

### **3. Materiales y Métodos**



### **3.1 Cultivo de material para estudios tipológicos y de desarrollo**

Se cultivaron plantas de *Chaetium*, *Eriochloa*, *Megathyrsus*, *Melinis* y *Urochloa* a partir de semillas provenientes de colecciones a campo o de Bancos de Germoplasma (CIAT, USDA), en el invernáculo de la Facultad de Ciencias Agrarias (UNL, Esperanza). Por tratarse de plantas C<sub>4</sub>, con floración en meses estivales, la germinación de las semillas se realizó a principios de la primavera. Las semillas fueron germinadas en cajas de petri forradas con papel secante humedecido con agua corriente y colocadas en estufa de germinación a oscuridad permanente y temperatura constante de 26°C ó 28°C. Al cabo de 4-7 días, dependiendo de la especie, las semillas germinaron y fueron trasplantadas a macetas de 1 lt. con iguales cantidades de tierra y turba. Cuando fue necesario, las plantas fueron transplantadas por segunda vez a macetas de 4 lts. o 7 lts. Las plantas crecieron en invernáculo en el período comprendido entre los meses de Septiembre y Noviembre. Luego, las macetas fueron trasladadas a campo en los meses de Noviembre a Abril. Las plantas fueron regadas cuando fue necesario y no se empleó ningún fertilizante. Entre los meses de Diciembre a Marzo, dependiendo de la especie, se alcanzó la etapa de floración, y a partir de ello se re-determinaron las especies empleando las claves y descripciones taxonómicas de Stapf (1919), Clayton (1979), Clayton & Renvoize (1982), Nicora & Rúgolo de Agrasar (1987), Webster (1987), Zizka (1988), Zuloaga et al. (1994), Zuloaga & Morrone (1995, 1996), Morrone et al. (1998), Morrone & Zuloaga (1992, 1993, 1999), Arriaga (2000), Simon & Jacobs (2003) y Veldkamp (1996, 2004). Además, se tomaron fotografías de las inflorescencias maduras con cámara digital Nikon COOLPIX 990, se herborizó material que posteriormente fue depositado en el herbario A. E. Ragonese (SF) y se tomaron muestras de las diferentes etapas de desarrollo de las mismas.

### **3.2 Estudios sobre la morfología comparada de las inflorescencias adultas**

Plantas vivas (cultivadas en el invernáculo de la Facultad de Ciencias Agrarias, UNL) y material herborizado, provenientes de herbarios nacionales (CTS, J, LIL, SI, y SF) y extranjeros (NY, MO, US), de 110 especies en total fueron analizadas empleando microscopio estereoscópico (SM) (**Apéndice 2A**). Entre ellas: un total de 91 especies pertenecen al complejo *Brachiaria-Urochloa* mientras que las restantes son representantes de los géneros afines (*Megathyrsus*, *Eriochloa*, *Melinis*, *Chaetium*, *Yvesia* y *Thuarea*). Se caracterizaron los sistemas de ramificación de los órganos vegetativos y de las inflorescencias empleando la terminología tipológica propuesta por Troll (1964) y Weberling (1989), concepción que permite la comparación general de las formas existentes (Rua, 1999). Cuando fue necesario, se utilizaron las abreviaciones de la terminología tipológica propuesta por Vegetti & Müller-Doblies (2004) para el uso internacional.

Las observaciones fueron organizadas de acuerdo a las características de las diferentes zonas de la sinflorescencia. Especialmente, se analizaron caracteres relacionados con: (1) si el eje principal y las ramas primarias (paracladios) terminan en una espiguilla o son estériles. En el último caso se caracterizó dicha terminación; (2) número y grado de desarrollo de las ramas primarias: reducidas a una espiguilla (coflorescencia), o constituidos además por ramas (paracladios) de orden consecutivo (sólo secundarios o hasta de orden n); (3) caracterización de las ramas distales (paracladios cortos o paracladios distales): reducidos a una espiguilla, formados por un par de espiguillas o por un grupo de más de dos espiguillas; (4) disposición de las ramas primarias y ramas distales sobre el eje principal; (5) disposición de las ramas largas: número de ramas por nudo; (6) ausencia o presencia de trofotagma: perfilo y además una

o más brácteas. Variabilidad en el desarrollo de las brácteas y en el número de brácteas por rama larga. Potencialidad de desarrollo de las yemas axilares del trofotagma; (7) caracterización del raquis; y (8) crecimiento intercalar de los entrenudos, tanto del eje principal como de las ramas.

