

4.3 Genética del desarrollo floral

4.3.1 Desarrollo de la espiguilla de *Eleusine indica* y *Megathyrsus maximus*. *Eleusine indica* posee espiguillas multifloras, en las cuales las lemmas y los órganos florales maduran en sentido acrópeto. El desarrollo de la espiguilla (Fig. 114A) comienza con la iniciación de la gluma inferior, seguida por la gluma superior. En este momento, el meristema floral de la flor proximal (la primera en iniciarse) se hace visible. Luego, se inicia la lemma de la primera flor formada por encima de la gluma inferior y opuesta a la gluma superior. Posteriormente, la lemma de la segunda flor se inicia y desarrolla, seguida por el desarrollo de la lemma de la tercera flor. Cuando la lemma de la tercera flor comienza su desarrollo, los estambres y el gineceo de la primera flor formada se inician y las glumas se elongan. Cuando las anteras de la primera flor son visibles, la palea inicia su desarrollo, la lemma se alarga, y las lodículas se inician; en esta etapa la primera lemma circunda a la segunda flor (Fig. 114A). Dicho patrón de desarrollo floral se repite en el resto de las flores que conforman la espiguilla, donde siempre la flor proximal es la más avanzada en el desarrollo en relación a las flores más recientemente formadas ubicadas por encima de ésta. El desarrollo de la espiguilla continúa hasta que 3-8 flores se hayan diferenciado, donde finalmente el meristema apical detiene su actividad. A la madurez, las flores proximales son las fértiles y perfectas, mientras que las flores más distales son neutras. Asimismo, las glumas y lemmas de la espiguilla madura de *E. indica* presentan idéntica forma y textura (Fig. 115A).

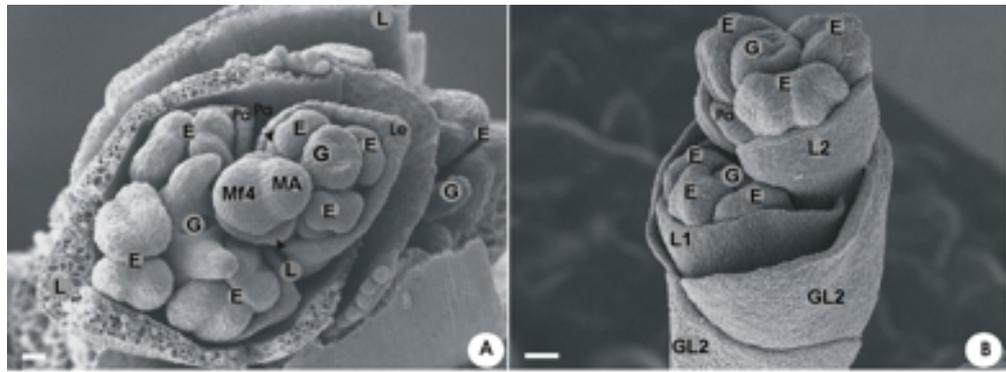


Figura 114.- Fotomicrografía electrónica de barrido sobre el desarrollo de las espiguillas de *Eleusine indica* and *Megathyrsus maximus*. A, espiguilla de *Eleusine indica* donde se observan cuatro flores en proceso de diferenciación. Las lemmas de las tres flores proximales se están alargando. Los estambres y el gineceo de la primera y segunda flor están bien desarrollados y los estambres y el gineceo de la tercera flor se encuentran en los inicios del proceso de diferenciación. B, espiguilla de *Megathyrsus maximus* con dos flores en proceso de diferenciación. **Referencias:** MA, meristema apical; Mf, meristema floral; GL1, gluma inferior; GL2, gluma superior; L, lemma; Pa, palea; E, estambre; G, gineceo. Barra = 20 μ m.

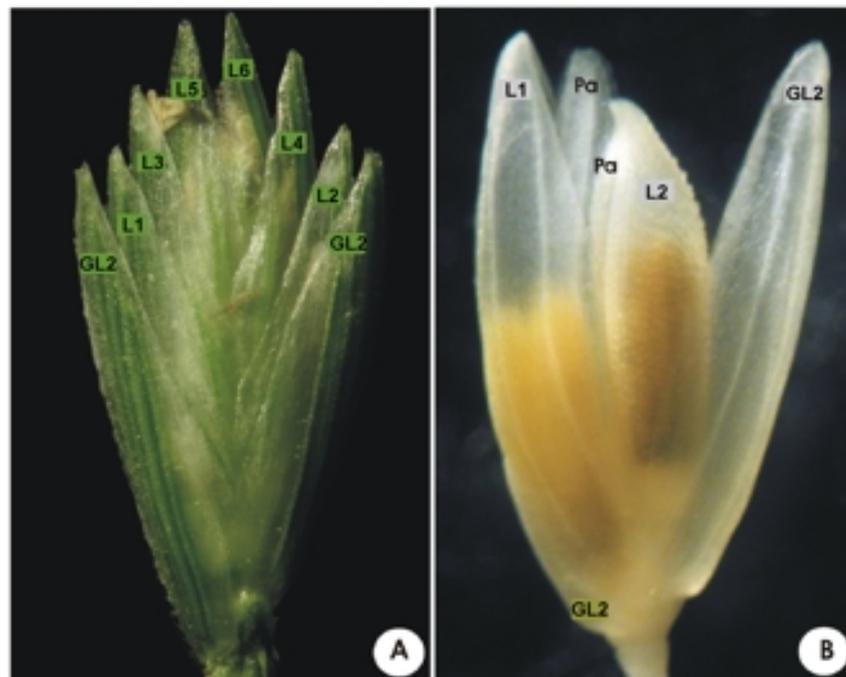


Figura 115.- Espiguilla de *Eleusine indica* y *Megathyrsus maximus*. A, espiguilla madura de *Eleusine indica* mostrando glumas y lemmas con la misma forma y textura. B, espiguilla madura de *Megathyrsus maximus* en la cual la lemma de la flor proximal es membranacea, mientras que la lemma de la flor distal es gruesa y rugosa la que se endurece a la madurez. **Referencias:** GL1, gluma inferior; GL2, gluma superior; L, lemma; Pa, palea. Las flores dentro de la espiguilla de *E. indica* están numeradas en el orden de diferenciación.

El desarrollo de la espiguilla de *M. maximus* fue ya descrito (véase Capítulo 4.2: “Desarrollo de espiguillas” y “Desarrollo floral”) y será mencionado brevemente en esta oportunidad (Fig. 114B). *Megathyrsus maximus* posee espiguillas bifloras. Después que se han iniciado dos glumas alternas, la lemma de la flor proximal comienza su desarrollo, seguida por la lemma de la flor distal. Luego, los estambres, las lodículas y el gineceo de la flor distal se inician. Dicha secuencia de desarrollo floral se repite en la flor proximal. Por consiguiente, las glumas y lemmas se inician siguiendo una secuencia acrópeta de desarrollo, mientras que la formación de estambres, gineceo y lodículas es basípeta dentro de la espiguilla. Ambas flores son perfectas hasta la formación de los carpelos, momento en el cual el gineceo de la flor proximal detiene su desarrollo y comienza a deteriorarse. Cuando las espiguillas de *M. maximus* se han desarrollado completamente, la flor distal es perfecta y la flor proximal estaminada. En la espiguilla adulta la lemma de la flor proximal es membranacea, mientras que la lemma de la flor distal es gruesa y rugosa la que se endurece a la madurez (Fig. 115B).

4.3.2 Aislamiento de ortólogos de *LHS1* de *E. indica* y *M. maximus*. Los ortólogos de *LHS1* en *E. indica* y *M. maximus* fueron identificados empleando RT-PCR sobre RNA floral. Solamente un producto del gen *LHS1* fue amplificado para cada especie. Este fragmento producto de la PCR posee 660 pb (*M. maximus*) hasta 900 pb (*E. indica*) y representa el 95–99% de la región codificable del gen (basado en la longitud total de la secuencia de *LHS1* en *Oryza sativa*); los nucleótidos adicionales en *E. indica* corresponden a la región 3'UTR, que no fue aislada en *M. maximus*. La traslación conceptual del producto de la actividad del gen mostró un amplio frente de lectura; los dos amino ácidos

reemplazados y responsables de los fenotipos mutantes *lhs1* en *Oryza sativa* (Arg24 hasta Cys24 y Gly27 hasta Asp27 [Jeon et al., 2000]) no fueron encontrados en ninguna de las dos especies, sugiriendo que ambas proteínas son funcionales.

Los ortólogos de las nuevas secuencias fueron verificados por análisis filogenéticos. La secuencia de *E. indica* es hermana a la de *E. coracana*, y la secuencia de *M. maximus* es hermana a la de *Panicum miliaceum*, como es de esperar sobre la base de sus parentescos conocidos actualmente (Fig. 116). Los parálogos de *LHS1* más cercanos se encuentran dentro del clado *OsMADS5* (Malcomber and Kellogg, 2005), y las nuevas secuencias claramente no se encuentran dentro de este grupo.

Dado que *LHS1* es un miembro de una gran familia multigénica, fue necesario identificar la región del gen que es útil como prueba específica para *LHS1*. Se consideró particularmente la posible hibridación cruzada con genes del clado hermano, que contiene el gen de arroz *Oryza sativa* *MADS5* (*OsMADS5*) y de maíz *Zea mays* *MADS3* (*ZmM3*) (Fig. 116); la duplicación *LHS1/OsMADS5* ocurrió en o cerca de la base de las gramíneas (Malcomber and Kellogg, 2004; Zahn et al., 2005). La secuencia de nucleótidos de la región terminal-C + 3'UTR de *E. indica* (*EiLHS1*) y el C-terminal de *M. maximus* (*MmLHS1*) son 33.0% y 31.2% diferentes de sus respectivos *OsMADS5/ZmM3* genes. Este nivel de divergencia indica que las pruebas generadas a partir de estas regiones deberían ser *LHS1*-específicas. A su vez, también fue comprobada la especificidad usando *DNA gel blot hybridizations* empleando las pruebas de *EiLHS1* y *MmLHS1*. A partir de ello se encontró

