

5. Discusión



5.1 La estructura de la inflorescencia adulta

La unidad de inflorescencia (UIF) de *Brachiaria*, *Urochloa* y los géneros afines es politélica, como ha sido descrita para las Poaceae (Troll, 1966, 1969; Cámara Hernández & Rúa, 1991; Vegetti, 1991a,b) y para la mayor parte de las Monocotiledóneas. El eje principal de la UIF politélica de *Brachiaria*, *Urochloa* y los géneros relacionados, puede culminar o no en una espiguilla terminal o florescencia principal (FP). En el primer caso la UIF es un paniculodio no-truncado (P) y, en el segundo caso la UIF es un paniculodio truncado (PT).

El hecho de que el eje principal y las ramas terminen en una espiguilla terminal podría llevar a dudas sobre una posible monotelia. Sin embargo Goebel (1931) sostiene que las flores de las Poaceae son laterales y Cámara Hernández & Miente Alzogaray (1994), al analizar la estructura floral en la familia, determinan que todas las flores son laterales y, consecuentemente, la UIF en la familia es politélica. Asimismo, en *Brachiaria*, *Urochloa* y los géneros afines, la condición de UIF politélica está confirmada por la presencia de un remanente (estéril) del meristema apical de la raquilla que se observa cuando se estudia el desarrollo de la espiguilla y flores, lo cual también ha sido determinado en otros géneros de Paniceae (*Setaria*, *Pennisetum* y *Cenchrus*, Doust & Kellogg, 2002a,b).

Como ya se ha mencionado anteriormente, *Brachiaria*, *Chaetium*, *Eriochloa*, *Urochloa*, *Megathyrsus* y *Melinis* forman un clado monofilético altamente soportado (Gómez-Martínez & Culham, 2000; Zuloaga et al., 2000; Duvall et al., 2001; Giussani et al., 2001). A partir de estos resultados parece natural suponer que al estudiar la morfología de la UIF se encontrarían más similitudes que diferencias. Sin embargo se ha observado todo lo

contrario, dado que: (1) existen por lo menos veintiún subtipos diferentes de UIF adultas en el clado, y (2) dentro de un mismo género existen diversas morfologías de UIF.

A partir del análisis comparado de las morfologías de inflorescencias adultas de *Brachiaria*, *Urochloa* y los géneros que están directamente relacionados a ambos, surgen 10 caracteres que varían entre los diversos géneros y especies: (1) presencia/ausencia de R_{TT} , (2) presencia/ausencia de bráctea en la UIF, (3) grado de homogeneización de la UIF, (4) truncamiento de la FP, de las Cof y de R^1 , (5) número y máximo grado de ramificación de las R^1 , (6) disposición de las R^2 sobre las R^1 , (7) diferencias en la longitud de los entrenudos del eje principal y filotaxis de las R^1 , (8) diferencias en la longitud de los entrenudos de las R^1 o R de ramificación consecutiva, (9) distribución y ordenamiento de las espiguillas sobre las R, y (10) estructura de las R^1 más distales de la UIF. De estos diez caracteres, algunos son polimórficos entre las especies y otros entre ejemplares de una misma especie como se detalla a continuación.

Al estudiar comparativamente la estructura adulta de la inflorescencia del grupo de taxa seleccionados se observa que, el eje principal de la UIF lleva un número total de R^1 variable entre los géneros estudiados, entre las especies de un mismo género y a su vez entre ejemplares de una misma especie. El número de R^1 puede ser entre: 1-24 en *Brachiaria*, 1-62 en *Urochloa*, 1-20 en *Eriochloa*, 9-13 en *Chaetium*, 18-56 en *Megathyrsus*, 8-22 en *Melinis*, 3-6 en *Yvesia* y sólo 1 en *Thuarea*. Así, *Urochloa* es el género que presenta un mayor rango de variación en el número total de R^1 , mientras que *Thuarea* es el género que posee la mínima expresión en el número de R^1 que constituyen la UIF. Por otro lado, los géneros *Chaetium*, *Megathyrsus*, *Melinis* e *Yvesia* siempre presentan un número de 3 o más

R^1 sobre el eje principal. Por lo tanto, el carácter número total de R^1 es polimórfico, inclusive dentro de la misma especie.

Generalmente las R^1 se disponen en forma alterna sobre el eje principal de la UIF. Sin embargo, y dependiendo de los procesos de acortamiento de entrenudos del eje principal, numerosas especies presentan R^1 de disposición subopuesta o seudoverticilada intercaladas entre las R^1 alternas de la misma UIF.

En aquellas UIF que son del tipo Paniculodio no-truncado (P), independientemente del grado de homogeneización que presenten, por debajo de la FP se encuentran Rc^1 o Rd^1 (excepto en *B. pungipes*). Según la especie y los ejemplares estudiados de una misma especie, estas ramas pueden estar conformadas por 1 o hasta 4 coflorescencias (espiguillas). En consecuencia, el carácter estructura de las ramas distales de la UIF, al igual que lo observado para el número de R^1 , es polimórfico dentro de la misma especie.

La sinflorescencia de las gramíneas puede poseer o no ramas del trofotagma (R_{TT}) (Vegetti & Müller-Doblies, 2004). En todos los géneros estudiados este carácter varía entre las especies examinadas, no es característico de un género en particular y no se correlaciona con el ciclo de vida de la planta dado que existen plantas perennes o anuales que pueden presentar o no R_{TT} . Frank (1998) analizó la correlación existente entre la presencia de R_{TT} y los diferentes climas en los que habitan las especies de *Brachiaria* y *Urochloa*. Este autor encontró que la ausencia de R_{TT} depende de la existencia de climas tropicales o climas áridos y secos (ej. estepa) y a su vez, que las especies que desarrollan R_{TT} no habitan en climas con gran variabilidad de temperatura y humedad. Parecería que este tipo de ramas no se desarrollan en condiciones extremas de humedad.

Las R_{TT} se originan a partir de yemas axilares ubicadas en la zona de entrenudos largos de la sinflorescencia. En las gramíneas, mientras las R de la UIF carecen completamente de hojas, las R_{TT} comienzan su desarrollo con la iniciación de un perfil y, puede continuar su crecimiento produciendo una o más hojas normales, muy raramente sin desarrollar hojas, pero sólo con brácteas (Vegetti & Müller-Doblies, 2004). En consecuencia, Vegetti & Müller-Doblies (2004) proponen dos tipos diferentes de R_{TT} en Poaceae: ramas del trofotagma con hojas (R_{TT+L}) y muy raramente ramas del trofotagma sin hojas (R_{TT-L}). En los géneros estudiados en los que se desarrollan R_{TT} sólo se han observado ramas del trofotagma que llevan hojas vegetativas normales (R_{TT+L}).

De todos los caracteres observados se identifican al menos nueve procesos evolutivos ya descritos e identificados para las Poaceae (Vegetti & Anton, 1995, 2000) que son, en parte, los responsables de originar las diversas formas de UIF observadas en este grupo de géneros:

1. Truncamiento de FP
2. Truncamiento de Cof
3. Truncamiento de ramas largas (Rl^1)
4. Truncamiento de ramas cortas (Rc^1)
5. Homogeneización de ramas (parcial o completa)
6. Aumento o reducción en la producción de ramas de orden consecutivo (grado de ramificación)
7. Alargamiento diferencial de los entrenudos del eje principal
8. Alargamiento diferencial de los entrenudos de las ramas
9. Presencia o ausencia de bráctea foliosa (similar a una espata)

Como se muestra en la **Tabla 3** los géneros *Brachiaria* y *Urochloa* presentan la mayor cantidad de procesos evolutivos entre sus UIF, mientras que el resto de los géneros afines son más estables en la morfología de las UIF.

Tabla 3.- Procesos evolutivos presentes en *Brachiaria*, *Urochloa* y los géneros directamente emparentados a ambos. Referencias: 1, truncamiento de FP; 2, truncamiento de Cof; 3, truncamiento de ramas largas; 4, truncamiento de ramas cortas; 5, homogeneización de ramas (parcial o completa); 6, aumento o reducción en la producción de ramas de orden consecutivo (grado de ramificación); 7, alargamientos diferenciales de los entrenudos del eje principal; 8, alargamiento diferenciales de los entrenudos de las ramas; 9, presencia o ausencia de bráctea foliosa (similar a una espata). La tilde (✓) indica presencia y el guión medio (-) indica ausencia.

Género	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Brachiaria</i>	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-
<i>Urochloa</i>	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-
<i>Eriochloa</i>	✓	-	✓	✓	✓	✓	-	-	-
<i>Chaetium</i>	-	-	-	-	✓	✓	-	-	-
<i>Megathyrsus</i>	-	-	-	-	-	✓	✓	✓	-
<i>Melinis</i>	-	-	-	-	-	✓	-	✓	-
<i>Thuarea</i>	✓	-	✓	✓	✓	✓	-	-	✓
<i>Yvesia</i>	-	-	-	-	-	-	✓	-	-

Los procesos de truncamiento (pérdida de estructuras apicales) y homogeneización (especialización de ramas de la UIF) han sido propuestos como procesos evolutivos comunes en todas las Angiospermas (Troll, 1964, 1969; Maresquelle,

1970; Sell, 1976; Weberling, 1965, 1985; Kunze, 1989; Vegetti & Anton, 1995, 2000). Estos procesos han sido considerados como responsables, al menos en parte, de generar diversidad morfológica en las UIF de las Angiospermas (Troll, 1964, 1969; Maresquelle, 1970; Sell, 1976; Weberling, 1965, 1985; Kunze, 1989; Vegetti & Anton, 1995, 2000).

5.1.1 Truncamiento. Este proceso significa la pérdida de la flor apical (como en la gran mayoría de las Poaceae), o un paso más, representado por un sistema apical de flores sobre el eje principal de la UIF (espiguilla terminal o FP), un sistema apical de flores sobre el extremo apical de las ramas o la pérdida de ramas completas. Kunze (1989) determinó diversos tipos de inflorescencias politélicas en función de la existencia de distintos grados de truncamiento.

Entre las especies estudiadas existen UIF que no presentan truncamiento y otras que experimentaron truncamiento de distintas partes de la UIF dependiendo de la especie examinada. En este último caso se observó truncamiento de: (1) partes distales del eje principal, (2) ramas primarias (ya sean $R1^1$ o Rc^1) y (3) partes distales de las R^1 .

Las UIF de *Chaetium*, *Melinis*, *Megathyrsus* e *Yvesia*, son del tipo paniculodio no truncado (P), mientras que *Eriochloa* y *Thuarea* presentan siempre UIF del tipo paniculodio truncado (PT), es decir que este último tipo ha perdido las regiones distales del eje principal de la UIF. Por otro lado, en *Brachiaria* y *Urochloa* existen UIF del tipo P o PT dependiendo de la especie en estudio. Todas las especies de *Brachiaria* que presentan UIF del tipo PT son africanas (excepto *B. rugulosa* que es una especie australiana). A su vez, la

mayoría de las especies de *Urochloa* que poseen una UIF del tipo PT son africanas (excepto, *U. adpersa*, *U. meiziana*, *U. ophryodes* y *U. platyphylla* que son especies americanas).

Al comparar las morfologías de las UIF del tipo P y PT se observa que en todas aquellas UIF que no desarrollan FP, faltan las Rc^1 que se encontrarían por debajo de dicha espiguilla.

Existen dos morfologías novedosas para el grupo en estudio (subtipo PcH_1 y subtipo PcH_2) e inclusive para las Paniceae en general. *Brachiaria pungipes*, especie africana, posee una UIF del tipo P constituida por la FP y por RI^1 únicamente. Si comparamos esta inflorescencia con otras UIF del tipo P completamente homogeneizadas se observa que la UIF de *B. pungipes* carece de las Rc^1 que se ubican por debajo de la FP. Por el contrario, las UIF de *B. dimorpha*, *B. epacridifolia* y *U. holosericea*, parecen haber perdido sus RI^1 a lo largo de la evolución, dado que sus UIF sólo están formadas por la FP y Rc^1 . Las dos primeras especies son africanas, mientras que *U. holosericea* es una especie australiana. A partir de ello, resulta muy interesante determinar si la FP de *B. pungipes* es realmente terminal o, por el contrario es lateral y adoptó la posición de terminal. Igualmente, resultaría de sumo interés determinar el origen del sistema de ramificación de la UIF de *B. dimorpha*, *B. epacridifolia* y *U. holosericea*, dado que toda la UIF también podría considerarse como una RI^1 que adoptó la posición del eje principal. Al respecto, no existen indicios de pulvínulos o brácteas que estén apoyando estas últimas hipótesis, sin embargo los estudios ontogenéticos podrían ser una herramienta útil para corroborar estas hipótesis. Hasta el momento se carece de información sobre el desarrollo de estos subtipos de UIF y tampoco fueron incluidos en esta tesis por falta de material disponible.

Otro nivel de truncamiento se ha observado en algunas especies de *Urochloa*, en las cuales la UIF presenta RI¹ que carecen de las espiguillas distales (incluyendo la Cof). Este fenómeno es constante en todos los especímenes estudiados de *U. ruzizensis*, mientras que sólo se observó en algunos ejemplares de *U. brizantha* y *U. decumbens*. Esto indica que en estas dos últimas especies el truncamiento de las partes distales de las RI¹ puede estar condicionado por factores ambientales más que estar genética y ontogenéticamente impuesto como se observa en *U. ruzizensis*.

5.1.2 Homogeneización. La homogeneización de ramas (es decir la similitud morfológica entre las ramas de la UIF) es un proceso evolutivo que determina, en gran medida, la apariencia general de la inflorescencia. Dicha tendencia evolutiva existe en diferentes grupos de Poaceae, tanto en especies pertenecientes a la subfamilia Panicoideae (Rua, 1993; Rua, 1996; Rua & Weberling, 1998; Vegetti, 1999a; Pensiero & Vegetti, 2001) como en otras subfamilias, como por ejemplo en Chloridoideae (Perreta & Vegetti, 1998; Cámara Hernández, 2001; Liu et al., 2005) y Ehrhartoideae (Vegetti & Pensiero, 1999; Vegetti, 2000).

Resulta muy interesante remarcar los diferentes grados de homogeneización, presentes especialmente entre taxones de los géneros *Brachiaria*, *Urochloa*, *Eriochloa* y *Chaetium* y a su vez, en algunos casos, entre ejemplares de una misma especie. Se han observado tres grados diferentes de homogeneización: UIF no-homogeneizadas, UIF parcialmente homogeneizadas y UIF completamente homogeneizadas. Las UIF que son incompletas o parcialmente homogeneizadas han sido consideradas como formas de transición o intermedias entre las UIF no-homogeneizadas y las UIF completamente

homogeneizadas (Rua & Weberling, 1998; Rua, 1996; Reinheimer & Vegetti, 2004). Estas formas intermedias de homogeneización también han sido observadas en otros géneros de Paniceae (ej. *Panicum* y *Paspalum*) (Rua & Weberling, 1998; Rua, 1996; Reinheimer & Vegetti, 2004).

Como consecuencia directa de los diferentes grados de homogeneización, la UIF puede ser disyunta o no disyunta. Las UIF no-homogeneizadas no presentan ningún grado de disyunción, mientras que las UIF que son parcial o completamente homogeneizadas son disyuntas, en las cuales se pueden reconocer RI¹ y Rc¹.

La homogeneización de ramas fue asociada numerosas veces con otro proceso evolutivo muy importante denominado truncamiento (Vegetti, 1991a; Rua & Weberling, 1998; Vegetti & Anton, 2000). A partir de las observaciones presentadas en esta tesis, se sugiere que no siempre la homogeneización está directamente correlacionada con el truncamiento, a diferencia de lo observado para otros miembros de la tribu Paniceae. En el grupo en estudio se advirtió que todas las UIF que experimentaron procesos de truncamiento presentan algún grado de homogeneización aunque no todas las UIF homogeneizadas son truncadas. Numerosas especies de *Brachiaria*, *Urochloa* y *Chaetium* presentan UIF homogeneizadas en algún grado sin observarse procesos de truncamientos. Por el contrario, todas las especies de *Eriochloa* y a su vez *Thuarea involuta* y ciertas especies de *Brachiaria* y *Urochloa* muestran una correlación directa entre los procesos de homogeneización y truncamiento como ocurre en otros géneros pertenecientes a la subfamilia Panicoideae (ej. *Setaria*, la mayoría de las especies de *Paspalum* y miembros de la tribu Andropogoneae) (Rua, 1993; Rua, 1996; Rua & Weberling, 1998, Vegetti, 1999a;

Pensiero & Vegetti, 2001), y especies de la subfamilia Chloroideae (ej., *Leptochloa* y *Digitaria*) (Perreta & Vegetti, 1998; Cámara Hernández, 2001; Liu et al., 2005).

