

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas

DESARROLLO Y ESTRUCTURA DE LA INFLORESCENCIA DE
BRACHIARIA Y *UROCHLOA* (POACEAE: PANICOIDEAE:
PANICEAE) Y SUS IMPLICANCIAS SISTEMÁTICAS

Lic. Renata Reinheimer

Tesis presentada para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas

Director de Tesis: Dr. Fernando O. Zuloaga
Instituto de Botánica Darwinion (IBODA, CONICET)
San Isidro, Buenos Aires, Argentina

Co-Director de Tesis: Dr. Abelardo C. Vegetti
Facultad de Ciencias Agrarias (UNL)
Esperanza, Santa Fe, Argentina

Asesor de Tesis: Dr. Raúl Pozner
Instituto de Botánica Darwinion (IBODA, CONICET)
San Isidro, Buenos Aires, Argentina

- Marzo 2007 -

JURADO DE TESIS

Dra. Ana M. ANTON

Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal
Universidad Nacional de Córdoba
Argentina

Dr. Gabriel BERNALDELLO

Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal
Universidad Nacional de Córdoba
Argentina

Dra. Teresa A. KRAUS

Universidad Nacional de Río Cuarto
Argentina

Dr. José F. PENSIERO (Suplente)

Universidad Nacional del Litoral
Argentina

A mi familia querida...

AGRADEZCO ...

... Al Dr. Fernando Zuloaga, Director de esta Tesis, por haber confiado en mí aún sin conocerme, por guiarme en este camino tan difícil, por su cariño, por escucharme siempre y por su apoyo incondicional. Como así también por sus útiles y por cierto valiosos y acertados consejos, por su constante motivación a nivel científico y personal, por haberme recibido con mucha amabilidad en el Instituto de Botánica Darwinion, y por permitirme un lugar entre ellos. Asimismo, por brindarme el estímulo y apoyo necesario para emprender el viaje a Saint-Louis (USA).

... Al Dr. Abelardo Vegetti, Co-Director de esta Tesis, por dejarme entrar en el maravilloso universo de la morfología de las plantas, y en especial por mostrarme la inmensa diversidad de formas de inflorescencias de Gramíneas, por haberme brindado su constante apoyo y estímulo a nivel científico y personal y, por su cariño característico. Por brindarme el estímulo y apoyo necesario para emprender el viaje hacia USA. Como así también haberme dado la posibilidad de integrar su grupo de trabajo, por tantas ideas y oportunidades.

... Al Dr. Raúl Pozner, Asesor de esta Tesis, por enseñarme el sorprendente mundo del desarrollo de las plantas, por la excelencia en el trabajo, y por su ayuda científica y técnica, que contribuyeron a mi formación en técnicas no antes realizadas. Por su colaboración personal y disposición para compartir sus conocimientos. Asimismo, por los tantos puntos críticos realizados y las cientos y cientos de platinitas de bronce cortadas!

... A la Universidad Nacional del Litoral, Facultad de Ciencias Agrarias (FCA, UNL) y al Instituto de Botánica Darwinion (IBODA, CONICET) por brindarme el espacio físico necesario para llevar a cabo este plan de investigación.

... A Toby Kellogg (UMSL) por escucharme y ver mi trabajo en las Jornadas de Botánica en San Luis (Argentina) y desde ese momento confiar en mí y brindarme todo el apoyo necesario para ir a trabajar al Laboratorio que ella dirige en la University of Missouri Saint Louis. Por permitirme formar parte de su equipo de trabajo por unos meses y enseñarme la fascinante complejidad de la expresión de los genes y la evolución de las gramíneas.

... A Simon Malcomber (UMSL) por su buena disposición, valiosa colaboración y capacitación en la realización de técnicas moleculares que hasta ese momento eran totalmente desconocidas para mí. Por su paciencia y chistes "Ácidos" que tanto me divertían. Por su excelente nivel de trabajo, disposición para compartir sus conocimientos y por seguir estando presente. Asimismo, por enseñarme lo más divertido del *american slang* ... DA BOMB!!

... A Toby Kellogg, Simon Malcomber y Andrew Doust por su admirable capacidad para compartir sus conocimientos y por todas las enseñanzas que me dejaron en relación al desarrollo de las plantas, control génico y evolución del desarrollo, muchas de las cuales quedan plasmadas en esta Tesis.

