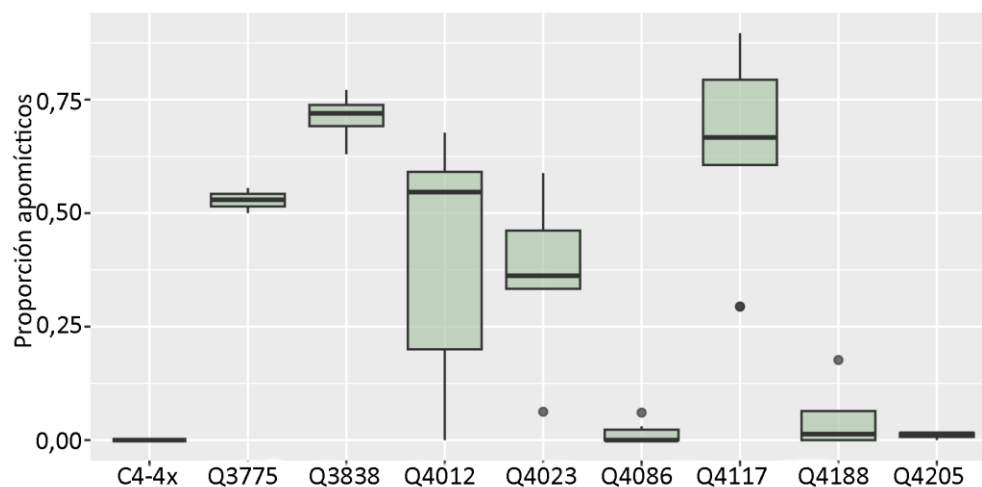


Figura 11: Proporción de descendencia apomíctica obtenida de los cruzamientos entre Q4086 y diversos genotipos paternos.

Por su parte, la madre facultativa Q3664 formó mayoritaria o exclusivamente cariopses vía sexual cuando se cruzó por los genotipos sexuales C4-4x (100%) y Q4188

(92,9%), mientras que con los polinizadores apomícticos, Q4117 y Q3775, el 85,6 y 90,9% de los cariopses se formaron por vía apomíctica (Figura 12).

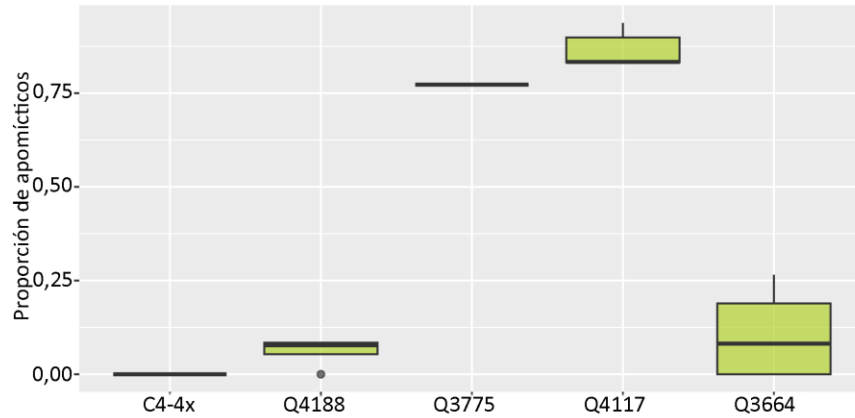


Figura 12: Proporción de descendencia apomíctica producto del cruzamiento entre Q3664 y diversos genotipos paternos.

Por su parte, es interesante el caso de la madre de reproducción facultativa Q4023. Estudios previos en este genotipo, realizados por Martínez et al. (2001) a través de técnicas de citoembriología (transparencia por DIC), mostraron que el 35,7% de los óvulos contenían exclusivamente un saco meiótico (M), el 2,4% uno o más sacos apo (A), el 59,5 tenían un saco M+A y un 2,4% de sacos inmaduros. Es decir, un potencial mínimo de 35,7% y un máximo de 95,2 de sexualidad, mientras el potencial de reproducción apomíctica variaba de un mínimo de 2,4% a 61,9%. También, Rebozzio et al. (2011), estudiaron con “fingerprintings” de AFLP una progenie de Q4023, pero solamente el 5,12% de esa progenie mostró tener origen por vía sexual, contrastando con lo que se podía esperar de acuerdo a los resultados de estudios citoembriológicos. En los resultados presentes, con estudios realizados a través de FCSS, el mismo genotipo estudiado por Martínez et. al. (2001) y Rebozzio et al. (2011) produjo el 99,7%, y 100% de semillas con una relación de contenido de ADN en embrión: endospermo de 2:3, típica de un desarrollo por la vía sexual, cuando fue polinizada con los genotipos de reproducción sexual C4-4x y Q4205, respectivamente.

Consecuentemente, la producción de semillas por vía apomítica (relación de contenido de ADN embrión:endospermo 2:5) fue inferior al 1%, variando de 0,3% a 0% cuando los polinizadores fueron esos dos genotipos sexuales (Tabla 10 y Figura 13).

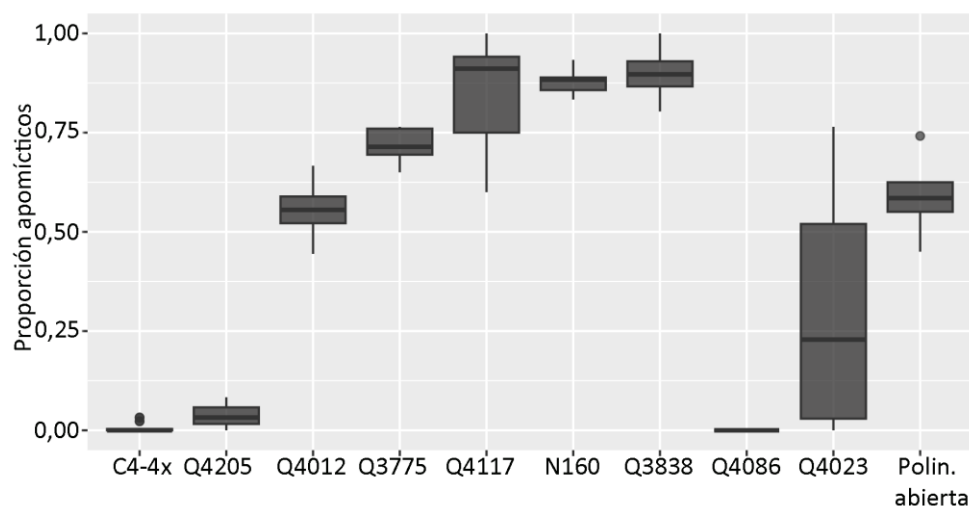


Figura 13: Proporción de descendencia apomítica en cruzamientos entre Q4023 y diferentes combinaciones paternas.

Muy por el contrario, la formación de semillas vía apomixis, del mismo genotipo Q4023, creció cuando fue polinizado por cinco genotipos de reproducción apomítica (Q4012, Q3775, N160, Q3838 y Q4117) variando de 71,7 a 91,9%. Por tanto, la diferencia entre la expresión de la sexualidad y la expresión de la apomixis en la formación de semillas por las vías sexual y apomítica es netamente significativa y tiene sin dudas una influencia positiva de los gametos aportados por los progenitores masculinos (Figuras 11, 12 y 13). Los resultados obtenidos por Martínez et al. (2001) determinaron la expresión de la apomixis/sexualidad a partir de la observación del tipo de sacos embrionarios observados en óvulos maduros a través de microscopía DIC. Esta tesis determinó la expresión con base en el tipo de embrión y endospermo (relación del contenido relativo de ADN entre ambos) que contenían las semillas después de polinizaciones controladas; mientras que Rebozzio et al. (2011) determinaron la expresión de esa sexualidad/apomixis a través de un test de

progenie en estudios moleculares. Durante los estudios realizados por Martínez et al. (2001) y Rebozzio et al. (2011) no se realizó control de la polinización. Sin embargo, la técnica realizada por Martínez et al. (2001) requirió, para realizar el análisis por microscopía, espiguillas en estado de antesis; mientras que Rebozzio et al. (2011), si bien utilizó para su test de progenie, semillas de la misma planta que anteriormente estudiaran Martínez et al. (2001), cultivada en una parcela de un metro cuadrado, integrando un lote de parcelas individuales, del mismo tamaño, en un terreno de aproximadamente 280 metros cuadrados. Allí se distribuían cerca de 60 genotipos de *P. notatum*, en su inmensa mayoría tetraploides y apomícticos. Solo había en ese lote un genotipo sexual (Q4205) y dos facultativos (Q4086 y Q3664) por lo que en ese momento la polinización libre de Q4023 involucró exclusiva o mayoritariamente polen de plantas tetraploides y apomícticas. Esto indica, y en los tres casos se confirma, que Q4023 es una planta de reproducción apomíctica facultativa pero que expresa mayoritariamente la apomixis cuando es polinizada por polen de plantas apomícticas.