En resumen, a través del estudio de la morfología comparada de las UIF adultas de *Brachiaria*, *Urochloa* y los géneros cercanos a ambos, se pueden identificar diez caracteres, derivados principalmente de variaciones observadas a nivel de la UIF de la sinflorescencia. De la combinación de estos caracteres se identificaron dos grandes grupos de UIF: P y PT. Cada uno de estos grupos de UIF se pueden dividir en varios subgrupos dependiendo del grado de homogeneización que presenten las especies. Cuando se incorporan el resto de los caracteres considerados se obtienen al menos veintiuna morfologías adultas de UIF diferentes en este grupo de géneros muy cercanos evolutivamente entre sí.

De todos los caracteres observados no existe carácter alguno que permita delimitar taxonómicamente a *Brachiaria* de *Urochloa*. Por el contrario, los géneros *Chaetium*, *Melinis*, *Megathyrsus*, *Thuarea* e *Yvesia* presentan caracteres constantes entre sus especies los que permite una mejor delimitación de estos taxa. De esta manera, la UIF del género *Chaetium* puede ser del tipo PCH₆ (paniculodio completamente homogeneizado con mayor número de Rc¹ que de Rl¹) o raramente PpH₁ (paniculodio parcialmente homogeneizado con ramificaciones hasta de cuarto orden). Todas las especies estudiadas del género *Melinis* son del subtipo PnH₂ (paniculodio no homogeneizado con entrenudo proximal de la R¹ muy corto). A su vez, la UIF de *Megathyrsus* es del subtipo PnH₃ (paniculodio no homogeneizado con entrenudo proximal de la R¹ muy largo), la UIF de *Thuarea* pertenece al subtipo PTCH₁ (paniculodio truncado completamente homogeneizado con presencia de

bráctea que cubre totalmente la UIF) y la UIF de *Yvesia* es del subtipo PnH₁ (paniculodio no homogeneizado con ramificaciones hasta de segundo orden). Este último subtipo de UIF también está presente en tres especies de *Brachiaria* (*B. chusqueoides*, *B. longiflora* y *B. umbelata*). La UIF del subtipo PnH₂ característico del género *Melinis* se halla presente también en una especie de *Urochloa*, *U. comata*. El subtipo PcH₆ presente en *Chaetium* también se encontró en *Brachiaria ovalis* y algunas especies de *Urochloa* (*U. lachnantha*, *U. oligotricha* y *U. sclerochleaena*).

5.2 Desarrollo

A lo largo de su vida, la planta sufre profundos cambios en su desarrollo, modificando su forma en respuesta a una variedad de factores. Estos cambios pueden ser sutiles y graduales o pueden ocurrir rápidamente y ser cambios abruptos (Chuk & Hake, 2005). Entre estos últimos se pueden mencionar la transición de meristema vegetativo a reproductivo y la transición de meristema de inflorescencia a meristema floral.

5.2.1 Cambios en el ápice relacionados con la transición a floración. Morfológicamente, la transición a floración en *Brachiaria* y *Urochloa* implica el alargamiento del meristema apical por encima del último primordio de hoja formado, al igual que lo observado para otros miembros de la familia Poaceae (Stür, 1986; Fraser & Kokko, 1993; Orr & Sundberg, 1994; Sundberg et al., 1995; Sundberg & Orr, 1996; Doust & Kellogg, 2002a,b). Hasta el momento, las diferencias en los diámetros del meristema apical durante la transición a floración correlaciona directamente con el número de ramas y ortósticos que se van a iniciar posteriormente (cf. Sundberg & Orr, 1996).

Actualmente se han realizado importantes avances en el estudio de la regulación genética y la biología molecular de la transición a floración, tomando como modelos a *Arabidopsis* y *Zea mays* (Chuck & Hake, 2005). Las plantas integran exitosamente numerosas señales ambientales para llevar a cabo la transición. No obstante esta transición involucra la actividad de los meristemas en algún punto, las señales causantes parecen provenir de regiones fuera de los meristemas. La evidencia para esta hipótesis proviene de comprobar la ausencia de expresión de *CO* (*CONSTANS*), *id1* (*indeterminate1*) y *PLA1* (*PLASTOCHRON1*) en las zonas meristemáticas, cuyos mutantes florecen tardíamente o nunca florecen (Putterill et al., 1995; Colasanti et al., 1998; Itoh et al., 1998; Kozaki et al., 2004).

Cambio en la filotaxis del meristema apical. Una vez que el meristema apical ha dejado de ser un meristema vegetativo para pasar a ser reproductivo, éste se alarga y comienza a producir ramas primarias laterales (R^1). Al comparar la disposición de las hojas, en la etapa vegetativa, y la disposición de las R^1 , en la etapa reproductiva, se observó que en numerosas especies de gramíneas el meristema apical modifica la filotaxis durante la transición a floración. En estos casos, en la etapa vegetativa el meristema apical produce primordios de hojas en forma dística (dos ortósticos), para luego cambiar a una disposición polística o espiralada (numerosos ortósticos) con la producción de R^1 . El cambio de filotaxis dística a espiralada es bien conocida dentro de la familia Poaceae y se ha observado en Ehrhartoideae [*Oryza* (Ikeda et al., 2005; Itoh et al., 2005), *Zizania* (Weir & Dale, 1960)], Panicoideae [*Zea* (Bonnett, 1948; Sundberg & Orr, 1996), *Ixophorus* (Kellogg et al., 2004), *Panicum*, *Pennisetum*, *Setaria* (Doust & Kellogg, 2002a,b; Bess et al., 2005)], y

Chloridoideae [*Eragrostis*, *Eleusine* (Moncur, 1981)]. Este cambio de filotaxis también se observa en algunas especies de *Urochloa*, *Eriochloa* y en *Megathyrsus*.

La filotaxis espiralada de la inflorescencia también se presenta en *Streptochaeta* (Anomochlooideae), y *Joinvillea* y *Ecdeiocolea* (Ecdeiocolaceae; Rudall et al., 2005), grupo basal de las Poaceae. Algunas porciones de la inflorescencia de *Restionaceae* resultan ser también espiraladas (Ronse Decraene et al., 2002), sin embargo el desarrollo temprano de la inflorescencia completa de este grupo taxonómico no se ha estudiado en detalle. La presencia de filotaxis espiralada en los linajes más basales de las Poaceae hace suponer que probablemente se trate de un estado de carácter ancestral (Malcomber et al., 2006).

5.2.2 Desarrollo del sistema de ramificación de la UIF. El desarrollo del sistema de ramificación difiere en numerosas características entre *Brachiaria*, *Urochloa* y los géneros directamente emparentados a ellos. Se han observado divergencias en el tipo de crecimiento del eje principal, en el sentido de iniciación, disposición y diferenciación de los primordios de R^1 , sentido de iniciación y disposición de los primordios de ramas de segundo orden (R^2). Algunas de estas divergencias están estrechamente relacionadas entre sí. Por ejemplo, el tipo de crecimiento del eje principal, el sentido de iniciación de las R^1 y la simetría de la inflorescencia parecen ser tres caracteres directamente vinculados.

El desarrollo del eje principal. Se han observado dos patrones diferentes de desarrollo del eje principal: (1) iniciación de R^1 y alargamientos de entrenudos simultáneamente dependientes de la actividad del MA (patrón A); (2) iniciación de R^1 y alargamientos de entrenudos después que el MA ha iniciado la primer R^1 y cesa su actividad (patrón B). Las

inflorescencias (unidad de inflorescencia, UIF) que presentan el primer patrón pueden o no desarrollar florescencia principal (FP) y presentan una simetría estable entre los ejemplares de una misma especie. Por el contrario, hasta el momento todas las UIF que presentan el segundo patrón de desarrollo del eje principal nunca desarrollan FP y ramas cortas primarias (R^1) sobre el extremo distal del eje principal y la simetría es indeterminada.

Sentido de iniciación de R^1 . Las R^1 se pueden iniciar en sentido acrópeto o basípeto. Los géneros *Brachiaria*, *Eriochloa*, *Megathyrsus*, *Melinis* y algunas especies de *Urochloa* poseen UIF donde las R^1 se inician en sentido acrópeto. Por otro lado, sólo ciertas especies de *Urochloa* presentan UIF donde las R^1 se inician en sentido basípeto. Este último patrón se correlaciona directamente con el patrón B de desarrollo del eje principal (véase más arriba).

Las R^1 que se inician en sentido acrópeto lo hacen a partir de yemas normales o axilares. La presencia de pequeñas brácteas que se observan en estados tempranos del desarrollo en ciertas especies, confirma el origen axilar de dichas ramas. En consecuencia, en estos casos, la totalidad de la UIF esta representada por ramas que nacen de yemas axilares de primordios de hojas que no llegan a desarrollar completamente y son prácticamente imperceptibles cuando la inflorescencia es adulta.

Por el contrario, el origen de aquellas R^1 que se inician en sentido basípeto puede ser interpretado de diversas maneras. A continuación se plantean tres hipótesis que intentan esclarecer las homologías entre las diferentes ramas de la inflorescencia: las dos primeras establecen homologías sobre el tipo de meristemas que darán origen a las R^1

(axilar o adventicio), mientras que la última establece homologías de posición al comparar la inflorescencia de *Arabidopsis* con la inflorescencia de gramíneas.

Una posible hipótesis sería considerar a estas R^1 como de origen adventicio, excepto la primera rama iniciada (la más distal) la cual se origina en la axila de un primordio de hoja que deja de crecer muy tempranamente. Esto último ha sido bien documentado en *U. decumbens* (Stür, 1986). Es decir, las R^1 que se inician por debajo de la primer rama desarrollada, podrían tener su origen a partir de meristemas formados de novo a lo largo del único entrenudo de la UIF comprendido entre la inserción de la hoja bandera y la primera rama formada. Estos meristemas son similares a las yemas adventicias descritas por Rauh (1937). Existen tres características que soportan el carácter adventicio de este tipo de meristemas (cf. Rauh, 1937): (1) se forman en un entrenudo que se está alargando, (2) se forman en sentido basípeto, y (3) la correlación entre el desarrollo de los meristemas que se forman de novo y el cese temprano del desarrollo del eje principal. Esta hipótesis implica también que (Fig. 130): (1) el eje principal de estas especies de *Urochloa* es homólogo al primer entrenudo basal del eje principal de las UIF cuyas ramas se inician en sentido acrópeto, (2) la rama más distal es homóloga a la primer rama proximal de las UIF con ramas que se inician en sentido acrópeto y, (3) la segunda y las sucesivas ramas primarias no tienen homólogos directos con la rama más distal de la misma UIF (es decir la que se desarrolla a partir de una yema axilar), y tampoco con las ramas de las UIF cuyas ramas se inician en sentido acrópeto. Stür (1986), sobre la base del estudio del desarrollo de la inflorescencia de *U. decumbens*, fue el primer autor que planteó la posibilidad del desarrollo de ramas a partir de yemas adventicias en *Urochloa*.

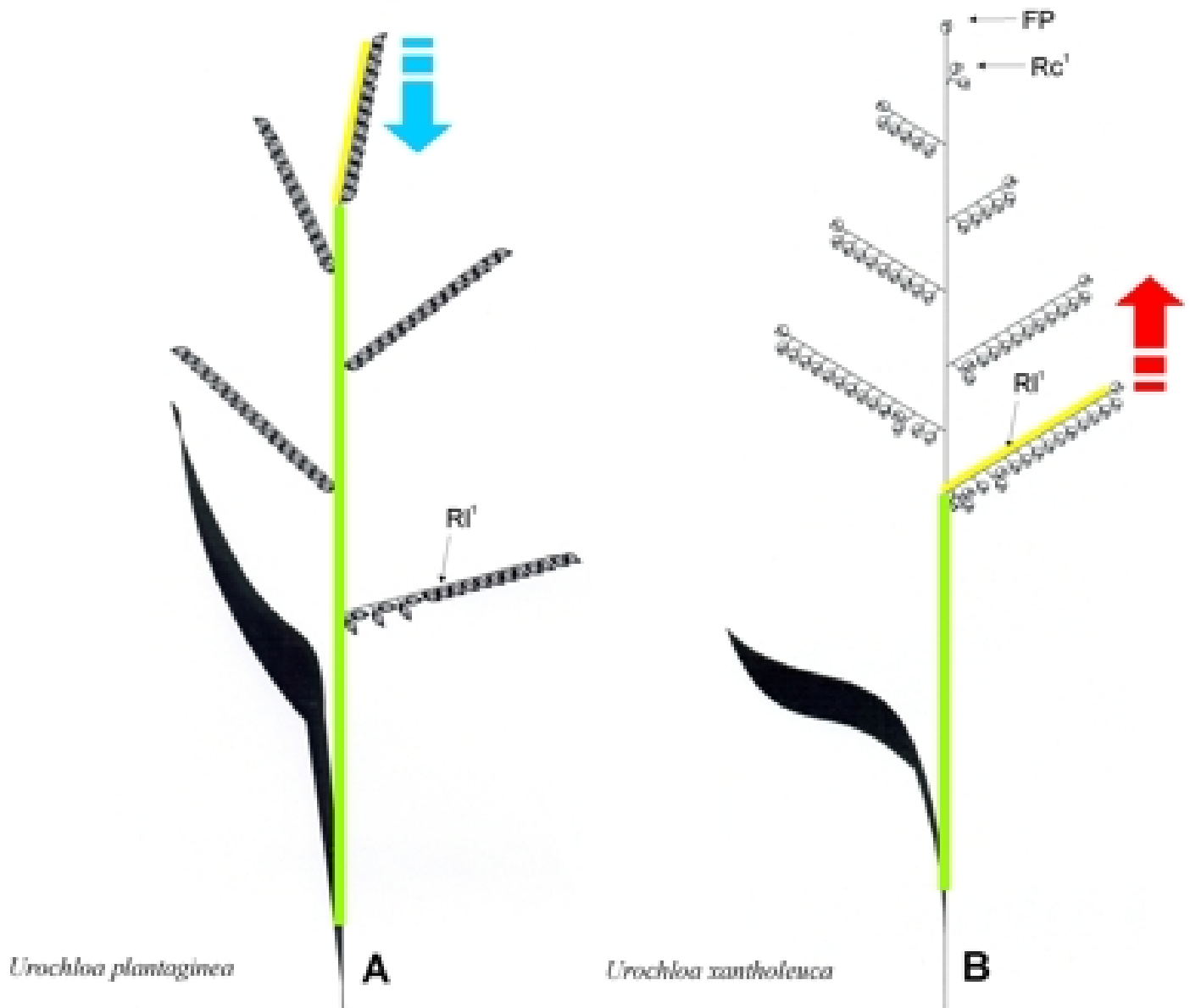


Figura 130.- Primer hipótesis sobre las posibles homologías de las diferentes partes de la inflorescencia al considerar a las ramas que se inician en sentido basípeto como de origen adventicio. Esta hipótesis implica que: (1) el eje principal de estas especies de *Urochloa* (A) es homólogo al primer entrenudo basal del eje principal de las UIF cuyas ramas se inician en sentido acrópeto (B) (en verde), (2) la rama más distal de B es homóloga a la primer rama proximal de las UIF con ramas que se inician en sentido acrópeto (A) (en amarillo) y, (3) la segunda y las sucesivas ramas primarias no tienen homólogos directos ni con la rama más distal de la misma UIF (es decir la que se desarrolla por yema axilar), ni tampoco con las ramas de las UIF cuyas ramas se inician en sentido acrópeto. Referencias: FP, florescencia principal; Rc', rama corta de primer orden; Ri', rama larga de primer orden. La flecha roja representa el sentido acrópeto de iniciación de las ramas primarias. La flecha azul indica el desarrollo basípeto de las ramas primarias.

Esta hipótesis se basa en la ausencia de primordios foliares en la inflorescencia de *U. decumbens*, cuestión que posteriormente fue puesta en duda por Frank (1998). Frank (1998) considera que la ausencia de primordios foliares en la inflorescencia no es razón suficiente para suponer que los racimos no tienen su origen en nudos verdaderos. Aunque la formación de yemas adventicias es bien conocida en otras Angiospermas (Rauh, 1937), en la familia Poaceae la presencia de estos meristemas parece ser un patrón poco común. De comprobarse esta hipótesis en *Urochloa*, este grupo de plantas constituiría la primera evidencia sobre yemas adventicias en inflorescencias de gramíneas conocidos hasta el momento.

Asimismo, como una segunda hipótesis, se podría plantear que los meristemas que darán origen a las R¹ quedan genéticamente determinados en sentido acrópeto sobre el eje principal de la inflorescencia durante la transición a floración (Rua & Reinheimer, inédito). Posteriormente, la determinación de la identidad de las R¹, a partir de dichos meristemas pre-existentes, y con ello la iniciación de las mismas se sucede en sentido basípeto, lo que quedaría evidenciado por el desarrollo de los primordios de R¹ en tal sentido.