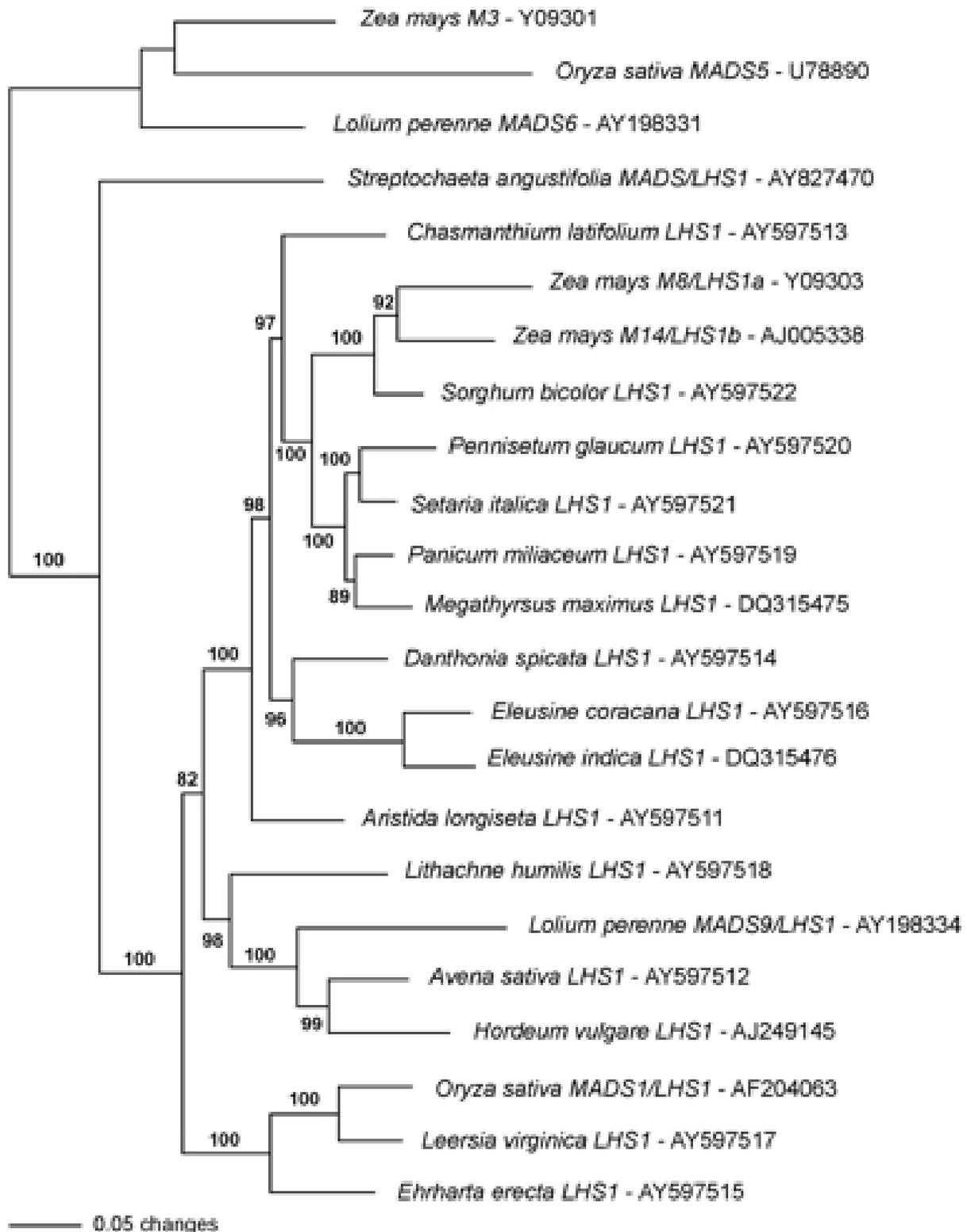


Figura 116.- Árbol de consenso Bayesiano sobre 20 secuencias de nucleótidos del gen LHS1, enraizado en el Clado de *Oryza sativa* MAD55 (*OsMAD55*), *Zea mays* MAD3 (*ZmM3*), y *Lolium perenne* MAD6. Análisis realizado empleando el modelo GTR, de sitios invariantes, y Gtasas de distribución (GTR+I+G). Los números asociados a las ramas representan las estimaciones de credibilidad de los clados. El 95% de credibilidad de los árboles Bayesianos contienen 62 topologías diferentes, una de las cuales es idéntica a las relaciones estimadas por el Grass Phylogeny Working Group (GPWG, 2001), indicando que el árbol del gen LHS1 no es significativamente diferente en relación a la filogenia de organismos.

el número de bandas esperadas cuando la prueba reacciona con un único locus por genoma (Fig. 117). Los individuos de *E. indica* posiblemente son diploides o tetraploides y los de *M. maximus* pueden ser diploides, tetraploides, o hexaploides (*Index to Plant Chromosome Numbers*, <http://mobot.mobot.org/W3T/Search/ipcn.html>). El DNA gel blots indica que los especímenes de *E. indica* considerados en este trabajo son probablemente diploides dado que solo posee un único gen *LHS1*, mientras que *M. maximus* podría tratarse de un hexaploide por la presencia de tres bandas (Fig. 117).

4.3.3 Patrones de expresión de *LHS1*. Los patrones de expresión de *LHS1* a nivel de órgano en *E. indica* y *M. maximus* fueron determinados mediante RT-PCR con *primers* específicos para *LHS1* sobre cDNA de inflorescencias jóvenes, cañas, hojas y raíces. Estos análisis mostraron que *LHS1* se expresa en los tejidos de la inflorescencia y hoja de *E. indica*, mientras que se encuentra restringido a la inflorescencia de *M. maximus*, con una débil expresión en hoja (Fig. 118).

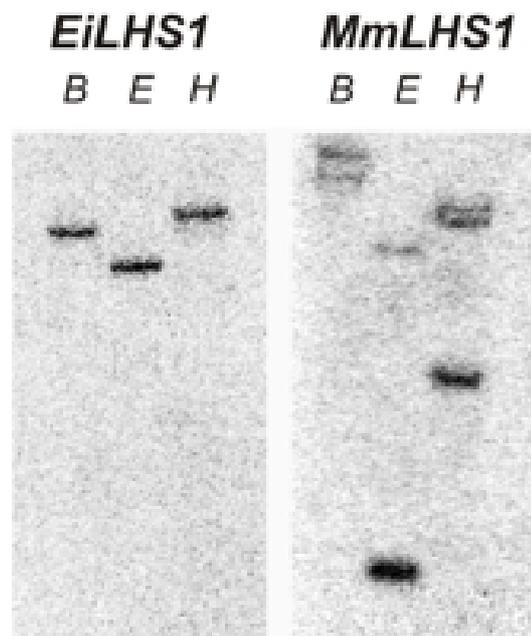


Figura 117.- DNA gel Blots empleando pruebas de cDNA específicas para el gen *LHS1*. Las pruebas de *Eleusine indica* (*Ei*) consiste en el C-terminal + 3'UTR. La prueba de *Megathyrsus maximus* (*Mm*) consistió únicamente en el C-terminal. DNA digerido con las siguientes enzimas de restricción: *Bam*HI (B), *Eco*R1 (E) y *Hin*dIII (H).

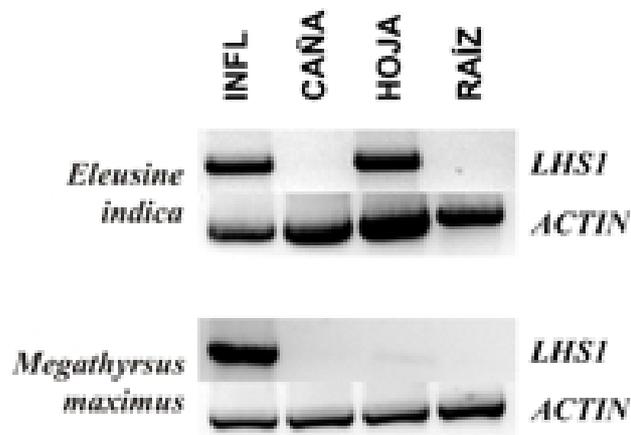


Figura 118.- RT-PCR a partir de cDNA de inflorescencia (INFL), caña, hoja y raíz de *Eleusine indica* y *Megathyrsus maximus*. Los primers *ACTIN* fueron empleados como control positivo.

Para determinar más específicamente la expresión temporal y espacial del mRNA de *LHS1* durante el desarrollo de la espiguilla y flor de *E. indica* y *M. maximus* se realizaron hibridaciones in situ. Los ejemplares analizados de *E. indica* poseen de 3-8 flores por espiguilla que se desarrollan siguiendo una secuencia acrópeta. En primer lugar, *EiLHS1* se detectó con baja intensidad en los meristemas jóvenes de las espiguillas (Fig. 119A). Luego, el gen comienza a restringir su expresión al meristema floral justo después de la iniciación de las glumas (Fig. 119B). Más tarde, *EiLHS1* se expresa con mayor intensidad en los primordios de lemma y pálea iniciados a partir del primer meristema floral formado (más proximal) (Fig. 119, C-E). La expresión de *EiLHS1* gradualmente decrece en la primera flor a medida que la espiguilla prosigue el desarrollo y en consecuencia la expresión de *LHS1* no se detecta sobre la primera flor cuando el meristema de la quinta flor se hace evidente (Fig. 119D). Este mismo patrón de expresión (a lo largo de los meristemas florales, seguido de la localización en la lemma y pálea, seguido por la localización con un gradual decrecimiento y desaparición a medida que las flores maduran) se repite en todas las flores funcionales restantes dentro de la misma espiguilla (Fig. 119, C-G). En ningún momento del desarrollo se detectó expresión en lodículas, estambres o gineceos de las flores en diferenciación (Fig. 119, E-G). La coloración apenas oscura que se detecta sobre los estambres y gineceos de las flores más viejas (Fig. 119G) fue interpretada como la causa de pequeñas células con citoplasma muy denso, y no como expresión del gen. Esta interpretación es soportada por la aparición del mismo tipo de células en el control negativo. *EiLHS1* continúa expresándose en los meristemas de las espiguillas a lo largo del desarrollo de la espiguilla. Durante el desarrollo tardío, las flores distales, que presumiblemente son las que no desarrollan

completamente y serán neutras, también expresan *EiLHS1*, al menos en la etapa de meristema floral (Fig. 119G).

Megathyrsus maximus posee dos flores por cada espiguilla las cuales se desarrollan siguiendo una secuencia basípeta. Dentro de la espiguilla la flor distal es perfecta, mientras que la flor proximal es estaminada. *MmLHS1* se expresa débilmente en la lemma y la pálea de la flor distal en el momento en que dichos órganos comienzan a evidenciarse (Fig. 120A). Conforme la flor distal va madurando, *MmLHS1* se expresa rápidamente en las lodículas (Fig. 120B). El gen continúa expresándose en la lemma y la pálea durante el desarrollo, y se observa que dicha expresión se hace más fuerte en etapas tardías del desarrollo cuando los estambres alcanzan la madurez (Fig. 120, C y D). Por otro lado, durante el desarrollo de la flor proximal no se detectó expresión de *MmLHS1* en ninguno de los órganos que conforman dicha flor e inclusive tampoco se detectó en los estambres y el gineceo de la flor distal (Fig. 120, A–D). Es importante recordar que el patrón de expresión de *M. maximus* es el resultado de la expresión de tres copias presentes en el presumible ejemplar hexaploide.