... A *The Toby's Lab People*, por haberme recibido con mucha amabilidad y hacerme un lugar entre ellos, por la ayuda brindada en todo momento y por los momentos divertidos pasados. Asimismo, por mostrarme el hermoso paisaje de Saint Louis en los tiempos libres.

... A Sandra Aliscioni (BAA) por los hermosos meses compartidos en Saint Louis, horas en el Lab y viajes en MetroLink! Por su contención en los momentos difíciles donde todo parece que está mal, por las risas compartidas y por mostrarme desde el comienzo todo aquello que era necesario para poder adaptarme fácilmente a la vida en Saint Louis.

... A todos aquellos que no dejaron de hacerse presente con e-mails o llamados telefónicos mientras duró la estadía en el exterior, por el constante e incondicional apoyo y estímulo.

... A todos mis compañeros del equipo de investigación de la Cátedra de Morfología Vegetal (UNL) por permitirme un lugar entre ellos, por tantos buenos momentos compartidos, por la calidez humana y por la ayuda brindada en este trabajo. En especial por sus constantes y por cierto necesarios consejos.

... A Fernando Zuloaga, Abelardo Vegetti, Osvaldo Morrone, José Pensiero (Pepe), Gabriel Rúa, Juan de Dios Muñoz y Julio Ramos por tenerme en cuenta cada vez que se cruzaban con alguna *Brachiaria* o *Urochloa*, por darme las coordenadas precisas de donde ubicarlas o directamente, por coleccionar matas o semillas de muchas de las especies estudiadas en esta Tesis.

... A Fernando Zuloaga, Osvaldo Morrone, José Pensiero y Gabriel Rúa por poner a disposición su importante colección de semillas de *Brachiaria*, *Urochloa*, *Eriochloa* y *Melinis*.

... A Gabriel Rúa por su excelente disposición para compartir sus conocimientos y por estar siempre dispuesto a discutir sobre temas relacionados con las homologías y evolución de las inflorescencias, charlas entre las que surgieron muchas de las ideas que quedan expresadas a lo largo de esta tesis.

... A Alicia Amsler, Nicolás Guarise, Julio Ramos y Gustavo Marino y a todos aquellos que no se salvaron de cuidar y regar mis plantitas de *Urochloa* cuando me ausentaba y cada vez que era necesario.

... A Diego Salariato, por haber puesto a disposición sus extracciones de ADN para poder llevar a cabo la amplificación y secuenciación de los genes ITS1, 5.8S e ITS2 y por las lindas y divertidas charlas sobre las nuevas hipótesis de filogenia de *Brachiaria* y *Urochloa*.

... Al Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Botánica Darwinion por permitirme sus instalaciones para poder realizar las amplificaciones de la región comprendida entre ITS1, 5.8S e ITS2 y por brindarme la asistencia técnica necesaria.

... A Fabián Tricarico (MCN) por la excelencia del servicio de Microscopía Electrónica de Barrido del Museo de Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia, buena predisposición y por las facilidades que me brindó en el momento de solicitar turnos, como así también por su destreza para observar y tomar cientos de fotos de inflorescencias en tiempo record.

... A mi amiga paleontóloga Brenda por la literatura ofrecida sobre las diversas eras geológicas y su principales hechos, por el asesoramiento en la interpretación de los datos y por la amistad que perdura a pesar de las distancias.

... A Alicia Amsler por ayudarme con la transcripción de la bibliografía y excicata presentada en esta tesis, por su buena disposición y valiosa colaboración en la lectura y

corrección gramatical de los resultados y discusión. También por los hermosos momentos compartidos, por las risas, las charlas y por su constante apoyo.

... A Silvana Sede y Silvia Denham por su buena disposición, valiosa colaboración y asesoramiento en técnicas cladísticas que fueron muy útiles para la realización del capítulo de filogenia.

... A Liliana Giussani y Osvaldo Morrone por la lectura crítica del capítulo de filogenia, por las sugerencias y comentarios que han sido de gran utilidad para mejorar el capítulo. Por darme el empujón necesario para concluir con la última parte de esta tesis.

... A mi hermano Bruno por el asesoramiento en el manejo del Software Autocad 2004 y por su *tach* "multiestilo" a la hora de orientarme con gran parte del diseño gráfico de este trabajo.