Entonces, a la pregunta de quién “decide” el tipo de embriogénesis de una planta de *P. notatum* perteneciente a un genotipo de reproducción facultativa (apomíctica/sexual), cuando se cruza con otro genotipo, la respuesta es sin dudas: el tipo de reproducción de la planta que aportó el polen “decide” la vía por la cual se forman los embriones y sus respectivos endospermos en las semillas de la madre facultativa. Estos embriones serán exclusivamente o en altísimo porcentaje por vía sexual si el genotipo del polinizador es de reproducción sexual, por el contrario, embriones y endospermos serán mayoritariamente, aunque no todos, originados por vía apomíctica (aposporia, partenogénesis y pseudogamia) cuando el polinizador es un genotipo apomíctico. Cabe mencionar que, en el primer caso, las semillas con embriones de origen sexual producirán plantas segregantes que podrán ser de reproducción apomíctica o sexual, mientras que, en el segundo caso, las semillas mayoritariamente formadas por apomixis se espera que produzcan exclusivamente plantas de reproducción facultativa, y la minoría producida vía sexual producirán plantas segregantes.

En los cruzamientos realizados, las 3 madres facultativas, cruzadas con los tres polinizadores sexuales dieron como resultado porcentajes muy altos de semillas con embriones vía sexual y muy semejantes entre ellos no manifestando diferencias significativas ($p > 0,05$), lo que muestra una constante. Mientras que, cuando las 3 madres facultativas se cruzaron con diferentes genotipos apomícticos dieron resultados de semillas apomícticas mayoritariamente, pero variables entre sí, lo que indica que los factores que determinan la vía del desarrollo del embrión son variables, aunque siempre altos en los padres apomícticos.

Por otro lado, también se forzó la autopolinización de las madres, obteniéndose en todos los casos semillas que mayoritariamente se formaron por la vía sexual, presentado variaciones en el porcentaje dependiendo de la madre que fue autopolinizada. Cuando se autopolinizó Q4086 presentó mayoritariamente semillas por la vía sexual con un 97,7%. Por su parte, la autopolinización de Q3664 produjo un 83,7% de semillas por la vía sexual, mientras que Q4023 fue la que produjo menor cantidad de semillas por la vía sexual cuando fue autopolinizada, presentando un 72,1%. Esta variación seguramente está relacionada con el origen de las plantas utilizadas como madres, ya que tal como se observa en la (Tabla 7), tanto Q4086 como Q3664 tienen un origen experimental, siendo que Q4086 surgió directamente a partir de la duplicación con colchicina de una semilla de una planta diploide sexual, proveniente de una población diploide sexual de la localidad de Cayastá, donde varias plantas de dicha población (5 de 7 analizadas) mostraron capacidad de producir muy eventualmente un saco apospórico junto al saco meiótico que siempre está presente en todos los óvulos (Quarin et al 2001). La planta Q3664 también surgió originalmente de una diploide, tetraploidizada con colchicina, a la que siguieron algunos cruzamientos con tetraploides naturales apomícticos, antes de ser seleccionada como una planta facultativa, pero con un importante grado de reproducción sexual. Mientras que Q4023 es una planta tetraploide de reproducción facultativa tomada directamente de la naturaleza (Figura 14). Las diferencias entre la formación variable de semillas con embriones de origen sexual entre las tres madres autopolinizadas, también sugiere que los factores que se supone producen

este efecto a través del polen, deben ser cuantitativamente variables en cada uno de ellas, probablemente debido al origen de cada una de estas plantas de reproducción facultativa.

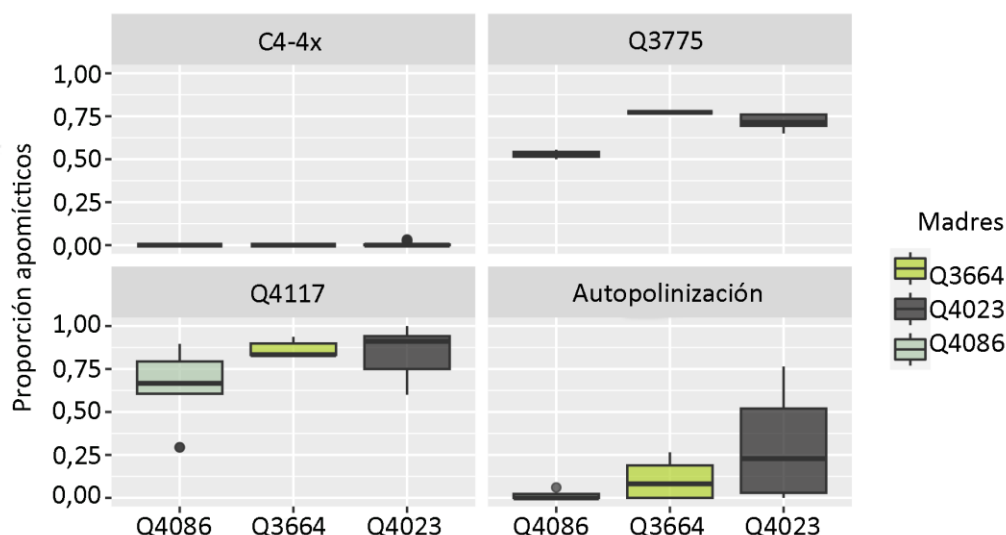


Figura 14: Proporción de descendencia apomíctica de las tres madres respecto de cuatro genotipos paternos.

Al realizar el análisis de la varianza según Tukey, (Figura 15) se observaron diferencias entre las semillas analizadas de los cruzamientos realizados, entre aquellas obtenidas asociadas al sistema reproductivo del progenitor masculino de origen sexual versus apomíctico. Polen de un progenitor de reproducción sexual favoreció significativamente a la formación de semillas por la vía sexual, como así también polen de un progenitor de reproducción apomíctica favoreció la vía apomíctica.

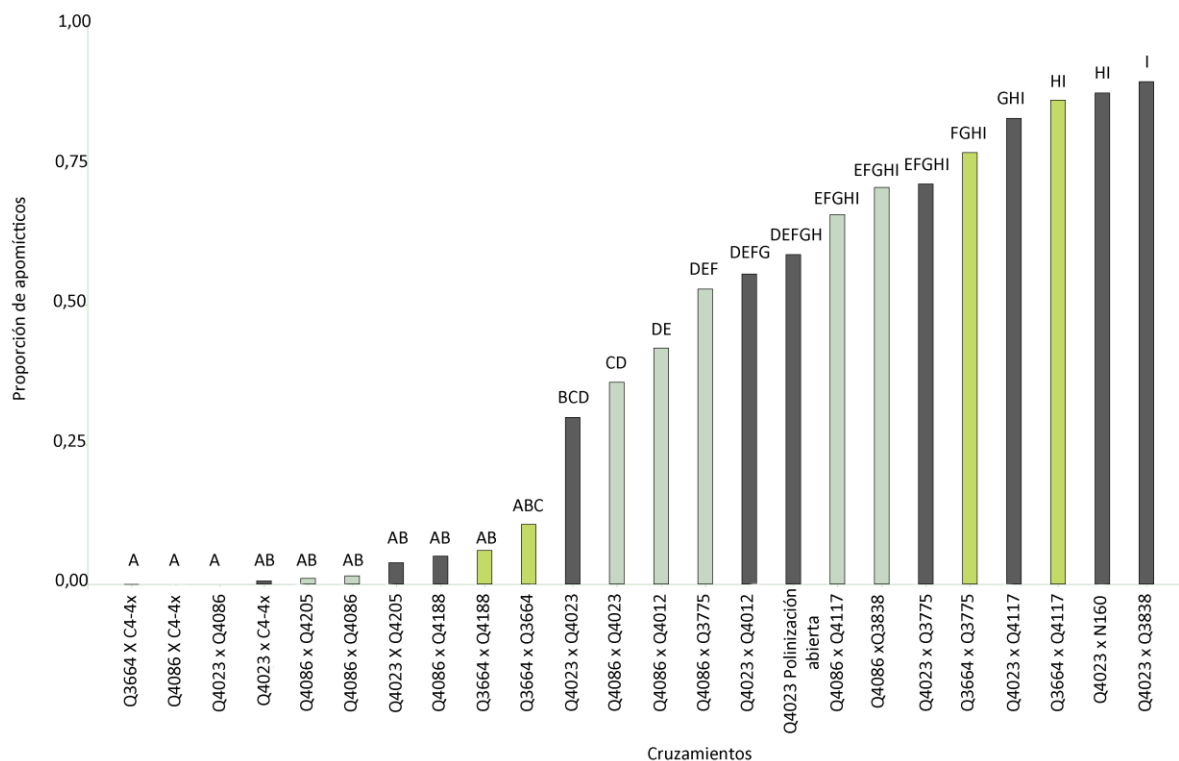


Figura 15: Análisis de la varianza de las diferentes combinaciones de cruzamientos realizados. En verde (madre Q3664), celeste (madre Q4086), y gris (madre Q4023). Letras distintas indican diferencias significativas ($p=0,05$). $F = 58,40$.