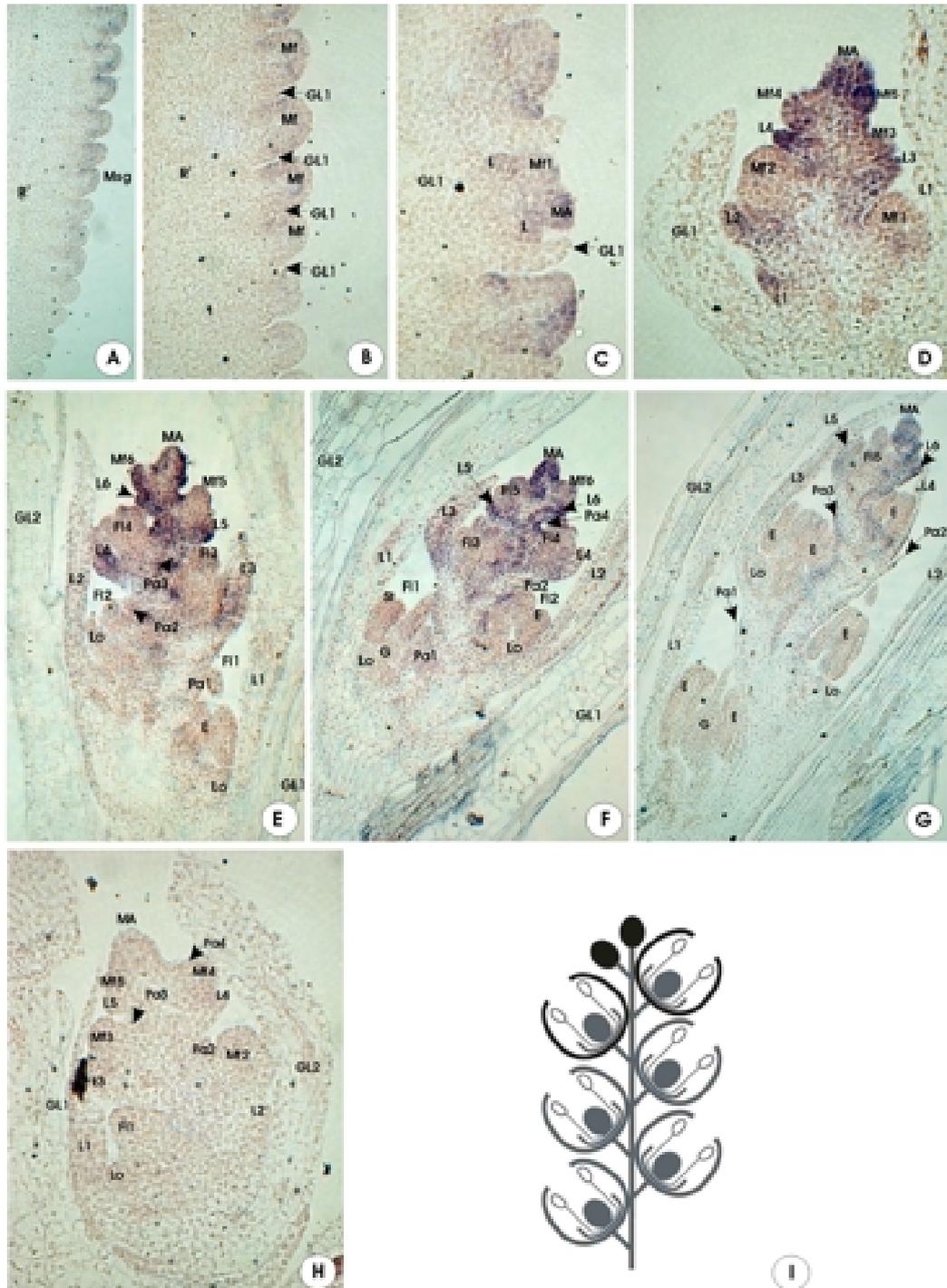


Figura 119.- Detección de *LHS1* mRNA en secciones longitudinales de espiguillas en diferentes estados del desarrollo de *Eleusine indica*. A, rama de primer orden donde se observan bajos niveles de expresión de *EiLHS1* en los meristemas de la espiguilla. B, rama de primer orden donde se observan bajos niveles de expresión de *EiLHS1* en los meristemas florales y ausencia de expresión en las glumas. C, rama primaria donde se observa expresión de *EiLHS1* en lemmas jóvenes de la primera y segunda flor; no se observa expresión en glumas. D-G, espiguillas en estados sucesivos del desarrollo, donde se observa una reducción paulatina en la expresión de *EiLHS1* sobre las flores más viejas y la persistencia de expresión en el ápice de la espiguilla. H, control negativo empleando una prueba de sentido. I, esquema de una espiguilla resumiendo el patrón de expresión de *EiLHS1*; las líneas en negro indican los órganos en los cuales el gen se expresa; símbolos como en la Figura 121 (las líneas negras indican los órganos en los cuales el gen se expresa). **Referencias:** E, estambre; Fl, flor; G, gineceo; GL1, gluma inferior; GL2, gluma superior; L, lemma; Lo, lodícula; MA, meristema apical; Mf, meristema floral; Msg, meristema de la espiguilla; Pa, pálea; R¹, rama de primer orden. Las flores se encuentran numeradas en el orden de diferenciación.

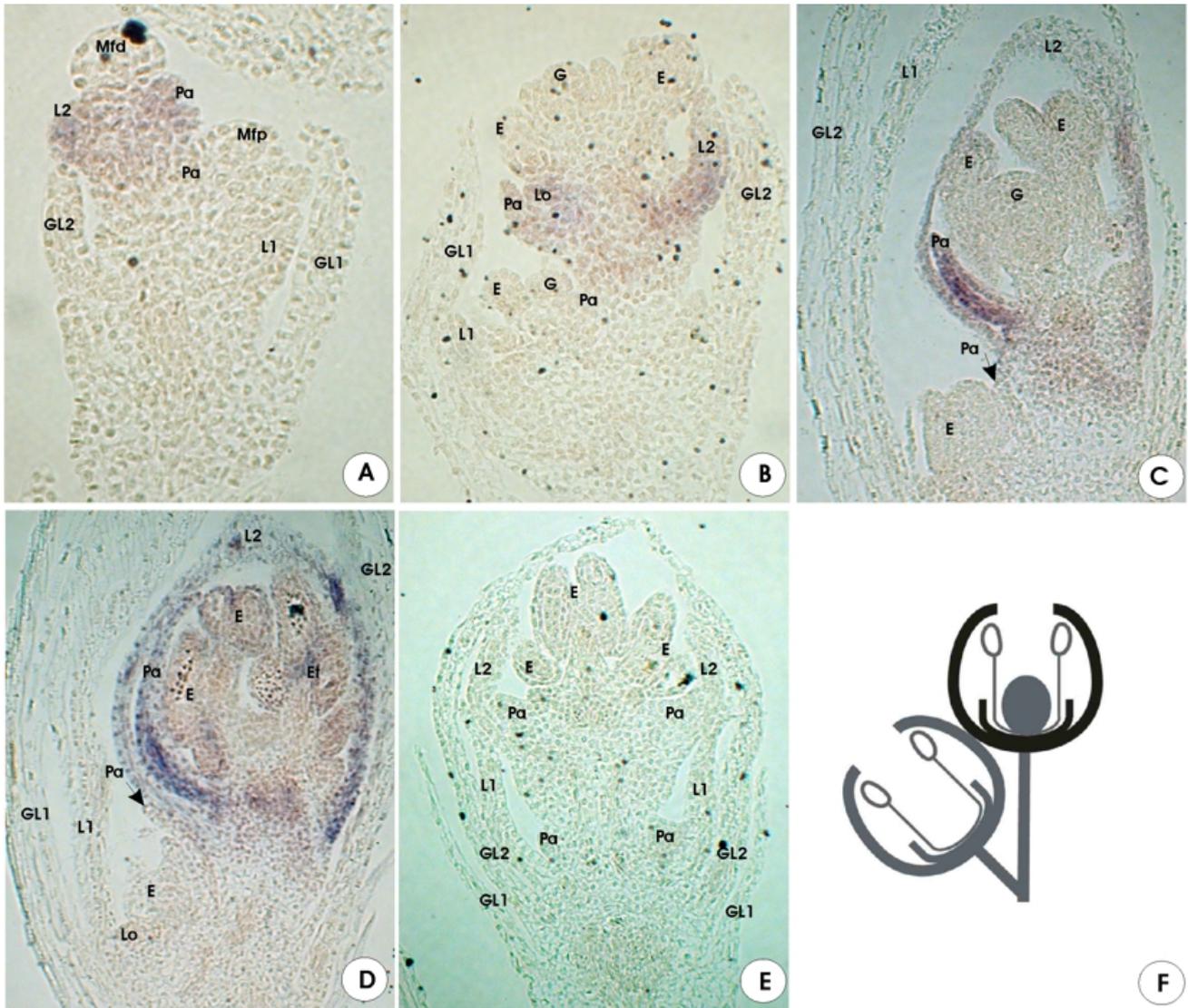


Figura 120.- Expresión de *LHS1* mRNA en secciones longitudinales de espiguillas de *Megathyrsus maximus* spikelets. A, espiguilla joven con bajos niveles de expresión de *MmLHS1* en lemma y pálea de la flor distal. B, espiguilla joven, en el momento en que los órganos florales se están iniciando, donde se observan bajos niveles de expresión de *MmLHS1* en lemma, pálea, y lodículas de la flor distal. C, espiguilla donde se observa la expresión de *MmLHS1* en lemma y pálea de la flor distal en el momento en el que ambas brácteas comienzan su alargamiento. D, espiguillas mostrando fuerte expresión de *MmLHS1* en lemma y pálea de la flor distal cuando ambas brácteas envuelven completamente a los órganos florales. E, control negativo empleando una prueba de sentido. F, esquema simplificado de una espiguilla donde se resumen los patrones de expresión de *MmLHS1*; símbolos como en la Figura 121 (las líneas negras indican los órganos en los cuales el gen se expresa). **Referencias:** E, estambre; G, gineceo; GL1, gluma inferior; GL2, gluma superior; L1, lemma de la flor proximal; L2, lemma de la flor distal; Lo, lodícula; Mfd, meristema floral distal; Mfp, meristema floral proximal; Pa, pálea.

4.3.4 Evolución de la expresión de *LHS1*. Combinando los nuevos patrones de expresión de *LHS1* sobre *E. indica* y *M. maximus* con los datos previamente publicados (Chung et al., 1994; Cacharrón et al., 1999; Schmitz et al., 2000; Malcomber & Kellogg, 2004), es posible estimar los patrones de evolución de la expresión de *LHS1* en gramíneas a través de reconstrucciones filogenéticas empleando el método de la parsimonia, basados en la filogenia altamente soportada propuesta por el GPWG (2001) (Fig. 121).

Todas las especies muestran un patrón de expresión similar durante etapas tempranas del desarrollo, dado que *LHS1* se expresa en los meristemas de las espiguillas después de la iniciación de las glumas. Después de esta etapa, la expresión de *LHS1* difiere entre las diversas especies estudiadas. Los análisis filogenéticos reconstruyeron un patrón de expresión ancestral localizado en la pálea, lemma, y gineceo, únicamente en las flores distales de la espiguilla. La reconstrucción filogenética presentada en este trabajo al igual que lo propuesto por Malcomber & Kellogg (2004), muestra que la expresión de *LHS1* en la espiguilla evolucionó antes que la aparición del clado *Hordeum–Avena* (subfamilia Pooideae).

La expresión en el gineceo se perdió separadamente en el linaje de *Eleusine* y antes de la base del clado *Pennisetum–Megathyrsus* (tribu Paniceae, subfamilia Panicoideae). La expresión en los estambres apareció independientemente en los linajes de *Chasmanthium* y *Zea*. A diferencia de los análisis de Malcomber & Kellogg (2004), la reconstrucción presentada en este trabajo resultó ser ambigua al estimar la ausencia de expresión en lodículas del ancestro. La expresión en las lodículas apareció en el linaje de *Hordeum vulgare* y antes de la base del clado Centothecoideae–Panicoideae (*Chasmanthium*,

Pennisetum, *Megathyrsus*, *Sorghum*, *Zea*) antes de perderse posteriormente en el linaje de *Sorghum*.