... A Gustavo por estar conmigo siempre, por acompañarme en todo lo que necesito y por el proyecto de vida juntos. Por su ayuda en la redacción cuando ya no encontraba palabras para escribir lo que necesitaba comunicar y por las largas, interesantes y a la vez muy divertidas charlas sobre el significado evolutivo de las inflorescencias. Como así también por ofrecerme su impresora para imprimir gran parte de esta tesis.

... A mis amigos por su incondicional apoyo y estímulo.

... A mis padres, mi hermano, mis abuelos y Gus para quienes no me alcanzan las palabras de agradecimiento, porque sin ellos no soy nadie, por estar siempre y brindarme todo lo que necesito para ser feliz.

... En especial a mis padres queridos, por darme la fuerza y el apoyo necesario para llevar adelante mis proyectos, por guiarme en el intrincado y difícil camino de vida, por enseñarme a vivir. GRACIAS por estar siempre.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de Tesis se difundieron parcialmente a través de las siguientes publicaciones:

✦ Rua G.H. & R. Reinheimer. 2006. Homology of inflorescences revisited. *Journal of Evolutionary Biology* (en evaluación).

✦ Rua G.H. & Reinheimer R. 2006. Inflorescências - Terminologia/classificação e tendências evolutivas em Magnoliophyta (Angiospermae). *En: Mariath JEA & dos Santos RP (Orgs.), Os avanços da Botânica no início do século XXI. Sociedade Botânica do Brasil*, Porto Alegre: 23-29.

✦ Malcomber S. T., J. C. Preston, R. Reinheimer, J. Kossuth and E. A. Kellogg. 2006. Developmental gene evolution and the origin of grass inflorescence diversity. *Advances in Botany Research* 44: 425-481.

✦ Reinheimer R., S. T. Malcomber & E. A. Kellogg. 2006. Evidence for distinct roles of the *SEPALLATA* gene *LEAFY HULL STERILE1* in *Eleusine indica* and *Megathyrsus maximus* (POACEAE). *Evolution & Development*: 8(3): 293–303.

✦ Reinheimer R., R. Pozner & A. C. Vegetti. 2005. Inflorescence, spikelet and floral development in *Panicum maximum* and *Urochloa plantaginea* (Poaceae). *American Journal of Botany* 92: 565-575.

Esta tesis ha sido financiada por los siguientes proyectos:

✦ Beca Doctoral Interna (CONICET). TEMA: Desarrollo y tipología de la inflorescencia de especies sudamericanas de *Brachiaria* y *Urochloa* y sus consecuencias sistemáticas y taxonómicas (Poaceae: Panicoideae: Paniceae). Dirección: Dr. F. O. Zuloaga. Co-Dirección: Dr. A. C. Vegetti y R. Pozner. Lugar de realización: Facultad de Ciencias Agrarias (Universidad Nacional del Litoral), Esperanza, Santa Fe, Argentina e Instituto de Botánica Darwinion (IBODA – CONICET), San Isidro, Buenos Aires, Argentina.

✦ PIP-5453. Subsidio otorgado por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). TEMA: “Estudios filogenéticos, sistemáticos, de desarrollo y biogeográficos en géneros de Paniceae (Poaceae): su importancia en la biodiversidad y conservación de las gramíneas nativas”. Dirigido por O. Morrone. 2005-2007.

✦ PICT-2003. 01-13374. Subsidio aprobado por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCYT). TEMA: “Estudios sistemático-moleculares, de desarrollo y fenotípicos en géneros forrajeros y cerealeros de la tribu Paniceae (Poaceae, Panicoideae); su implicancia en la biodiversidad y conservación de plantas nativas”. Dirigido por O. Morrone. 2005-2007.

✦ DBI-0110189 National Science Foundation Grant. TEMA: “Regulation of Inflorescence Architecture in Maize”. Dirigido por: Elizabeth A. Kellogg. Año: 2004.

✦ PIP-02131. Resolución 962. Subsidio otorgado por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). TEMA: “Estudios filogenéticos, biogeográficos, moleculares y morfológicos en la tribu Paniceae (Poaceae)”. Dirigido por O. Morrone.. 2003-2005.

✦ PICT-2002 01-11739. Subsidio aprobado por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCYT). TEMA: “Patrones evolutivos, de desarrollo, fenotípicos y biogeográficos en géneros forrajeros y cerealeros de la tribu Paniceae (Poaceae, Panicoideae)”. Dirigido por O. Morrone. 2004-2006.