La tercera hipótesis surge de comparar el desarrollo de la planta modelo de *Arabidopsis* con las de este grupo de gramíneas (Fig. 131) (Rua & Reinheimer, inédito). Hempel & Feldman (1994) describieron el desarrollo de *Arabidopsis thaliana* como bidireccional. Estos autores observaron que, en *Arabidopsis*, después de un período de inducción de días largos, las ramas más distales son las primeras en iniciarse y lo hacen en sentido acrópeto formando la UIF principal. A continuación, nuevas R¹ se inician por debajo de la UIF siguiendo una secuencia basípeta (Hempel & Feldman, 1994). Estas

nuevas ramas iniciadas en sentido basípeta culminan posteriormente su desarrollo con la formación de una nueva UIF en su extremo distal. Todas las ramas de *Arabidopsis*, independientemente del sentido ulterior de iniciación, tienen su origen en yemas axilares ubicadas en la axila de hojas bien desarrolladas. Asimismo, dichas yemas se inician en sentido acrópeto a lo largo de la planta de *Arabidopsis*, no obstante su posterior activación es anfípeta. Es probable que las ramas de *Urochloa* que se inician en secuencia basípeta puedan ser homólogas a aquellas ramas proximales que se originan en sentido basípeta en *Arabidopsis*, con la sola excepción que las R^1 más distales de *Urochloa*, y en general en gramíneas, no desarrollan hojas (quizá sean R_{TT-L} , véase más abajo y Fig. 131C) como si lo hacen las ramas de *Arabidopsis* (R_{TT+L}). Esta hipótesis implica que los procesos de truncamiento son aún más drásticos que lo sospechado hasta el momento. Al establecer una comparación entre las plantas de *Arabidopsis* y otras especies del Clado PCK con desarrollo acrópeto de ramas primarias (ej. *Megathyrsus*, *Melinis*, *Chaetium*, *Brachiaria*, *Urochloa leucacrantha*, *U. lorentziana*, *U. xantholeuca*) y especies de *Urochloa* cuyas ramas primarias se inician siguiendo una secuencia basípeta, se podría sospechar que en estas últimas ha desaparecido por completo la UIF principal (región que correspondería al desarrollo acrópeto de ramas primarias) (Fig. 131). De comprobarse esto último, sería un hallazgo de una gran connotación e importancia evolutiva en el estudio de la morfología de las inflorescencias de las Poaceae.

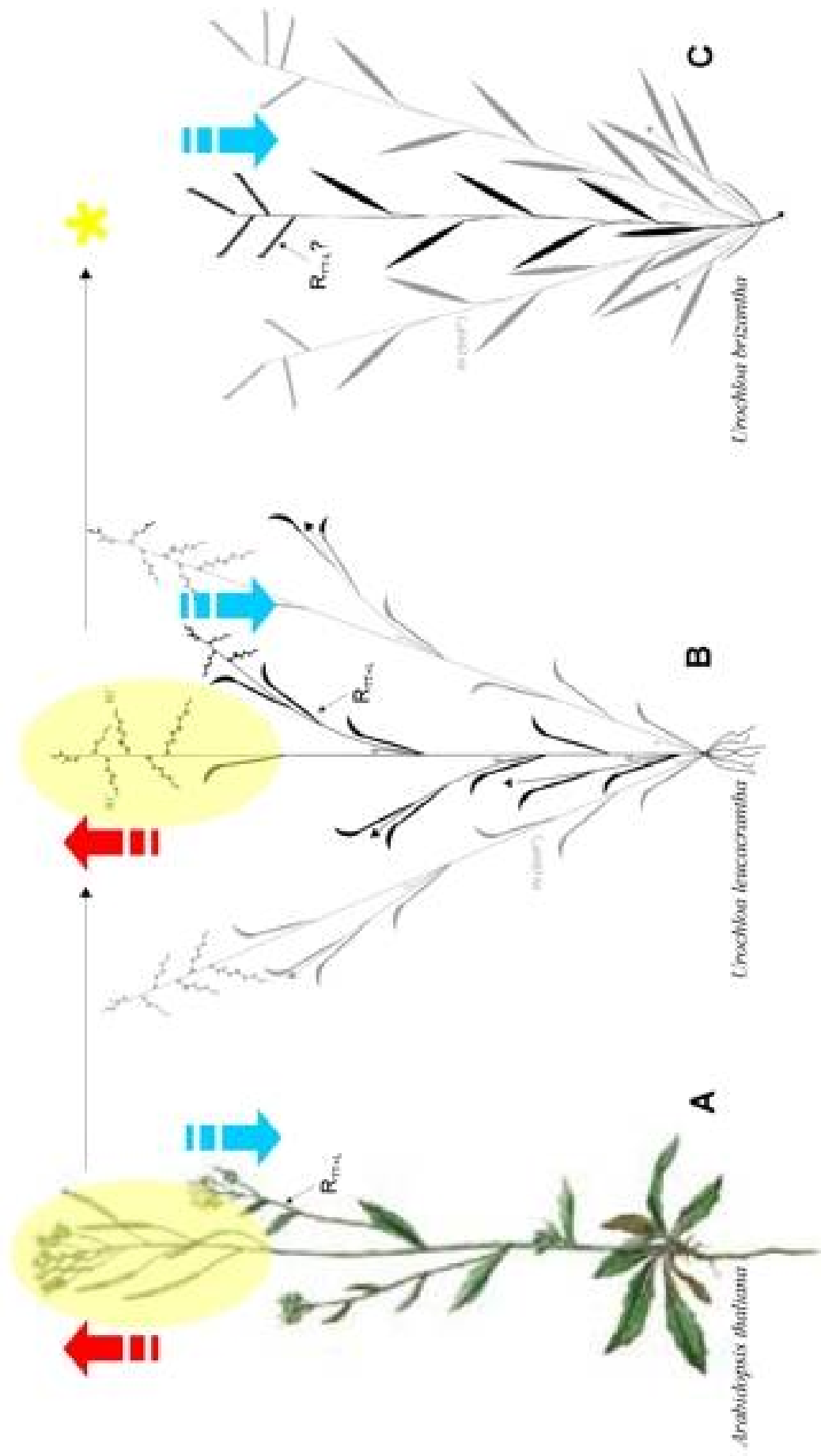


Figura 131.- Segunda hipótesis sobre el origen de las ramas primarias que se inician en sentido basipeto que surge de comparar el desarrollo de la planta de *Arabidopsis* con el desarrollo de las plantas de gramíneas. Es probable que las ramas de *Urochloa* que se inician en secuencia basipeta puedan ser homólogas a aquellas ramas proximales que se originan en sentido basipeto en *Arabidopsis*, con la sola excepción que éstas ramas en *Urochloa* no desarrollan hojas como si lo hacen las ramas de *Arabidopsis*. Al establecer una comparación entre las plantas de *Arabidopsis* (A) y otras especies de *Urochloa* con desarrollo acrópeto de ramas primarias (B) y especies de *Urochloa* cuyas ramas primarias se inician siguiendo una secuencia basipeta (C), se podría sospechar que en estas últimas ha desaparecido por completo la UIF principal (C). Referencias: R1, rama larga de primer orden; R2, rama del trofotagma con hojas desarrolladas; R3, rama del trofotagma sin hojas desarrolladas; IN(SINF), sinfloriscencia de segundo orden. La flecha roja representa el sentido acrópeto de iniciación de las ramas primarias. La flecha azul representa el sentido de iniciación basipeto de las ramas primarias. La sombra en amarillo indica la UIF terminal. El asterisco amarillo indica la posible ausencia de unidades de inflorescencia terminal.

Las hipótesis propuestas sobre el posible origen de las ramas primarias que se inician en secuencia basípeta son aún controversiales y no hay pruebas contundentes permitan conocer con mayor precisión el origen de las mismas. La primera hipótesis esta basada solo en la presencia o ausencia de primordios de hojas en la inflorescencia y de la correlación entre las características descritas por Rauh (1937) para las yemas adventicias presentes en otras familias de plantas. La segunda hipótesis surge de observar que, en general, todas las yemas de una planta de gramínea se inician en sentido acrópeto y son de origen axilar, inclusive aquellas que se encuentran por debajo de la UIF. Sin embargo, esta hipótesis no puede explicar la simetría inestable que tienen las UIF con R^1 que se inician en sentido basípeta (véase más abajo). Asimismo, hasta el momento no hay evidencias de primordios de hojas más o menos evidentes que permitan afirmar que dichas ramas son de origen axilar. La tercera hipótesis se basa en comparar dos plantas que evolutivamente, son muy distantes entre si. A su vez, esto se complica aún más si consideramos los diversos eventos de duplicación génica que han sufrido las Poaceae, lo que hace que el control génico del desarrollo de las gramíneas difiera ampliamente del descrito para *Arabidopsis* (Malcomber et al., 2006). Es por ello, que para comprender mejor el origen de las ramas que se inician siguiendo una secuencia basípeta a lo largo del eje principal, hacen falta estudios sobre la evolución de la genética del desarrollo. Entre los genes que podrían estar involucrados en el control de este tipo de ramificación durante el desarrollo de la inflorescencia se encuentran: *APO1*, *ABERRANT PANICLE ORGANIZATION1*; *BA1*, *BARREN STALK1/LAX*, *LAX PANICLE1*; *BIF2*, *BARREN INFLORESCENCE2*; *MOC1*, *MONOCULM1*; *PAP1*, *PANICLE PHYTOMER1*; *RA1*, *RAMOSA1*; *RCN*, *RICE CENTRORADIALIS*; *TS4*, *TASSELSEED4*; *TS6*, *TASSELSEED6*;

ZFL, ZEA LEAFY (Malcomber et al., 2006). Para la mayoría de estos genes no se conocen aún ortólogos con los genes de *Arabidopsis*, sólo un escaso número de ellos han sido recientemente clonados y se desconocen muchas de las funciones que cumplen durante el desarrollo de las inflorescencias de las gramíneas. Por lo tanto, el origen de las ramas que se inician en sentido basípeto en *Urochloa* es un aspecto muy interesante para estudiar pero a la vez muy complejo por el escaso conocimiento que se posee sobre las funciones de estos genes y su interacción con otros genes durante el desarrollo de las inflorescencias.

Por otra parte, es necesario resaltar que el desarrollo basípeto de las ramas primarias sobre el eje principal, observado en algunas especies de *Urochloa*, constituye el primer registro para las Paniceae y para las Poaceae en general. A partir de ello, se plantea la necesidad de conocer si este patrón de desarrollo es exclusivo de *Urochloa*, y por lo tanto evolucionó por única vez a lo largo de la historia evolutiva de las gramíneas o bien, apareció varias veces e independientemente dentro de la familia Poaceae.

Asimismo, este patrón es sumamente interesante de estudiar no sólo por el hecho de representar una novedad para las Poaceae, sino también porque no todas las especies que exhiben la misma morfología adulta presentan el mismo patrón de desarrollo. Es decir, se puede lograr la misma forma adulta de inflorescencia ya sea por desarrollo de ramas primarias en sentido acrópeto o basípeto, como por ejemplo en *U. jubata* y *U. platyphylla*.

Simetría de la inflorescencia. La simetría de un órgano queda definida por los planos de división que acepta este órgano, lo cual va a estar estrechamente relacionado con la posición o filotaxis de las estructuras que lo forman (Font Quer, 1993). De esta manera se

pueden encontrar simetrías radiadas, dorsiventrales y bilaterales. Los órganos con simetría radiada y bilateral son actinomorfos, mientras que los órganos con simetría dorsiventral son zigomorfos (Font Quer, 1993).

La filotaxis, es decir el arreglo de hojas y flores alrededor de un eje, es uno de los patrones más fascinantes en la biología. Tradicionalmente, y por numerosos años, la modelización por computadoras ha sido empleada para desarrollar y testear los mecanismos por los cuales se define la filotaxis (Adler et al., 1997). Sin embargo, al no incorporarse información sobre las bases celulares/moleculares de la filotaxis en dichos modelos, los mismos son considerados abstractos por numerosos autores (Adler et al., 1997). Recientemente, se ha descubierto que la auxina es la hormona que induce la formación de órganos (Reinhardt et al., 2003; Reinhardt, 2005). A partir de ello se plantea un nuevo modelo que trata de explicar las bases moleculares y el control en la regulación del establecimiento de la filotaxis. Es importante mencionar que dicho modelo ha sido propuesto para órganos que se inician siempre siguiendo una dirección acrópeta. En este modelo, el transporte polar de auxina en el ápice de la planta genera picos concentrados y localizados de auxina que determinarían el sitio preciso donde se formaría el órgano y, por consiguiente, el patrón de filotaxis observado en la naturaleza (Reinhardt et al., 2003; Reinhardt, 2005). Las proteínas PIN tienen un papel fundamental en el transporte de la auxina. Estas proteínas se localizan siguiendo una secuencia polar, lo que se traduce en la dirección del transporte polar de auxina. Estos estudios muestran que la mayoría de los aspectos de la filotaxis pueden ser explicados directamente por los patrones de expresión y la localización dinámica subcelular de *PIN1* (Reinhardt et al., 2003; Reinhardt, 2005). Hasta el momento, se conoce que el centro de la filotaxis es la auxina, que junto con *PIN1*

y *PID* (*PINOID*) regulan el transporte, y que *MP* (*MONOPTEROS*) es el encargado de la traducción de señales. Sin embargo, nuevos componentes involucrados en la corriente hacia arriba y hacia abajo permanecen desconocidos, al igual que la mayoría de los detalles bioquímicos y moleculares de la biosíntesis de la auxina, transporte y percepción (Reinhardt, 2005).

La simetría de la inflorescencia ha sido empleada como uno de los caracteres agrostológicos más importantes para distinguir las especies americanas de *Urochloa* y *Brachiaria* (Morrone & Zuloaga, 1992, 1993). Sin embargo, a partir de estudiar el desarrollo de la inflorescencia de un gran número de representantes de *Urochloa* y los géneros afines, la simetría de la inflorescencia parece ser un carácter variable en algunas especies y está correlacionado directamente con el sentido de iniciación de los primordios de R^1 sobre el eje principal. Todas aquellas especies cuyas ramas se inician siguiendo una secuencia acrópeta de iniciación tienen simetrías radiadas o dorsiventrales que se mantienen constantes en todos los ejemplares analizados para cada una de las especies y, a su vez, queda definida muy temprano en el desarrollo.

Por el contrario aquellas especies cuyas R^1 se inician siguiendo una secuencia basípeta presentan simetrías muy variables entre los diferentes ejemplares estudiados de una misma especie. Asimismo, en numerosas ocasiones la simetría de la inflorescencia resulta muy difícil de determinar porque algunas de las UIF están formadas por una o dos R^1 únicamente. En general, hasta el momento, se observa que el sentido basípeta de iniciación de las R^1 sobre el eje principal parece afectar el lugar donde se iniciarán dichas ramas, alterando en consecuencia la filotaxis de las ramas y la simetría de la inflorescencia.

Esto último podría ser interpretado de diversas maneras al considerar las diversas hipótesis sobre el origen de las R^1 mencionadas más arriba. Si las yemas que dan origen a estas ramas son adventicias, probablemente, no se encuentran reguladas y controladas por el mismo mecanismo fisiológico y genético propuesto por Reinhardt et al. (2003) y Reinhardt (2005) para ramas que nacen de yemas axilares y en sentido acrópeto. Por otro lado, si los meristemas que darán origen a las R^1 se inician en sentido acrópeto, aunque luego se activen en dirección basípeta, deberíamos pensar que siguen el mismo patrón de determinación de la filotaxis que aquellas UIF que inician meristemas y R^1 en sentido acrópeto y, en consecuencia, es de esperar una simetría estable de las UIF. Sin embargo, se sabe que la simetría de estas UIF es indeterminada, y en efecto, el mecanismo por el cual queda determinado el lugar donde se inician las R^1 parece no guardar relación con el mecanismo propuesto por Reinhardt et al. (2003) y Reinhardt (2005). A su vez, si consideramos que estas ramas son de origen axilar y surgen del desarrollo de las yemas que se encuentran por debajo de la UIF deberíamos considerar a cada una de las R^1 como una UIF separada, por lo tanto la simetría en este caso debería considerarse para cada una de las R^1 y ser tratadas como UIF separadas.