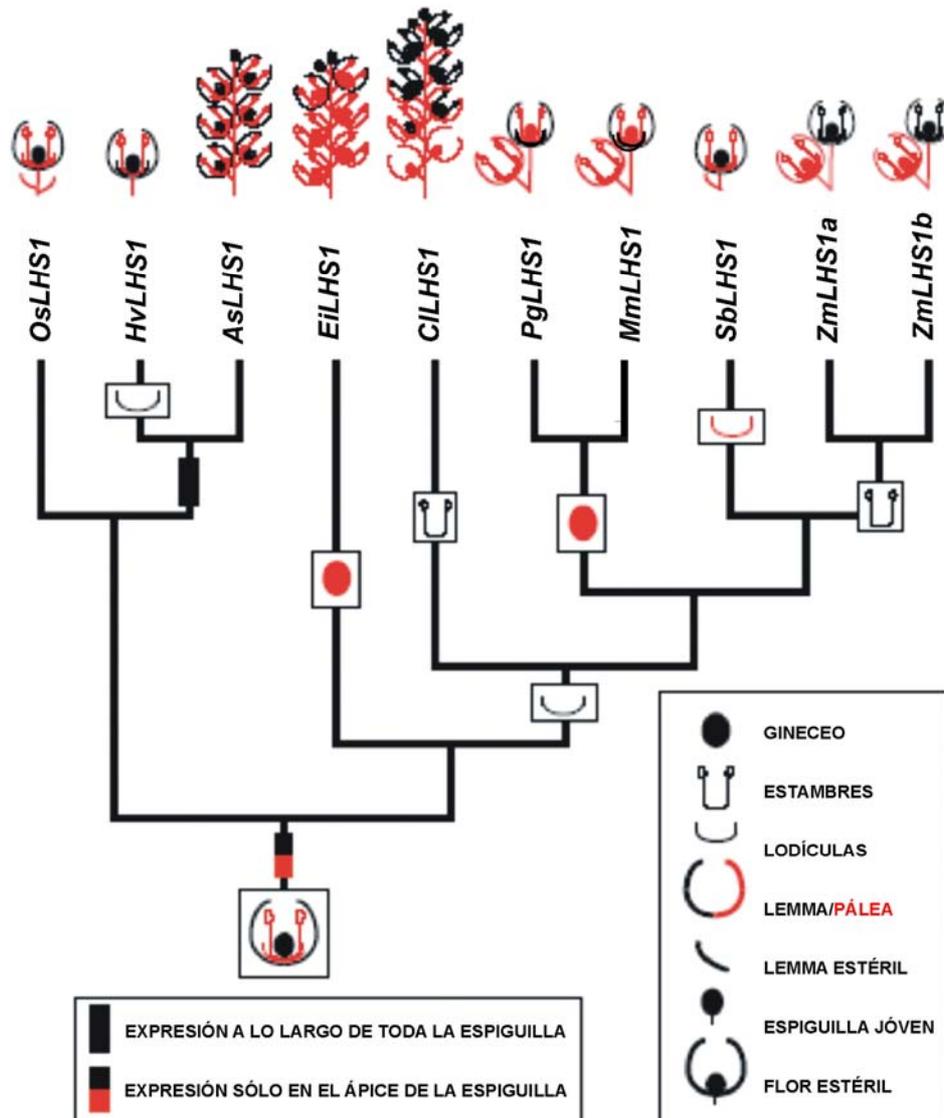


Figura 121.- Patrones de expresión de *LHS1* optimizados sobre la filogenia de organismos propuesta por el GPWG (2001). Negro = expresión del gen o ganancia de expresión en la reconstrucción del carácter. Rojo = ausencia de expresión o pérdida de expresión en la reconstrucción del carácter. As, *Avena sativa* (Malcomber & Kellogg, 2004); Cl, *Chasmanthium latifolium* (Malcomber & Kellogg, 2004); Ei, *Eleusine indica*, en este estudio; Hv, *Hordeum vulgare* (Schmitz et al., 2000); Os, *Oryza sativa* (Chung et al., 1994); Pg, *Pennisetum glaucum* (Malcomber & Kellogg, 2004); Mm, *Megathyrsus maximus*, en este estudio; Sb, *Sorghum bicolor* (Malcomber & Kellogg, 2004); Zm, *Zea mays* (Cacharrón et al., 1999). Sólo una espiguilla de maíz es ilustrada dado que ambas flores (pistilada y estaminada) presentan los mismos patrones de expresión.

4.4 Filogenia

4.4.1 Datos moleculares. En *Eriochloa montevidensis*, *Urochloa lorentziana*, *Urochloa mollis*, y *Urochloa plantaginea* el largo de la región comprendida entre ITS1 (*Internal Transcribed Spacer, 1*), 5.8S y ITS2 (*Internal Transcribed Spacer, 2*) incluye entre 582 y 591 pares de bases (pb). La región ITS1 está representada por 207 pb en la mayoría de los casos o por 208 pb en *E. montevidensis*, mientras que la región ITS2 fue más variable en longitud entre las cuatro nuevas secuencias (213-220 pb). La longitud del gen 5.8S es de 162 o 164 pb. El contenido de G y C siempre fue mayor que el contenido de A y T, siendo cercano al 52,88% y 58,94% en el ITS1 y levemente mayor en el ITS2 en la mayoría de los casos. Las cuatro especies no presentan variación en la región central de ITS1. En la **Tabla 1** se resumen las principales variaciones de la región ITS1, 5.8S e ITS2 observadas en las cuatro nuevas secuencias.

Tabla 1- Variaciones en el largo, contenido de G+T y presencia de región conservada (GGCRY [n 4 a 7] GYGYCAAGGAA [donde Y=C o T; R=G o A]) en la región central de ITS1 entre *Eriochloa montevidensis*, *Urochloa lorentziana*, *Urochloa mollis* y *Urochloa plantaginea*.

Especie	Largo total (pb)	Largo de la región ITS1 (pb)	Largo del gen 5.8S (pb)	Largo de la región ITS2 (pb)	Contenido de G+T (%) en ITS1/ITS2
<i>E. montevidensis</i>	588	208	162	218	52,88/53,42
<i>U. lorentziana</i>	586	207	164	215	58,94/61,57
<i>U. mollis</i>	582	207	162	213	57,97/63,44
<i>U. plantaginea</i>	591	207	164	220	58,94/63,40

4.4.2 Análisis filogenético

Análisis molecular. El alineamiento de las secuencias de ITS1, 5.8S e ITS2 resultó en una matriz de 631 caracteres y 17 taxones de los cuales 13 corresponden al grupo interno y 4 al grupo externo (**Apéndice 5A**). Del total de caracteres moleculares, 134 resultaron ser filogenéticamente informativos. El análisis resultó en 4 árboles, de 564 pasos de longitud cada uno. El árbol de consenso estricto a partir de los tres árboles junto con los valores de soporte se muestra en la Figura 122.

En el consenso estricto *Brachiaria* y *Urochloa* se encuentran formando un clado monofilético (**Clado PCK**) altamente soportado (Jackknife (JK) = 97%) junto con los géneros *Eriochloa*, *Megathyrsus* y *Melinis* (Fig. 122). Dentro de él *Brachiaria*, *Melinis* y una especie africana de *Urochloa* (*U. decumbens*) constituyen el **Clado Basal** (JK = 78%), donde las tres especies forman una politomía. El Clado Basal es grupo hermano de un gran clado de bajo soporte integrado por *Eriochloa*, *Megathyrsus*, más diez especies de *Urochloa* (8 son africanas y 2 son nativas de América) (**Clado E-M-U**). Las relaciones dentro de este clado presentan bajo soporte, excepto por la relación de *U. ruziziensis* y *U. brizantha* (JK = 96%) y por otro lado *U. jubata* y *U. xantholeuca* (JK = 99%).

Al mapear los caracteres morfológicos de inflorescencia sobre uno de los árboles moleculares más parsimoniosos obtenidos de la búsqueda anterior se observa que los miembros del Clado PCK comparten el carácter sinapomórfico tipo PnH de UIF adulta (carácter 0 estado 2) (Fig. 123). Por otro lado, el Clado E-M-U está representando por un carácter homoplásico (UIF de tipo PTcH; carácter 0, estado 3) y una sinapomorfía morfológica ambigua entre una simetría radiada (carácter 3, estado 1) y una simetría indeterminada (carácter 3, estado 2) (Fig. 123).

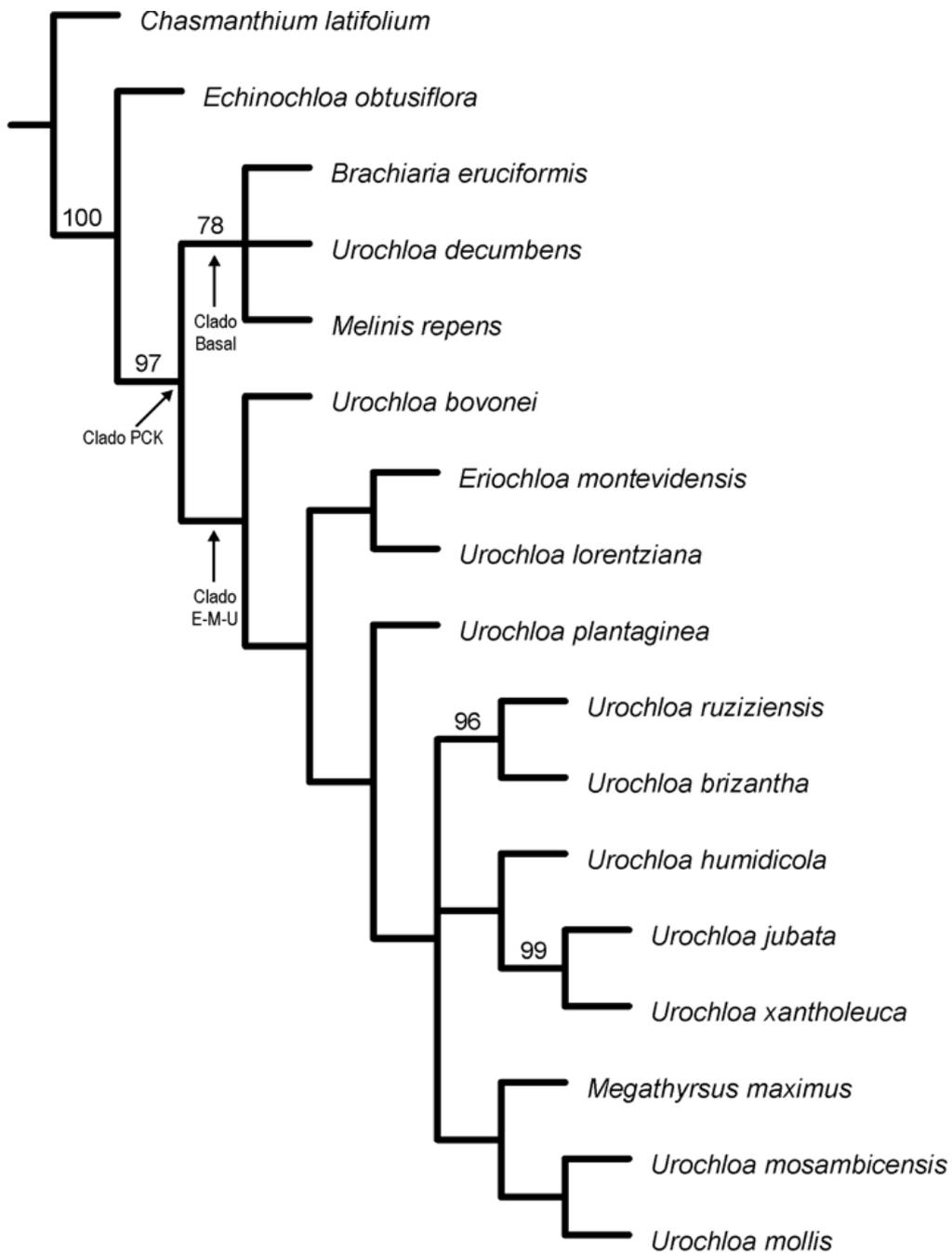


Figura 122.- Árbol de consenso estricto obtenido en el análisis de máxima parsimonia empleando datos moleculares (ITS1, 5.8S y ITS2). Los números arriba de las ramas indican los valores de soporte de grupos empleando el método de Jackknife (sólo se muestran los valores de JK por encima de 60%).