Los datos tipológicos obtenidos fueron volcados en una matriz de especies vs. caracteres tipológicos y se realizaron esquemas de toda la planta y de la inflorescencia adulta empleando el Software AutoCAD 2004, que fueron impresos (en impresora HP DESKJET 930C) y posteriormente “escaneados” empleando Scanner HP SCANJET 2200C. Las imágenes obtenidas fueron exportadas con archivos de extensión .jpg y editadas empleando Corel PHOTO-PAINT 10 y Corel PHOTO-PAINT 12. Las láminas que se presentan en esta Tesis fueron realizadas con CorelDRAW 10 y CorelDRAW 12.

### **3.3 Estudios de desarrollo**

Un total de 14 especies de *Urochloa*, una especie de *Brachiaria*, 2 especies de *Eriochloa*, *Megathyrsus maximus*, y dos especies de *Melinis* fueron seleccionadas y estudiadas utilizando Microscopia Electrónica de Barrido (MEB) (**Apéndice 2B**). Los géneros *Chaetium*, *Eccoptocarpha*, *Thuarea* y *Yvesia* no fueron incluidos por carecer de material disponible para realizar este tipo de estudios.

Se trabajó con material coleccionado a campo, o cultivado en el invernáculo y en el Jardín Botánico de la Facultad de Ciencias Agrarias de Esperanza (UNL). Las muestras de inflorescencias en diferentes etapas de desarrollo fueron fijadas con FAA (formol : ácido acético: 70% etanol, 10 : 5 : 85, v/v) por un período no menor a 48 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras fueron lavadas y preservadas en etanol al 70%. La

dissección y clasificación ulterior de las muestras en las diversas etapas del desarrollo se realizó sumergiéndolas en etanol al 70% en una caja de petri que se colocó bajo microscopio estereoscópico ZEISS DV4 (Jena, Alemania). Las muestras diseccionadas fueron almacenadas en etanol 70% en eppendorf de 1,5 ml debidamente rotulados. Para proceder con la deshidratación se perforaron eppendorf de 0,5 ml como se muestra en la Figura 4.



**Figura 4.-** Eppendorf perforados

Los eppendorf de 0,5 ml se rotularon y las muestras fueron traspasadas de a una a estos nuevos recipientes. Para evitar la deshidratación en este paso, siempre se mantuvieron las muestras sumergidas en etanol 70% en cajas de petri como así también los eppendorf perforados. En cada eppendorf se colocaron entre 5 a 6 muestras e inmediatamente fueron sumergidos en etanol 70% en un frasco de esterilización común. De esta manera, la deshidratación posterior se realizó cambiando el contenido de dicho frasco de esterilización y recargándolo nuevamente. Las muestras fueron deshidratadas en series crecientes de etanol (70%, 80%, 96%, 100%) más dos cambios finales de acetona pura. Los cambios fueron de una hora cada uno. Posteriormente las muestras fueron secadas con punto crítico en un BALTEC CPD 030, utilizando CO<sub>2</sub> como medio para el equilibrio entre las fases.

Una vez secadas, las muestras fueron montadas en placas de bronce circulares de aproximadamente 1 cm de diam. y 1 mm de espesor, previamente desengrasadas con ácido nítrico al 1% diluido en etanol 70%. Cuando fue necesario, el montaje se realizó empleando un microscopio estereoscópico ZEISS DV4 (Jena, Alemania). En este caso, se

empleó como adherente una mezcla de grafito con esmalte sintético transparente. En general, por cada placa de bronce se montó una única muestra. A su vez, las placas de bronce fueron adheridas con una mezcla de purpurina y acetona a porta muestras de aluminio torneadas. Cada uno de los porta muestras fue fijado sobre planchas de telgopor y almacenados en recipientes de cierre hermético, los que a su vez, se colocaron dentro de cajas con silica gel. De esta manera se logró almacenar las muestras montadas hasta el momento de ser observadas bajo MEB evitando por completo que las mismas se humedezcan.

Las muestras montadas fueron metalizadas con oro-paladio (40% y 60% respectivamente) utilizando un equipo Thermo VG Scientific POLARON SC7620 SPUTTER COATER y fueron posteriormente observadas y fotografiadas por medio de un microscopio JEOL JSM-T 100 (Kent, UK) del servicio de microscopia electrónica de barrido del Museo de la Plata (La Plata, Argentina) o mediante un microscopio electrónico de barrido marca PHILIPS XL30 series (Eindhoven, Holanda) del servicio de microscopia electrónica de barrido del Museo de Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia" (Buenos Aires, Argentina). Las muestras fueron fotografiadas en formato digital, empleando la mayor resolución posible (300dpi) en extensión tif.

