



Universidad Nacional del Nordeste

Facultad de Ciencias Agrarias

“Ampliación de la variabilidad genética de una población sintética tetraploide sexual del grupo Plicatula, del género *Paspalum*”.

Trabajo final de graduación

-Modalidad Tesina-

Alumno: Lucas Daniel Díaz

Asesora: Lic. (Dra.) Patricia Elda Novo

Lugar de trabajo: Cátedra de Genética, Facultad de Ciencias Agrarias - UNNE.

Ciudad de Corrientes, Argentina 2023

ÍNDICE

1. RESUMEN	2
2. INTRODUCCIÓN.....	3
3. OBJETIVOS.....	5
3.1 General:.....	5
3.2 Específicos:	5
4. HIPÓTESIS	5
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	6
5.1 Material vegetal	6
5.2 Sistema reproductivo	7
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	9
6.1 Corroboración del modo reproductivo de los híbridos que formaron parte de la población de policruzamiento.	9
6.2 Determinación del modo reproductivo de nuevos híbridos analizados	15
6.3 Policruzamiento	17
7. CONCLUSIONES.....	18
8. BIBLIOGRAFÍA	19

1. RESUMEN

El género *Paspalum* L. de la familia Poaceae cuenta con aproximadamente 400 especies adaptadas a las regiones cálidas y templadas de América, siendo particularmente abundantes en Brasil, este de Bolivia, Paraguay y nordeste de Argentina. El grupo subgenérico Plicatula contiene alrededor de 30 especies morfológicamente afines a *P. plicatulum* Michx. Una gran proporción de ellas pueden considerarse multiploides puesto que el mismo taxón contiene citotipos de varios niveles de ploidía, generalmente desde diploides de reproducción sexual a poliploides apomícticos. Sin embargo, se ha logrado de manera experimental una planta tetraploide sexual de *P. plicatulum* 4PT, mediante la duplicación cromosómica con colchicina. Esto permitió cruzarlas con 9 accesiones tetraploides apomícticas naturales pertenecientes a 6 especies, seleccionándose 50 híbridos sexuales que se utilizaron para formar una población de policruzamiento, la que luego dio lugar a una población sintética tetraploide sexual (PSTS). Teniendo como base esta información el objetivo del presente trabajo fue ampliar la diversidad genética de la PSTS del grupo Plicatula, mediante la incorporación de nuevos híbridos intra e interespecíficos de reproducción sexual. Para ello se tomó una muestra de 24 híbridos que formaron parte de la población de policruzamiento y se corroboró si mantuvieron su condición de reproducción sexual exclusiva mediante la técnica de clarificado de ovarios y citometría de flujo. Por ambas técnicas se observó que 4 híbridos fueron de reproducción sexual exclusiva. Además, se determinó el modo reproductivo de 7 nuevos híbridos, observándose que todos ellos presentaron cierto grado de apomixis. Debido a que decreció la proporción de híbridos sexuales (16,6%) de la población original de policruzamiento y a que no se logró incorporar nuevos individuos, no fue posible formar un nuevo pool de plantas sexuales tetraploides y por lo tanto realizar el policruzamiento.

2. INTRODUCCIÓN

El género *Paspalum* pertenece a la familia Poaceae, subfamilia Panicoideae, tribu Paniceae y comprende entre 330 y 400 especies, las cuales se distribuyen de forma natural en las regiones tropicales, subtropicales y templadas de América del Norte y América del Sur, con unas pocas especies nativas de África, Asia y Oceanía. Este género presenta una gran diversidad que le permite adaptarse a diferentes ambientes y posee numerosas estrategias reproductivas: clonación, apomixis y sexualidad (Quarin, 1992), la cual ha tenido una gran influencia en la evolución (Bashaw et al., 1970). Muchas de estas especies son valoradas por su calidad como forrajeras, palatabilidad y producción de materia seca. Sin embargo, sólo unas pocas han sido seleccionadas de la naturaleza, domesticadas y llevadas a cultivo.