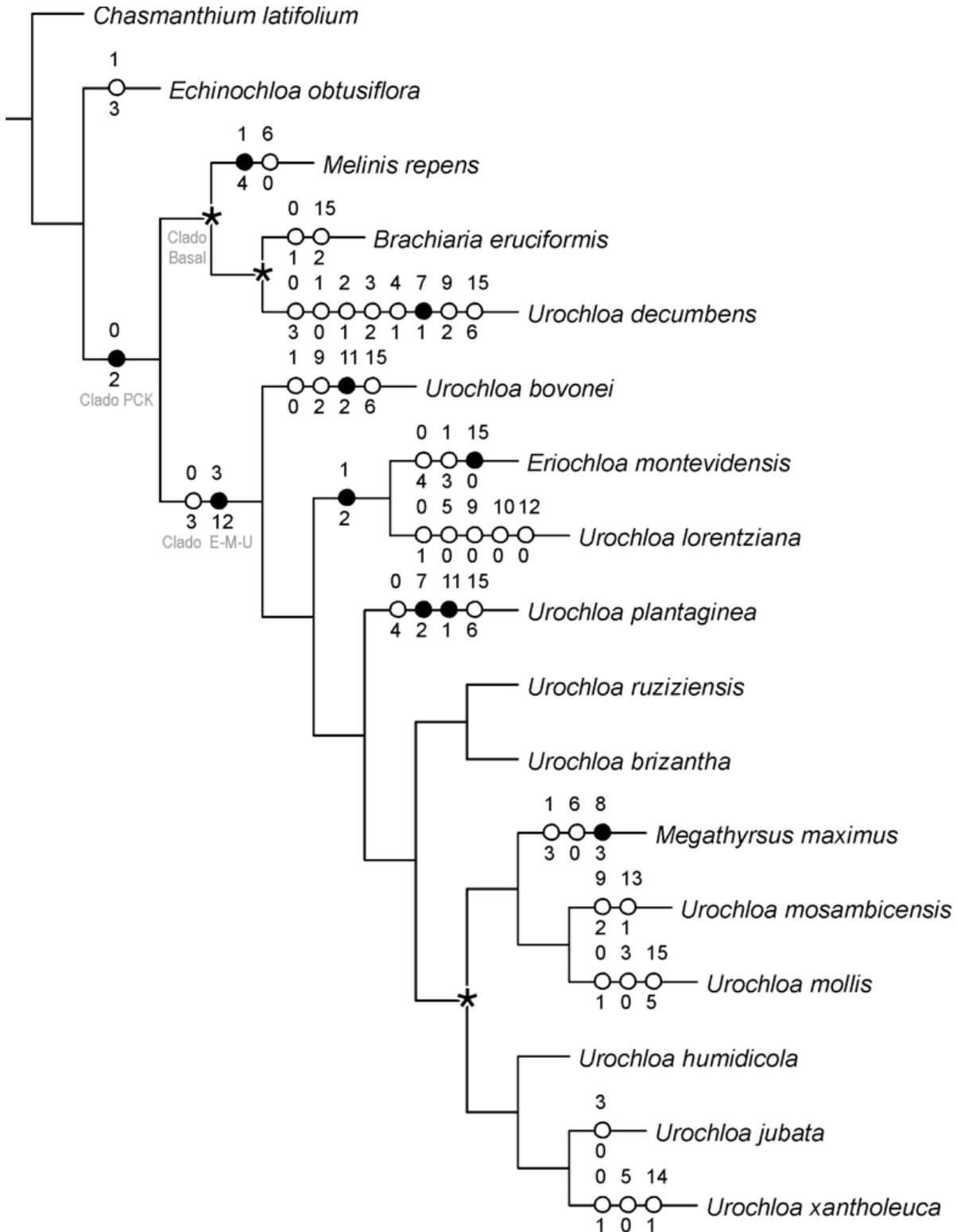


Figura 123.- Topología de uno de los árboles más parsimoniosos obtenido en el análisis de máxima parsimonia empleando la matriz molecular, donde se muestran las sinapomorfías comunes a los cuatro árboles igualmente parsimoniosos. El asterisco negro indica las ramas que colapsan en el consenso estricto. Los números de los caracteres morfológicos (véase texto) se encuentran por arriba de las ramas y los estados por debajo de las mismas. Los círculos negros son sinapomorfías morfológicas y los círculos blancos son homoplasia. El largo de las ramas es equivalente al número de cambios en la morfología de las inflorescencias.

Análisis combinado. La matriz combinada consta de 647 caracteres (631 caracteres moleculares y 16 caracteres morfológicos) y 17 taxones, de los cuales 13 corresponden al grupo interno y 4 al grupo externo. De los 649 caracteres, 150 resultaron ser filogenéticamente informativos. Todos los caracteres morfológicos seleccionados son informativos (**Apéndice 5B**).

El análisis resultó en tres árboles, de 653 pasos de longitud cada uno. El árbol de consenso estricto a partir de los tres árboles junto con los valores de soporte se muestra en la Figura 124. Uno de los árboles más parsimoniosos resultado de la búsqueda con las sinapomorfías comunes a los tres árboles se muestra en la Figura 125.

En el consenso estricto obtenido a partir de la matriz de datos combinada (Fig. 124) *Brachiaria*, *Urochloa*, *Eriochloa*, *Megathyrsus* y *Melinis* forman un clado monofilético (**Clado PCK**) con altos valores de soporte (JK = 93%). Dentro del Clado PCK, *Brachiaria eruciformis* y *Melinis repens* constituyen el **Clado Basal** (JK = 76%), el que resulta ser grupo hermano de una gran clado de moderado soporte (JK = 60%) integrado por *Eriochloa*, *Megathyrsus* y todas las especies de *Urochloa* estudiadas (**Clado E-M-U**). Las relaciones dentro de este clado están débilmente soportadas, donde *Megathyrsus maximus* y las dos especies americanas de *Urochloa* estudiadas no están agrupadas. Entre ellas, *U. mollis* es especie hermana de un clado de bajo soporte integrado por *Eriochloa* y la totalidad de las especies africanas de *Urochloa* (**Clado E-UAfr**). Dentro del Clado E-UAfr se observa que *U. ruziziensis* y *U. brizantha* son especies muy afines (JK = 100%) al igual que *U. jubata* y *U. xantholeuca* (JK = 100%).

Al mapear los caracteres morfológicos de inflorescencia sobre uno de los árboles moleculares más parsimoniosos obtenidos de la búsqueda anterior, se observa que los

miembros del Clado E-M-U comparten la simetría radiada de la inflorescencia como carácter sinapomórfico morfológico (Fig. 125). Asimismo, dentro del Clado E-M-U las especies tienden a relacionarse de acuerdo a las características morfológicas de inflorescencias (Fig. 125):

- 1) morfológicamente, la relación de *U. mollis* y el Clado E-UAfr está soportada por la presencia de ramificaciones de la UIF hasta de tercer orden (carácter 1, estado 1; homoplasia) y la ausencia de alargamientos diferenciales de los entrenudos en estados tardíos del desarrollo (carácter 8, estado 0; sinapomorfía),
- 2) los miembros del Clado E-UAfr comparten cinco sinapomorfías morfológicas relacionadas con la inflorescencia: UIF de tipo PTcH (carácter 0, estado 3), diferenciación basípeta de R¹ (carácter 5, estado 1), secuencia de iniciación de espiguillas de tipo patrón PT con desarrollo de Cof de la R¹ primero (carácter 9, estado 1), iniciación basípeta de las Cof de la R¹ (carácter 10, estado 1) y sentido basípeta de iniciación de las espiguillas sobre la R¹ en la UIF (carácter 12, estado 1),
- 3) dentro del Clado E-UAfr:
 - *Eriochloa*, *U. jubata* y *U. xantholeuca* comparten el mismo patrón de desarrollo floral donde los estambres laterales son los más adelantados en el desarrollo y la flor proximal queda protegida por la lemma en etapas tardías del desarrollo floral (carácter 15, estado 1; homoplasia);
 - se diferencia un grupo de siete especies africanas de *Urochloa* con características muy similares de inflorescencia que se distinguen por compartir cuatro sinapomorfías morfológicas: patrón B de desarrollo del eje principal (carácter 2, estado 1), simetría indeterminada de la UIF

(carácter 3, estado 2); desarrollo basípeto de R¹ (carácter 4, estado 1) y sentido anfípeto de iniciación de las espiguillas sobre la R¹ (carácter 13, estado 1);

- finalmente, cuatro de las siete especies de *Urochloa* mencionadas arriba se caracterizan por compartir el mismo patrón de desarrollo floral en el cual el estambre abaxial es el más adelantado en el desarrollo y la flor proximal queda protegida por la gluma inferior cuando los carpelos de la flor distal se inician.

Principales variaciones entre los resultados de los análisis moleculares y los morfológicos. Las principales variaciones observadas al comparar la topología del consenso estricto entre los análisis exclusivamente moleculares (ITS1, 5.8S e ITS2) y aquellos combinados (ITS1, 5.8S e ITS2 más los caracteres morfológicos de inflorescencias) se detallan a continuación y se resumen en la **Tabla 2**:

- 1) al incorporar los caracteres morfológicos de inflorescencia a la matriz molecular se logró una mejor resolución interna del Clado PCK en comparación con los resultados moleculares,
- 2) la posición de *Megathyrsus* y numerosas especies de *Urochloa* se ven modificadas al incorporar los caracteres de inflorescencia; en particular, en el análisis combinado las especies americanas de *Urochloa* tienden a ubicarse junto con *Megathyrsus* por fuera del grupo integrado por *Eriochloa* y las especies africanas de *Urochloa*,

- 3) en el análisis molecular *Urochloa* es parafilético con *Brachiaria*, *Melinis*, *Eriochloa* y *Megathyrsus*, mientras que en el análisis combinado el género *Urochloa* es parafilético con los géneros *Megathyrsus* y *Eriochloa*,
- 4) al combinar los datos moleculares con los morfológicos de inflorescencias se observan nuevas sinapomorfías soportando la relación entre ciertos taxa dentro del Clado PCK.

