

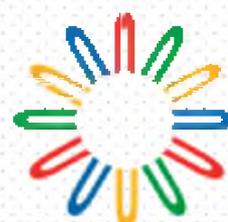
XXVII JORNADAS DE JOVENS PESQUISADORES

A ciência e a tecnologia na produção de inovação e transformação social

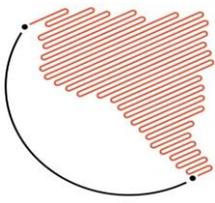
23 A 25 DE OUTUBRO DE 2019

UFSCar | Brasil | 2019

ISBN: 978-85-94099-11-2



Asociación de Universidades
GRUPO MONTEVIDEO



23. Agroalimentaria

OBTENCIÓN DE POLIPLOIDE DE REPRODUCCIÓN SEXUAL EN EL GRUPO PLICATULA

Autor: Carrizo, Julio Martin; martin15.carrizo@gmail.com

Co-autores: Novo Patricia Elda; pnovo@agr.unne.edu.ar; Wagner Alberto Werfil;
werfilwagner@gmail.com; Espinoza Francisco; espinoza@agr.unne.edu.ar

Orientador: Espinoza, Francisco; espinoza@agr.unne.edu.ar

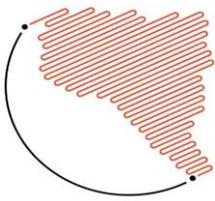
Facultad de Ciencias Agrarias,

Universidad Nacional del Nordeste - Instituto de Botánica del Nordeste, CONICET

Resumen

Paspalum chaseanum es una gramínea que pertenece al grupo Plicatula del género *Paspalum*, es originaria de América del Sur y se caracteriza por presentar citotipos diploides sexuales (2xS) y autoincompatibles, y citotipos tetraploides apomicticos (4xA),seudógamos y autocompatibles. En la naturaleza no se han encontrado plantas 4x sexuales (4xS). El objetivo de este estudio fue obtener plantas 4xS a partir de plantas 2xS de *P. chaseanum*. Esas plantas 4xS pueden ser utilizadas como parentales femeninos en cruzamientos intra e interespecíficos con 4xA. Un total de 230 plántulas 2xS de *P. chaseanum* fueron sumergidas en una solución de colchicina (0, 2%) y dimetil sulfóxido (2%) durante 2, 4, y 6 hs. Lograron sobrevivir 135 plántulas, que fueron analizadas por citometría de flujo. Entre estas, solo una planta 4x inducida fue obtenida (tratamiento de 6hs). Los resultados fueron confirmados por recuento de cromosomas en punta de raíces. Los estudios embriológicos realizados en 120 ovarios maduros, utilizando un microscopio de contraste diferencial interferencial (DIC), revelaron que todos los ovarios presentaron sacos embrionarios meióticos, indicando que la misma se reproduce sexualmente. Esta planta no produce semillas en autopolinización, manteniendo el sistema de autoincompatibilidad de los 2xS. Sin embargo, produce semillas luego de ser polinizada con otros genotipos. Esto permitiría usarla como madre en cruzamientos intra e interespecíficos con citotipos 4xA del grupo. Los resultados sugieren además que es posible quebrar la barrera de la apomixis en los genotipos 4x naturales permitiendo la liberación de los genes y crear nuevas combinaciones genotípicas que pueden ser utilizadas en programas de mejoramiento genético.