La poliploidía en este género es una característica no sólo importante sino también muy particular ya que existe diversidad intraespecífica de niveles de ploidía. Las especies se agrupan en taxones que son diploides ($2n=2x=20$) de reproducción sexual y en poliploides, mayoritariamente tetraploides ($2n=4x=40$) de reproducción apomítica (Ortiz et al., 2013). La mayoría de ellas se consideran multiploides puesto que el mismo taxón contiene citotipos de varios niveles de ploidía.

El grupo *Plicatula* es una categoría botánica informal establecida por Chase (1929) constituido por 30 especies. Este grupo sobresale dentro del género por el potencial forrajero de sus especies e incluye a aquellas del género *Paspalum* que presentan marcadas afinidades morfológicas con la especie *Paspalum plicatulum*, siendo ésta una de las más representativas ya que fue la primera en ser descripta (Chase, inédito). El grupo comprende plantas perennes, anuales, terrestres, palustres, que pueden ser fácilmente reconocidas por presentar inflorescencias con numerosos racimos rígidos y con las espiguillas marcadamente planoconvexas, antecio superior de color castaño oscuro brillante y la lemma inferior posee visibles arrugas o pliegues transversales; que es lo que le da el nombre al grupo, debido a que *plicatulum* proviene del latín *plicatus* que significa plegado.

Así como ocurre en el género, este grupo se caracteriza por incluir a especies $2x$ de reproducción sexual y poliploides, siendo los $4x$ los más dominantes, que se reproducen por apomixis (Quarin et al., 1997; Espinoza et al., 2001, Ortiz et al., 2013). Si bien los citotipos diploides son raros en la naturaleza, han sido reportados biotipos $2x$ para algunas especies de este grupo, tales como: *P. compressifolium* (Quarin et al., 1996), *P. glaucescens* (Pritchard, 1962; sin. *P. yaguaronense*), *P. plicatulum* (Espinoza & Quarin, 1997), *P. lenticulare* (Espinoza et al., 2001; sin. *P. limbatum*) y *P. wrightii* (Martínez & Quarin, 1999; sin. *P. hydrophilum*). Por otra parte, los estudios realizados hasta el momento demostraron que la mayoría de las especies analizadas presentan citotipos tetraploides y todos ellos se reproducen por apomixis, tales como: *P. guenoarum* (Pritchard, 1970; Burson & Bennett, 1971b; Espinoza et al. 2001), *P. atratum* (Quarin et al., 1997), *P. lenticulare* (Espinoza et al., 2001) y *P. plicatulum* (Saura, 1941; Pritchard, 1970; Bashaw et al., 1970; Burson & Bennett, 1971b).

Dado que los genotipos 4x son apomícticos y que los 2x son de reproducción sexual, el mejoramiento genético mediante cruzamientos y selección es impracticable. La obtención de plantas 4x sexuales es un requisito importante para estudios básicos de la apomixis así como para iniciar cualquier programa de mejoramiento genético a ese nivel de ploidía. Recientemente se logró de manera experimental, mediante la duplicación cromosómica con colchicina, plantas tetraploides sexuales de *P. plicatulum* 4PT, 7PT (Sartor et al., 2009) y *P. chaseanum* (Carrizo et al., 2018, Novo et al., 2023), permitiendo la realización de cruzamientos intra-específicos e inter-específicos (Novo et al., 2020). La planta de *P. plicatulum* 4PT, que se caracteriza por su autoincompatibilidad, ha sido usada en múltiples cruzamientos intra-específicos e inter-específicos, obteniéndose en su mayoría híbridos, los cuales fueron fértiles y segregaron para el modo reproductivo, (Aguilera et al., 2011; Novo et al., 2013, 2015, 2016, 2017, 2019, 2020a, 2020b; Lutz et al., 2017; Ruiz Díaz et al., 2019; Villalba et al., 2022).