Al analizar cómo contribuyen los diferentes genotipos parentales al fenotipo (sexualidad/apomixis) de la descendencia a través de la construcción de modelos lineales generalizados y con el fin de estandarizar los datos, se seleccionaron para dicho análisis aquellos genotipos masculinos que se han repetido en cruzamientos con las 3 madres. Los genotipos seleccionados para dicho análisis corresponden a dos clasificados como apomícticos (Q3775 y Q4117) de distinto origen (Tabla 7) y aulpolinización forzada de cada una de las madres. Se decidió no incorporar en el análisis al parental masculino C4-4x, clasificado como sexual (Tabla 7) debido a que la totalidad de la progenie presentó poca variabilidad en cuanto a su clasificación como fenotipo de reproducción sexual.

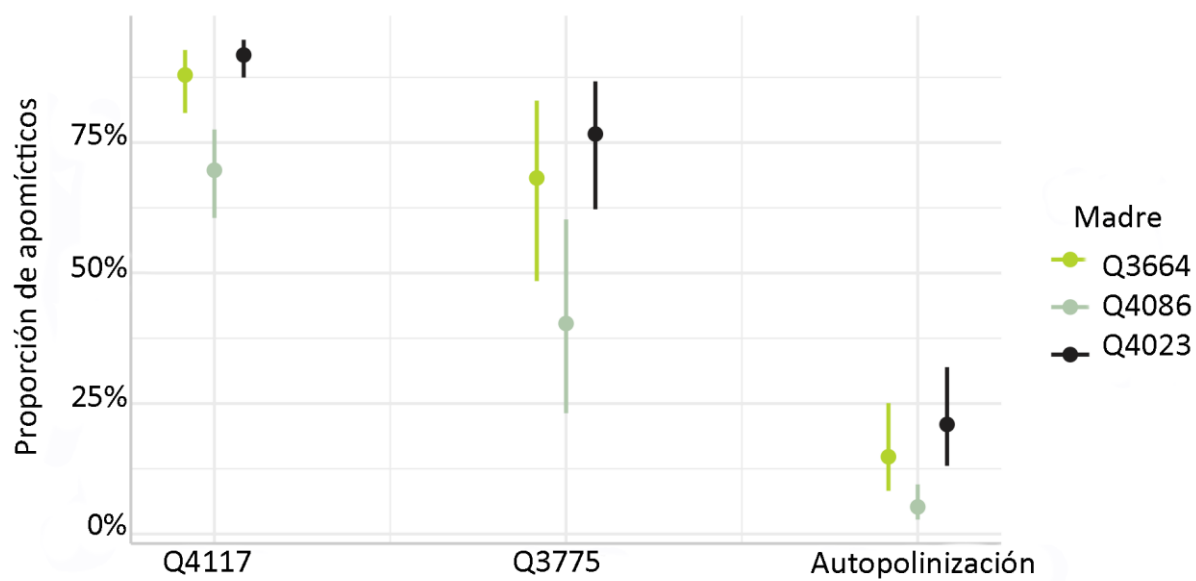
Estos resultados me permitieron observar una influencia del genotipo parental con el fenotipo de la descendencia ($p < 2,2e-16$). Tal como se puede observar en la Tabla 11 y Figura 16, al comparar los resultados obtenidos a partir de los cruzamientos con los genotipos apomícticos con los obtenidos por autopolinización cruzada, la proporción de apomixis encontrada es superior al 50%. En todos los cruzamientos los valores más elevados se observaron cuando los progenitores femeninos fueron Q3664 y Q4023. Presentando Q4023 cuatro individuos apomícticos en el cruzamiento con el padre puramente sexual (C4-4x). Cuando se forzó la autopolinización se observó la respuesta diferencial entre los progenitores femeninos: Q4023 presentó una mayor proporción de descendencia apomíctica cercana al 23%, seguida de Q3664 cuya proporción fue del 16%, mientras que Q4086 al ser autopolinizada produjo una proporción de descendencia sexual del 97%. Se observó en dicho análisis una asociación entre el fenotipo de la madre y el genotipo de la descendencia ($p=1,5e-7$), sin embargo, se estableció que la madre interactúa potenciando la expresión del genotipo del padre y no determinando diferencialmente la expresión del genotipo del padre ($p=0,47$). Esto se puede apreciar en la Tabla 11, donde los valores de AICc son menores para el modelo que no involucra la determinación diferencial de una variable sobre la otra. Las mayores proporciones de apomícticos (Figura 16) están asociados a la madre que tiene una mayor variabilidad en la descendencia obtenida en la autopolinización forzada. Cabe destacar, que Q4023 es la única planta utilizada como progenitor femenino de origen natural mientras que Q4086 y Q3664 son de origen experimental (ver Tabla 7).

No se encontraron diferencias significativas entre el efecto causado por Q3775 y Q4117 en la descendencia ($p=0,08$), sin embargo, ambos genotipos fueron significativamente diferentes respecto de las autopolinizaciones forzadas ($p < 0,0001$).

Tabla 11: Valoración de los modelos lineales generalizados.

Modelo	AICc	χ^2	P
Padre + Madre	440,10	--	--
Padre x Madre*	443,58	2,51	0,47
Padre	467,52	225,56	$2,2 \text{ e}^{-16}$
Madre	661,66	31,41	$1,506 \text{ e}^{-7}$

* Este modelo incluye la interacción entre las variables padre y madre.

**Figura 16:** Proporción de descendencia apomíctica predicha por el modelo seleccionado para cada padre y madre.

Autran et al. (2005), realizaron análisis genéticos en *Arabidopsis thaliana*, sugiriendo que la actividad de varios genes durante la embriogénesis temprana y la formación del endospermo dependen solamente de la transcripción de alelos inherentes a la madre. En dicho estudio ninguno de los alelos inherentes al padre se expresó durante la formación temprana de las semillas, por lo que se concluyó que la transcripción materna es suficiente para el desarrollo directo de los primeros estadíos tanto en el embrión como en el endospermo. Grimanelli et al. (2005) establecen que dicho modelo es controversial, ya que existen evidencias de alelos paternos transcritos en estadíos tempranos en *Arabidopsis* (Weijers et al., 2001; Kohler y Grossniklaus, 2005) y que la expresión de un trasgén inherente al padre es conducido por un promotor viral en maíz (*Zea mays*) (Scholten et al., 2002). También los fenotipos de numerosos embriones mutantes letales presentan una tasa típica de segregación esporofítica de 3:1 (Tzafrir et al., 2004), sugiriendo que no hay efectos maternos aparentes. De todos modos, el silenciamiento paterno (o por lo menos una fuerte reducción en la expresión de los alelos paternos) ha sido también confirmada por varios genes o marcadores del desarrollo (Baroux et al., 2001; Sorensen et al., 2001; Golden et al., 2002).

De acuerdo a estos resultados y aún si se asume que gran parte del genoma inherente al padre sufre un retardo en su activación, Grimanelli et al. (2005) plantean importantes dudas sin resolver al respecto. En primer lugar, sugieren que no es claro si el silenciamiento del genoma paterno puede generalizarse al desarrollo temprano de las semillas en otras plantas. La analogía con animales sugiere la posibilidad de una variabilidad muy extensa. Segundo, incluso para aquellos genes donde el control materno es demostrado claramente, se desconoce si la transcripción materna es gametofítica (es decir, depositada antes de la fertilización), cigótica (producida después de la fertilización), o ambos. Por último, no está claro si el curso de activación del genoma es similar en el embrión y el endospermo.