### **3.4 Estudios anatómico-histológicos**

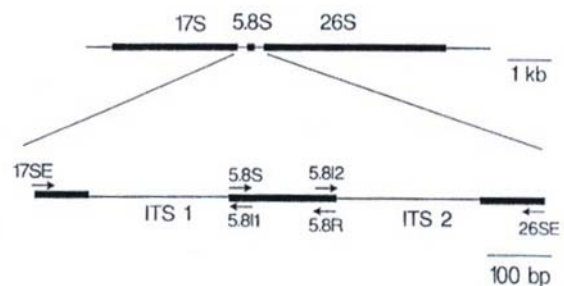
Para los estudios con microscopia óptica (MO), espiguillas en diversas etapas del desarrollo fueron fijadas con FAA, posteriormente deshidratadas en una serie creciente de *n*-butanol e incluidas en Histoplast siguiendo el protocolo propuesto por Ruzin (1999).

A partir del material incluido se realizaron secciones longitudinales y trasversales seriadas cortadas a 9-10 micrones de espesor utilizando micrótomo rotativo REICHERT. Las secciones fueron adheridas a porta-objetos, previamente desengrasados, empleando Albúmina de Mayer (Johansen, 1940). Posteriormente, las secciones fueron coloreadas con safranina-fast green o hematoxilina de Mayer (Johansen, 1940) y montadas en Eukitt (Hatfield, PA, USA). El material coloreado fue estudiado con microscopio óptico OLYMPUS BH30 y fotografiado con cámara digital NIKON COOLPIX 990.

### **3.5 Análisis filogenético y estudio preliminar de la evolución de las inflorescencias de *Brachiaria* y *Urochloa***

**3.5.1 Extracción, amplificación y secuenciación de ADN.** A los efectos de analizar en un contexto evolutivo la morfología de la inflorescencia, se empleó la hipótesis molecular propuesta por Torres González & Morton (2005), a la que se le incorporaron cuatro nuevas secuencias y datos morfológicos referidos a la tipología y desarrollo de las inflorescencias. Entre las cuatro nuevas secuencias se encuentran 3 especies de *Urochloa* (*U. lorentziana*, *U. mollis* y *U. plantaginea*) más una especie de *Eriochloa* (*E. montevidensis*).

El ADN para los cuatro nuevos taxa fue extraído a partir de hojas preservadas en silica-gel, empleando el método CTAB-total y CTAB-miniprep de Giussani et al. (2001) que resultan



**Figura 5.-** La composición del gen rDNA en *Sorghum* y sus parientes. Las líneas gruesas representan la región codificante de la unidad ribosomal; las líneas delgadas representan la región espaciadora ITS. Las flechas representan la posición de la secuencia del primer usados para la amplificación y secuenciación. Diagrama obtenido de Sun et al. (1994).

ser modificaciones de los protocolos propuestos por Doyle & Doyle (1987), Murray & Thompson (1980), y Saghai-Marroof et al. (1984).

La región genómica ITS, incluyendo el gen 5.8S, fue amplificada por medio de la PCR (*Polymerase Chain Reaction*) empleando como *primers* 17SE y 26SE (Sun et al., 1994) (**Apéndice 2C**). Los *primers* consisten en dos regiones conservadas de 20 pb en los genes ribosomales 17s y 26s (Fig. 5).

Además, se incluyó en el extremo 5' de cada uno de los *primers* 8 pb correspondientes al sitio *EcoR* I. El fragmento de ADN amplificado por medio de estos *primers* es de aproximadamente 800 pb de largo e incluye los genes ribosomales ITS1, 5.8S e ITS2. Las condiciones de amplificación en 25  $\mu$ l fueron: 2.5  $\mu$ l 10X Buffer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 2.5  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub> (2.5 mM, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 1  $\mu$ l dNTP (10  $\mu$ M, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 1  $\mu$ l 17SE (10 mM), 1  $\mu$ l 26SE (10 mM), 1  $\mu$ l DMSO (100%), 0.3  $\mu$ l de Taq Polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 14.2  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O, 1.5  $\mu$ l ADN. Después de un calentamiento inicial de 94° C por 3 min., las muestras fueron incubadas por 35 ciclos a 94° C por 1 min, a 58° C por 1 min. y a 72° C por 2 min. Las reacciones fueron completadas incubando las muestras por 5 min. a 72° C.