Tomando como base el modelo genético de la herencia de la apomixis en diferentes especies de *Paspalum* (Martínez et al., 2001; Stein et al., 2004; Aguilera et al., 2015) y en otras gramíneas Panicoideas como *Megathyrsus maximus* (Jacq.) BK Simon & SWL Jacobs (Savidan, 1975) y *Brachiaria* (Valle & Glenke, 1993), el cual considera que la aposporia estaría controlada por un gen dominante con herencia tetrasómica, en donde las plantas sexuales al autofecundarse, o al cruzarse entre sí, siempre dan descendientes sexuales, se seleccionaron algunos híbridos sexuales de 9 familias híbridas de *P. plicatulum* 4PT \times 9 accesiones tetraploides apomícticas (Novo et al., 2020a). Para ello se estimó visualmente el vigor y su fertilidad, es decir, la capacidad de producir semillas. Estos híbridos fueron usados para realizar una población de policruzamiento, la que posteriormente dio lugar a una población sintética tetraploide sexual (Novo et al., 2020a), la que se caracteriza por tener una amplia variabilidad genética y fenotípica, proveniente de las diferentes especies tetraploides apomícticas. En esa población se podría incrementar la variabilidad genética, mediante la incorporación de híbridos provenientes de nuevos cruzamientos sexual \times apomíctico con el objetivo de seleccionar un pequeño grupo de individuos que serían utilizados como madres en cruzamientos futuros con plantas apomícticas dentro del grupo Plicatula.

3. OBJETIVOS

3.1 General:

Ampliar la diversidad genética de una población sintética tetraploide sexual del grupo *Plicatula* del género *Paspalum*, mediante la incorporación de nuevos híbridos intra e inter-específicos de reproducción sexual.

3.2 Específicos:

- Corroborar si los híbridos intra e inter-específicos que formaron parte de la población de policruzamiento mantienen su condición de reproducción cien por ciento sexual.
- Determinar el modo reproductivo de nuevos híbridos.
- Formar un pool de plantas sexuales tetraploides para realizar una población de policruzamiento.
- Cosechar las semillas del policruzamiento para ampliar la población sintética tetraploide sexual.

4. HIPÓTESIS

La incorporación de nuevos individuos a la población sintética tetraploide sexual del grupo *Plicatula* permitiría ampliar la variabilidad genética de esa población debido a que se adicionarían nuevas combinaciones génicas.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Material vegetal

De los 50 híbridos de reproducción sexual intra e inter-específicos que formaron parte de la población de policruzamiento (Novo et al., 2020a), se tomó una muestra de 24 individuos (Tabla 1). Los mismos corresponden a cruzamientos realizados entre una planta tetraploide sexual (4xS) de *P. plicatulum* 4PT, usada como madre, obtenida por duplicación cromosómica mediante el uso de colchicina (Sartor et al., 2009), y parentales masculinos tetraploides apomícticos (4xA) que se detallan a continuación: *P. plicatulum* Hojs388; *P. chaseanum* ST13894; *P. guenoarum* Azulao, Baio, GR19, Q4108; *P. lenticulare* V11893; *P. nicorae* PI508821; *P. oteroi* A&V1332.

Además, se utilizaron 7 nuevos híbridos (Tabla 1), es decir que no han formado parte de la población de policruzamiento, los mismos también provenían de cruzamientos entre la planta 4xS de *P. plicatulum* 4PT × 6 especies 4xA silvestres los cuales se especifican a continuación: *P. atratum* cv. Cambá, U44; *P. compressifolium* AK40811; *P. glaucescens* Q4337; *P. guenoarum* BO107; *P. lenticulare* BO190; *P. wrightii* Q4351.

Tabla 1. Híbridos intra e inter-específicos entre *P. plicatulum* 4PT tetraploide sexual × 10 especies tetraploides apomícticas silvestres.

Cruzamientos	Cantidad de híbridos seleccionados	Híbridos
Híbridos que formaron parte de la población de policruzamiento		
<i>P. plicatulum</i> 4PT		
× <i>P. chaseanum</i> ST13894	3	#2, #4, #25
× <i>P. guenoarum</i> Azulao	3	#1, #4, #41
× <i>P. guenoarum</i> Baio	4	#1, #11, #44, #56
× <i>P. guenoarum</i> GR19	4	#29, #36, #60, #116
× <i>P. guenoarum</i> Q4108	1	#1
× <i>P. lenticulare</i> V11893	1	#1
× <i>P. nicorae</i> PI508821	1	#10
× <i>P. oteroi</i> A&V1332	3	#5, #8, #13
× <i>P. plicatulum</i> Hojs388	4	#2, #3, #6, #8
Nuevos híbridos evaluados		
<i>P. plicatulum</i> 4PT		
× <i>P. atratum</i> cv. Cambá	1	#55
× <i>P. atratum</i> U44	1	#3
× <i>P. compressifolium</i> AK40811	1	#1
× <i>P. glaucescens</i> Q4337	1	#6
× <i>P. guenoarum</i> BO107	1	#3
× <i>P. lenticulare</i> BO190	1	#1
× <i>P. wrightii</i> Q4351	1	#27