Palabras claves: Autopoliploidía, tetraploide sexual, citometría de flujo

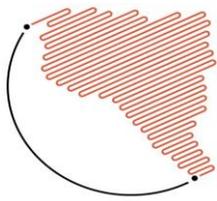


Introducción

Las gramíneas predominan en la vegetación natural del nordeste de Argentina y el género *Paspalum* es uno de los más importantes por el número de especies que aporta. Muchas de sus especies tienen un alto valor forrajero, por lo que la selección y el cultivo sistemático de variedades mejoradas podrían incrementar notablemente el potencial ganadero de la región. Por otra parte, la apomixis, reproducción asexual por medio de verdaderas semillas (Nogler, 1984), se encuentra con frecuencia en especies de este género. Este modo reproductivo está asociado a la poliploidía (Ortiz et al., 2013) y generalmente la mayoría de las especies apomícticas son tetraploides (4x) y tienen una contrapartida co-específica diploide (2x) y de reproducción sexual (Quarin, 1992). En las poblaciones de especies 4x apomícticas no existen individuos de reproducción sexual, aunque la reproducción de cada individuo no es siempre totalmente apomíctica. Sin embargo, las poblaciones 2x de la misma especie son totalmente de reproducción sexual.

El grupo *Plicatula* agrupa a todas aquellas especies relacionadas a *P. plicatum* (Chase, 1929), especies que se caracterizan fundamentalmente por presentar espiguillas cuyas lemmas tienen arrugas transversales y el antecio es de

Color marrón oscuro brillante. Este grupo incluye a numerosas especies y formas nativas cuyo principal centro de variación se encuentra en el centro y oeste de Brasil, Paraguay y este de Bolivia. La gran diversidad observada en poblaciones naturales hace de este grupo un complejo extremadamente variable de especies, muchas de ellas actualmente no bien definidas taxonómicamente. Existen especies que son diploides y se reproducen por sexualidad, mientras que los poliploides son apomícticos, pseudógamos y autofértiles (Quarin et al., 1997; Espinoza et al., 2001). El mejoramiento genético mediante cruzamientos y selección es impracticable dentro de especies de este grupo a nivel tetraploide, debido a que todos los genotipos 4x estudiados hasta el momento se reproducen por apomixis. Por otra parte, las razas diploides de este grupo son de reproducción sexual. La obtención de plantas sexuales a nivel 4x es un requisito importante para estudios básicos de la apomixis y/o para iniciar cualquier programa de mejoramiento genético a nivel tetraploide. Por lo tanto, la duplicación de cromosomas a partir de plantas 2x es la manera más directa para la obtención de plantas 4x sexuales, las que podrían ser luego utilizadas como progenitores femeninos en cruzamientos de plantas sexuales por apomícticas.



P. chaseanum especie perteneciente al grupo Plicatula, se caracteriza por incluir plantas hirsutas, con espiguillas también hirsutas dispuestas en pares sobre un raquis angosto. Su distribución ocurre en suelos arenosos en la región del chaco árido, en la zona norte de la Argentina, oeste de Paraguay y Bolivia. Esta especie presenta dos citotipos distintos uno diploide ($2n=2x=20$) que se reproduce de manera sexual y con elevado grado de autoincompatibilidad (Espinoza & Quarín, 1997) y otro citotipo tetraploide ($2n=4x=40$) que se reproduce mediante apomixis (Novo et al., 2013).

Objetivos

El objetivo principal de este proyecto fue la obtención de plantas 4x sexuales a partir de 2x sexuales en la especie de *Paspalum chaseanum*.

Materiales y Métodos

Material vegetal

Un total de 230 plántulas diploides 2x de *P. chaseanum* fueron sumergidas en una solución de colchicina (0.2%) y dimetil sulfóxido (2%) durante 2, 4, y 6hs. Posteriormente al tratamiento, las plántulas fueron lavadas en agua esterilizada y trasplantadas a bandejas multi-celdas con sustrato estéril y mantenidas en invernáculo en condiciones controladas.