Tabla 2.- Principales variaciones observadas entre los resultados de los análisis exclusivamente moleculares (ITS1, 5.8S e ITS2) y aquellos combinados

	<i>Análisis molecular</i>	<i>Análisis combinado</i>
Clado Basal	<i>Brachiaria + Melinis + Urochloa decumbens</i> (JK = 78%) <u>Sinapomorfías morfológicas:</u> • UIF de tipo PnH	<i>Brachiaria + Melinis</i> (JK = 76%)
Clado E-M-U	<i>Megathyrsus + Eriochloa</i> + especies americanas y africanas de <i>Urochloa</i> (bajo soporte) <u>Sinapomorfías morfológicas:</u> • Simetría de la UIF (radiada-indeterminada)	<i>Megathyrsus + Eriochloa</i> + todas las especies de <i>Urochloa</i> (JK = 60%) <u>Sinapomorfías morfológicas:</u> • Simetría de la UIF radiada
Clado E-UAfr	Ausente	<i>Eriochloa</i> + especies africanas de <i>Urochloa</i> (bajo soporte) <u>Sinapomorfías morfológicas:</u> • UIF de tipo PTcH • Diferenciación basípeta de R ¹ • Secuencia de iniciación de espiguillas de tipo patrón PT con desarrollo de Cof de la R ¹ primero • Iniciación basípeta de las Cof de la R ¹ • Sentido basípeta de iniciación de las espiguillas sobre la R ¹ en la UIF.

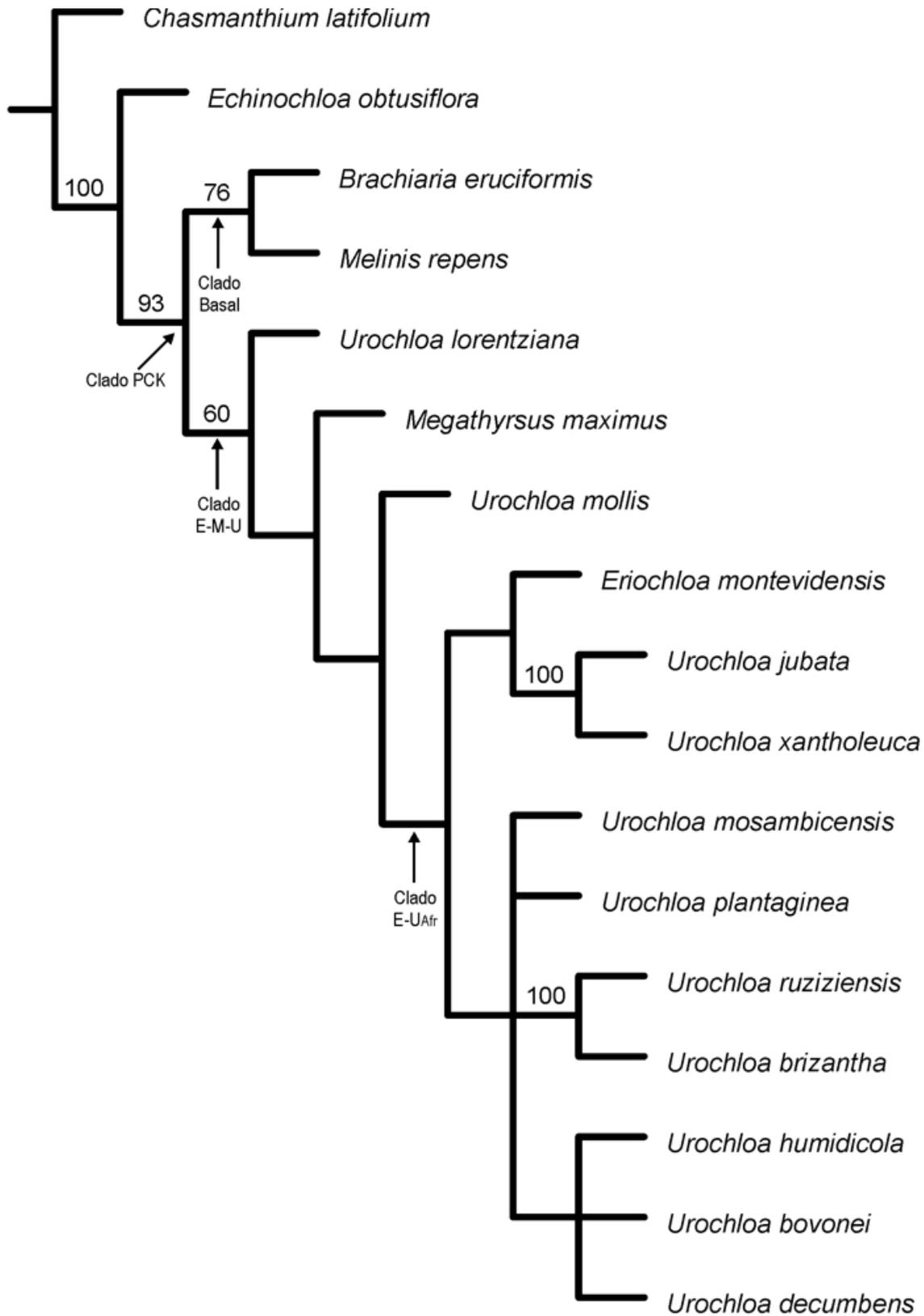


Figura 124.- Árbol de consenso estricto obtenido en el análisis de máxima parsimonia empleando datos moleculares (ITS1, 5.8S y ITS2) y morfológicos (estructura y desarrollo de la inflorescencia). Los números arriba de las ramas indican los valores de soporte de grupos empleando el método de Jackknife (sólo se muestran los valores de JK por encima de 60%).

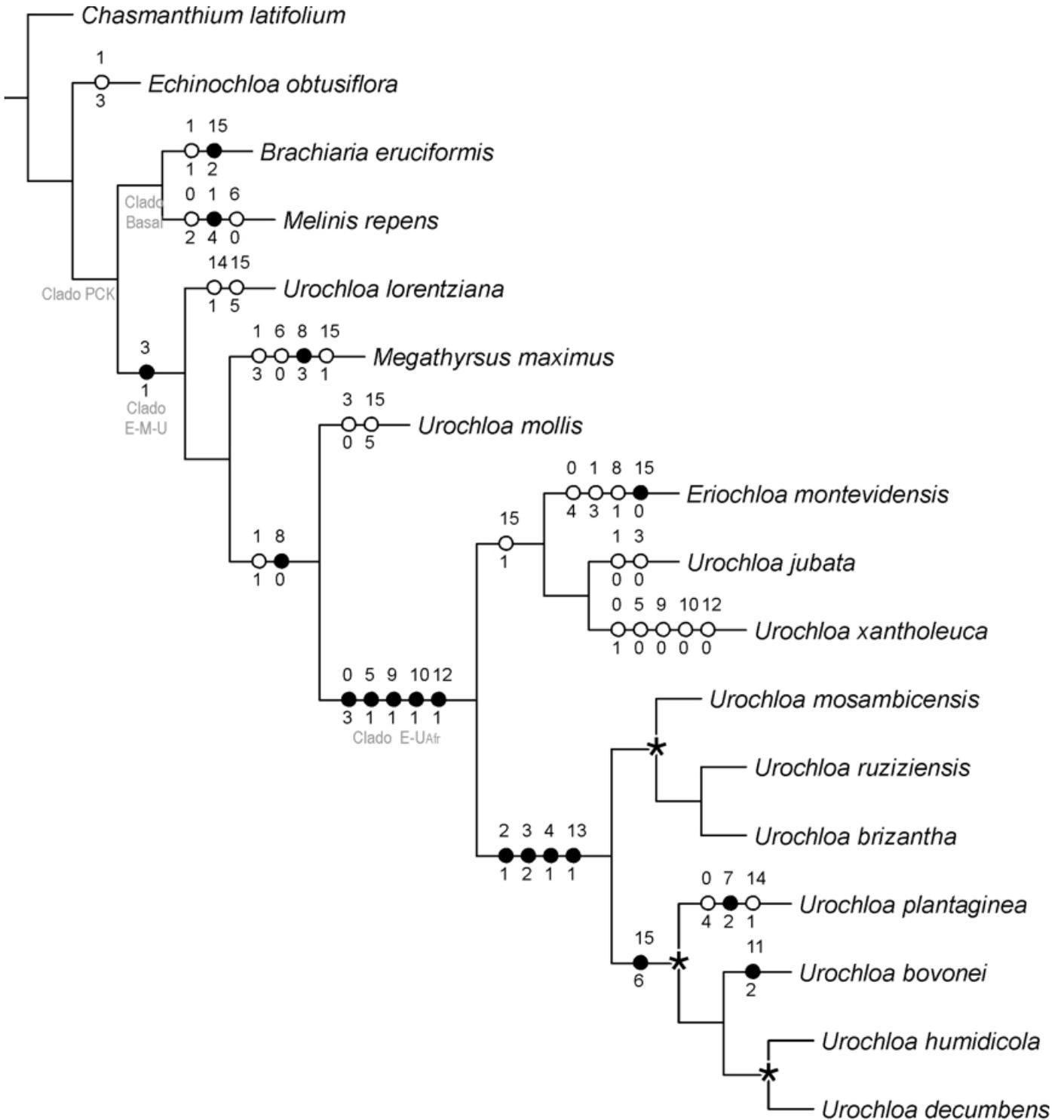


Figura 125.- Topología de uno de los árboles más parsimoniosos obtenido en el análisis de máxima parsimonia empleando la matriz combinada de datos moleculares y morfológicos donde se muestran las sinapomorfías comunes para los tres árboles igualmente parsimoniosos. El asterisco negro indica las ramas que colapsan en el consenso estricto. Los números de los caracteres morfológicos (véase texto) se encuentran por arriba de las ramas y los estados por debajo de las mismas. Los círculos negros son sinapomorfías morfológicas y los círculos blancos son homoplasia. El largo de las ramas es equivalente al número de cambios en la morfología de las inflorescencias.

4.4.3 Evolución de las inflorescencias. Para explorar la evolución de la morfología de las inflorescencias de *Brachiaria*, *Urochloa* y los géneros afines, los caracteres morfológicos que resultaron ser sinapomórficos para los tres árboles (Fig. 125), se optimizaron sobre uno de los dichos árboles más parsimoniosos obtenidos del análisis combinado. Cuando un estado de carácter fue ambiguo en algún nodo se revisaron todas las reconstrucciones posibles para dicho carácter.