Disposición de las R^2 sobre las R^1 . Numerosos autores emplean el carácter disposición de las R^2 sobre las R^1 como carácter de valor taxonómico (Webster, 1988; Morrone & Zuloaga, 1992, 1993; Frank, 1998). En consecuencia, se pueden reconocer especies con R^2 en posición abaxial, sobre todos los lados de la R^1 o distribuida siguiendo un arreglo dístico. Sin embargo, este carácter es discutible en especial por las dificultades prácticas que se presentan cuando se intenta determinar la disposición de R^2 sobre R^1 en especies con

ramificaciones largas e inflorescencias laxas y a su vez, cuando se estudia material herborizado. En este trabajo se demuestra que los estudios de desarrollo pueden contribuir a mejorar la definición de este carácter, dado que el estudio del desarrollo temprano del sistema de ramificación permite determinar con precisión la ubicación inicial de las ramas antes que se elongen y se distorsione la disposición. De esta manera, se observó que todas las especies estudiadas pertenecientes al Clado PCK presentan R² que se inician en una posición abaxial con respecto a la R¹ que les dio origen, a diferencia de los que se pensaba para algunas especies que fueron definidas con disposición de R² hacia todos los lados de las R¹ (ej. *Megathyrsus maximus*).

Alargamiento diferencial de los entrenudos. A la madurez se observó que las inflorescencias de ciertas especies del Clado PCK presentan diferencias en la longitud de los entrenudos de la inflorescencia. Esta diferencia puede presentarse entre los entrenudos del eje principal (ej. *U. lorentziana*), entre los entrenudos que forman las R¹ y R² (ej. *Brachiaria eruciformis*) o presentarse sobre el eje principal y en ramas en una misma inflorescencia (ej. *Megathyrsus*). A partir de los estudios de desarrollo presentados en este trabajo se observó que dicha característica está definida en estados tardíos del desarrollo del sistema de ramificación de la inflorescencia, una vez que se han diferenciado los órganos florales y antes que las inflorescencias emerjan de la hoja bandera.

Es probable que el carácter alargamiento diferencial de entrenudos se defina en estados tardíos del desarrollo del sistema de ramificación de las inflorescencias de Paniceae y de Poaceae en general. Esta hipótesis surge de comparar el desarrollo tardío de las inflorescencias de los géneros del Clado PCK con otros géneros de Poaceae en los

cuales se observa que la diferenciación de los entrenudos se sucede siempre luego que se han diferenciado las espiguillas y los órganos florales. Ejemplo de ello son las inflorescencias de *Dactylis glomerata* (Fraser & Kokko, 1993), *Oryza sativa* (Ikeda et al., 2004), *Cenchrus*, *Setaria* y *Pennisetum* (Doust & Kellogg, 2002a,b; Bess et al., 2005), *Ixophorus* (Kellogg et al., 2004) e *Hymenachne* (Sörenson et al., inédito).

En numerosos casos las diferencias observadas en los entrenudos de las inflorescencias adultas determinan la apariencia general de dicha inflorescencia como por ejemplo se observa en las inflorescencias adultas de *Brachiaria* s.s. [= *Moroochloa*, (Veldkamp, 2004)], *Megathyrsus*, *Melinis*, algunas especies de *Urochloa* y otros géneros de Paniceae (Fraser & Kokko, 1993; Doust & Kellogg, 2002a,b; Ikeda et al., 2004; Kellogg et al., 2004; Bess et al., 2005; Malcomber et al., 2006; Sörenson et al., inédito). En consecuencia, la forma definitiva de la inflorescencia adulta depende, al menos en parte, del patrón de expresión de los genes que regulan el desarrollo tardío de la inflorescencia los que determinan selectivamente cuales son los entrenudos a alongar. Asimismo, el momento en que se observa el alargamiento diferencial de los entrenudos sugiere que el control génico no es el mismo que regula la especificación de la identidad de las ramas y espiguillas (Malcomber et al., 2006).

Posiblemente, por tratarse de un carácter especialmente cuantitativo y no cualitativo, son pocos los genes que han sido identificados como modificadores de la longitud de los entrenudos. *PANICLE PHYTOMER1* en arroz es uno de ellos, aunque también este gen está involucrado en aumentar el número de ramas (Takahashi et al., 1998). Asimismo, recientemente se identificaron numerosos QTL que afectan la densidad de las ramificaciones primarias en *Setaria* (Doust et al., 2005). Además, se ha observado

que el tratamiento de las plantas con giberelina (GA) e inhibidores GA afectan el largo de las ramas en *Setaria* (Malcomber et al., 2006; Bess et al., inédito). No obstante estos resultados, la información que existe sobre el control fisiológico y génico del alargamiento diferencial de los entrenudos es aún escasa en la literatura. Los futuros estudios sobre el desarrollo tardío de la inflorescencia deberían centrarse en identificar aquellos loci que afectan exclusivamente el largo de los entrenudos de la inflorescencia y no en partes vegetativas de la planta.

5.2.3 Desarrollo de las espiguillas

Secuencia y sentido de iniciación de las espiguillas en la UIF. En el Clado PCK, la secuencia y sentido de iniciación de las espiguillas se puede correlacionar directamente con las inflorescencias de tipo paniculodio (P) y paniculodio truncado (PT).

En las especies que poseen inflorescencia de tipo P, las espiguillas se desarrollan en el extremo distal del eje principal y de las ramificaciones. En este caso, la primera espiguilla que se inicia es la FP, luego le siguen las Cof de las R¹, posteriormente se inician espiguillas sobre el extremo distal de las R³, R⁴, etc. Las Cof de las R¹ siguen un sentido de iniciación anfípeto al igual que el resto de las espiguillas que se inician a lo largo de la UIF. En este patrón, las espiguillas de las ramas proximales de la inflorescencias (que son las que llevan un mayor grado de ramificación) son las últimas en iniciarse, aunque en numerosos casos dichas ramas son las primeras en desarrollarse. Por el contrario, en aquellas UIF que carecen de espiguilla terminal y ramas distales (PT), el desarrollo de las espiguillas es en sentido basípeto al considerar la UIF en su totalidad. En general, en estas especies la rama más distal es la que presenta el desarrollo más adelantado.

Por lo tanto, se puede afirmar que: (1) en el Clado PCK el sentido anfípeto de iniciación de espiguillas a lo largo de la UIF es característico de especies con inflorescencias de tipo P, mientras que el sentido basípeto de iniciación de espiguillas es común en las inflorescencias de tipo PT, (2) cuando la inflorescencia es del tipo P, el sentido de iniciación de las espiguillas no se correlaciona con el sentido de iniciación de las ramas de la inflorescencia, siendo que por ejemplo en *Megathyrsus maximus*, las ramas se inician en sentido acrópeto, mientras que las espiguillas lo hacen en sentido anfípeto al considerar la UIF en su totalidad y, (3) la iniciación de las espiguillas no es sincrónica a lo largo de la inflorescencia.

El hecho que en las UIF de tipo P el sentido de iniciación de las ramas no se correlacione con el sentido de iniciación de las espiguillas a lo largo de la inflorescencia puede tener su explicación en el diferente grado de ramificación que exhiben las ramas en este tipo de inflorescencias. En general, las ramas con mayor orden de ramificación se observan en la región proximal de las UIF de tipo P y son las últimas en iniciar espiguillas. Esto sugiere que, el sentido de iniciación de las espiguillas en este tipo de UIF depende directamente de la producción de ramificaciones, es decir, a mayor grado de ramificación a partir de una rama, más tarde se formarán las espiguillas sobre dicha rama.

El sentido de iniciación de las espiguillas también se puede relacionar con el momento en el cual la UIF emerge de la hoja bandera. En general, en todas las especies estudiadas hasta ahora, las ramas más distales, aunque en muchos casos son las últimas en iniciarse, son las primeras en desarrollar y diferenciar espiguillas y flores siendo también las primeras ramas en emerger de la hoja bandera.

En el Clado PCK la iniciación de las espiguillas no es sincrónica a lo largo de la inflorescencia lo cual parece ser una característica no compartida con otros miembros de Poaceae, como por ejemplo, *Cenchrus*, *Setaria*, *Pennisetum* e *Ixophorus* (Doust & Kellogg, 2002a,b; Kellogg et al., 2004). Por otro lado, al igual que en el Clado PCK, las espiguillas de Andropogoneae no se desarrollan todas simultáneamente sino que siguen un sentido acrópeto o basípeto a lo largo de la inflorescencia (Le Roux & Kellogg, 1999).

El control génico involucrado en la simultaneidad de la iniciación de las espiguillas y, los diferentes sentidos de iniciación de las mismas cuando su desarrollo no es sincrónico es un campo muy interesante para investigar. Como ha sido sugerido previamente, este fenómeno puede tener su explicación en los diversos tipos de inflorescencias y en particular, en el nivel de complejidad en cuanto al grado de ramificación de las mismas (Doust & Kellogg, 2002a,b; Kellogg et al., 2004; Bess et al., 2005). Asimismo, esto indica que el control génico del desarrollo de las espiguillas está regulado corriente arriba por los genes involucrados en determinar la identidad de las ramas de la inflorescencia.

Sentido de iniciación de las espiguillas sobre las R^1 . Se ha observado que la iniciación de las espiguillas a lo largo de las R^1 puede darse en tres sentidos diferentes de acuerdo a la especie estudiada: acrópeto, basípeto y anfípeto. En los dos primeros casos siempre la Cof se inicia primero, mientras que en el último patrón la Cof se inicia luego del desarrollo de las espiguillas de la región media de la R^1 y esta espiguilla puede continuar su desarrollo o abortar tempranamente (ej. *U. ruziziensis*). Además, ciertas especies con desarrollo anfípeto presentan variaciones en la posición de la gluma inferior de la Cof con respecto al

resto de las espiguillas (ej. *U. bovonei*, *U. mosambisensis*, *U. plantaginea* y *U. ruziziensis*). Frank (1998) ha interpretado y correlacionado estos dos fenómenos como el resultado de la reducción de ramas de una panoja ancestral en diversos grados e involucrando partes diferentes. Hasta el momento, y a partir de los estudios de desarrollo presentados en esta tesis, no se han encontrado ejes rudimentarios que permitan confirmar esta hipótesis.

Origen de las espiguillas apareadas sobre las R¹. Webster (1988) y posteriormente Frank (1998) discuten el origen de las espiguillas apareadas en algunos géneros de Paniceae. Sobre la base de la posición de la gluma inferior (GL1) sobre el raquis, estos autores sostienen que, en algunas especies de *Urochloa* (ej. *U. ramosa* y *U. platyphylla*), las espiguillas solitarias serían homólogas a la espiguilla subsésil del par de espiguillas que poseen otras especies de *Urochloa*. Por medio de los estudios con MEB se han observado tres evidencias que ponen en duda la hipótesis propuesta por Webster (1988) y Frank (1998): (1) las ramificaciones de la UIF se inician en orden consecutivo (primero se inician las R¹, luego las R² sobre las R¹, posteriormente las ramas de tercer orden [R³] sobre las R² y así sucesivamente), (2) cuando las espiguillas están de a pares, la espiguilla que será la pedicelada se desarrolla sobre una R² y la subsésil sobre una R³, (3) en ciertas especies las R³ detienen tempranamente su desarrollo al iniciar en su extremo distal una espiguilla anormal. Todo ello sugiere que la hipótesis que considera el posible origen de la espiguilla solitaria a partir de la R³ es inválida. Por el contrario, estos estudios sugieren que las espiguillas solitarias son homólogas a la espiguilla pedicelada del par de espiguillas. La presencia de especies con espiguillas pareadas donde la subsésil permanece vestigial puede ser interpretada como un estado intermedio entre especies con espiguillas

apareadas y aquellas que han evolucionado a espiguillas solitarias o viceversa. Asimismo, esto último, sumado a las diversas morfologías observadas en el desarrollo anormal de las espiguillas (véase abajo), indica que la transición entre especies con espiguillas apareadas a especies con espiguillas solitarias sea posiblemente el resultado de un proceso gradual a lo largo de la historia evolutiva.

Desarrollo anormal de espiguillas. Se han observado dos morfologías de espiguillas anormales: (1) espiguillas que llegan a diferenciar glumas, lemmas y pálea que encierran a los primordios de estambres, lodículas y carpelos y, (2) espiguillas que inician primordios de glumas, lemmas y pálea de la flor distal, las que luego detienen su desarrollo antes de diferenciarse mientras que los estambres, lodículas y carpelos no se desarrollan. El primer patrón se observó en las Cof de las R¹ (ej. *U. brizantha*, *U. decumbens* y *U. ruzizensis*) y en espiguillas que se inician en el extremo distal de las R³ (ej. *B. grossa*, *B. ovalis*, *U. adspersa*, *U. deflexa*, *U. leucacrantha*, *U. meiziana*, *U. oligotricha*, *U. panicoides*, *U. texana* y *U. trichopus*). Por otro lado, el segundo fenotipo se observó exclusivamente en espiguillas que se inician en el extremo apical de R³ (ej. *U. lata*).

Es probable que los dos fenotipos anormales de espiguillas se desarrollen por cambios en los mecanismos genéticos sucedidos en diferentes momentos del desarrollo floral. Desde un punto de vista genético, el desarrollo floral puede ser dividido en cuatro etapas que ocurren siguiendo una secuencia temporal como se detalla a continuación (Jack, 2004): (1) primero, la planta cambia de un crecimiento vegetativo a uno reproductivo en respuesta a señales ambientales y endógenas, proceso que está controlado por un grupo de numerosos genes denominados *flowering time genes*, (2) las

señales provenientes de las diversas vías de floración son integradas y llevan a la activación de un pequeño grupo de genes denominados *meristem identity genes* que especifican la identidad floral, (3) estos últimos activan a los *floral organ identity genes* en regiones discretas de la flor y (4) por último los *floral organ identity genes* activan corriente abajo a los “*organ building*” genes que especifican los diferentes tipos celulares y tejidos que constituyen los cuatro verticilos florales. Una de las funciones más importantes de los *floral meristem identity genes* es activar los ABCDE *floral identity genes* (Goto et al., 2001; Theissen, 2001; Theissen & Saedler, 2001). En *Arabidopsis*, los genes Clase A determinan la identidad del verticilo 1 (sépalos), los genes de Clase A+B+E en conjunto determinan la identidad del verticilo 2 (pétalos), los genes de Clase B+C+E interactúan para dar identidad al tercer verticilo floral (estambres) y por último el cuarto verticilo (carpelos) está regulado por la interacción de los genes Clase C+E. Los genes Clase D, inicialmente caracterizados en *Petunia*, confieren identidad a la placenta y óvulo (Angenent et al., 1995; Colombo et al., 1995; Favaro et al., 2003; Vandenbussche et al., 2003).

En gramíneas existe evidencia actual (Kramer et al., 1998; Schmidt & Ambrose, 1998; Ambrose et al., 2000; Irish, 2000; Lamb & Irish, 2003; Prasad & Vijayraghavan, 2003; Yamaguchi et al., 2006; Whipple et al., en prensa) que demuestra que los genes de Clase A confieren identidad a lemma y pálea, los genes Clase A+B+E, otorgan identidad a las lodículas, los genes Clase B+C+E determinan la identidad de los estambres y los genes Clase C+E confieren identidad a los carpelos. Estos resultados implican que los sépalos de *Arabidopsis* son homólogos a lemma y pálea de las gramíneas, y que a su vez, las lodículas de gramíneas son homólogas a los pétalos de *Arabidopsis*. Sin embargo, la interacción de los genes ABCDE difiere del simple modelo descrito para *Arabidopsis*, dado que por

ejemplo, se ha comprobado que en *Oryza sativa* la expresión de los genes Clase C se expande hacia un dominio por fuera (externo) de los estambres (Yamaguchi et al., 2006). Es probable que la expansión de expresión de los genes Clase C a un dominio extra-estaminal esté involucrado en la determinación de las diferencias observadas entre la morfología de los pétalos de *Arabidopsis* y las lodículas en gramíneas (Whipple et al., en prensa; Kellogg com. pers.), al igual que los diversos eventos de duplicación génica sucedidos antes y durante la especiación de las gramíneas (Malcomber et al., 2006).

En el primer patrón de desarrollo anormal, se observa que la modificación en el patrón de expresión e interacción génica probablemente ocurra en la etapa (4) en el momento en el cual los “*organ building*” genes deberían especificar los diferentes tipos celulares y tejidos que constituyen los cuatro verticilos florales. Por el contrario, en el segundo caso el cambio se sucede en la etapa (3), en el momento en el cual los genes de Clase ABCDE interactúan para conceder identidad a los órganos florales, y en la etapa (4) ya que para aquellos primordios de gluma, lemma y pálea iniciados no se observa diferenciación alguna.

A partir de ello, surgen nuevos interrogantes: (a) en primer lugar queda por determinar si el segundo patrón de desarrollo anormal está restringido únicamente a las espiguillas que se desarrollan sobre el extremo apical de las R³ de algunas especies del Clado PCK, (b) cuáles son las causas de las modificaciones en los patrones de expresión de los genes involucrados en la etapa 3 y 4, (c) en que consisten esos cambios y por último, (d) el significado evolutivo de la existencia de desarrollo anormal de espiguillas en algunas especies del Clado PCK. Las últimas tres preguntas son de difícil respuesta hasta tanto se disponga de mayor información acerca de cuales son los genes que

intervienen en el desarrollo floral, las funciones y la interacción de los mismos en el modelo ABCDE de gramíneas.