Los resultados obtenidos en esta tesis en el citotipo tetraploide de *Paspalum notatum* al cruzar como madres a plantas de reproducción facultativa (sexual/apomíctica)

con polinizadores contrastantes: o sexuales o apomícticos, demostraron una influencia neta del tipo de polinizador sobre el proceso que conduce a la formación de las semillas de la madre facultativa. El polen de una planta de reproducción sexual conduce total o mayoritariamente a la formación por vía sexual (meiosis + doble fecundación), por parte de la madre facultativa. Y viceversa, la misma madre facultativa produce semillas vía apomixis (aposporía + partenogénesis + pseudogamia) cuando el polen proviene de una planta de reproducción apomíctica. Estos resultados, dejan en evidencia que existen elementos del genoma paterno decisivos en el tipo de embriogénesis que interviene en la formación de una semilla.

Es decir, el genotipo del polinizador determina el proceso de las semillas que se forman en la madre. En el desarrollo de una semilla, el tipo de embrión y de endospermo queda resuelto desde que se concreta la polinización de la flor, ya que depende de si los mismos se inician por la doble fecundación en un saco meiótico o por la partenogénesis y pseudogamia en un saco apospórico. Cabe aclarar que en esta tesis solamente se estudió el fenotipo de las semillas respecto de la respuesta del mismo en el estudio por citometría (FCSS), donde se considera la relación de contenido relativo de ADN del embrión:endospermo, nuestros resultados no involucran estudios moleculares que determinen la expresión de factores ya sean genes en concreto o factores de transcripción en ese momento en el óvulo. Sin embargo, se podría inferir que el genoma paterno actúa desde muy temprano en la embriogénesis en las semillas de *P. notatum*, en concordancia con lo sugerido por Grimanelli et al. (2005) y los estudios previos de investigaciones en *Arabidopsis* (Weijers et al., 2001; Kohler y Grossniklaus, 2005).

Los mecanismos moleculares que controlan la apomixis, son en gran parte desconocidos. Conner et al. (2015) demostraron que en *Pennisetum squamulatum*, la apomixis segrega como un único locus dominante, la región genómica específica para la aposporia (ASGR, del Inglés “apospory-specific genomic region”), la ASGR contiene múltiples copias del gen similar a *PsASGR-BABYBOOM* (*PsASGR-BBML*), un miembro del subgrupo similar a BBM de factores de transcripción APETALA 2. La expresión de un

transgén *PsAGR-BBML* en mijo perla tetraploide sexual promovió tanto la partenogénesis como la producción de descendencia haploide. Por otro lado, los embriones haploides producidos en líneas con el promotor *PsASGR-BBML* en arroz y maíz sugieren que la expresión en monocotiledóneas debiera ser similar a lo encontrado en el mijo perla y podría ser usado para dirigir la partenogénesis en monocotiledóneas (Conner et al., 2017).

A partir de los resultados obtenidos por Boutilier et al. (2002), mis resultados permiten especular sobre la existencia de un efecto de superposición en la expresión de factores o genes al momento de la fecundación, manifestada a través de la influencia que ejerce el padre (sexual o apomíctico) al fecundar a diferentes madres (apomícticas facultativas). Es decir, estos, me facultan plantear una nueva hipótesis que podrá ser abordada mediante estudios de expresión molecular, de factores aportados por el polen, desde el momento de la fecundación.

VI. Conclusiones específicas

- Se acepta la segunda hipótesis que establece que en una planta tetraploide apomíctica facultativa, el desarrollo de semillas por vía sexual, cuando recibe polen de un genotipo tetraploide, depende mayoritariamente del sistema reproductivo de la planta que aporta el polen, aunque también influye el potencial de la madre.
- Esta tesis permitió detectar que el tipo de reproducción del polinizador actúa desde estadios tempranos produciéndose la embriogénesis por la vía sexual o por la vía apomíctica.

Conclusiones generales

- En algunos casos específicos se observó un ligero efecto de disminución o aumento en el tamaño del genoma. Ese aumento o disminución en el tamaño del genoma podría ser atribuido a la historia de la evolución de las especies multiploides donde podrían haberse dado tanto eventos de autoploidía como también eventualmente de aloploidía. También podría ser una consecuencia de identificaciones taxonómicas incorrectas, que lleven a considerar que los citotipos considerados, en realidad, no corresponderían realmente a la misma especie. En este género, donde no existe una revisión taxonómica moderna y completa, esto es muy posible.
- Es necesario plantearse o diagramar estudios moleculares en la embriogénesis para resolver cuales son los factores que provienen del polinizador, y que se expresan para producir semillas, ya sea por la vía sexual o por la vía apomíctica.

Bibliografía

- Albach D.C. y Greilhuber J. (2004). Genome size variation and evolution in *Veronica*. *Ann Bot* 94: 897–911. <https://doi.org/10.1093/aob/mch219>.
- Anderson S.N., Johnson C.S., Chesnut J., Jones D.S., Khanday I., Woodhouse M., Li C., Conrad L.J., Russell S.D. y Sundaresan V. (2017). The zygotic transition is Initiated in unicellular plant zygotes with asymmetric activation of parental genomes. *Dev Cell* 43: 349-358. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.10.005>.
- Asker S.E. y Jerling L. (1992). *Apomixis in Plants*. Eds. Boca Raton and London: CRC Press, Inc. Florida, USA. 298 pp.
- Autran D., Huanca Mamani W. y Vielle Calzada J.P. (2005). Genomic imprinting in plants: the epigenetic version of an *Oedipus* complex. *Curr Opin Plant Biol* 8: 19-25. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2004.11.011>.
- Autran D., Baroux C., Raissig M.T., Lenormand T., Wittig M., Grob S., Steimer A., Barann M., Klostermeier U.C., Leblanc O., Vielle-Calzada J.P., Rosenstiel P., Grimanelli D. y Grossniklaus U. (2011). Maternal epigenetic pathways control parental contributions to *Arabidopsis* early embryogenesis. *Cell* 145: 707–719. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.04.014>.
- Baroux C. y Grossniklaus U. (2015). The maternal-to-zygotic transition in flowering plants. Evidence, mechanisms, and plasticity. *Curr Top Dev Biol* 113: 351–371. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2015.06.005>.
- Baroux C., Blanvillain R. y Gallois P. (2001). Paternally inherited transgenes are down-regulated but retain low activity during early embryogenesis in *Arabidopsis*. *FEBS Letters* 509: 11-16.
- Bashaw E.C. y Holt E.C. (1958). Megasporogenesis, embryo sac development and embryogenesis in Dallisgrass, *Paspalum dilatatum* Poir. *Agron J.* 50: 753-756.
- Bashaw E.C., Hovin A.W. y Holt, E.C. (1970). Apomixis, its evolutionary significance and utilization in plant breeding. In: Norman MJT (eds) *Proceeding 11th International Grassland Congress*. Surfers Paradise, Queensland. University of Queensland Press, St. Lucia, pp245-248.