Estructura adulta de la inflorescencia (Fig. 126). La inflorescencia ancestral para el Clado PCK habría sido de tipo PpH (carácter 0, estado 1) con ramificaciones de hasta cuarto orden (carácter 1, estado 2). Los resultados de la optimización sugieren que el Clado E-M-U evolucionó hacia inflorescencias de tipo PnH en *Megathyrsus* (carácter 0, estado 2) y hacia inflorescencias de tipo PTcH que han experimentado truncamiento de sus partes distales (florescencia principal y ramas cortas) además de presentar ramas completamente homogeneizadas (carácter 0, estado 3). Estos análisis sugieren también que las UIF de tipo PTPH (carácter 0, estado 4) son derivadas de las UIF de tipo PTcH. Por otro lado, la evolución de las UIF de tipo PcH (carácter 0, estado 1) no ha sido considerada en los análisis filogenéticos debido a la falta de secuencias disponibles para incorporar estas especies a dichos análisis.

En general, dentro del Clado E-M-U las inflorescencias tienden a disminuir el grado máximo de ramificación hacia ramificaciones de segundo (carácter 1, estado 0) o tercer grado (carácter 1, estado 0).

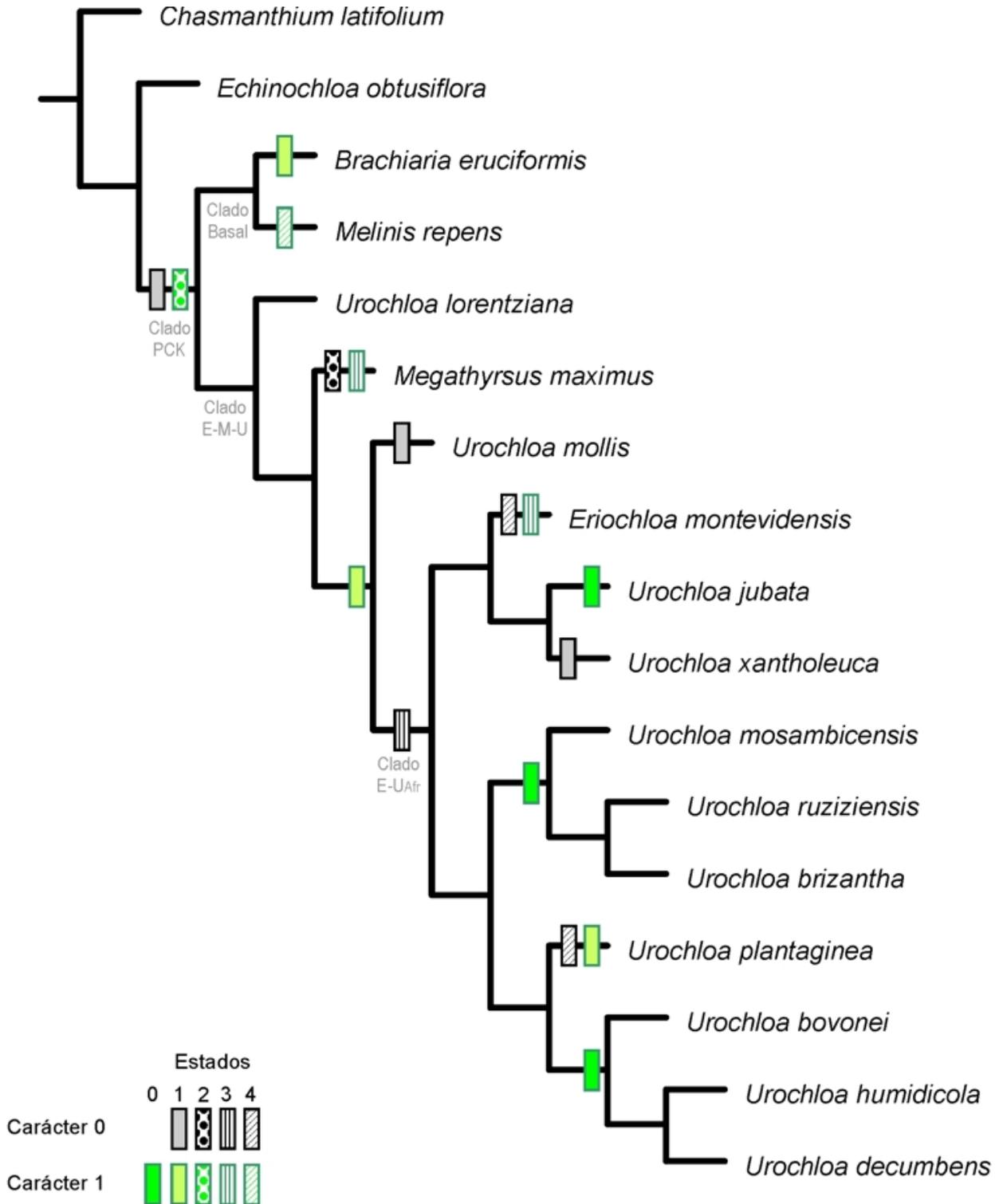


Figura 126.- Optimización de los caracteres de la estructura adulta de la inflorescencia (véase texto) sobre uno de los árboles más parsimonioso obtenidos en el análisis combinado de datos moleculares (ITS1, 5.8S e ITS2) y morfológicos (estructura y desarrollo de la inflorescencia).

Desarrollo del sistema de ramificación de la inflorescencia (Fig. 127). La optimización de los caracteres relacionados al desarrollo del sistema de ramificación de la UIF sugiere que el estado plesiomórfico para el Clado PCK podría ser una inflorescencia cuyo eje principal se alarga a partir del meristema apical a medida que las R¹ se van iniciando (carácter 2, estado 1) siguiendo una secuencia acrópeta (carácter 4, estado 0) las cuales, por la posición donde se desarrollan, determinan, en estados muy tempranos, una simetría dorsiventral para la UIF (carácter 3, estado 0). El sentido de diferenciación de las R² podría ser acrópeta (carácter 5, estado 0) para el ancestro hipotético, mientras que el estado plesiomórfico para el carácter alargamiento diferencial de los entrenudos (carácter 8) resultó ambiguo y no se puede determinar con precisión la evolución de dicho carácter.

La optimización sugiere que posteriormente, dentro del Clado E-M-U las inflorescencias han modificado su simetría pasando de dorsiventrales a radiadas (carácter 3, estado 1) o de radiadas a una simetría indeterminada (carácter 3, estado 2). Este último cambio coincide con el momento en el cual las inflorescencias cambian el patrón A de desarrollo del eje principal a un patrón B de desarrollo (carácter 2, estado 1) y el sentido de iniciación acrópeta de las R¹ a basípeta (carácter 4, estado 1). Además, la optimización sugiere que el estado de carácter sentido de diferenciación basípeta de las R² (carácter 5, estado 1) podría ser derivado del estado ancestral y posiblemente surgió en el Clado E-UAfr.

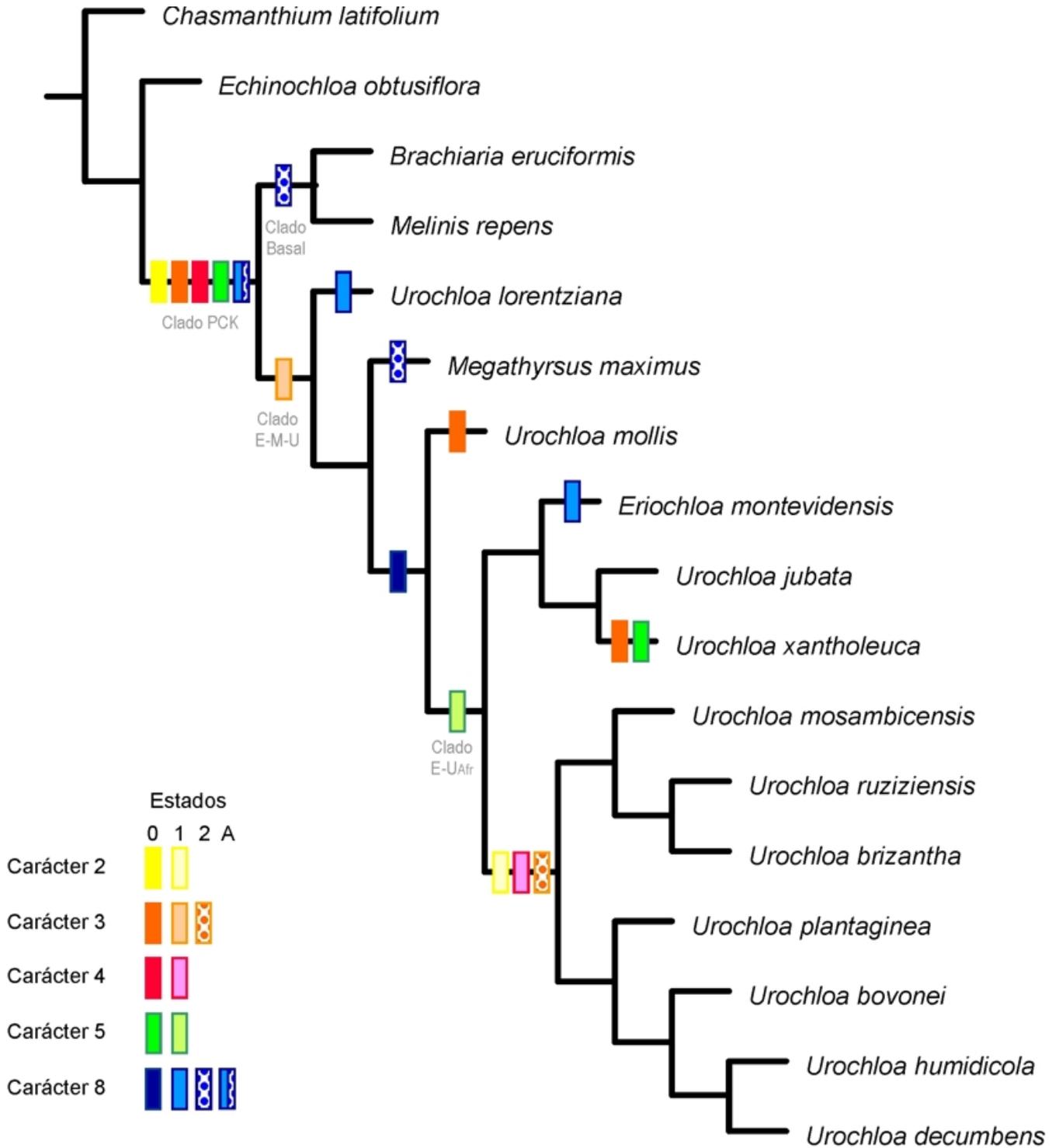


Figura 127.- Optimización de los caracteres relacionados al desarrollo del sistema de ramificación de la inflorescencia (véase texto) sobre uno de los árboles más parsimonioso obtenidos en el análisis combinado de datos moleculares (ITS1, 5.8S e ITS2) y morfológicos (estructura y desarrollo de la inflorescencia).

Desarrollo de las espiguillas (Fig 128). La optimización de los caracteres de inflorescencia sugiere que el ancestro hipotético del Clado PCK podría presentar un patrón P de secuencia de iniciación de espiguillas (carácter 9, estado 0), donde las Cof de las R¹ se inician en sentido anfípeto a lo largo de la UIF (carácter 10, estado 0). Además sugiere que las espiguillas que se desarrollan sobre el extremo distal de las R² lo hacen siguiendo un sentido anfípeto al considerar la inflorescencia en su totalidad (carácter 12, estado 0), mientras que el desarrollo de dichas espiguillas sigue un sentido basípeto sobre la R¹ (carácter 13, estado 0).