5.2.4 Desarrollo floral. En este trabajo el desarrollo floral se estudió considerando: (1) el sentido de iniciación de las flores en la totalidad de la UIF y sobre las R¹, (2) el sentido de iniciación y maduración de las flores dentro de la espiguilla y (3) la secuencia de iniciación y diferenciación de los órganos florales en la flor distal y, por otro lado, en la flor proximal.

Se han identificado al menos nueve patrones diferentes de desarrollo floral entre los géneros que conforman el Clado PCK. Los mismos surgen de variaciones en la secuencia de iniciación de los estambres, tipo de expresión sexual, tipo de bráctea que cubre a la flor proximal y etapa del desarrollo floral en la cual la flor proximal queda completamente protegida.

Sentido de iniciación de los órganos florales en la UIF. El sentido de iniciación de los órganos florales, al considerar la UIF en su totalidad, se correlaciona directamente con el tipo de UIF que presenten las especies estudiadas, al igual que lo observado para la iniciación de las espiguillas. Siempre que las UIF sean del tipo P las flores se inician en sentido anfípeto sobre la UIF una vez iniciados los órganos florales de la FP. Por el contrario, el sentido de iniciación basípeto de flores es característico de UIF del tipo PT. Es probable que dicho patrón no sea exclusivo para las especies que integran el Clado PCK, sino que podría ser una característica general para todas aquellas UIF de gramíneas que sean del tipo P o PT e inclusive para otras Angiospermas que presenten este tipo de UIF.

Sentido de iniciación de los órganos florales en las R¹. Al considerar cada una de las R¹ independientemente, por lo general, la iniciación de los órganos florales también sigue la misma secuencia y sentido de diferenciación que las espiguillas sobre las R¹. Hasta el momento, una única excepción a este patrón se observa en *U. mosambisensis*, en la cual no se encontró una correlación entre el sentido de iniciación de las espiguillas con el de las flores. Mientras que en *U. mosambisensis*, las espiguillas se inician en sentido anfípeto sobre las R¹, cuando se inician los órganos florales lo hacen siguiendo una dirección basípeta sobre la R¹.

Sentido de iniciación de los órganos florales dentro de la espiguilla. La presencia de dos flores por espiguilla (una proximal y otra distal) es común entre las especies del Clado PCK, y en general dentro de la Tribu Paniceae. En algunas especies de Paniceae muy raramente se pueden encontrar tres flores por espiguilla como por ejemplo se observó en *Panicum quadriglume* (Döll) Hitchc., *Lasiacis anomala* Hitchc., y ocasionalmente en *Anthaenantiopsis fiebrigii* Parodi, *A. perforata* (Nees) Parodi var. *perforata*, *Panicum crateriferum* Sohns e *Hymenachne grumosa* (Nees) Zuloaga (Cialdella & Vega, 1996).

En general, la iniciación y diferenciación de las flores dentro de la espiguilla varía dependiendo del órgano floral. Las lemmas se inician siguiendo un sentido acrópeto dentro de la espiguilla, es decir primero se inicia la lemma de la flor proximal y luego la lemma de la flor distal. Por el contrario, la pálea, estambres, lodículas y carpelos siguen una dirección basípeta de iniciación dado que primero se inician a partir del meristema floral distal y luego a partir del meristema floral proximal. El sentido de iniciación de los órganos florales se mantiene constante en todas las especies estudiadas del Clado PCK al

igual que en otras especies de gramíneas como por ejemplo se observó en *Setaria*, *Pennisetum* y *Cenchrus* (Doust & Kellogg, 2002a,b).

Presencia de un meristema remanente del ápice de la raquilla. En todas las especies estudiadas, cuando todos los órganos florales se han iniciado, se observó un meristema remanente apenas por encima de la flor distal de la espiguilla. Dicho meristema corresponde al extremo apical de la raquilla. La presencia del remanente estéril de la raquilla demuestra que las espiguillas carecen de flor terminal y ha sido interpretado también como un carácter vestigial que representa la transición de espiguillas multifloras a espiguillas con menor número de flores (Cialdella & Vega, 1996).

Secuencia de iniciación de los órganos florales. *Brachiaria*, *Urochloa* y los géneros emparentados (*Eriochloa*, *Megathyrsus* y *Melinis*) mostraron la misma secuencia de iniciación de los órganos florales. En todos los casos, el primer órgano en iniciarse es la lemma, seguida por la pálea, los estambres, las lodículas y por último los carpelos.

La secuencia de iniciación de los órganos que formarán la flor en el Clado PCK coincide con la observada para otras especies de gramíneas, como por ejemplo en *Eleusine*, *Oryzopsis*, *Panicum* s.l., *Pennisetum* y *Setaria* (Clifford, 1987). Se conoce que la secuencia de iniciación de los órganos florales no es constante a lo largo de la familia (Clifford, 1987), como puede observarse en la **Tabla 4** en la que se resumen siete diferentes secuencias de iniciación de órganos florales observadas en diversos géneros de Poaceae:

Tabla 4.- Resumen de las diferentes secuencias de iniciación de los órganos florales en diversos géneros de Gramínea. Tabla reproducida de Clifford (1987). Observación: este autor no reconoce a la lemma como parte del verticilo de protección de las flores de gramíneas.

Developmental sequence	Taxa
palea → lodicules → stamens → pistil	<i>Avena</i> ¹⁰ , <i>Bambusa</i> ¹ , <i>Hordeum</i> ² , <i>Lolium</i> ¹ , <i>Zea</i> ⁴ , <i>Zizania</i> ⁷
palea → stamens → lodicules → pistil	<i>Eleusine</i> ⁹ , <i>Oryzopsis</i> ³ , <i>Panicum</i> ⁹ , <i>Pennisetum</i> ⁹ , <i>Setaria</i> ⁹
palea → stamens → pistil → lodicules	<i>Triticum</i> ⁸ , <i>Oryza</i> ⁶
stamens → lodicules → palea → pistil	<i>Bromus</i> ¹
stamens → lodicules → pistil → palea	<i>Bromus</i> ¹
stamens → palea → lodicules → pistil	<i>Dactylis</i> ⁵
stamens → palea → pistil → lodicules	<i>Phalaris</i> ⁵

¹Barnard, 1957; ²Kamra and Nilan, 1959; ³Mehlenbacher, 1970; ⁴Bonnett, 1953; ⁵Holt, 1954; ⁶Juliano and Aldama, 1937; ⁷Weir and Dale, 1960; ⁸Barnard, 1955; ⁹Khosla, 1946; ¹⁰Bonnett, 1961.

Secuencia de iniciación de los estambres en una misma flor. Entre las lodículas y los carpelos se encuentran insertos los estambres de la flor. Se han observado diferencias en la secuencia de iniciación de los estambres y el tamaño de los mismos en las especies que integran el Clado PCK. Por ejemplo, en *Melinis* y *Megathyrsus maximus* y en la mayoría de las especies estudiadas de *Urochloa* el estambre abaxial, de mayor tamaño, se inicia antes que los laterales. Por el contrario, en *Eriochloa*, *Brachiaria eruciformis* y en algunas especies de *Urochloa* los estambres de los flancos, de mayor tamaño, son los más adelantados en el desarrollo con respecto al abaxial. Este fenómeno ha sido observado en numerosas especies de gramíneas (Clifford, 1987).

El androceo de las gramíneas esta formado generalmente por tres estambres, pero existen algunos géneros o especies en que sólo hay uno o dos estambres (ej. *Bothriochloa decipiens* (Hack.) C.E. Hubb.) aunque pueden desarrollarse hasta seis estambres en Bambusoideae y Ehrhartoideae. La disposición de los estambres con respecto a la

ubicación de las lodículas, pálea y carpelos ha sido motivo de numerosos estudios (véase Clifford, 1987). Estos estudios, generalmente concluyen que la condición primitiva en la familia Poaceae sería una flor integrada por dos verticilos de tres estambres cada uno, alternos entre ellos, donde el estambre anterior del verticilo externo se ubica entre las lodículas. Sin embargo esta hipótesis no es coincidente con lo observado en *Ehrharta*, *Zizania* y *Oryza* (Clifford, 1987; Matsuo & Hoshikawa, 1993). Estos géneros presentan flores con seis estambres los que se desarrollan en diferentes planos y no forman necesariamente dos verticilos bien definidos. A pesar de estas variaciones en la posición, se ha demostrado que la iniciación de los estambres no es simultánea e inclusive el patrón de iniciación varía entre los miembros de las gramíneas. Pueden variar entre géneros, especies o inclusive entre ejemplares de una misma especie. Por ejemplo, en *Zea mays* se ha observado que los estambres laterales se pueden iniciar antes o después que el estambre abaxial (véase Clifford, 1987).

A pesar de las diferencias relativas en la iniciación de los estambres, el tamaño de los estambres en flores triandras también varía entre las especies de gramíneas (Clifford, 1987). Generalmente, el estambre abaxial es de mayor tamaño que los laterales, aunque no son pocos los ejemplos en los que ocurre lo contrario (ej. *Eriochloa*, *Brachiaria eruciformis* y algunas especies de *Urochloa*).

Diferenciación de los órganos florales y expresión sexual. Las espiguillas de los géneros de Paniceae se caracterizan por ser bifloras, donde la flor distal es siempre perfecta, y la flor proximal puede ser estaminada o neutra. Entre las especies de *Brachiaria* y *Urochloa* la

presencia de flores proximales estaminadas o neutras varía ampliamente entre las diversas especies.

La transición entre flores bisexuales y unisexuales ha ocurrido frecuentemente durante los 70 millones de años de la historia de las Poaceae. Incluso entre especies directamente relacionadas, la expresión sexual es altamente variable; por ejemplo, al menos seis transiciones en la expresión sexual han sido estimadas para el género *Bouteloua* Lag. (Chloridoideae) (Columbus, 1999; Kinney et al., 2003). Por lo tanto, los datos filogenéticos muestran que los cambios en la expresión sexual ocurren habitualmente, y la ganancia o pérdida de la unisexualidad es aparentemente muy común (Malcomber & Kellogg, 2006).

✦ *Diferenciación de la flor distal.* Las flores distales de *Brachiaria*, *Urochloa* y los géneros afines presentan un patrón similar de desarrollo, en el cual los órganos florales completan su maduración originando una flor distal perfecta. Una variación a este patrón fue observada en *U. mollis*, especie en la cual el desarrollo del gineceo de la flor distal varía sutilmente con respecto al patrón observado en el resto de las especies. Mientras que en la mayoría de las especies que integran el Clado PCK el tegumento del óvulo se inicia cuando éste se encuentra completamente cubierto por los carpelos, en *U. mollis* el tegumento del óvulo se inicia antes que los carpelos logren cubrir totalmente al óvulo. Dicho patrón, también ha sido observado en *Zizania aquatica*, con la única diferencia que en esta especie este patrón de desarrollo fue descrito únicamente para flores masculinas donde el gineceo detiene el desarrollo tempranamente (Zaitchik et al., 2000).

✦ *Diferenciación de la flor proximal.* Si bien las flores distales de *Brachiaria*, *Urochloa* y los géneros afines presentan el mismo patrón de desarrollo (exceptuando algunas variaciones sutiles), se han observado numerosas diferencias durante el desarrollo y expresión sexual de la flor proximal las que se detallan a continuación: (1) cambios en el desarrollo que determinan la expresión sexual de la flor proximal, (2) los diferentes tamaños de los meristemas florales, (3) los pulsos de elongación y tipo de bráctea que cubre a la flor distal, y (4) número de etapas del desarrollo floral necesarias para que una bráctea cubra a la flor proximal.

Desarrollo de flores unisexuales. En todas las especies de Poaceae y sus parientes, las flores inician el desarrollo de los primordios de estambres y gineceo, incluso si la flor madura va a ser unisexual (Cheng et al., 1983; Le Roux & Kellogg, 1999; Zaitchik et al., 2000; Rudall et al., 2005). Las flores estaminadas se forman cuando el gineceo detiene su desarrollo tempranamente, y las flores pistiladas cuando los estambres nunca llegan a madurar. Este patrón de aborto de órganos por selección se encuentra también en las flores unisexuales de otras familias, incluyendo Actinidiaceae, Asparagaceae, Caryophyllaceae, Cucurbitaceae, Fabaceae y Polygonaceae (Ainsworth, 2000). El control de la expresión sexual, por lo tanto, controla usualmente el desarrollo de los órganos florales, deteniendo o activando un camino de desarrollo funcional existente (Malcomber et al., 2006).

Desarrollo de una flor estaminada. En aquellas especies del Clado PCK que presentan una espiguilla biflora donde la flor distal es perfecta y la flor proximal estaminada, ambas flores comienzan su desarrollo como primordios de flores perfectas, como ha sido

observado en otras gramíneas (Cheng et al., 1983; Le Roux & Kellogg, 1999; Zaitchik et al., 2000; Rudall et al., 2005). Luego el primordio floral distal prosigue su desarrollo normalmente y madura como flor perfecta, mientras que el cese del crecimiento del gineceo de la flor proximal determina la formación de una flor estaminada. Este fenómeno fue observado también en otros miembros de la tribu Andropogoneae, como por ejemplo en *Zea mays* L. (Sundberg and Orr, 1996), *Heteropogon contortus* (L.) P. Beauv. ex Roem y Schult. (Le Roux & Kellogg, 1999), *Tripsacum dactyloides* L. (Orr et al., 2001), y en una especie de la tribu Paniceae, *Panicum repens* L. (Le Roux & Kellogg, 1999).

Se conocen numerosas variaciones sobre el mecanismo que determina el cese del crecimiento del gineceo y a su vez, el momento en el cual éste fenómeno ocurre para dar lugar a la formación de flores estaminadas en gramíneas. Por ejemplo, se sabe que en las flores estaminadas de la mayoría de las especies de la subfamilia Panicoideae, el gineceo detiene su desarrollo por un mecanismo que implica la muerte celular de un conjunto de células subepidérmicas inmediatamente después de iniciados los carpelos. En las flores estaminadas de maíz, se ha correlacionado el aborto del gineceo con la presencia de células muertas vacuolizadas, y sin ribosomas y organelas en el citoplasma (Cheng et al., 1983). En Andropogoneae, se observó que la muerte celular de un corazón de células subepidérmicas del primordio de gineceo, la que induce a la pérdida de citoplasma y núcleo y sólo las paredes celulares permanecen intactas, lleva al detenimiento del desarrollo del gineceo y a la formación de una flor masculina (Le Roux & Kellogg, 1999). En *Panicum repens*, la muerte celular aparece en un anillo de células epidérmicas en la base del primordio de gineceo que detiene su desarrollo para formar una flor proximal estaminada. Por el contrario, en *Zizania aquatica* (Ehrhartoideae), el gineceo de la flor

estaminada detiene su crecimiento en etapas más avanzadas del desarrollo en relación a lo observado en las especies anteriores. En *Zizania aquatica*, las ramas estigmáticas se alargan, el óvulo se inicia, el tegumento del óvulo se hace visible y finalmente, el desarrollo del gineceo se detiene cuando los carpelos encierran casi completamente al óvulo. En esta especie el aborto del gineceo se ha correlacionado con la presencia de una sustancia oscura que se deposita en las células que forman la pared del ovario (Zaitchik et al., 2000).

Del mismo modo, los géneros pertenecientes al clado PCK que llevan flores proximales estaminadas presentan variaciones en el patrón de aborto del gineceo. Por ejemplo, en *Megathyrsus maximus*, la muerte celular de células epidérmicas y subepidérmicas ocurre en un plano transversal subapical de una célula de espesor. En *Megathyrsus maximus*, las células muertas retienen sus paredes celulares, como también fue documentado para Andropogoneae y *Panicum repens* (Le Roux & Kellogg, 1999). Sin embargo, la muerte celular en *Megathyrsus maximus* ocurre más tempranamente (antes que se inicien los carpelos) que lo observado en estos taxa. Entre las especies de *Urochloa* se han identificado variaciones en el momento en el cual el gineceo detiene su desarrollo. En ciertas especies (ej. *U. panicoides*) el gineceo detiene su desarrollo en el momento en el cual los carpelos apenas se han iniciado, mientras que en otras (ej. *U. lata*, *U. mollis*, *U. ruziziensis*) lo hace cuando los carpelos se han elongado y el óvulo se hace visible.