Todos los híbridos utilizados se mantuvieron en macetas con suelo estéril (Fig.1) dentro del invernáculo de la cátedra de Genética de la Facultad de Ciencias Agrarias de la UNNE.



Figura 1: Híbridos intra e inter-específicos entre *P. plicatulum* 4xS × especies 4xA silvestres.

5.2 Sistema reproductivo

Para corroborar y determinar el sistema reproductivo de los híbridos se emplearon dos técnicas. La primera consistió en el clarificado de ovarios maduros, para lo cual se fijaron inflorescencias en estado de antesis en una solución de FAA (formaldehído, ácido acético glacial y etanol 70%), en una proporción de 1:1:18 durante 24 horas. Para el análisis, se procedió a la disección de los ovarios, los cuales se mantuvieron en etanol 70% durante 24hs como mínimo, luego se procedió al clarificado de los mismos. Primero fueron sometidos a diferentes concentraciones de alcohol (50%, 70%, 95% y 100%) y finalmente en metilsalicilato (50%, 75%, 85% y 100%) según el protocolo detallado por Young et al., (1979). Seguidamente fueron observados en un microscopio de Contraste de Interferencia Diferencial (DIC) (Leica DM2500).

La segunda técnica empleada fue citometría de flujo, en la que se midió el contenido relativo de ADN en células del embrión y del endospermo en semillas maduras usando un citómetro Partec PAII (Ploidy Analyser II, Partec GmG, Münster, Alemania) siguiendo la metodología descrita por Matzk et al., (2000). En cada planta, el análisis se realizó en grupos o bulks de 2 a 5 cariopses. Para lo cual, previamente se realizó la cosecha de semillas de las inflorescencias maduras en condiciones de polinización libre, luego se realizó la separación manual de las espiguillas de las inflorescencias y finalmente se separaron las llenas de las vacías mediante el uso de un soplador mecánico de semillas (Seedburo Equipment Company 1022W. Jackson Blvd. Chicago. IL 60607 1-800-284-5779). Posteriormente se realizó el escarificado y los cariopses obtenidos fueron finamente cortados con una hoja de afeitar en 0,5 ml de buffer para extracción nuclear. Luego se dejó incubar durante 2 minutos y la

solución fue pasada por un filtro de 30 μm y transferida a un tubo en el cual se adicionó 1,5 ml del buffer de tinción fluorescente 4 α 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Las suspensiones fueron analizadas pasándolas a través del citómetro de flujo, con el detector operando a 355 nm. Para el análisis de los datos se utilizó el software de computación PA-II Partec FloMax, el cual genera histogramas con los datos de las muestras.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Corroboración del modo reproductivo de los híbridos que formaron parte de la población de policruzamiento.

El análisis para corroborar el modo reproductivo se llevó a cabo en los 24 híbridos, los cuales corresponden a 6 especies y 9 accesiones diferentes. Mediante la técnica de clarificado de ovarios, se evaluaron entre 66 y 290 ovarios maduros. La diferencia se debe a que en algunas plantas la presencia del hongo *Claviceps paspali* no permitió el desarrollo normal de ellos. Se observó que 8 individuos fueron de reproducción sexual (Tabla 2). Éstos se caracterizaron por presentar sacos embrionarios meióticos (SEM) del tipo *Polygonum* (Fig. 2 A), el cual presenta en el extremo micropilar un aparato oosférico con la ovocélula bien nítida y dos sinérgidas, generalmente difíciles de identificar al momento de anthesis porque ya desaparecen los nucleolos; una gran célula central bi-nucleada muy vacuolizada y en el extremo calazal una masa de antípodas típicas de los SEM. En estos individuos el porcentaje de SEM varió entre 72,82% y 95,76%, y los restantes 4,24% y 27,18% correspondieron a sacos embrionarios anormales (SEa), incluidos en ellos los sacos abortados e inmaduros (Tabla 2).