Para el control de la cuantificación y calidad del ADN se sembraron 3  $\mu$ l de cada muestra en 5  $\mu$ l de Loading Buffer en geles de agarosa al 1% y TBE 1X. La electroforesis se llevó a cabo a 4,5 V/cm (corriente constante) durante 1 hora. Posteriormente, los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (0,1  $\mu$ g/  $\mu$ l), TBE 1X por 30 minutos y se visualizaron en un transiluminador de UV.

Los fragmentos de ADN fueron purificados y secuenciados empleando un secuenciador automático capilar ABI3730XL (Applied Biosystems, Foster City, CA). Los



*primers* empleados en la reacción de secuenciación son aquellos que fueron empleados para realizar PCR (17SE y 26SE) (Fig. 5 y **Apéndice 2C**).

Para descartar la ocurrencia de amplificación inespecífica o contaminación en la muestra, las secuencias obtenidas se compararon con secuencias conocidas en distintas bases de datos mediante el programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*, desarrollado por el National Center for Biotechnology Information, EUA) disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>. Este programa utiliza un algoritmo de búsqueda de homología de secuencias que permite identificar coincidencias significativas entre una secuencia provista por el usuario (incógnita) y una secuencia de ADN almacenada en la base de datos en donde se está realizando la búsqueda.

La edición de las secuencias se realizó con el programa BioEdit Sequence Alignment Editor, de utilización gratuita, disponible en <http://services.bioesp.nl/blat/cgi-bin/blast.cgi?program=blastn>. Este programa permite visualizar gráficos de cromatogramas de secuencias, editar y reconstruir una secuencia completa de una molécula de ADN a partir de otras más cortas.

Para la identificación de posibles secuencias parálogas de ITS, éstas se caracterizaron por: el largo, el contenido de G + C y la presencia de la región conservada en ITS1 (GGCRY [n 4 a 7] GYGYCAAGGAA [donde Y=C o T; R=G o A]) (Liu & Schardl, 1994), utilizando el programa BioEdit Sequence Alignment Editor. Se ha hipotetizado que parte de esta región conservada o la misma completa actúa como señal crítica en el procesamiento enzimático del ARN ribosomal y además facilita el alineamiento de las secuencias en los análisis filogenéticos (Liu & Schardl, 1994; Sede, 2005).

### 3.5.2 Análisis filogenético: alineamiento, estrategias de búsqueda y medidas de apoyo.

Para explorar en forma preliminar el valor filogenético que poseen los caracteres de inflorescencia y la evolución de los mismos se empleó como base la filogenia molecular propuesta por Torres González & Morton (2005) para *Brachiaria* y *Urochloa*. Al combinar los caracteres que surgen de estudiar la estructura adulta y el desarrollo de las inflorescencias sobre una base molecular, es posible obtener una primera aproximación del valor filogenético y patrón de evolución de la morfología de las mismas.

Para ello se construyeron dos matrices: (1) una matriz exclusivamente molecular constituida por secuencias de la región ITS1, 5.8S e ITS2; (2) una matriz en la que se combinaron los caracteres moleculares anteriores y los morfológicos de inflorescencia presentados en esta tesis. El alineamiento de las secuencias se realizó por medio del programa ClustalW Multiple Alignment (Thompson et al., 1994) y posteriormente se corrigió manualmente.

Las matrices se construyeron sobre la base de las 14 secuencias de ITS (sobre un total de 22 estudiadas por Torres González & Morton, 2005) de especies africanas de *Brachiaria* y *Urochloa* obtenidas de GENBANK (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y tres nuevas. Dos de estas últimas corresponden a especies americanas de *Urochloa* (*U. lorentziana* y *U. mollis*) y la otra, a una especie africana (*U. plantaginea*) (**Apéndice 2D**). Cuatro especies fueron seleccionadas como grupo externo de *Brachiaria* y *Urochloa* (*Chasmanthium latifolium*, *Echinochloa obtusifolia*, *Eriochloa montevidensis* y *Melinis repens*) cuyas secuencias de ITS fueron también obtenidas de la base de datos de GENBANK (excepto *Eriochloa montevidensis* la cual se incorpora en esta tesis) (**Apéndice 2D**).