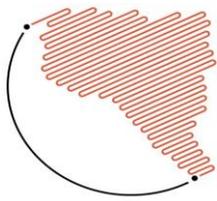
Determinación del nivel de ploidía

La estimación del nivel de ploidía se efectuó utilizando la técnica de citometría de flujo descrita en Urbani et al. (2002). Para ello se utilizó un citómetro de flujo Partec PA II existente en el IBONE. Para corroborar el número cromosómico se realizaron recuentos en puntas de raíces. Raíces jóvenes fueron fijadas en 2 α -bromonaftaleno durante 2 horas. Luego se realizó la hidrólisis en CIH 1N durante 10 minutos a 60° C y se tiñeron con el reactivo de Schiff. Finalmente las puntas de raicillas fueron aplastadas sobre un portaobjetos en una gota de orceina acética al 2% y observadas con un microscopio óptico.

Análisis del sistema reproductivo de plantas inducidas

El modo de reproducción de las plantas inducidas se realizó utilizando estudios embriológicos. Para el mismo, las inflorescencias fueron fijadas en FAA (formaldehído, ácido acético glacial y etanol 70%) en una proporción de 1:1:18 durante al menos 24 h y luego mantenidas en etanol 70% a 4° C. Luego los pistilos fueron extraídos con ayuda de agujas histológicas y lupa de las espiguillas, deshidratados en una serie de alcohol butírico terciario y embebido en parafina. Luego fueron cortados con micrótomo a 12 μ m y coloreados en una serie de safranina y verde rápido. Finalmente, los preparados se observaron con un microscopio óptico.

También se realizaron observaciones de



sacos embrionarios por el método de clarificado de ovarios siguiendo el protocolo de Young et al (1979).

En ambos casos la observación de óvulos portadores, en forma exclusiva, de sacos embrionarios meióticos indicaría que la planta es de reproducción sexual. La eventual presencia de uno o más sacos apospóricos por óvulo indicaría que la planta está genéticamente capacitada para la reproducción apomíctica.

Producción de semillas y cruzamientos interespecíficos

La producción de semillas de la planta 4x inducida se determinó en condiciones de autopolinización y polinización cruzada. En las autopolinizaciones, las inflorescencias fueron aisladas con sobres antes de la anthesis y se mantuvieron en estas condiciones hasta la cosecha de las semillas. Para el análisis de producción de semillas mediante polinización cruzada se realizaron cruzamientos controlados intra-específicos e inter-específicos. Estos cruzamientos se realizaron sin previa emasculación de la planta madre.

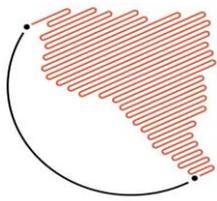
Resultados y Discusión

Un total de 135 plantas sobrevivieron después del tratamiento de colchicina (58, 7%). Los estudios por citometría de flujo permitieron establecer que una sola planta resultó ser inducida (4x) y la misma perteneció al tratamiento de 6hs con

colchicina. Los resultados fueron confirmados por recuento tradicional de cromosomas en punta de raíces jóvenes. El resto de las plantas fueron todas 2x. Morfológicamente la planta 4x inducida fue muy similar al diploide, salvo el tamaño de las espiguillas. Las plantas poliploides suelen ser más grandes y presentar órganos de mayor tamaño (efecto 'gigas') que las diploides. Este tipo de variación morfológica suele ser observados entre los diploides naturales y las plantas tetraploides en algunas especies de *Paspalum*.

Los resultados del análisis embriológico de esta planta 4x inducida se realizó en 120 ovarios maduros por contraste diferencial interferencial (DIC) observado en microscopio óptico. Las observaciones relevaron estructuras típicas de sacos embrionarios meióticos, demostrando que la reproducción de la planta inducida es de sexual. Resultados similares fueron obtenidos en las especies de *P. notatum* (Forbes & Burton, 1961; Quarin et al., 2001), *P. simplex* (Cáceres et al. 1999) y *P. plicatum* (Sartor et al., 2009).

Respecto a los estudios de fertilidad, esta planta inducidas 4x no produjo semillas en autopolinización, manteniendo el sistema de auto-incompatibilidad de las diploides, similar a lo observado en una de las plantas inducidas de *P. plicatum* (Sartor et al., 2009). Por otra parte, esta misma planta, produjo semillas después de ser polinizadas con polen de especies nativas con de



genotipos tetraploides.