En consecuencia, el lugar donde ocurre el patrón de muerte celular y el momento en el cual este fenómeno ocurre varía entre las especies de gramíneas, y parecen no guardar relación con el linaje. Incluso se ha demostrado que el desarrollo del gineceo y el androceo podría estar bajo controles genéticos separados (Malcomber & Kellogg, 2006).

Estos autores sostienen que dada la ausencia de covariación evolutiva entre el aborto de estambres y gineceo, o inclusive necesariamente en la misma planta, la producción de flores estaminadas ocurre por mecanismos diferentes que la producción de flores pistiladas.

Desarrollo de una flor neutra. Las especies de *Urochloa* poseen espiguillas bifloras en las cuales la flor distal es perfecta y la flor proximal puede ser masculina o neutra (Morrone & Zuloaga, 1992; Watson & Dallwitz, 1992). *Urochloa plantaginea* es un ejemplo del último caso. Ambas flores inician su desarrollo como primordios perfectos, pero cuando las tecas y los carpelos de la flor distal están claramente iniciados, la flor proximal detiene su desarrollo resultando un antecio neutro. En *Eriochloa* se observó que las flores proximales inician un primordio de pálea y tres estambres, los cuales detienen su desarrollo muy tempranamente en relación a *Urochloa* y no hay evidencia de inicio de carpelos. En consecuencia, en *Eriochloa* las flores proximales maduras carecen de pálea y presentan rudimentos muy pequeños de estambres. A su vez, en *Melinis minutiflora* y ciertas especies de *Urochloa* (*U. distachya*) los órganos florales directamente nunca llegan a iniciarse. En estos últimos casos el control de expresión sexual parece activarse en etapas más tempranas en relación a las flores proximales de *Eriochloa* e inclusive puede estar regulada a nivel de los meristemas florales. Este patrón no es común dentro de las Poaceae dado que por lo general las flores que serán estaminadas o neutras inician al menos los primordios de estambres y carpelos.

La variación observada en el desarrollo de flores estaminadas y neutras llevó a algunos autores (Malcomber & Kellogg, 2006) a plantear la posibilidad que no exista un único patrón de expresión sexual y que el mismo ha sido modificado de diferentes maneras en distintos linajes de la familia Poaceae. La gran diversidad morfológica y repetidos orígenes de flores unisexuales hace poco probable que exista un único simple cambio que afecte la transición entre la bisexualidad y unisexualidad y viceversa. Por lo tanto se concluye que la unisexualidad cambió numerosas veces durante la evolución de las Poaceae. Dentro de este contexto, los genes *TS1* (*TASSELSEED1*), *TS2* (*TASSELSEED2*), *TS5* (*TASSELSEED5*), y *SK1* (*SILKLESS1*) son excelentes candidatos de genes que posiblemente hayan sido modificados durante la evolución para producir diferentes patrones de expresión sexual en las gramíneas (Malcomber & Kellogg, 2006).

En un principio se pensó que el gen *TS2* era el principal responsable de causar cambios en la expresión sexual y de originar flores unisexuales (Le Roux & Kellogg, 1999). Sin embargo, se ha demostrado que *TS2* tiene un rol general durante el desarrollo de la planta entera, y que su función en la determinación sexual es secundaria y posiblemente taxonómicamente restringida (Malcomber & Kellogg, 2006).

Por ejemplo, *TS2* es necesario para el aborto del gineceo en flores estaminadas de maíz y *Tripsacum* L. (DeLong et al., 1993; Li et al., 1997). La expresión de *TS2* en aquellas flores que van a ser estaminadas parece correlacionarse con la muerte celular, presumiblemente de aquellas en las cuales se expresa, las que pierden su citoplasma. Por lo tanto, se piensa que la muerte celular previene el desarrollo normal del gineceo. Un patrón similar se ha observado en las flores estaminadas de otras Panicoideae (Le Roux & Kellogg, 1999).

Actualmente se sabe que la expresión de *TS2* es general en toda la planta, que existe una fuerte conservación de la secuencia y no hay correlación entre la variación de la secuencia y expresión con la unisexualidad, todo lo cual sugiere que *TS2* es de hecho una proteína que no determina la expresión sexual. Parece más razonable pensar que *TS2* probablemente puede haber sido adoptado para la expresión sexual en un linaje de las gramíneas (Subfamilia Panicoideae) pero que tiene otros múltiples roles dentro de la familia (Malcomber & Kellogg, 2006).

Tamaño de los meristemas y órganos florales de la flor proximal y distal. En maíz, Irish & Nelson (1993), encontraron que los estambres y el gineceo con un desarrollo normal son mayores que aquellos que abortarán. Por el contrario, Le Roux & Kellogg (1999) no encontraron dicha diferencia de tamaño entre los órganos florales de especies de Andropogoneae. Los datos obtenidos en *Megathyrsus maximus* y *Urochloa plantaginea* concuerdan con los de Le Roux & Kellogg (1999). No obstante, existe una relación entre el tamaño de los meristemas florales y el sexo de las flores en ambas especies. En *Megathyrsus maximus*, el meristema floral proximal (que originará los órganos de la flor masculina) es cerca del 50% más pequeño que el meristema floral distal (que originará los órganos de la flor perfecta). En *U. plantaginea*, la diferencia en los tamaños entre los meristemas proximal y distal es incluso mucho mayor que en *Megathyrsus*, dado que el meristema proximal de la flor que dejará de crecer tempranamente es menos que un 30% del tamaño del meristema distal. En consecuencia, la expresión sexual de las flores parece estar determinada antes que la diferenciación de los meristemas florales.

Tipo de bráctea que cubre la flor proximal y etapa del desarrollo floral en la cual la flor proximal queda cubierta

Irish & Nelson (1993) e Irish et al. (1994), al estudiar el desarrollo floral en *Zea mays*, encontraron una correlación entre el momento de diferenciación (expansión y alargamiento) de las glumas de la espiguilla y la expresión sexual de las flores. En la inflorescencia masculina de maíz, las glumas se elongan y cubren a las flores cuando los primordios de los órganos de las flores se están iniciando, antes del aborto del gineceo. En la inflorescencia femenina del maíz, las flores están completamente cubiertas por las glumas antes que aborten los estambres. Estos autores sugieren que los genes que intervienen en la determinación del sexo de las flores en maíz, y posiblemente en otros miembros de la tribu Andropogoneae, como fue sugerido por Le Roux & Kellogg (1999), inducen de alguna manera el alargamiento y expansión de las glumas. La diferenciación de las glumas en *Megathyrsus* y algunas especies de *Urochloa* concuerda con la hipótesis de Le Roux & Kellogg (1999): el hecho que, en *U. plantaginea*, las glumas cubren la flor proximal antes de lo que ocurre en *Megathyrsus* se correlaciona con la temprana determinación sexual en *U. plantaginea* (particularmente en la flor proximal). Sin embargo, en algunas especies de *Urochloa* se observó que la lemma proximal es la encargada de envolver a la flor proximal en lugar de la gluma inferior. Inclusive, entre las especies que integran el Clado PCK, se han observado variaciones en el momento en el cual las brácteas protegen a la flor proximal. Algunas especies logran cubrir sus flores proximales en una etapa muy temprana del desarrollo floral, otras lo hacen cuando el carpelo de la flor distal se ha iniciado y otras especies en una etapa posterior. Hasta el momento, en ciertas especies de *Urochloa* no se ha podido establecer una correlación entre el sexo de la

flor proximal y el momento en el cual la misma queda protegida dado que las flores que serán neutras pueden quedar protegidas por alguna bráctea en estados tempranos o tardíos del desarrollo floral.

En conclusión, existen numerosos patrones de expresión sexual entre las especies del grupo en estudio, como ya ha sido observado en otros géneros de Poaceae. Estos patrones de expresión sexual, varían en: (1) los órganos abortados, (2) momento en el cual los órganos abortan, (3) lugar donde se produce el deterioro celular que posiblemente sea el responsable del aborto del órgano, (4) tipo de bráctea que protege a la flor que sufrirá modificaciones en su desarrollo que la harán pasar de primordio de flor perfecta a primordio de flor estaminada o neutra y (5) momento en el que la flor proximal queda protegida.

5.2.5 Anatomía del desarrollo. La flor proximal y distal de *Megathyrsus maximus*, difieren no solamente en el desarrollo del gineceo (dado que el gineceo proximal aborta tempranamente), sino que también difieren sutilmente en el desarrollo del polen. Seis etapas del desarrollo del polen surgen de comparar la flor distal con la proximal: (1) las anteras de ambas flores inician su desarrollo en el mismo momento hasta la formación de la célula madre de polen (CMP); (2) las anteras de la flor proximal detienen su desarrollo en la etapa de CMP, mientras que las anteras de la flor distal experimentan meiosis y alcanzan la etapa de polen 1-celular; (3) las anteras de la flor proximal reinician el desarrollo, sufren meiosis, y alcanzan la etapa de polen 1-celular, mientras que el polen de la flor distal está detenido en la etapa de polen 1-celular; (4) el polen de la flor distal sufre

mitosis y alcanza la etapa de polen 3-celular más tempranamente que la flor proximal; (5) la antesis comienza primero con la flor distal de la espiguilla; (6) finalmente, la antesis ocurre en la flor proximal. El detenimiento del desarrollo del polen en la etapa CMP de la flor proximal (etapa 2) es simultánea con el aborto del primordio de gineceo, sugiriendo una relación entre ambos eventos del desarrollo. Posiblemente el control genético que ocasiona el aborto del primordio de gineceo también está involucrado en el atraso general del desarrollo de la flor proximal (particularmente en el desarrollo de la antera y polen) y está relacionado con la diferenciación basípeta de las flores de la espiguilla.

5.3 Genética del desarrollo

Las gramíneas son muy diversas en sus inflorescencias y morfología de las espiguillas, particularmente en relación al número y sexo de sus flores, y al tamaño y textura de las glumas y lemmas. La diversidad morfológica de las plantas es presumiblemente causada por diferencias en el número, expresión, e interacción de los genes que intervienen en el desarrollo (Theissen, 2001). En gramíneas, la diversificación de los genes *SEPALLATA* (*SEP*) posiblemente tenga un papel muy importante en la diversificación de las espiguillas, a pesar que existe limitada información acerca de cual es exactamente el rol que cumplen (Malcomber & Kellogg, 2004; Malcomber & Kellogg, 2005).

Los genes *SEP* presentan patrones de expresión muy variables dentro de las gramíneas y parecen cumplir con diversas funciones (Malcomber & Kellogg, 2005). *LHS1* tendría un rol muy importante en definir la identidad de la pálea y lemma, en especificar la flor más distal de la espiguilla, y en determinar la expresión sexual de sus flores. Al

estudiar dos especies cuidadosamente seleccionadas (*Megathyrsus maximus* y *Eleusine indica*) y usando análisis comparativos, a partir de trabajos sobre la expresión de *LHS1* en otras gramíneas, fue posible testear estas hipótesis, formular nuevas hipótesis y proveer nuevos conocimientos sobre la evolución de *LHS1* en un amplio número de especies de gramíneas.

5.3.1 La ausencia de expresión en el gineceo posiblemente caracterice a la tribu Paniceae (subfamilia Panicoideae). La expresión de *LHS1* en pálea y lemma es conservada en las Poaceae, sin embargo la expresión en el segundo verticilo floral (lodículas), el tercero (estambres) y el cuarto (gineceo) es variable entre las especies de gramíneas estudiadas y es inconsistente con las relaciones filogenéticas dentro de la familia. Malcomber & Kellogg (2004) demostraron que *LHS1* se expresa en el gineceo de todas las especies estudiadas excepto en *Pennisetum glaucum* (L.) R. Br. (subfamilia Panicoideae). Sin embargo, estos autores no lograron determinar con precisión si la pérdida de la expresión de *LHS1* en el gineceo caracteriza exclusivamente a *Pennisetum* Rich. o a múltiples miembros de la tribu Paniceae. Incluyendo *M. maximus* en el análisis fue posible inferir que la ausencia de expresión de *LHS1* en el gineceo posiblemente caracteriza a un clado formado por más de 2000 especies dentro de la tribu Paniceae, y presumiblemente a la tribu completa (más de 3000 especies).

El patrón de evolución de la expresión de *LHS1* en gramíneas se complica mucho más al incluir los nuevos datos sobre *E. indica* (subfamilia Chloridoideae). *Eleusine indica* se encuentra distantemente relacionada con las especies de la tribu Paniceae, como *M. maximus* y *P. glaucum*. Sin embargo, al igual que estas dos últimas especies *E. indica*

también ha perdido la expresión de *LHS1* durante el desarrollo del gineceo de sus flores. Las reconstrucciones parsimoniosas mostraron que la expresión de *LHS1* en el gineceo se pierde independientemente en *Eleusine* y el linaje de las Paniceae. La ausencia de expresión de *LHS1* en el gineceo en estas taxa es intrigante dada la amplia presencia de expresión de *LHS1* en el gineceo de otras especies de gramíneas. En arroz, al menos cuatro genes *SEP* se expresan en el gineceo, sugiriendo ya sea funciones redundantes, división de funciones, o una combinación de las dos (Malcomber & Kellogg, 2004). En otras plantas con flores, todas las especies poseen al menos un gen *SEP* que se expresa en el gineceo (Malcomber & Kellogg, 2005) sugiriendo que uno o más de los cuatro genes *SEP* en gramíneas posiblemente se expresan en el gineceo de *E. indica*, *P. glaucum*, y *M. maximus*.

5.3.2 La expresión de *LHS1* se correlaciona con el orden en que maduran las flores dentro de la espiguilla. La expresión de *LHS1* se correlaciona con el orden en el que las flores maduran dentro de la espiguilla. *LHS1* es presumiblemente el responsable de especificar la flor terminal de la espiguilla en maíz, donde la expresión de los ortólogos de *LHS1* se restringe a la flor terminal de la espiguilla biflora (Cacharrón et al., 1999). Esta hipótesis es consistente únicamente en especies con espiguillas en las cuales los órganos florales (pálea, lodículas, estambres, y gineceo) de las flores distales se inician y maduran antes que los de la flor proximal (Malcomber & Kellogg, 2004). En especies cuyas flores maduran en sentido acrópeto dentro de la espiguilla, *LHS1* se expresa en la mayoría de las flores distales, indicando que el gen puede tener diferentes funciones en estas especies, o bien presenta funciones adicionales a la especificación de la flor terminal. Los patrones de expresión de *LHS1* en *E. indica* y *M. maximus* constituye una evidencia a favor de la

correlación entre el orden de maduración de las flores dentro de la espiguilla y el patrón de expresión. Las flores de *E. indica* se inician y maduran siguiendo un orden acrópeto, y *LHS1* se expresa en todas las flores de la espiguilla. Por el contrario, *M. maximus*, posee flores que se inician y maduran en sentido basípeto, donde la expresión de *LHS1* se encuentra restringida a la flor superior de la espiguilla biflora. El significado funcional de esta diferencia en los patrones de expresión es desconocida.

5.3.3 La expresión de *LHS1* no se correlaciona con la determinación del sexo de las flores. Los datos presentados en este trabajo declinan la correlación entre la expresión de *LHS1* y el sexo de las flores. Malcomber & Kellogg (2004) observaron que *LHS1* no se expresa en las flores proximales estaminadas o estériles de arroz, sorgo, *Pennisetum* y *Chasmanthium*. Sin embargo, esta correlación general no está soportada en maíz, donde la flor estaminada distal de la inflorescencia masculina y la flor pistilada de la inflorescencia femenina expresan *LHS1* a pesar de ser unisexuales. Asimismo, la flor estaminada distal de la espiguilla pedicelada de sorgo también expresa *LHS1*.

En este trabajo, la expresión de *LHS1* en *M. maximus* se correlaciona con la determinación del sexo de las flores dado que el gen se expresa exclusivamente en la flor perfecta distal. Sin embargo, en *E. indica*, la expresión de *LHS1* no se correlaciona con la expresión del sexo de las flores. En *E. indica*, las flores proximales perfectas son las que se inician y maduran primero dentro de la espiguilla mientras que, las flores neutras son las últimas en desarrollar y se ubican en la región distal de la espiguilla. En dicha especie, todas las flores de la espiguilla expresan *LHS1* durante el desarrollo temprano sin considerar el momento de la determinación sexual. En las flores perfectas, *LHS1* se

expresa generalmente en el meristema floral antes de restringirse a la pálea y lemma y luego de apagarse en el desarrollo floral tardío. En las flores estériles y distales, *LHS1* se expresa en el meristema floral durante el desarrollo temprano, indicando claramente que dicho gen no determina que flores van a desarrollar como perfectas.

La conexión aparente entre la expresión de *LHS1* y el sexo de las flores en especies de la tribu Paniceae posiblemente sea indirecta y no causal. *LHS1* se expresa en la flor distal de la espiguilla, que será perfecta en muchos pero no en todos los casos. Los datos comparativos presentados en esta tesis sugieren que la expresión sexual se encuentra regulada independientemente de *LHS1*.