✦ PIP CONICET 2935/99 (Resolución 1231/03). TEMA: "Reevaluación de la morfología de las inflorescencias en Paniceae (Panicoideae - Poaceae)". Subsidio otorgado por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Director: A. Vegetti. 2003-2006

✦ UNL-CAI+D 2002. Resol. HCS 278/02. TEMA: “Reevaluación de las inflorescencias en especies sudamericanas de *Panicum* (Panicoideae - Poaceae)”. Director: A. Vegetti.

✦ UNL-CAID+D 2006. Resol. HCS 119/06). TEMA: “La inflorescencia de las Paniceae (Poaceae: Panicoideae: Paniceae)”. Directora: Renata Reinheimer.

Abreviaturas	XI
Resumen	XIII
Abstract	XV
1. Introducción	1
1.1 La familia Poaceae	2
1.2 Subfamilia Panicoideae	12
1.3 Tribu Paniceae	12
1.4 <i>Brachiaria</i> y <i>Urochloa</i> , su posición en la filogenia de Paniceae y su relación con otros géneros	14
1.4.1 Características de los géneros afines y su relación con <i>Brachiaria</i> y <i>Urochloa</i>	15
1.4.2 Variación morfológica entre <i>Brachiaria</i> , <i>Urochloa</i> y los géneros afines	19
1.5 <i>Brachiaria</i> y <i>Urochloa</i>	21
1.5.1 Delimitación taxonómica	21
1.5.2 La filogenia de <i>Brachiaria</i> y <i>Urochloa</i>	24
1.5.3 Distribución e importancia económica de <i>Brachiaria</i> y <i>Urochloa</i>	25
1.5.4 Características de <i>Brachiaria</i> y <i>Urochloa</i>	27
1.5.5 Las inflorescencias de <i>Brachiaria</i> , <i>Urochloa</i> y los géneros afines	29
1.6 Estudios que permiten comprender la variación morfológica de las inflorescencias	31
1.6.1 Estudio comparado de la variación morfológica de las inflorescencias adultas	31
1.6.2 Estudio de los patrones de desarrollo de las inflorescencias	33
1.6.3 Estudios de genética del desarrollo (Evo-Devo)	35
1.6.4 Hipótesis de trabajo	39
2. Objetivos	40
2.1 Objetivo general	41
2.2 Objetivos específicos	41
3. Materiales y métodos	43
3.1 Cultivo de material para estudios tipológicos y de desarrollo	44
3.2 Estudios sobre la morfología comparada de las inflorescencias adultas	45

3.3 Estudios de desarrollo	46
3.4 Estudios anatómico-histológicos	48
3.5 Análisis filogenético y estudio preliminar de la evolución de las inflorescencias	49
3.5.1 <i>Extracción, amplificación y secuenciación de ADN</i>	49
3.5.2 <i>Análisis filogenético: alineamiento, estrategias de búsqueda y medidas de apoyo</i>	52
3.6 Estudios de Expresión génica a nivel floral	54
3.6.1 <i>Material estudiado</i>	54
3.6.2 <i>Aislamiento de cDNA, PCR, subclonado y secuenciación</i>	55
3.6.3 <i>Análisis filogenético</i>	55
3.6.4 <i>Hibridaciones in-situ</i>	56
3.6.5 <i>Análisis de Southern blot</i>	57
4. Resultados	58
4.1 Estructura de la inflorescencia	59
4.1.1 <i>Zonación de la sinflorescencia</i>	59
4.1.2 <i>Presencia de zona de enriquecimiento en la región del trofotagma</i>	60
4.1.3 <i>Variaciones tipológicas en la unidad de inflorescencia (UIF)</i>	66
4.1.4 <i>Tipos y subtipos de UIF</i>	74
4.2 Desarrollo del sistema de ramificación de la inflorescencia, espiguilla y flor	105
4.2.1 <i>Sistema de ramificación de la UIF</i>	105
4.2.2 <i>Desarrollo tardío de la inflorescencia</i>	114
4.2.3 <i>Desarrollo de las espiguillas</i>	154
4.2.4 <i>Desarrollo floral</i>	162
4.2.5 <i>Anatomía del desarrollo floral</i>	172
4.3 Genética del desarrollo floral	208
4.3.1 <i>Desarrollo de la espiguilla de <i>Eleusine indica</i> y <i>Megathyrsus maximus</i></i>	208
4.3.2 <i>Aislamiento de ortólogos de LHS1 de <i>E. indica</i> y <i>M. maximus</i></i>	210
4.3.3 <i>Patrones de expresión de LHS1</i>	213