- Bennett H.W. y Burson, B.L. (1971). Effect of culm breakage on seed set in seven *Paspalum* species and an intraspecific hybrid 1. Crop Sci 11: 229–231. <https://doi.org/10.2135/cropsci1971.0011183x001100020018x2wc>.
- Bennett M.D. (1972). Nuclear DNA content and minimum generation time in herbaceous plants. Proc Royal Soc London. Series B. Biol Sci 181: 109–135. <https://doi.org/10.1098/rspb.1972.0042>.
- Bennett M.D. y Leitch I.J. (2010). Plant DNA C-values database. Royal Kew Botanical Garden. UK. URL: <http://data.kew.org/cvalues/homepage.html>.
- Bharathan G. (1996). Reproductive development and nuclear DNA content in angiosperms. Am J Bot 83: 440–451. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1996.tb12725.x>.
- Bonilla J.R. y Quarin C.L. (1997). Diplosporous and aposporous apomixis in a pentaploid race of *Paspalum minus*. Plant Sci 127: 97-104.
- Boutilier K., Offringa R., Sharma V.K., Kieft H., Ouellet T., Zhang L., Hattori J., Liu Ch.M., van Lammeren A.A.M., Miki B.L.A., Custers J.B.M. y van Lookeren Campagne M.M. (2002). Ectopic expression of BABY BOOM triggers a conversion from vegetative to embryonic growth. Plant Cell 14: 1737-1749.
- Brewbaker J.L. (1967). The distribution and phylogenetic significance of binucleate and trinucleate pollen grains in the angiosperms. Am J Bot 54: 1069–1083. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1967.tb10735.x>.
- Brooks M.E., Kristensen K., van Benthem K.J., Magnusson A., Berg C.W., Nielsen A., Skaug H.J., Maechler M. y Bolker B.M. (2017). glmmTMB Balances Speed and Flexibility Among Packages for Zero-inflated Generalized Linear Mixed Modeling. The R Journal, 9(2), 378-400. <https://doi.org/10.32614/RJ-2017-066>.
- Brown W.V. y Emery W.H.P. (1958). Apomixis in the Gramineae: Panicoideae. Am J. Bot 45: 253-263.
- Bruck D.K., y Walker D.A.N.B. (1985). Cell determination during embryogenesis in *Citrus jambhiri*. I. Ontogeny of the epidermis. Bot Gaz 146: 188–195. <https://doi.org/abs/10.1086/337514>.
- Burson B.L. (1975). Cytology of some apomictic *Paspalum* species. Crop Sci. 15: 229-232.

- Burson B.L. (1978). Genome relations between *Paspalum conspersum* and two diploid *Paspalum* species. Can. J. Genet. Cytol. 20: 365-372.
- Burson B.L. (1983). Genetic Investigations of *Paspalum dilatatum* and related species. Proceedings of the XIV International Grassland Congress. 170-173.
- Burson B.L. (1985). Cytology of *Paspalum chacoense* and *P. durifolium* and their relationship to *P. dilatatum*. Bot Gaz 146: 124-129.
- Burson B.L. (1991). Homology of chromosomes of the X genomes in common and Uruguayan dallisgrass, *Paspalum dilatatum*. Genome 34: 950-953.
- Burson B.L. (1997). Apomixis and sexuality in some *Paspalum* species. Crop Sci. 37: 1347-1351.
- Burson B.L. y Bennett H.W. (1970a). Cytology, method of reproduction, band fertility of Brunswickgrass, *Paspalum nicorae* Parodi. Crop Sci 10:184–187.
- Burson B.L. y Bennett H.W. (1970b). Cytology and reproduction of three *Paspalum* species. J Hered 61: 129-132.
- Burson B.L. y Bennett H.W. (1971a). Chromosome numbers, microsporogénesis, and mode of reproduction of seven *Paspalum* species. Crop Sci 11: 292-294.
- Burson B.L. y Bennett H.W. (1971b). Meiotic and reproductive behavior of some introduced *Paspalum* species. J Missis Acad Sci 17: 5-8.
- Burson B.L. y Quarin C.L. (1982). Cytology of *Paspalum virgatum* and its relationship with *P. intermedium* and *P. jurgensii*. Canad J Genet Cytol 24: 219-226.
- Burson B.L. y Hussey M.A. (1998). Cytology of *Paspalum malacophyllum* and its relationship with *P. intermedium* and *P. jurgensii*. Canad J Genet Cytol 24: 219-226.
- Burson B.L., Lee H., y Bennett H.W. (1973). Genome relations between tetraploid *Paspalum dilatatum* and four diploid *Paspalum* species. Crop Sci 13: 739–743.
<https://doi.org/10.2135/cropsci1973.0011183x001300060045x>.
- Burson B.L., Voigt P.W. y Evers G.W. (1991). Cytology, reproductive behavior, and forage potential of hexaploidy dallisgrass biotypes. Crop Sci. 31: 636-641.
- Burton G.W. (1948). Artificial fog facilitates *Paspalum* emasculation. J Am Soc Agron 40: 281-282.

- Butterfass Th. (1995). Reproduction and continuity of chloroplasts in spermatophytes. *Bot Rev* 61:1–27. <https://www.istor.org/stable/4354245>.
- Cáceres M.E.; Matzk F.; Busti A.; Pupilli F. y Arcioni, S. (2001). Apomixis and sexuality in *Paspalum simplex*: characterization of the mode of reproduction in segregating progenies by different methods. *Sex. Plant Reprod* 14: 201–206. <https://doi.org/10.1007/s00497-001-0109-1>.
- Caponio I y Quarin C.L. (1987). El sistema genético de *Paspalum simplex* y de un híbrido interespecífico con *P. dilatatum*. *Kurtziana* 19: 35–45.
- Caponio I. y Quarin C.L. (1993). Cytology and reproduction of *Paspalum densum* and its genomic relationship with *P. intermedium* and *P. urvillei*. *J Hered* 84: 220–222. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a111323>.
- Carman J. G. (1997). Asynchronous expression of duplicate genes in angiosperms may cause apomixis, bispory, tetraspory, and polyembryony. *Biol J Linn Soc* 61: 51–94. <https://doi.org/10.1006/bjil.1996.0118>.
- Chase A. (1929). This is a reproduction of a library book that was digitized by Google as part of an ongoing effort to preserve the information in books and make it universally accessible. *Biologia Centrali-America* 2: 413.
- Chase A. (1939). *Paspalum* of South America. Hitchcock and Chase Library, Botany Department, Smithsonian Institution, Washington, D.C. Unpublished manuscript.
- Chrtek J., Zahradníček J., Krak K., y Fehrer J. (2009). Genome size in *Hieracium* subgenus *Hieracium* (Asteraceae) is strongly correlated with major phylogenetic groups. *Ann Bot* 104: 161–178. <https://doi.org/10.1093/aob/mcp107>.
- Conner J.A., Mookkan M., Huo H., Chae K. y Ozias-Akins P. (2015). A parthenogenesis gene of apomictic origin elicits embryo formation from unfertilized eggs in a sexual plant. *PNAS* 8: 11205–11210. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1505856112.
- Conner J.A., Podio M., y Ozias-Akins P. (2017). Haploid embryo production in rice and maize induced by PsASGR-BBML transgenes. *Plant Reprod.* 30: 41–52. <https://doi.org/10.1007/s00497-017-0298-x>.
- Crouse H.V. (1960). The controlling element in sex chromosome behavior in *Sciara*. *Genetics*

- 45: 1429–1443. <https://doi.org/10.1093/genetics/45.10.1429>.
- Dahmer N., Schifino-Wittmann M.T., Dall'Agnol M., y De Castro B. (2008). Cytogenetic data for *Paspalum notatum* Flüge accessions. *Sci Agric* 65: 381–388. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162008000400009>.
- Del Toro-De León G., García-Aguilar M., y Gillmor C.S. (2014). Non-equivalent contributions of maternal and paternal genomes to early plant embryogenesis. *Nature* 514: 624–627. <https://doi.org/10.1038/nature13620>.
- Delgado L., Galdeano F., Sartor M.E., Quarín C.L., Espinoza F., y Ortiz J.P.A. (2014). Analysis of variation for apomictic reproduction in diploid *Paspalum rufum*. *Ann Bot* 113: 1211–1218. <https://doi.org/10.1093/aob/mcu056>.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G. y González L. InfoStat versión 2014. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M. y Robledo C.W. InfoStat versión 2020. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.
- Dilkes B.P. y Comai L. (2004). A differential dosage hypothesis for parental effects in seed development. *Plant Cell* 16: 3174–3180. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.161230>.
- Ehlenfeldt M.K., y Hanneman R.E. (1988). Genetic control of endosperm balance number (EBN): three additive loci in a threshold-like system. *Theor Appl Genet* 75: 825–832. <https://doi.org/10.1007/BF00258041>.
- Enke N., Fuchs J. y Gemeinholzer B. (2011). Shrinking genomes? Evidence from genome size variation in *Crepis* (Compositae). *Plant Biol* 13: 185–193. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2010.00341.x>.
- Ernst A. (1918). Bastardierung als ursache der apogamie im Plazenreich. Ed. Jena Verlag von Gustav Fischer. Abbildungen, Germany. 665 pp.
- Ford H., y Richards A.J. (1985). Isozyme variation within and between *Taraxacum* agamospecies in a single locality. *Heredity* 55: 289–291. <https://doi.org/10.1038/hdy.1985.110>.