5.3.4 *LHS1* se expresa en la pálea y la lemma de todas las especies estudiadas y posiblemente su función sea la de determinar la morfología de pálea y lemma.

Malcomber & Kellogg (2004) demostraron que *LHS1* se expresa en la pálea y lemma de ocho especies de gramíneas filogenéticamente distantes, y este es el mismo caso para las especie estudiadas en este trabajo (*E. indica* y *M. maximus*). La expresión de *LHS1* en la lemma y pálea es consistente con los datos funcionales publicados anteriormente en arroz, los que muestran un efecto de la expresión de *LHS1* sobre la morfología de la lemma y la pálea. La espiguilla de arroz posee tres flores, una perfecta y fértil (distal) y dos reducidas a lemmas estériles (proximales) (Staff, 1917; Komatsu et al., 2003). La expresión ectópica del gen *LHS1* de *Oryza sativa* (*OsLHS1*) es suficiente para transformar las lemmas estériles de las flores proximales en estructuras similares a la pálea y lemma de la flor distal (Prasad et al., 2001). Asimismo, la expresión de *LHS1* se correlaciona con las diferentes morfologías de la lemma que expresa *LHS1* de la flor distal la cual es de mayor tamaño y

grosor que las lemmas que no expresan *LHS1* como en *Pennisetum glaucum* que es de menor tamaño y más delgada (Malcomber & Kellogg, 2004).

Morfológicamente las lemmas de las diferentes flores de la espiguilla de *E. indica* son similares en tamaño, textura y consistencia, y todas ellas expresan *LHS1* en alguna etapa del desarrollo de la espiguilla. En *M. maximus*, la pálea y la lemma de la flor superior, la cual es gruesa y rugosa y se endurece a la madurez, exhiben expresión de *LHS1*. En contraste, la lemma y la pálea de la flor proximal de *M. maximus* es membranacea y no expresa *LHS1*.

En conclusión, la expresión de *LHS1* es consistente con la función general en determinar la identidad de la lemma y pálea en todas las especies analizadas hasta el día de hoy. Hasta el momento, la hipótesis de *LHS1* en la determinación de la flor más distal de la espiguilla es solamente cierta en aquellas especies con maduración basípeta de sus flores. La expresión de *LHS1* se correlaciona con la expresión del sexo de las flores únicamente en cuatro de los siete casos estudiados, sugiriendo una conexión indirecta entre el patrón de expresión y el fenotipo. A diferencia de lo observado en otras gramíneas estudiadas, *LHS1* no se expresa en el gineceo de *E. indica*, *P. glaucum*, y *M. maximus*; es probable que otros genes *SEP* sean requeridos para el desarrollo del gineceo en estas especies. El próximo paso será testear estas hipótesis usando una combinación de análisis de expresión y funcionales, preferentemente sobre un amplio número de especies de gramíneas modelos y no-modelos.

LHS1 presenta un patrón heterogéneo de expresión entre las diversas especies estudiadas y, en Paniceae en particular, parece ser un gen que especifica la morfología

final (*organ building gene*) de la lemma y pálea de la flor distal las que presentan diferente textura y ornamentación con respecto a la lemma y pálea de la flor proximal. Estas últimas no expresan *LHS1* y son similares en textura a las glumas de la espiguilla. Los miembros del Clado PCK, al igual que la mayoría de los géneros de Paniceae, exhiben diferencias en la textura y ornamentación de la lemma y pálea del antecio superior con respecto al antecio inferior. De hecho las diversas ornamentaciones observadas en la lemma y pálea de la flor distal han sido empleadas como un carácter de valor taxonómico para describir a las especies del Clado PCK y en especial para delimitar taxonómicamente a los géneros *Brachiaria* y *Urochloa* (Clayton & Renvoize, 1986; Thompson & Estes, 1986; Webster, 1987, 1988; Morrone & Zuloaga, 1992, 1993; Frank, 1998; Zuloaga & Morrone, 2003; Torres González & Morton, 2005). Se han descrito al menos diez patrones diferentes de ornamentaciones de la lemma y pálea de la flor superior (Thompson & Estes, 1986): (1) *Miliaceae pattern*: lemma y pálea de superficie lisa y lustrosa (ej. *Brachiaria eruciformis*), (2) *Eriochloa pattern*: superficie de la lemma y pálea con papilas de 1-39 μm de diam. en hileras longitudinales (ej. *Eriochloa*, *Axonopus*, *Paspalum*), (3) *Dura pattern*: se distingue de patrón *Eriochloa* por presentar papilas de menor tamaño, (4) *Urochloa pattern*: las papilas son compuestas donde las protuberancias asociadas a la pared celular transversal anticlinal quedan muy próximas entre sí formando un reborde transversal de 2-4 células de ancho (ej. *Brachiaria platyrhachis*), (5) *Brachylopha pattern*: las rugosidades transversales, originadas en la pared periclinal externa, son prácticamente continuas a lo largo de la lemma y pálea (ej. *Brachiaria serrata*), (6) *Semiundulata pattern*: protuberancias longitudinales atravesadas por lomas transversales semeando una grilla (ej. *Urochloa semiundulata*), (7) *Ciliatissima pattern*: las rugosidades transversales son más prominentes

que las longitudinales (ej. la mayoría de las especies de *Urochloa*), (8) *Setaria pattern*: las rugosidades transversales son prominentes, mientras que las longitudinales apenas sobresalen o directamente no son visibles (ej. *Brachiaria grossa*, *Urochloa leersioides* y *Setaria*), (9) *Dyctioneura pattern*: las rugosidades transversales no son prominentes como en el patrón de *Setaria* y las rugosidades longitudinales están usualmente ausentes (ej. *U. leucacrantha*) y finalmente, (10) *Radicans pattern*: forma más ornamentada que las anteriores donde las rugosidades longitudinales son filiformes y las transversales son cortas y arrugadas sobre las cuales se apoyan las papilas (ej. *Urochloa arrecta*).

A pesar del esfuerzo realizado en identificar los diversos patrones de ornamentación de la lemma y la pálea que conforman el antecio superior de la espiguilla de Paniceae, el carácter ornamentación del antecio superior ha sido empleado sin éxito en estudios taxonómicos y sistemáticos de *Brachiaria* y *Urochloa* dada la continua gradación observada entre los patrones de ornamentación entre las distintas especies (Clayton & Renvoize, 1986; Thompson & Estes, 1986; Webster, 1987, 1988; Morrone & Zuloaga, 1992, 1993; Frank, 1998; Zuloaga & Morrone, 2003; Torres González & Morton, 2005). A partir de los resultados obtenidos en esta tesis es posible inferir que *LHS1* parece ser un gen candidato a estar involucrado en definir la textura y ornamentación de la lemma y pálea de Paniceae. El estudio de las variaciones entre las secuencias de *LHS1* en diversas especies de Paniceae (especialmente en la región C-terminal) y la identificación de variaciones en los patrones de expresión de *LHS1* en especies con diferentes ornamentaciones y texturas de lemma y pálea pueden ayudar a determinar con mayor precisión este carácter y eventualmente elucidar el origen de dichos patrones.

5.4 Filogenia

Los resultados de los análisis filogenéticos realizados hasta el momento, proveen un fuerte soporte para la monofilia de *Brachiaria*, *Urochloa*, *Eriochloa*, *Megathyrsus*, *Melinis* y en ciertos casos compartida también con los géneros *Chaetium*, *Eccoptocarpha*, *Thuarea* y *Yvesia* (Frank, 1998; Gómez-Martínez & Culham, 2000; Duvall et al., 2001; Giussani et al., 2001; Aliscioni et al., 2003; Torres González & Morton, 2005). Todos estos géneros comparten el tipo anatómico foliar (PS) y fisiología C₄-PCK como sinapomorfía morfológica que los distingue del resto de los géneros de Paniceae. Esta característica distintiva ha llevado a algunos autores a denominar a este grupo como el Clado PCK (Gómez-Martínez & Culham, 2000; Duvall et al., 2001; Giussani et al., 2001; Aliscioni et al., 2003).

Son muy escasos los análisis filogenéticos que intentan esclarecer las relaciones dentro del Clado PCK. El primer estudio fue realizado por Frank (1998) quien empleó caracteres morfológicos relacionados con las formas de crecimiento, inflorescencias y espiguillas. Recientemente, se publicó la primera filogenia molecular exclusiva para *Brachiaria* y *Urochloa* (Torres González & Morton, 2005) basada en secuencias de la región genómica comprendida entre ITS1, 5.8S e ITS2. Ambos estudios sugieren que la posición de *Brachiaria* s.s. (= *Moroochloa* [Veldkamp, 2004]) es basal dentro del Clado PCK. Asimismo, indican que el complejo *Brachiaria-Urochloa* es un grupo parafilético con los géneros *Eriochloa*, *Eccoptocarpha*, *Megathyrsus*, *Thuarea* y *Yvesia* según el análisis de Frank (1998) ó con *Eriochloa*, *Megathyrsus* y *Melinis* al considerar el estudio realizado por Torres González & Morton (2005). Si bien *Chaetium* no fue incluido en los dos estudios anteriormente mencionados, en la filogenia de las Paniceae presentada por Giussani y

colaboradores (Giussani et al., 2001), este género se encuentra dentro del Clado PCK relacionado con *Eriochloa*. En este estudio, la relación de *Chaetium* y *Eriochloa* se encuentra soportada con moderado valor de Bootstrap (85%) compartiendo ambos géneros 5 sustituciones de nucleótidos en el gen de cloroplasto *ndhF*.

Aunque todos los estudios realizados coinciden en proponer al complejo *Brachiaria-Urochloa* como grupo parafilético, hasta el momento las relaciones internas entre las especies que conforman el Clado PCK no han sido resueltas con precisión dado los bajos soportes que presentan las ramas y la escasa resolución de los consensos presentados (Frank, 1998; Torres González & Morton, 2005). La falta de señal filogenética de los caracteres morfológicos y datos moleculares ha llevado a algunos autores (Torres González & Morton, 2005) a postular que, para lograr un completo entendimiento de las relaciones del Clado PCK, es necesario realizar un exhaustivo estudio de la morfología del grupo como así también incorporar un mayor número de especies al análisis filogenético.

Dada esta problemática, en este trabajo se añadieron al estudio filogenético propuesto por Torres González & Morton (2005): (1) nuevos caracteres morfológicos derivados de un estudio exhaustivo de la morfología de las inflorescencias del grupo, con especial énfasis en el desarrollo de las mismas y, (2) nuevas especies, con especial atención a aquellas especies de *Urochloa* que son nativas de América para las cuales se desconoce su posición en la topología obtenida a partir de los estudios moleculares.

En el nuevo análisis, incluyendo datos de inflorescencia y las cuatro nuevas secuencias, los géneros *Brachiaria*, *Urochloa*, *Eriochloa*, *Megathyrsus* y *Melinis* forman un clado monofilético y el complejo *Brachiaria-Urochloa* es parafilético, al igual que lo observado por otros autores (Frank, 1998; Torres González & Morton, 2005). Sin embargo,

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 observó que, al incorporar los caracteres morfológicos de inflorescencia a la matriz molecular, se logra una mejor resolución interna del Clado PCK en comparación con los resultados moleculares.

En el análisis combinado *Brachiaria* s.s. (= *Moroochloa* [Veldkamp, 2004]) y *Melinis* forman el Clado Basal, mientras que *Urochloa* es parafilético con los géneros *Megathyrsus* y *Eriochloa*. La posición de numerosas especies también sufrió cambios al incluir en el análisis los datos de inflorescencia. Particularmente, 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* (Clado E-UAfr). Sin embargo, estos cambios no cuentan con alto valor de soporte aunque aparecen en el consenso estricto. Asimismo, las relaciones internas del complejo *Urochloa-Megathyrsus-Eriochloa* aún quedan sin resolver. En particular, las especies africanas se encuentran formando una politomía en el consenso estricto resultado del análisis combinado.

La proximidad de las especies americanas fue también observada por otros autores. Al respecto, los estudios de Frank (1998) muestran que las especies americanas tienden a agruparse muy cercanas entre sí (excepto por la posición de *U. meiziana*), al igual que los que sugieren otros autores (Salariado, inédito; Morrone com. pers.) y los resultados presentados en esta tesis.

Asimismo, se desconoce hasta el momento la posición de *Megathyrsus maximus*. Esta última especie se encuentra relacionada con *U. deflexa*, *U. trichopus* y *Eriochloa* en el análisis combinado propuesto por Torres González & Morton (2005). En los análisis

presentados en esta tesis, *Megathyrsus maximus* se encuentra relacionada con *U. mosambicensis* y *U. mollis*, dentro de un clado integrado por la mayoría de las especies africanas de *Urochloa* en el consenso estricto del análisis molecular. Por otro lado, en el análisis combinado *Megathyrsus* se encuentra por fuera del Clado E-UÁfr (*Eriochloa* y especies africanas de *Urochloa*) junto con las especies americanas de *Urochloa*. Por lo tanto, esta especie es un taxón flotante el cual varía su posición de acuerdo al análisis y el tipo de caracteres incluidos en los mismos.

El análisis filogenético fue propuesto para explorar en forma preliminar, el valor filogenético que poseen los caracteres de inflorescencia en la resolución de la evolución de *Brachiaria* y *Urochloa*. Al combinar los datos moleculares con los morfológicos de inflorescencias se observaron nuevas sinapomorfías morfológicas soportando la relación entre ciertos taxa dentro del Clado PCK. Asimismo, dentro del complejo *Urochloa-Megathyrsus-Eriochloa* las especies tienden a relacionarse de acuerdo a las características morfológicas de inflorescencias. Dichos análisis muestran que 11 de los 16 caracteres de inflorescencia seleccionados para los estudios filogenéticos resultaron ser sinapomorfías para algunos de los grupos internos del Clado PCK. Entre ellos se destacan: tipo de UIF adulta, patrón de desarrollo del eje principal, simetría de la inflorescencia, sentido de iniciación de las R¹, sentido de diferenciación de las R¹, alargamiento diferencial de los entrenudos en estados tardíos del desarrollo, secuencia de iniciación de espiguillas en la inflorescencia, iniciación de las Cof de la R¹ en la inflorescencia, sentido de iniciación de las espiguillas en la UIF, sentido de iniciación de las espiguillas sobre la R¹ y patrón de desarrollo floral.

En consecuencia, la inflorescencia del Clado reveló ser fuente potencial de caracteres con señal filogenética para establecer algunas de las relaciones internas. Como evidencia de ello podemos mencionar que numerosos caracteres de inflorescencias son sinapomorfías para ciertos grupos dentro del Clado y con ello la tendencia de las especies a agruparse de acuerdo a la morfología de sus inflorescencias que se evidencia en los análisis combinados.

5.4.1 Posibles evidencias de una rápida radiación adaptativa en el complejo *Brachiaria-Urochloa*. Hasta el momento se desconoce con precisión la filogenia del Clado PCK dado que los consensos obtenidos presentan baja resolución y los datos moleculares y los morfológicos empleados, solos o en análisis combinados, han sido insuficientes para lograr resolver por completo las relaciones evolutivas entre las especies que conforman el Clado.

La falta de señal filogenética y la resolución pobre de las relaciones evolutivas entre las especies ha sido interpretada como un indicio de especiación explosiva o rápida radiación adaptativa en algunas floras (Baldwin & Sanderson, 1998; Richardson et al., 2001a,b; Verboom et al., 2003). La filogenia molecular propuesta para *Brachiaria* y *Urochloa* (Torres González & Morton, 2005) y los análisis presentados en este trabajo, indican que es probable que dentro del Clado PCK, al menos las especies africanas, hayan experimentado un proceso de rápida radiación adaptativa. Esta hipótesis surge de observar: (1) coincidencias de las filogenias hasta ahora propuestas en la falta de resolución interna y la constante aparición de politomías en los consensos, (2) la debilidad de los caracteres empleados solos o combinados para resolver la historia filogenética del

clado, (3) la gran diversidad morfológica del grupo y, finalmente (4) la diversificación de los patrones de desarrollo observada en este trabajo.

La morfología de las especies del Clado PCK, en especial *Brachiaria* y *Urochloa* varía ampliamente en cuanto a formas de crecimiento (Frank, 1998), morfología de espiguillas (Frank 1998; Torres González & Morton, 2005), número cromosómico básico, tipo de vía fotosintética, los diferentes niveles de ploidia y tipo de reproducción (sexual y apomíctica). Asimismo la inflorescencia mostró una notable diversificación morfológica, en su estructura adulta (Frank, 1998 y en este trabajo) y su desarrollo. Al menos veintiún subtipos de inflorescencias adultas fueron descritos, y se identificó una gran diversidad de patrones de desarrollo del sistema de ramificación de las inflorescencias, de las espiguillas y al menos nueve patrones de desarrollo floral. Algunos de los patrones de desarrollo temprano de la inflorescencia resultan ser novedosos incluso para las Paniceae y Poaceae en general.