Los 16 individuos restantes presentaron SEM, como así también sacos embrionarios apospóricos (SEA), que se caracterizan por presentar una ovocélula, dos núcleos polares y ausencia de antípodas (Tabla 2, Fig. 2 B). Los SEA se encontraban solos o acompañados de SEM, estos últimos son considerados como ovarios mixtos (Tabla 2, Fig. 2 C). Cabe destacar que en estos individuos también se observaron SEa (Tabla 2, Fig. 2 D). Estos resultados indican que los 16 híbridos son de reproducción apomítica facultativa, ya que tiene la capacidad de formar en sus óvulos tanto sacos embrionarios apospóricos como meióticos.

El análisis por citometría de flujo se realizó en los 24 híbridos, analizando entre 12 a 56 cariopses (Tabla 2). La diferencia en el número de cariopses analizados se debió a la escasa producción de semillas o por pérdida por desgrane natural de las panojas. Se observó que en los mismos hubo segregación, debido a la presencia de individuos de reproducción sexual y apomítica. Los individuos sexuales que fueron 13 mostraron una relación embrión/endospermo de contenido relativo de ADN de $2C + (3C)$: $2C$ del embrión ($n + n$) y $3C$ de la fusión de los dos núcleos polares reducidos ($n + n$) más el gameto masculino también reducido (n) (Tabla 2, Fig. 3 A). Los 11 híbridos restantes presentaron semillas con histogramas con picos $2C + (3C)$, y cariopses con histogramas con picos $2C + (5C)$, indicando que se formaron por un proceso de aposporia, seguido de partenogénesis y pseudogamia. El contenido $2C$ corresponde al embrión originado por partenogénesis de la ovocélula no reducida de un saco apospórico; y el contenido $5C$ corresponde al endospermo que surgió, en el mismo saco, por la fusión de dos núcleos polares no-reducidos y un gameto masculino reducido, aportado por el polen en un proceso pseudogámico (Tabla 2, Fig. 3 B).

Tabla 2. Determinación del modo reproductivo por la técnica de clarificado de ovarios y citometría de flujo de 24 híbridos intra e inter-específicos de *P. plicatulum* 4PT × 6 especies tetraploides apomícticas, que formaron parte de la población de policruzamiento. SEM: sacos embrionarios meióticos; SEA: sacos embrionarios apospóricos; SEM+SEA: sacos embrionarios mixtos; SEa: sacos embrionarios anormales; Apo. fac.: apomícticos facultativos; Sex.: sexuales.

Cruzamientos	Tipo de sacos embrionarios					Contenido de ADN del Embrión + (endosperma)			Modo reproductivo	
	Nº de ovarios	SEM (%)	SEA (%)	SEM + SEA (%)	SEa (%)	Nº de semillas	2C+(3C) (%)	2C+(5C) (%)	Embriología	Citometría
<i>P. plicatulum</i> 4PT										
× <i>P. chaseanum</i> ST13894										
#2	103	87,38	0,00	0,00	12,62	30	100	0,00	Sex	Sex
#4	148	72,97	0,46	2,70	24	18	100	0,00	Apo fac	Sex
#25	118	95,76	0,00	0,00	4,24	40	70,00	30,00	Sex	Apo fac
× <i>P. guenoarum</i> Azulao										
#1	115	88,70	0,00	2,61	8,70	38	81,58	18,42	Apo fac	Apo fac
#4	176	85,80	0,00	0,00	14,20	40	100	0,00	Sex	Sex
#41	105	85,71	0,00	0,00	14,29	28	75,00	25,00	Sex	Apo fac
× <i>P. guenoarum</i> Baio										
#1	102	93,14	0,00	0,98	5,88	52	80,77	19,23	Apo fac	Apo fac
#11	220	78,64	7,27	2,27	11,82	55	90,91	9,09	Apo fac	Apo fac
#44	102	70,59	0,00	0,98	28,43	13	100	0,00	Apo fac	Sex
#56	112	95,54	0,00	1,79	2,68	51	80,39	19,61	Apo fac	Apo fac
× <i>P. guenoarum</i> GR19										
#29	177	89,83	0,00	0,56	9,60	30	100	0,00	Apo fac	Sex
#36	121	93,39	0,00	2,48	4,13	35	100	0,00	Apo fac	Sex
#60	109	76,15	0,00	0,00	23,85	15	100	0,00	Sex	Sex
#116	101	88,12	0,00	0,00	11,88	30	100	0,00	Sex	Sex