- Espinoza F. y Quarin C.L. (1997). Cytoembriology of *Paspalum chaseanum* and sexual diploid biotypes of two *Paspalum* species. *Aust J Bot* 45: 871-877.
- Espinoza F; Daurelio L.D.; Pessino S.C., Valle E.M. y Quarin C.L. (2006). Genetic Characterization of *Paspalum notatum* accessions by AFLP markers. *Pl Syst Evol* 258: 147-159.
- Galdeano F., Urbani M.H., Sartor M.E., Honfi A.I., Espinoza F. y Quarin C.L. (2016). Relative DNA content in diploid, polyploid, and multiploid species de *Paspalum* (Poaceae) with relation to reproductive mode and taxonomy. *J Plant Res* 129: 697-710. <https://doi.org/10.1007/s10265-016-0813-4>.
- Gifford E.M. y Foster A.S. (1989). Morphology and evolution of vascular plants. 3er Edition. W.H. Freeman and Co, New York. 626 pp.
- Golden T.A., Schauer S.E., Lang J.D., Pien S., Mushegian A.R., Grossniklaus U., Meinke D.W. y Ray A. (2002). *SHORT INTEGUMENTS1/SUSPENSOR1/CARPEL FACTORY*, a dicar homolog, is a maternal effect gene required for embryo development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 130: 808-822.
- Greilhuber J., Doležel J., Lysák M.A., y Bennett M.D. (2005). The origin, evolution and proposed stabilization of the terms “genome size” and “C-value” to describe nuclear DNA contents. *Ann Bot* 95: 255–260. <https://doi.org/10.1093/aob/mci019>.
- Grimanelli D., Perotti E., Ramirez J y Leblanc O. (2005). Timing of the maternal-to-zygotic transition during early seed development in maize. *Plant Cell* 17: 1061-1072.
- Grossniklaus U. (2001). From sexuality to apomixis: molecular and genetic approaches. The Flowering of Apomixis: From mechanisms to Genetic Engineering (Savidan, Y. et al., Eds.), CIMMYT, México. Ch 12: 168-200.
- Grossniklaus U., Spillane C., Page D.R. y Köhler C. (2001). Genomic imprinting and seed development: endosperm formation with and without sex. *Curr Opin Plant Biol* 4: 21-27. [https://doi.org/10.1016/s1369-5266\(00\)00130-8](https://doi.org/10.1016/s1369-5266(00)00130-8).
- Haig D. (1990). New perspectives on the angiosperm female gametophyte. *Bot Rev* 56: 236–274. <https://doi.org/10.1007/BF02858326>.
- Haig D. (2000). The Kinship theory of genomic imprinting. *Ann Rev Ecol Syst* 31: 9–32.

<https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.31.1.9>.

Haig D. (2014). Coadaptation and conflict, misconception and muddle, in the evolution of genomic imprinting. *Heredity* 113: 96–103. <https://doi.org/10.1038/hdy.2013.97>.

Haig D. y Westoby M. (1989). Parent-specific gene expression and the triploid endosperm. *Am Naturalist* 134: 147-155.

Hanna W.W. y Bashaw E.C. (1987). Apomixis: its identification and use in plant breeding 1. *Crop Sci* 27: 1136–1139. <https://doi.org/10.2135/cropsci1987.0011183x002700060010x>.

Hartig F. (2022). *_DHARMa: Residual Diagnostics for Hierarchical (Multi-Level / Mixed) Regression Models_*. R package version 0.4.6, <<https://CRAN.R-project.org/package=DHARMa>>.

Hayman D.L. (1956). Cytological evidence of apomixis in Australian *Paspalum dilatatum*. *J Aust Inst Agric Sci* 22: 292-293.

Hojsgaard D.H., Martínez E.J. y Quarín C.L. (2013). Competition between meiotic and apomictic pathways during ovule and seed development results in clonality. *New Phytol* 197: 336–347. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04381.x>.

Hojsgaard D.H., Burson B.L., Quarín C.L. y Martínez E. J. (2016). Unravelling the ambiguous reproductive biology of *Paspalum malacophyllum*: a decades old story clarified. *Gen Resour Crop Evol* 63: 1063–1071. <https://doi.org/10.1007/s10722-015-0303-x>.

Hojsgaard D.H., Schegg E., Valls J.F.M., Martínez E.J. y Quarín C.L. (2008). Sexuality, apomixis, ploidy levels, and genomic relationships among four *Paspalum* species of the subgenus *Anachyris* (Poaceae). *Flora* 203: 535–547. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2007.09.005>.

Huang B.Q. y Russell S.D. (1992). Female Germ Unit: Organization, isolation, and function. *Inter. Rev Cytol* 140: 233–293. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)61099-2](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)61099-2).

Jarret R.L., Ozias-Akins P., Phatak S., Nadimpalli R., Duncan R. y Hiliard S. (1995). DNA contents in *Paspalum* spp. determined by flow cytometry. *Genetic Resour. Crop Evol* 42: 237–242. <https://doi.org/10.1007/BF02431258>.

Johnston S.A. (1980). The role and nature of genic balance in endosperm development. PhD

- thesis, University of Wisconsin-Madison, 157 p.
- Johnston S.A. y Hanneman R.E. Jr. (1980). Support of the endosperm balance number hypothesis utilizing some tuberbearing *Solanum* species. *Am. Potato J* 57: 7-14.
- Johnston S.A., Den Nijs T.P.M., Peloquin S.J. y Hanneman R.E. Jr. (1980). The significance of genetic balance to endosperm development in interspecific crosses. *Theor Appl Genet* 53: 262-269.
- Johnston J.S., Bennett M.D., Rayburn A.L., Galbraith D.W. y Price H.J. (1999). Reference standards for determination DNA content of plant nuclei. *Am J Bot* 86: 609–613. <https://doi.org/10.2307/2656569>.
- Johnston J.S., Pepper A.E., Hall A.E., Chen Z.J., Hodnett G., Drabek J., Lopez R. y Price H.J. (2005). Evolution of genome size in Brassicaceae. *Ann Bot* 95: 229–235. <https://doi.org/10.1093/aob/mci016>.
- Kermicle J.L. (1970). Dependence of the R-mottled aleurone phenotype in maize on mode of sexual transmission. *Genetics* 66: 69-85. <https://doi.org/10.1093/genetics/66.1.69>.
- Knight C.A., Molinari N.A. y Petrov D.A. (2005). The large genome constraint hypothesis: evolution, ecology and phenotype. *Ann Bot* 95: 177–190. <https://doi.org/10.1093/aob/mci011>.
- Knox R.B. (1984). 5 The Pollen Grain. *In*: B.M. Johri (eds.), *The biology of the male gamete*. Biol. J. Linn. Soc. 7 (Supplement). Academy Press, London.
- Knox R.B., Williams E.G. y Dumas, (1986). Pollen, pistil, and reproductive function in crop plants. *In*: Jules Janick (eds.). *The Avi Publishing Co., Wesport. USA.* 4: 9-79. <https://doi.org/10.1002/9781118061015.ch2>.
- Köhler C. y Grossniklaus U. (2005). Seed development and genomic imprinting in plants. *Progress in Molecular and Subcellular Biology* P. Jeanteur (Ed.) *Epigenetics and Chromatin*. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg. 237-262.
- Koltunow A.M. (1993). Apomixis: Embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. *Plant Cell* 5: 1425-1437. <https://doi.org/10.2307/3869793>.
- Labani R.M. y Elkington T.T. (1987). Nuclear DNA variation in the genus *Allium* L. (Liliaceae). *Heredity* 59: 119–128. <https://doi.org/10.1038/hdy.1987.103>.