A partir de ello, se sugiere que posiblemente las inflorescencias han evolucionado modificando por completo los sentidos de iniciación de las espiguillas. Estos cambios posiblemente se sucedan en la base del Clado E-UAfr donde se observa que: (a) las inflorescencias cambian de un patrón P de secuencia de iniciación de espiguillas hacia un patrón PT en el cual la Cof desarrolla primero (carácter 9, estado 1), (b) al mismo tiempo se observa que el sentido de iniciación de las Cof de las R¹ cambia de un sentido anfípeto o uno basípeto a lo largo de la UIF (carácter 10, estado 1) y (c) las espiguillas que se desarrollan sobre el extremo distal de las R² pasan de una sentido anfípeto a basípeto al considerar la inflorescencia en su totalidad (carácter 12, estado 1).

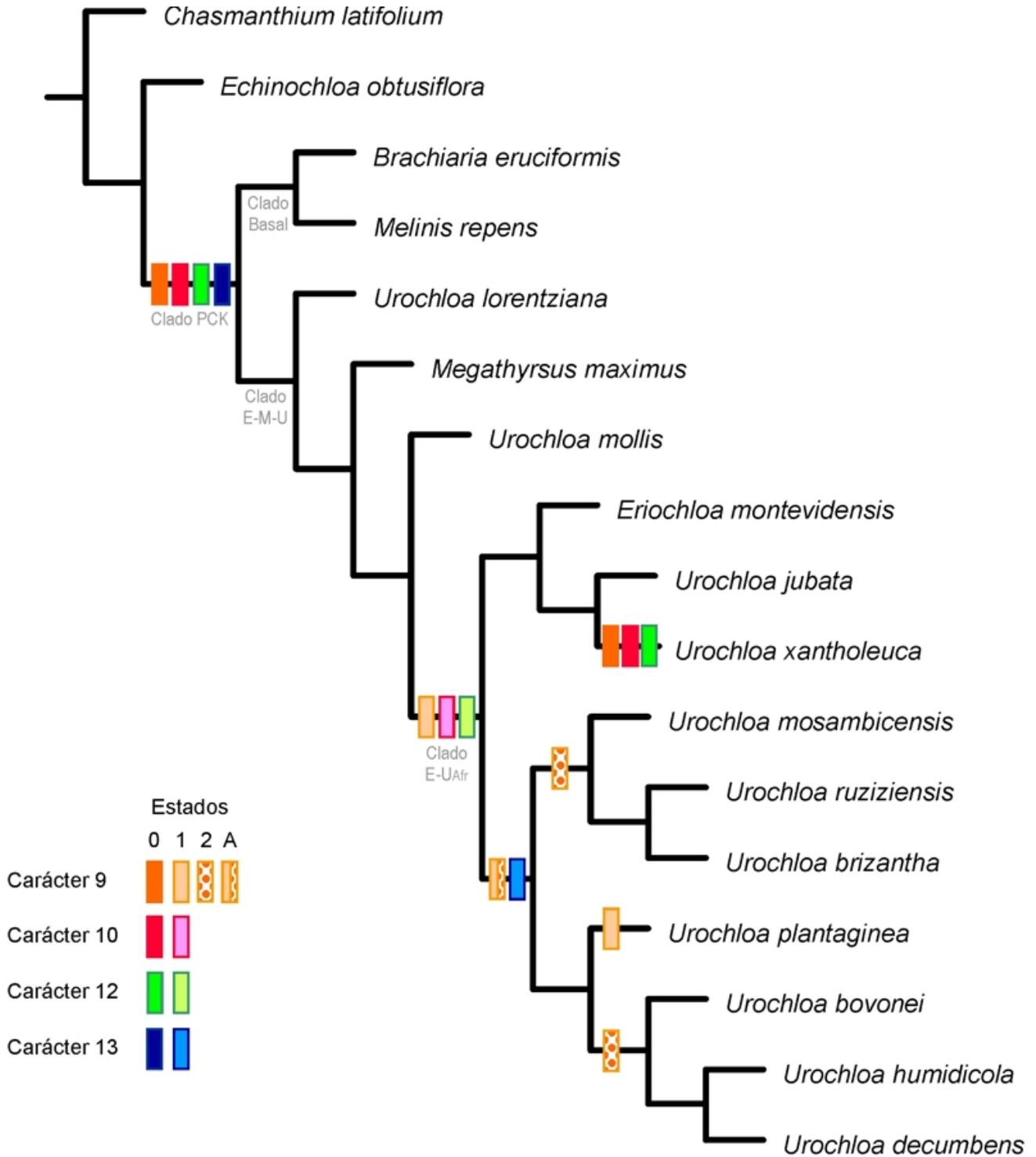


Figura 128.- Optimización de los caracteres relacionados al desarrollo de la espiguilla (véase texto) sobre uno de los árboles más parsimonioso obtenidos en el análisis combinado de datos moleculares (ITS1, 5.8S e ITS2) y morfológicos (estructura y desarrollo de la inflorescencia).

Luego, los resultados de la optimización sugieren que el patrón PT de secuencia de iniciación de las espiguillas donde el desarrollo de la Cof se ve retrasada con respecto al resto de las espiguillas (carácter 9, estado 2) es un estado derivado del patrón PT donde la Cof se inicia antes que el resto de la espiguilla, cambio que se observa dentro del Clado E-UAfr. Asimismo, dentro del Clado E-UAfr el desarrollo de dichas espiguillas cambia hacia un sentido anfípeto a lo largo de la R¹ (carácter 13, estado 0). Este último cambio se observa en el mismo momento en el que las inflorescencias experimentan una modificación en el tipo de desarrollo del eje principal y una inversión en los sentidos de iniciación y diferenciación de R¹ (Fig. 127).

Desarrollo floral (Fig. 129). El estado ancestral para el Clado PCK resultó ser ambiguo por lo que no es posible determinar con exactitud la polaridad de los caracteres, lo que se complica aún más por la falta de información sobre los patrones de desarrollo del grupo externo. En la Figura 129 se muestra una de las cuatro reconstrucciones potenciales para el carácter patrón de desarrollo floral.

Al estudiar todas las reconstrucciones posibles para este carácter se sugiere que una hipótesis posible sería considerar al patrón 4 (estado 3) como el estado plesiomórfico para el Clado PCK. El patrón 4, aparece como estado plesiomórfico en 3 de las 4 reconstrucciones posibles y representa a aquellas flores donde el estambre abaxial es el más adelantado en el desarrollo y la flor proximal queda protegida por la lemma cuando los carpelos de la flor distal se inician.

Asimismo, considerar al patrón 4 como ancestral para el Clado PCK implicaría que: el patrón 3 (estado 2) es derivado del patrón 4 (estado 3), que el patrón 1 (estado 0) es

derivado del patrón 2 (estado 1) y el patrón 7 (estado 6) es estado derivado del patrón 5 (estado 4). Dependiendo de la reconstrucción observada el patrón 6 (estado 5) puede ser estado derivado del patrón 4 o el patrón 5.

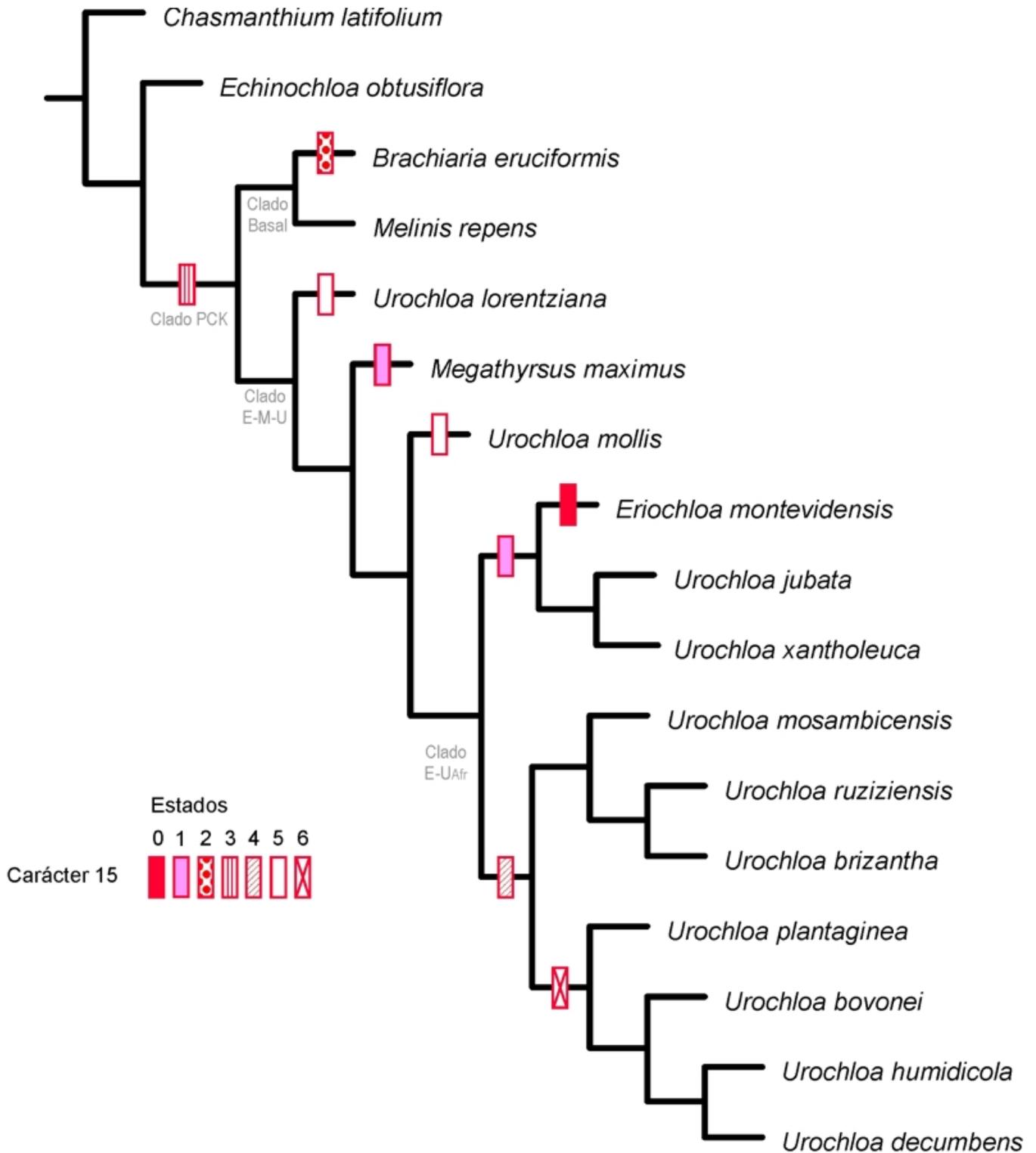


Figura 129.- Una de las cuatro reconstrucciones posibles para la optimización del carácter patrón de desarrollo floral sobre uno de los árboles más parsimoniosos obtenidos en el análisis combinado de datos moleculares (ITS1, 5.8S e ITS2) y morfológicos (estructura y desarrollo de la inflorescencia).