Del estudio comparado de la estructura adulta de la UIF y del desarrollo de la inflorescencia, se seleccionaron 16 caracteres morfológicos por ser discretos y no polimórficos entre ejemplares de una misma especie (**Apéndice 2E**). Los datos morfológicos para el grupo externo fueron obtenidos de observaciones personales y de estudios previos (Stür, 1989; Frank, 1998). Entre los caracteres morfológicos seleccionados, siete son binarios (caracteres 2, 4, 5, 6, 10, 12, 13) mientras que los restantes son caracteres multiestados cualitativos (**Apéndice 2E**).

Los análisis se realizaron siguiendo el principio de máxima parsimonia usando el software TNT 1.0 (Goloboff et al., 2003) con todos los caracteres de igual peso y no ordenados. La alineación de los caracteres gaps ("-") resultó ambigua en algunos puntos por lo que fueron codificados como datos perdidos ("?") y han sido excluidos del análisis.

Para evitar el problema de las islas (colección de árboles cortos interconectados que están separados de otras islas por árboles más largos) la búsqueda consistió en realizar 100 secuencias de adición al azar combinando *sectorial searches* y *tree fusing*, colapsando los árboles luego de la búsqueda. Seguidamente, y a partir de los árboles obtenidos en el paso anterior guardados en la memoria, se utilizaron los algoritmos de *ratchet* y *tree fusing*, hasta lograr la estabilización del consenso. El uso de *ratchet* permite encontrar islas adicionales a las cuales a veces es imposible llegar desde un árbol subóptimo hasta otro de longitud menor, a menos que se pase a través de un árbol de longitud mayor (Maddison, 1991).

El soporte relativo de los clados fue obtenido a partir del método de Jackknife, introducido en sistemática por Lanyon (1985). Este método se basa en realizar alteraciones de la matriz (mediante re-muestreos al azar sin reemplazo de algunos caracteres),

calculando con qué frecuencia un grupo dado se mantiene en los árboles óptimos. Esto da una idea de qué proporción de evidencia a favor y en contra existe para cada grupo y por lo tanto en qué grado la adición de nuevos caracteres puede modificar las conclusiones. Se llevaron a cabo 100 réplicas y para cada una de ellas se realizó una búsqueda heurística tradicional con TBR sobre 10 secuencias de adición al azar, reteniendo 10 árboles en cada replicación. La probabilidad de remoción de caracteres fue de  $p = 0,36$  y los valores se expresaron como frecuencias absolutas.

Los resultados obtenidos de las búsquedas empleando la matriz molecular y la matriz combinada fueron comparados para obtener un conocimiento preliminar del valor filogenético de los caracteres de inflorescencia y el grado de resolución que éstos aportan a la filogenia del Clado PCK

Con el objetivo de obtener una primera aproximación de la evolución de la morfología adulta y los patrones de desarrollo de la inflorescencia de *Brachiaria* y *Urochloa*, los caracteres fueron optimizados sobre uno de los árboles de mínima longitud resultante de la búsqueda previa. La optimización se realizó usando TNT versión 1.0 (Goloboff et al., 2003). Cuando los estados de caracteres fueron ambiguos en algún nodo, todas las reconstrucciones parsimoniosas equivalentes fueron examinadas.

### **3.6 Estudios de Expresión génica a nivel floral**

**3.6.1 Material estudiado.** Con el objetivo de estudiar las bases genéticas del desarrollo de las espiguillas se seleccionaron dos especies filogenéticamente distantes entre sí. De esta manera se coleccionaron inflorescencias de *Eleusine indica* (L.) Gaertn. (USDA # PI 315700) y *Megathyrsus maximus* (USDA # PI 419507) a partir de plantas que crecieron bajo

condiciones estándar en el invernáculo de la Universidad de Missouri-St. Louis (Missouri, USA) y en la Facultad de Ciencias Agrarias (Santa Fe, Argentina).

**3.6.2 Aislamiento de ADNc, PCR, subclonado y secuenciación.** El ARN total fue extraído a partir de inflorescencias jóvenes, hojas, cañas y raíces empleando la solución RNAwiz (Ambion, Austin, TX, USA) y siguiendo las instrucciones de los fabricantes. El ADNc fue generado a partir del ARN extraído usando Superscript III (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) siguiendo las recomendaciones de los fabricantes, utilizando polyT como *primer adaptador* (**Apéndice 2C**). Por medio de una PCR se comprobó la calidad del ARN y ADNc usando como control positivo *ACTIN*. Los *primers* empleados fueron *ACTIN-59F* y *ACTIN-764R* (**Apéndice 2C**).