Conclusiones

La obtención de una nueva planta 4x sexual resulta sumamente interesante ya que permitiría ser utilizada como progenitor femenino en cruzamientos intra e interespecíficos con otros citotipos 4x apomíticos. Los resultados sugieren además que es posible quebrar la barrera de la apomixis en los genotipos tetraploides naturales abriendo la posibilidad de utilizar a sus genes en programas de mejoramiento genético de plantas.

Referencias Bibliográficas

Caceres, M.E., Pupilli F., Quarin C.L. y Arcioni S. (1999). Feulgen-DNA densitometry of embryo sacs permits discrimination between sexual and apomictic plants in *Paspalum simplex*. *Euphytica* 110:161–167.

Chase, A. (1929). The North American species of *Paspalum*. *Contr U S Natl Herb* 28:1-310.

Espinoza, F. y Quarin, C.L. (1997). Cytoembryology of *Paspalum chaseanum* and sexual diploid biotypes of two apomictic *Paspalum* species. *Aust J Bot* 45:871-877.

Espinoza, F., Urbani, M.H., Martínez, E.J. y Quarin, C.L. (2001). The breeding system of three *Paspalum* species. *Tropical Grassl* 35:211-217.

Forbes, I., Jr., y Burton, G.W. (1961).

Cytology of diploids, natural and induced tetraploids, and intraspecies hybrids of bahiagrass, *Paspalum notatum* Flugge. *Crop Sci* 1:402–406.

Nogler, G. A. (1984). Gametophytic apomixis. In: Embryology of angiosperms. Johri BM Ed. Springer: Berlin, Heidelberg, New York. pp 475-518.

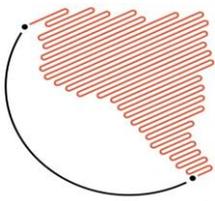
Novo, P.E., Espinoza, F. y Quarin, C.L. (2013). An apomictic tetraploid *Paspalum chaseanum* cytotype and its cytogenetic relationship with *P. plicatulum* (Poaceae): taxonomic and genetic implications. *Aust J Bot* 61:538-543.

Ortiz, J.P.A., Quarin, C.L., Pessino, S.C., Acuña, C.A., Martínez, E.J., Espinoza, F., Hojsgaard, D.H., Sartor, M.E., Cáceres, M.E. y Pupilli, F. (2013). Harnessing apomictic reproduction in grasses: what we have learned from *Paspalum*. *Ann Bot* 112:767-787.

Quarin, C.L. (1992). The nature of apomixis and its origin in Panicoid grasses. *Apomixis Newsl* 5:8-15.

Quarin, C.L., Valls, J.F.M., y Urbani, M.H. (1997). Cytological and reproductive behaviour of *Paspalum atratum* a promising forage grass for the tropics. *Tropical Grassl* 31:114-116.

Quarin, C.L., Espinoza, F., Martínez, E.J., Pessino, S.C., y Bovo, O.A. (2001). A rise of ploidy level induces the expression of apomixis in *Paspalum notatum*. *Sex Plant Reprod* 13: 243-249.



Urbani, M.H., y Quarin, C.L. (2002). Pasto "Chané": nuevo cultivar forrajero de *Paspalum guenoarum*. XIX Reunión de grupo técnico en forrajeras del cono sur. Zona Campos. INTA. Centro Regional Corrientes, Mercedes, Corrientes. 22-24 Oct 2002.

Young, B.A., Sherwood, R.T., y Bashaw, E.C. (1979). Cleared-pistil and thicksectioning techniques for detecting aposporous apomixis in grasses. Can J Bot 57: 1668-1672.

Financiamiento

Secretaría General de Ciencia y Técnica, UNNE (PI 17A012).