<hr/>										
× <i>P. guenoarum</i> Q4108										
#1	290	79,31	0,00	0,34	20,34	30	100	0,00	Apo fac	Sex
<hr/>										
× <i>P. lenticulare</i> V11893										
#1	210	50,48	0,48	2,38	46,67	30	100	0,00	Apo fac	Sex
<hr/>										
× <i>P. nicorae</i> PI508821										
#10	158	52,53	1,27	41,14	5,06	30	100	0,00	Apo fac	Sex
<hr/>										
× <i>P. oteroi</i> A&V 1332										
#5	106	85,85	0,00	0,00	14,15	27	37,04	62,96	Sex	Apo fac
#8	219	83,56	1,83	0,46	14,16	30	100	0,00	Apo fac	Sex
#13	66	80,30	0,00	10,61	9,09	12	91,67	8,33	Apo fac.	Apo fac
<hr/>										
× <i>P. plicatulum</i> Hojs388										
#2	113	77,88	0,00	2,65	19,47	10	100	0,00	Apo fac	Sex
#3	201	47,76	7,96	29,85	14,43	50	70,00	30,00	Apo fac	Apo fac
#6	101	84,16	0,00	13,86	1,98	56	51,79	48,21	Apo fac	Apo fac
#8	103	72,82	0,00	0,00	27,18	24	85,71	14,29	Sex	Apo fac
<hr/>										