Mediante PCR se amplificaron cadenas dobles de homólogos de *LHS1* a partir de ADNc usando los siguientes *primers* degenerados (**Apéndice 2C**): *LHS1-5F* y *EiLHS1-UTR1R* para *E. indica* y *LHS1-5F* y *LHS1-633R* para *M. maximus*. Los fragmentos de PCR fueron purificados usando Qiaquick purification columns (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA), subclonados usando el vector pGEM-T (Promega, Madison, WI, USA), y los plásmidos resultantes fueron limpiados empleando Qiaprep spin columns (Qiagen Inc.) siguiendo las recomendaciones de los fabricantes. Los plásmidos limpios fueron secuenciados y compilados como fue descrito previamente por Malcomber & Kellogg (2004). Ambas secuencias fueron ingresadas en GENBANK (DQ315475, DQ315476).

**3.6.3 Análisis filogenético.** Las secuencias de nucleótidos de *EiLHS1* y *MmLHS1* fueron alineadas con otras 18 secuencias de *LHS1* obtenidas de GenBank, basados en la

concepción de translación de amino-ácidos, empleando Clustal X (Jeanmougin et al. 1998) y MacClade 4 (Maddison & Maddison, 2003). Como grupo externo fueron incluidos *Oryza sativa* MADS5 (*OsMADS5*), *Zea mays* MADS3 (*ZmM3*), y *Lolium perenne* MADS6, obteniendo una matriz alineada de un total de 23 secuencias. Se realizó un análisis filogenético Bayesiano usando MrBayes 3.1 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001) en el *Beowulf parallel processing cluster* en la Universidad de Missouri – St. Louis empleando dos búsquedas separadas de 10 millones de generaciones con el *default flat priors* y usando el GTR 1 I1 G como modelos de evolución de las secuencias estimado por Modeltest (Posada & Crandall, 1998). Los árboles fueron muestreados cada 500 generaciones y el *burn-in* fue determinado empíricamente por *plotting likelihood score* contra el número de la generación. Después que los *burn-in trees* fueron eliminados, los valores de credibilidad de los clados (CC) y el 95% set de credibilidad de los árboles fue estimado usando MrBayes (Huelsenbeck & Ronquist, 2001). Para generar árboles de *constraint* que reflejen las relaciones estimadas por el GPWG (2001) se empleó MacClade 4.0. El 95% de credibilidad de las topologías Bayesianas fue filtrado contra el árbol obtenido por el GPWG que empleó PAUP 4.0 (Swofford, 2000).

**3.6.4 Hibridaciones in-situ.** Inflorescencias jóvenes en diferentes estados de desarrollo fueron diseccionadas, fijadas y deshidratadas como fue descrito por Malcomber & Kellogg (2004), excepto que el material no fue infiltrado en vacío y las secciones de 8–10 µm fueron secadas sobre porta objetos Probe-On plus (Fisher Scientific, Pittsburg, PA, USA) por lo menos por tres días consecutivos. Pruebas específicas de *LHS1-ADNc* fueron preparadas para *M. maximus* siguiendo el protocolo descrito por Malcomber & Kellogg (2004). El

templado de prueba C-terminal + la región no trasladable 3' (UTR) para *E. indica* fue amplificado mediante PCR usando los siguientes *primers*: *EiLHS1-542F* (5'-AGGAAGGCGGGCACAGTGGC-3') y la *polyT* como *primer adaptador*. Las pruebas de preparación, hibridación, lavado post-hibridación, inmunolocalización y la detección colorimétrica fueron llevadas a cabo siguiendo el protocolo descrito por Malcomber & Kellogg (2004). Luego de 2-3 días de coloración, se tomaron fotografías de los cortes usando cámara digital NIKON 995 digital camera sobre un microscopio ZEISS AXIOPHOT con campo brillante de iluminación.

**3.6.5 Análisis de Southern blot.** Aproximadamente un total de 10 mg de ADN de *E. indica* y *M. maximus* fue digerido con *BamH1*, *EcoR1*, or *HindIII*, separados en un gel de agarosa al 1.2%, traspasados sobre una membrana de nylon, e hibridizados con pruebas de *LHS1* 32P-dCTP-labeled C-terminal (para *M. maximus*) y C-terminal + 3' UTR (para *E. indica*) por 16 horas a 65° C siguiendo el protocolo propuesto por Laurie et al. (1993). Luego de la hibridación, los blots fueron lavados dos veces a 65° C en 2 x SSC (1 x SSC es 0.15M cloruro de sodio y 0.015M citrato de sodio)/0.5% sodium dodecyl sulfate (SDS) por 20 min cada uno, y dos veces en 0.1 x SSC/0.1% SDS.