La hipótesis sobre una posible radiación adaptativa, al menos en parte del Clado PCK, debería ser confrontada con nuevas filogenias basadas en diversos marcadores moleculares para lograr determinar con precisión si estos últimos responden al mismo patrón que el observado con ITS1, 5.8S e ITS2. En caso que esto último quede corroborado sería muy interesante identificar el momento preciso en el cual las especies comenzaron su explosión adaptativa, lo cual resultaría posible al calibrar los relojes moleculares a partir de información sobre los registros fósiles (GPWG, 2001).

Si bien las radiaciones adaptativas proveen una excepcional oportunidad para comprender el proceso de especiación y adaptación, reconstruir la historia filogenética de un grupo de especies que evolucionó muy rápida y recientemente es una tarea compleja.

Para resolver la filogenia de estos grupos se requiere del uso de múltiples e independientes genealogías de genes y datos morfológicos de todo el cuerpo de la planta (Whittall et al., 2006). Entre estos últimos, y a partir de los resultados presentados en esta tesis, los caracteres derivados de las inflorescencias han revelado conservar información valiosa sobre la evolución de este grupo tan diverso de especies.

5.4.2 El posible origen del complejo *Brachiaria-Urochloa* y el comienzo de la radiación adaptativa. Aunque *Brachiaria* y *Urochloa* comparten un ancestro en común, estos géneros se encuentran distribuidos en forma disyunta, en lugar de presentarse en una región más localizada (ej. el mismo continente). La mayoría de las especies del complejo *Brachiaria-Urochloa* (~ 71%) se encuentra en África, mientras que porcentajes menores son nativas de América (~ 13%), Asia (~ 8%) y Oceanía (~ 8%). Esta disyunción biogeográfica podría ser interpretada de varias maneras:

- 1) En primer lugar podría tener sus orígenes a partir de un proceso de vicarianza como resultado de la separación de Gondwana. Sin embargo, la disyunción biogeográfica de *Brachiaria* y *Urochloa* no pueden ser explicadas por esta hipótesis dado que estos géneros se han originado y diversificado después de la última conexión directa entre los continentes. De acuerdo al registro de polen fósil, se estima que las gramíneas surgieron a comienzos del Terciario (Paleoceno) entre los 70-55 millones de años atrás (Linder, 1987; Jacobs et al., 1999; Kellogg, 2001; GPWG, 2001). Este rango de fechas es empleado para calibrar los relojes moleculares, los que son usados para calcular el momento de otros eventos en la historia de las gramíneas (GPWG, 2001). En este momento los continentes se encontraban en la etapa final de separación (Clayton,

1981). La posición de los continentes en este período fue discutida por Raven & Axelrod (1974) y Raven (1979). En el Paleoceno, África y Sudamérica se encontraban separados por 800 km, Madagascar e India ya se habían separado de África e India formaba parte de Madagascar. Sin embargo, el origen de la subfamilia Panicoideae y en general el *PACCAD Clade* es aún más reciente. La calibración de relojes moleculares (Gaut & Doebley, 1997; GPWG, 2001) conjunto con la aparición de registro microfósil de gramíneas C₄ (Kingston et al., 1994; Latorre et al., 1997) sugieren que el *PACCAD Clade* tiene su origen entre los 15-25 millones años atrás. Estas fechas coinciden con la última etapa del Oligoceno y la primera mitad de Mioceno. Para ese entonces, los continentes presentaban la misma distribución que la actual excepto por la ausencia de conexión terrestre entre Norteamérica y Sudamérica, que posteriormente queda definida por la aparición del Istmo de Panamá en el Plioceno.

- 2) Una segunda vía de conexión entre estas especies podría tener su origen cuando Antártida, Sudamérica y Sudáfrica se encontraban unidas a comienzos del Cretácico. Sin embargo, esta hipótesis es inviable dado que África y Australasia se separaron mucho antes (162-165 millones de años atrás) que el origen de las gramíneas (Davis et al., 2002).
- 3) La dispersión directa por el Océano Atlántico, tal vez posible para ciertas especies, resulta insuficiente para realizar una generalización dado que la capacidad para migrar o desplazarse varía enormemente entre los diversos linajes (McLoughlin, 2001; Davis et al., 2002).
- 4) Varios autores han sugerido que la ruta de dispersión a través de Laurasia, durante el Terciario, ofrece una mejor explicación para ciertos grupos de Angiospermas con el

mismo patrón de disyunción geográfica que *Brachiaria* y *Urochloa* (Clayton 1981; Lavin & Luckow, 1993; Doyle & Le Thomas, 1997; Lavin et al., 2000; Chanderbali et al., 2001; Davis et al., 2002). Esta hipótesis surge de observar la distribución de algunos grupos de Angiospermas y la presencia de fósiles ancestros a estos grupos en Laurasia. En esta teoría se plantea una conexión entre Sudamérica, y el Viejo Mundo a través de Laurasia. Esta ruta se puede interpretar en varias direcciones (Fig. 132): (a) se han citado numerosos ejemplos de grupos de Angiospermas que se han dispersado desde Sudamérica hacia el Viejo Mundo entre los que se pueden mencionar Melastomeae (Renner et al., 2001) y Malpighiaceae (Davis et al., 2002), (b) se piensa que otros linajes (Annonaceae y Lauraceae) posiblemente hayan migrado desde el Viejo Mundo hacia Sudamérica (Doyle & Le Thomas, 1997; Chanderbali et al., 2001) y (c) por último, existen ejemplos (Leguminosae) de dispersión desde Norteamérica hacia el Viejo Mundo y posiblemente mucho después a Sudamérica (Lavin & Luckow, 1993; Lavin et al., 2000).

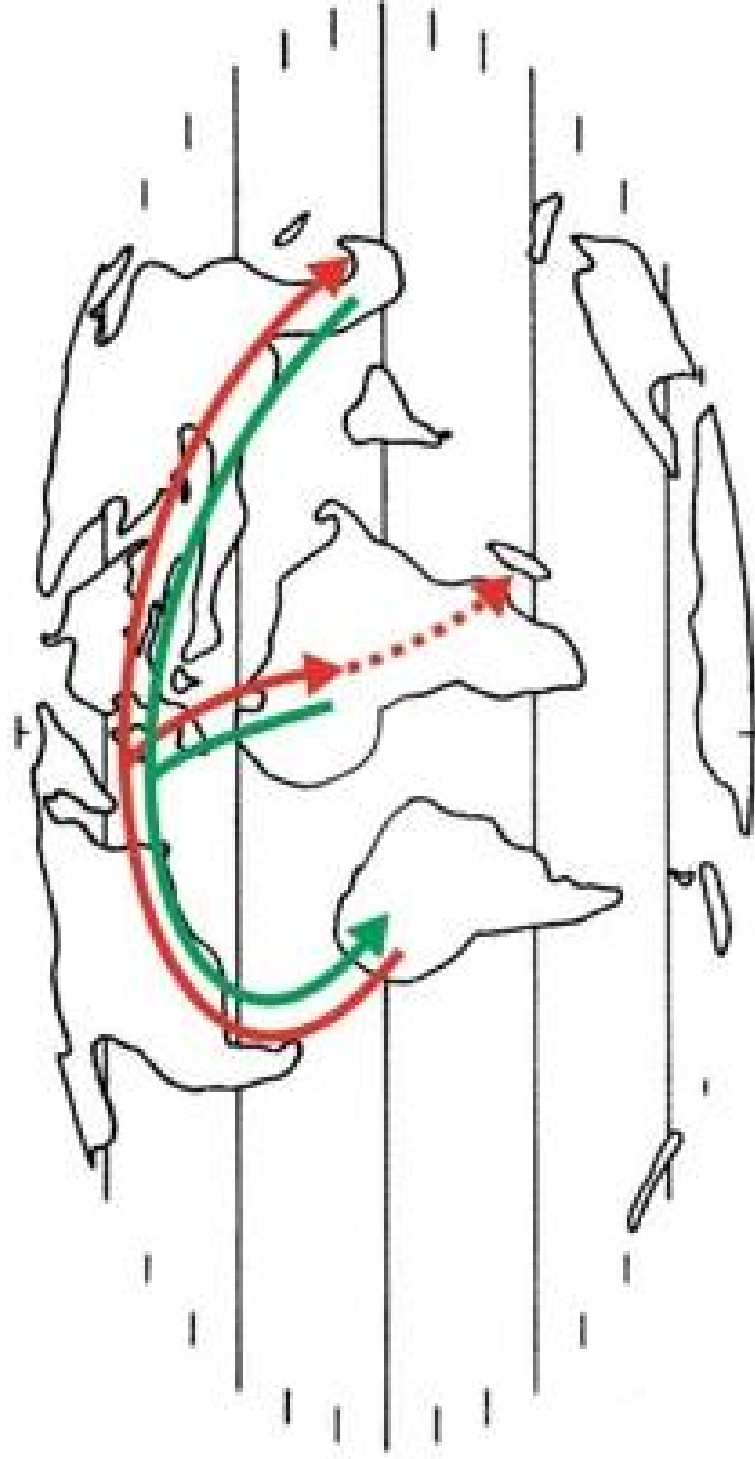


Figura 132.- Mapa paleogeográfico del Eoceno reproducido de Davis et al. (2002), previamente modificado por Doyle & Le Thomas (1997), donde se resumen las hipótesis sobre la migración a través de Laurasia. La dispersión desde Sudamérica hacia el Viejo Mundo está representada por la flecha roja. La migración desde el Viejo Mundo hacia el Nuevo Mundo se representa con la flecha verde.

Davis y colaboradores (2002) sugieren que la ruta a través de Laurasia cumple una función muy importante en la explicación de la distribución global de los grupos tropicales. Si no fuera por la dispersión por Laurasia, muchos clados de distribución pantropical posiblemente ahora estarían restringidos a uno u otro continente.

Brachiaria y *Urochloa*, en especial *Urochloa*, posiblemente respondan a un patrón similar de dispersión a través de Laurasia. Sin embargo, hasta el momento no se conocen fósiles de ancestros de estos géneros en lo que era Laurasia. En caso de que esta hipótesis quede confirmada, se podrían plantear las siguientes conjeturas:

- a) Las especies de *Urochloa* se dispersaron a través de Laurasia desde el Viejo Mundo hacia Sudamérica. Esta hipótesis se correlaciona con las hipótesis filogenéticas propuestas por Frank (1998) y Torres González & Morton (2005), dadas la presencia de *Brachiaria* s.s. (nativa de África), *Melinis* (originaria de África) y dos especies africanas de *Urochloa* como grupo basal. A su vez, la gran riqueza de especies que existe actualmente en África podría ser una evidencia a favor de esta hipótesis.
- b) Las especies de *Urochloa* se han dispersado desde Sudamérica hacia el Viejo Mundo, pasando por Laurasia. Esta hipótesis sugiere que las especies africanas se han diversificado más tardíamente cuando colonizaron África. Esta hipótesis se correlaciona con los resultados presentados por Giussani et al. (2001), dado que en esta filogenia *U. acuminata*, especie americana, es basal a todo el Clado PCK. Sin embargo, hasta el momento se desconoce si *U. acuminata* pertenece al género *Urochloa* o si se trata de una especie diferente agrupada informalmente dentro de este género.

- c) El origen de las especies de *Urochloa* se encuentra en Norteamérica, posteriormente se diversificaron en África y luego en Sudamérica más tardíamente. Hasta el momento no existe evidencia filogenética que soporte esta hipótesis.

Las hipótesis sobre la biogeografía y el momento en el cual las especies han experimentado una rápida radiación adaptativa, al menos en África, no pueden ser testeadas hasta tanto se posea una filogenia resuelta del grupo. Asimismo, los problemas metodológicos que existen relacionados a los estudios de biogeografía (ej. véase Donoghue & Moore, 2003), las controversias existentes en la calibración de los relojes moleculares (ej. Gaut & Doebley, 1997; GPWG, 2001; Davis et al., 2002; Morley & Dick, 2003) y la falta o discontinuidad de datos fósiles hacen muy difícil determinar con exactitud las posibles rutas o corredores de dispersión y el momento evolutivo en el cual se sucedieron.

5.4.3 Evolución de las inflorescencias

El desarrollo de la morfología es el resultado directo de la expresión temporal y espacial de los genes y es por ello, que el estudio de la morfología comparada del desarrollo es la conexión entre los estudios genéticos y la evolución de la diversidad morfológica entre clados (Doust & Kellogg, 2002a,b). La diversificación de los procesos de desarrollo en taxa relacionados conduce a una diversificación morfológica. Tal es el caso de las inflorescencias del Clado PCK.

Los estudios que tienden a identificar los cambios en los patrones de desarrollo en conjunto con una filogenia molecular agregan un componente temporal al estudio de la evolución de la morfología y con ello, se consigue determinar la dirección de los cambios morfológicos ocurridos.

Al optimizar los caracteres de estructura adulta de las inflorescencias en la hipótesis filogenética preliminar presentada en este trabajo, se observa que, en general, a partir de un paniculodio no truncado ancestral (tipo P) existe una tendencia hacia la homogeneización de la inflorescencia, lo cual está asociado directamente a una reducción del grado máximo de ramificación, y a la pérdida de estructuras distales de la inflorescencia y de las R^1 y con ello a la aparición de inflorescencia de tipo paniculodio truncado (tipo PT).

El desarrollo morfológico del Clado PCK es muy diverso. La diversificación de los procesos de desarrollo ocurre desde etapas muy tempranas luego de la transición a floración y los cambios se suceden en diferentes momentos del desarrollo de las inflorescencias.

Al estudiar la evolución de los caracteres derivados del estudio de desarrollo de la inflorescencia en la filogenia preliminar propuesta en este trabajo, se sugiere que el estado ancestral podría ser una inflorescencia con un patrón A de desarrollo del eje principal, con sentido de iniciación y diferenciación acrópeta de R^1 y una simetría dorsiventral. Posiblemente, dentro del complejo *Urochloa-Megathyrsus-Eriochloa*, las inflorescencias sufrieron grandes cambios en su desarrollo y con ello en la morfología adulta. La optimización presentada en esta tesis sugiere que el cambio hacia inflorescencia de tipo PT, en primer lugar, está correlacionado directamente con un cambio en el sentido de

diferenciación de R^1 (pasa de acrópeta a basípeta), la secuencia de iniciación de las espiguillas (cambia a un patrón PT, con Cof de las R^1 que se inicia en primer lugar que le resto de las espiguillas) y el sentido de iniciación de las Cof de las R^1 (cambia a basípeta) y las espiguillas en la UIF (cambia a basípeta). Asimismo, un cambio posterior se observa cuando se pasa de un patrón A de desarrollo del eje principal a un patrón B. Este último cambio está asociado a la aparición de un sentido de iniciación basípeta de R^1 , pérdida de determinación de la simetría de la inflorescencia y un sentido anfípeta de iniciación de espiguillas sobre la R^1 .

La coincidencia temporal de numerosos cambios en los patrones de desarrollo observada en este estudio preliminar sugiere que: (1) el mecanismo genético que impide el desarrollo de estructuras distales de la inflorescencia es el mismo que controla el cambio en el sentido de diferenciación de las R^1 , la secuencia y sentidos de iniciación de espiguillas, (2) el mecanismo que controla el patrón B de desarrollo del eje principal es el mismo que determina un sentido de iniciación basípeta de R^1 , una simetría indefinida y el sentido anfípeta de las espiguillas sobre las R^1 y (3) el desarrollo de las espiguilla está regulado por los mecanismo genéticos que intervienen en el desarrollo del sistema de ramificación de la inflorescencia.

Por otro lado, se observó que los cambios en los patones de desarrollo floral se sucedieron independientemente, pero hasta el momento se desconoce el carácter ancestral para el Clado y por lo tanto no se puede inferir con exactitud la evolución de los patrones de desarrollo floral hasta tanto no se conozca con precisión el patrón de desarrollo floral del grupo externo del Clado.

Los cambios en los patrones de desarrollo explican la evolución de la morfología de las inflorescencias en el Clado PCK. Por ello, la inflorescencia guarda información relevante sobre la evolución de las especies del Clado PCK.

Por cierto, nuevas filogenias que involucren un mayor número de especies y altos soportes y un mejor conocimiento del desarrollo del grupo externo seguramente nos brindarán mucha más información acerca de la evolución de las inflorescencias en el Clado, su estado ancestral y nos acercarán hacia un mejor conocimiento de los posibles mecanismos genéticos involucrados en los cambios de los patrones de desarrollo.