4.3.4 <i>Evolución de la expresión de LHS1</i>	219
4.4 Filogenia	221
4.4.1 <i>Datos moleculares</i>	221
4.4.2 <i>Análisis filogenético</i>	222
4.4.3 <i>Evolución de las inflorescencias</i>	231
5. Discusión	240
5.1 La estructura adulta de la inflorescencia	241
5.1.1 <i>Truncamiento</i>	246
5.1.2 <i>Homogeneización</i>	248
5.2 Desarrollo	251
5.2.1 <i>Cambios en el ápice relacionados con la transición a floración</i>	251
5.2.2 <i>Desarrollo del sistema de ramificación de la UIF</i>	253
5.2.3 <i>Desarrollo de las espiguillas</i>	267
5.2.4 <i>Desarrollo floral</i>	274
5.2.7 <i>Anatomía del desarrollo</i>	287
5.3 Genética del desarrollo	288
5.3.1 <i>La ausencia de expresión en el gineceo posiblemente caracterice a la tribu Paniceae</i>	289
5.3.2 <i>La expresión de LHS1 se correlaciona con el orden en que maduran las flores</i>	290
5.3.3 <i>La expresión de LHS1 no se correlaciona con la determinación del sexo de las flores</i>	291
5.3.4 <i>LHS1 se expresa en la pálea y la lemma de todas las especies estudiadas</i>	292
5.4 Filogenia	295
5.4.1 <i>Posibles evidencias de una rápida radiación adaptativa en el complejo Brachiaria-Urochloa</i>	300
5.4.2 <i>El posible origen del complejo Brachiaria-Urochloa y el comienzo de la radiación adaptativa</i>	302
5.4.3 <i>Evolución de las inflorescencias</i>	307
6. Conclusiones	311
7. Bibliografía	316
8. Apéndices	338

8.1 Apéndice 1	339
8.2 Apéndice 2	370
8.3 Apéndice 3	389
8.4 Apéndice 4	407
8.5 Apéndice 5	415

A: antera	Mfd: meristema floral distal
C: carpelo	Mfp: meristema floral proximal
CMP: célula madre del polen	Msg: meristema de la espiguilla
Co: tejido conectivo del estambre	O: óvulo
Cof: coflorescencia	P: paniculodium no truncado
E: estambre	Pa: pálea
Ega: estigma	PcH: paniculodium no truncado completamente homogeneizado
Elo: estilo	PnH: paniculodium no truncado no homogeneizado
EP: eje principal	PpH: paniculodium no truncado parcialmente homogeneizado
Fi: filamento del estambre	PT: paniculodium truncado
Fl: flor	PTcH: paniculodium truncado completamente homogeneizado
FP: florescencia principal	PTpH: paniculodium truncado parcialmente homogeneizado
G: gineceo	R: rama o paracladio
Ga: gineceo abortado	R¹: rama o paracladio de primer orden
GL1: gluma inferior	R²: rama o paracladio de segundo orden
GL2: gluma superior	R³: rama o paracladio de tercer orden
H: primordio de hoja	R⁴: rama o paracladio de cuarto orden
IN: ejes de innovación	R⁵: rama o paracladio de quinto orden
L: lemma	R⁶: rama o paracladio de sexto orden
L1: lemma de la flor proximal	Ra: raquilla
L2: lemma de la flor distal	Rc¹: rama o paracladio corto de primer orden
Lo: lodícula	Rd¹: rama o paracladio distal de primer orden
MA: meristemas apical	Rl¹: rama o paracladio largo de primer orden
Mf: meristema floral	Rtt: rama o paracladio del trofotagma

SinF^{II}: sinflorescencia de segundo orden **UIF**: unidad de inflorescencia o inflorescencia

T: teca **ZE**: zona de enriquecimiento

Teg: tegumento del óvulo **ZH**: una zona de inhibición

TT: región del trofotagma **ZI**: zona de innovación