- Leitch I.J. y Bennett M.D. (2004). Genome downsizing in polyploid plants. *Biol J Linn Soc* 82: 651–663. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2004.00349.x>.
- Lenth R (2023). *_emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means_*. R package version 1.8.6, <<https://CRAN.R-project.org/package=emmeans>>.
- Lin B.Y. (1984). Ploidy barrier to endosperm development in maize. *Genetics* 107: 103–115.
- Lüdtke D (2018). “ggeffects: Tidy Data Frames of Marginal Effects from Regression Models.” *Journal of Open Source Software*, 3(26), 772. <<https://doi.org/10.21105/joss.00772>>.
- MacGillivray C.W. y Grime J.P. (1995). Genome size predicts frost resistance in British herbaceous plants: Implications for rates of vegetation response to global warming. *Funct Ecol* 9: 320-325. <https://doi.org/10.2307/2390580>.
- Maheshwari P. (1950). *An Introduction to the Embryology of Angiosperms*. New York. Eds. MacGraw-Hill Book Co. Pp 453.
- Martínez E.J., Urbani M.H., Quarín C.L. y Ortiz J.P.A. (2001). Inheritance of apospory in bahiagrass, *Paspalum notatum*. *Hereditas* 135: 19-25. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.2001.00019.x>.
- Mascarenhas J.P. (1989). The male gametophyte of flowering plants. *Plant Cell* 1: 657-664. <https://doi.org/10.2307/3868955>.
- Matzk F., Meister A. y Schubert I. (2000). An efficient screen for reproductive pathways using mature seeds of monocots and dicots. *Plant J* 21: 97–108. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3113X.2000.00647.x>.
- Matzk F., Hammer K. y Schubert I. (2003). Coevolution of apomixis and genome size within the genus *Hypericum*. *Sex Plant Reprod* 16: 51–58. <https://doi.org/10.1007/s00497-003-0174-8>.
- Montgomery S.A. y Berger F. (2021). The evolution of imprinting in plants: beyond the seed. *Plant Reprod* 34: 373–383. <https://doi.org/10.1007/s00497-021-00410-7>.
- Morison I.M. y Reeve A.E. (1998). A catalogue of imprinted genes and parent-of-origin effects in humans and animals. *Hum Mol Genet* 7: 1599–1609.
- Naumova T.N. y Vielle-Calzada J.P. (2001). Ultrastructural analysis of apomictic

- development. In: The Flowering of Apomixis: From Mechanisms to Genetic Engineering. Savidan Y.; Garman; J.G. Dresselhaus, T. (eds.). CIMMYT, IRD, The European Commission DG VI (FAIR). D. F., México. pp. 44-63.
- Nordine M.D. y Bartel D.P. (2012). Maternal and paternal genomes contribute equally to the transcriptome of early plant embryos. *Nature* 482: 94–97.
<https://doi.org/10.1038/nature10756>.
- Nogler G.A. (1984). In: Embryology of Angiosperms. Cap. 10 Gametophytic Apomixis. Ed. B.M. Johri. 475-518.
- Norrman G.A. (1981). Citología y método de reproducción en dos especies de *Paspalum* (Gramineae). *Bonplandia* 5: 149-158.
- Norrman G.A., Quarin C.L. y Burson B.L. (1989). Cytogenetics and reproductive behavior of different chromosome races in six *Paspalum* species. *J. Hered* 80: 24-28.
- Norrman G.A., Quarin C.L. y Killeen T.J. (1994). Chromosome numbers in Bolivian grasses. *Ann Miss Bot Garden* 81: 768-774.
- Novo P.E., Espinoza F. y Quarin C.L. (2013). An apomictic tetraploid *Paspalum chaseanum* cytotype and its cytogenetic relationship with *P. plicatulum* (Poaceae): taxonomic and genetic implications. *Aust J Bot* 61: 538-543.
- Noyes R.D. y Rieseberg L.H. (2000). Two independent loci control agamospermy (Apomixis) in the triploid flowering plant *Erigeron annuus*. *Genetics* 155:379-390.
<https://doi.org/10.1093/genetics/155.1.379>.
- Ohri D. (1998). Genome size variation and plant systematics. *Ann Bot* 82: 75–83.
<https://doi.org/10.1006/anbo.1998.0765>.
- Ohri D, y Khoshoo T.N. (1986). Genome size in Gymnosperm. *Plant Syst Evol* 153: 119–132.
- Ohri D., Fritsch R.M. y Hanelt P. (1998). Systematics and Plant Evolution of genome size in *Allium* (Alliaceae). *Plant Syst Evol* 210: 57–86.
- Ortiz J.P.A., Pessino S.C., Leblanc O., Hayward M.D. y Quarin C.L. (1997). Genetic fingerprinting for determining the mode of reproduction in *Paspalum notatum*, a subtropical apomictic forage grass. *Theor Appl Genet* 95: 850-856.
<https://doi.org/10.1007/s001220050635>.

- Ortiz J.P.A., Quarin C.L., Pessino S.C., Acuña C., Martinez E.J., Espinoza F., Hojsgaard D.H., Sartor M.E., Cáceres M.E. y Pupilli F. (2013). Harnessing apomictic reproduction in grasses: what we have learned from *Paspalum*. *Ann Bot* 112: 767–787. <https://doi.org/10.1093/aob/mct152>.
- Ozias-Akins P. y van Dijk P.J. (2007). Mendelian genetics of apomixis in plants. *Annu Rev Genet* 41: 509-537. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.40.110405.090511>.
- Parodi L. (1969). Estudios sistemáticos sobre las Gramineae-Paniceae argentinas y uruguayas. *Darwiniana* 15: 65-111. <https://www.jstor.org/stable/23213794>.
- Parodi L.R. y Nicora E.G. (1966). Apuntes para una monografía del género *Paspalum* (inédito).
- Pichot C., El Maâtaoui M., Raddi S. y Raddi P. (2001). Surrogate mother for endangered *Cupressus*. *Nature* 178: 39.
- Pritchard A.J. (1970). Meiosis and embryo sac development in *Urochloa mosambicensis* and three *Paspalum* species. *Austr J Agric Res* 21: 648-652.
- Quarin C.L. (1992). The nature of apomixis and its origin in Panicoid grasses. *Apomixis News* 5: 8-15.
- Quarin C.L. (1994). A tetraploid cytotype of *Paspalum durifolium*: cytology, reproductive behavior and its relationship to diploid *P. intermedium*. *Hereditas* 121: 115-118.
- Quarin C.L. (1999). Effect of pollen source and pollen ploidy on endosperm formation and seed set in pseudogamous apomictic *Paspalum notatum*. *Sex Plant Reprod* 11:331-335.
- Quarin C.L. y Burson B.L. (1991). Cytology of sexual and apomictic *Paspalum* species. *Cytologia* 56: 223-228.
- Quarin C. L. y Hanna W.W. (1980a). Effect of three ploidy levels on meiosis and mode of reproduction in *Paspalum hexastachyum*. *Crop Sci* 20: 69-75. <https://doi.org/10.2135/cropsci1980.0011183x002000010016x>.
- Quarin C.L. y Hanna W.W. (1980b). Chromosome behavior, embryo sac development, and fertility of *Paspalum modestum*, *P. boscianum*, and *P. conspersum*. *J Hered* 71: 419-422.
- Quarin C.L. y Norrmann G.A. (1987). Cytology and reproductive behavior of *Paspalum*

- equitans*, *P. ionanthum*, and their hybrids with diploid and tetraploid cytotypes of *P. cromyorrhizon*. Bot Gaz 148: 386-391.
- Quarin C.L. y Caponio I. (1995). Cytogenetics and reproduction of *Paspalum dasyleurum* and its hybrids with *P. urvillei* and *P. dilatatum* ssp. *flavescens*. Int. J Plant Sci 156: 232-235.
- Quarin C.L., Hanna W.W. y Fernández A. (1982). Genetic studies in diploid and tetraploid *Paspalum* species. J Hered 73: 254-256. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a109634>.
- Quarin C.L., Burson B.L. y Burton G.W. (1984). Cytology of intra- and interspecific hybrids between two cytotypes of *Paspalum notatum* and *P. cromyorrhizon*. Bot Gaz 145: 420-426.
- Quarin C.L., Valls J.F.M. y Urbani M.H. (1997). Cytological and reproductive behaviour of *Paspalum atratum*, a promising forage grass for the tropics. Trop Grassl 31: 114-116.
- Quarin C.L., Espinoza F., Martínez E.J., Pessino S.C. y Bovo O. (2001). A rise of ploidy level induces the expression of apomixis in *Paspalum notatum*. Sex Plant Reprod 13: 243–249.
- Quarin C.L., Urbani M.H., Blount A.R., Martínez E.J., Hack C.M., Burton G.W. y Quesenberry K.H. (2003). Registration of Q4188 and Q4205, sexual tetraploid germplasm lines of Bahiagrass. Crop Sci 43: 745-746.
- Raven J.A. (1999). The size of cells and organisms in relation to the evolution of embryophytes. Plant Biol 1: 2–12. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.1999.tb00702.x>.
- R Core Team (2023). *_R: A Language and Environment for Statistical Computing_*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <<https://www.R-project.org/>>.
- Rebozzio R.N. (2009). La sexualidad en genotipos apomícticos de *Paspalum notatum* y las relaciones entre letalidad y sistema reproductivo. Tesis Doctoral. Doctorado de la UNNE “Área de Recursos Naturales”. Argentina.
- Rebozzio R.N., Sartor M.E., Quarín C.L., y Espinoza F. (2011). Residual sexuality and its seasonal variation in natural apomictic *Paspalum notatum* accessions. Biol Plant 55:

391–395.

Rejmanek M. y Richardson D.M. (1996). What attributes make some plant species more invasive?. *Ecol* 77: 1655–1661.

Riera-Lizarazu O., Rines H.W., y Phillips R.L. (1996). Cytological and molecular characterization of oat x maize partial hybrids. *Theor Appl Genet* 93: 123–135.
<https://doi.org/10.1007/BF00225737>.

Rodrigues J.A. y Zilberman D. (2015). Evolution and function of genomic imprinting in plants. *Genes & Devel* 29: 2517–2531. <https://doi.org/10.1101/gad.269902.115>.

Rosenberg O. 1907. Cytological studies on the apogamy in *Hieracium*. By: Saetrik af Botanisk Tidsskrift, Kobenhavn 28, 143-170.

Rosenberg O. (1930). Apogamie und Parthenogenesis bei Pflazen. *Handb. Vererb. II. L.* Berlin. p 66.

Rosso V.C., Valls J.F.M., Quarin C.L., Speranza P.R. y Rua G.H. (2022). New entities of *Paspalum* and a synopsis of the Dilatata group. *Syst Bot* 47: 125-139.
<https://doi.org/10.1600/036364422X16442668423437>.

Rua G.H. y Speranza P.R. (2010). A phylogenetic analysis of the genus *Paspalum* (Poaceae) based on cpDNA and morphology. *Plant Syst Evol* 288 227–243.
<https://doi.org/10.1007/s00606-010-0327-9>.

Rutishauser A. (1948). Pseudogamie und Polymorphie in der Gattung *Potentilla*. *Arch Julius Klaus-Stift Vererbungsforsch* 23: 267-424.

Sartor M.E. Quarin C.L., Urbani M.H. y Espinoza F. (2011). Ploidy levels and reproductive behaviour in natural populations of five *Paspalum* species. *Plant Syst Evol* 293: 31–41.
<https://doi.org/10.1007/s00606-011-0416-4>.

Savidan Y. (1978). L'apomixie gamétophytique chez les Graminées et son Utilisation en Amélioration des Plantes. *Ann. Amélior. Plantes* 28:1-9.

Savidan Y.H. (1982). Embryological analysis of facultative apomixis in *Panicum maximum* Jacq. *Crop Sci* 22:467-469.
<https://doi.org/10.2135/cropsci1982.0011183X002200030007x>.

Savidan Y.H. (2000). Apomixis: Genetics and Breeding. *Plant Breed Rev* 18: 13-86.

[https://doi:10.1002/9780470650158.ch2](https://doi.org/10.1002/9780470650158.ch2).

- Sazhenova E.A. y Lebedev I.N. (2021). Evolutionary aspects of genomic imprinting. *Mol Biol (Mosk)* 55:3-19. <https://doi.org/10.31857/S0026898420060105>.
- Schon M.A. y Nodine M.D. (2017). Widespread contamination of arabidopsis embryo and endosperm transcriptome data sets. *Plant Cell* 29: 608–617. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00845>.
- Scholten S., Lorz H. y Kranz E. (2002). Paternal mRNA and protein synthesis coincides with male chromatin decondensation in maize zygotes. *Plant J* 32: 221–231.
- Siena L.A., Sartor M.E., Espinoza F., Quarín C.L. y Ortiz J.P.A. (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.
- Smith J. (1841). Notice of a plant which produces seeds without any apparent action of pollen. *Trans Linnean Soc* p. 18.
- Smith B.W. (1948). Hybridity and apomixis in the perennial grass, *Paspalum dilatatum*. *Genetics* 33: 628-629.
- Snyder L.A. 1957. Apomixis in *Paspalum secans*. *Am J Bot* 44: 318-324.
- Sorensen M.B., Chaudhury A.M., Robert H., Bancharel E. y Berger F. (2001). Polycomb group genes control pattern formation in plant seed. *Curr Biol* 11: 277–281.
- Tadros W., y Lipshitz H. D. (2009). The maternal-to-zygotic transition: A play in two acts. *Development* 136: 3033–3042. <https://doi.org/10.1242/dev.033183>.
- Tzafrir I., Pena-Muralla R., Dickerman A., Berg M., Rogers R., Hutchens S., Sweeney T.C., McElver J., Aux G., Patton D. y Meinke, D. (2004). Identification of genes required for embryo development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 135, 1206–1220.
- Tucker M.R. y Koltunow A.M.G. (2009). Sexual and asexual (apomictic) seed development in flowering plants: molecular, morphological and evolutionary relationships. Review. *Funct. Plant Biol* 36: 490-504. <https://doi.org/10.1071/FP09078>.
- Tucker M.R., Araujo A.G., Paech N.A., Hecht V., Schmidt E.D.L., Rossell J., de Vries S.C. y Koltunow A.M.G. (2003). Sexual and apomictic reproduction in *Hieracium* subgenus *Pilosella* are closely interrelated developmental pathways. *Plant Cell* 15: 1524–1537.

<https://doi.org/10.1105/tpc.011742>.

- Urbani M.H., Quarin C.L., Espinoza F., Penteado M.I.O. y Rodrigues I.F. (2002). Cytogeography and reproduction of the *Paspalum simplex* polyploid complex. *Plant Syst Evol* 236: 99- 105.
- Vaio M., Mazzella C., Porro V., Speranza P., López-Carro B., Estramil E. y Folle G.A. (2007). Nuclear DNA content in allopolyploid species and synthetic hybrids in the grass genus *Paspalum*. *Plant Syst Evol* 265: 109–121. <https://doi.org/10.1007/s00606-006-0506-x>.
- Walbot V. (1996). Sources and consequences of phenotypic and genotypic plasticity in flowering plants. *Trends Plant Sci* 1: 27–32. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(96\)80020-3](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(96)80020-3).
- Weijers D., Geldner N., Offringa R., y Jurgens, G. (2001). Seed development: Early paternal gene activity in *Arabidopsis*. *Nature* 414: 709–710.
- Wickham H., Averick M., Bryan J., Chang W., McGowan L.D., François R., Golemund G., Hayes A., Henry L., Hester J., Kuhn M., Pedersen T.L., Miller E., Bache S.M., Müller K., Ooms J., Robinson D., Seidel D.P., Spinu V., Takahashi K., Vaughan D., Wilke C., Woo K. y Yutani H. (2019). “Welcome to the tidyverse.” *Journal of Open Source Software*, 4(43), 1686. <<https://doi.org/10.21105/joss.01686>>.
- Willemse M.T.M. y Went J.L.V.A.N. (1984). The Female Gametophyte. In: Johri, B.M., ed. *Embryology of angiosperms*. New York: Springer Verlag 159-196.
- Wilms H.J., van Went J.L., Cresti M. y Ciampolini F. (1983). Adventive embryogenesis in citrus. *Caryologia* 36: 65–78. <https://doi.org/10.1080/00087114.1983.10797645>.
- Xia X. (1995). Body temperature, rate of biosynthesis, and evolution of genome size. *Mol Biol Evol* 12: 834–842. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040260>.
- Yamauchi A., Hosokawa A., Nagata H. y Shimoda M. (2004). Triploid Bridge and Role of Parthenogenesis in the Evolution of Autopolyploidy. *Am Nat* 164: 101-112.
- Zhao P. y Sun M.X. (2015). The Maternal-to-Zygotic Transition in Higher Plants: Available Approaches, Critical Limitations, and Technical Requirements. *Curr Top Dev Biol* 113: 373-398. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2015.06.006>.
- Zilli A.L., Hojsgaard D.H., Brugnoli E.A., Acuña C.A., Honfi A.I., Urbani M.H., Quarin C.L. y

Martínez E.J. (2014). Genetic relationship among *Paspalum* species of the subgenus *Anachyris*: Taxonomic and evolutionary implications. *Flora* 209: 604-612.

Zuloaga FO, Morrone O. (2005). Revisión de las especies de *Paspalum* para América del Sur austral. *Ann. Missouri Bot. Garden; Monogr Syst Bot* 102: 1–297.