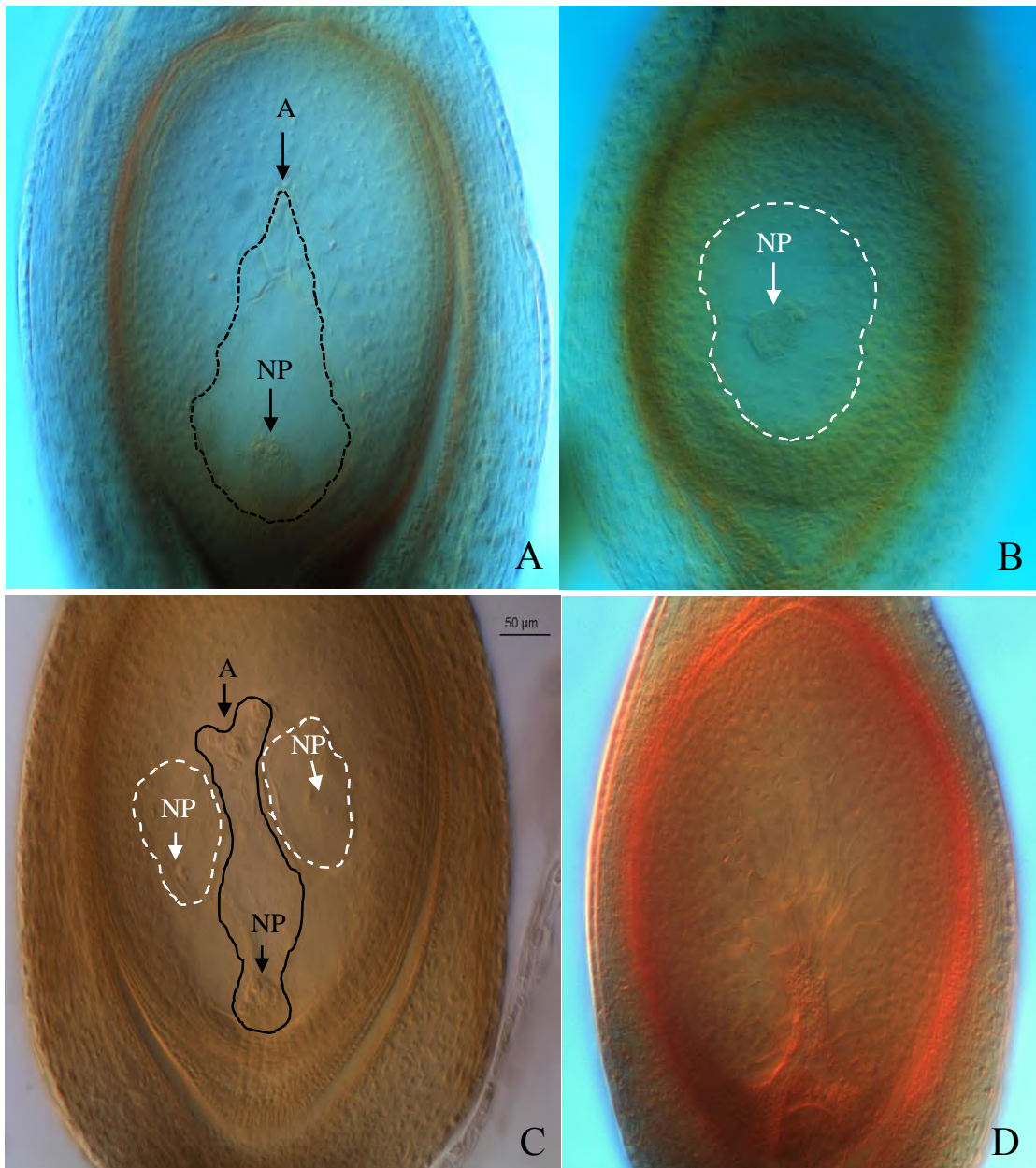


Figura 2. Análisis del sistema reproductivo de los híbridos por clarificado. Óvulos con: A) SEM, B) SEA, C) SEM+SEA, D) SEa. NP: núcleos polares, A: antípodas. La escala de la figura C es equivalente para las demás figuras.

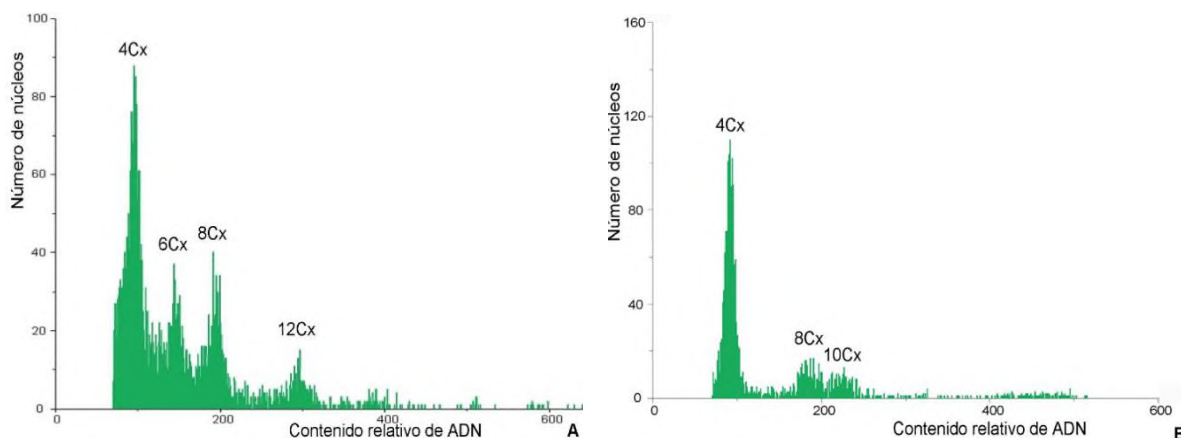


Figura 3. Análisis del modo reproductivo de los híbridos por citometría. A) Histograma de contenido de ADN de la semilla de un híbrido sexual: 4C corresponde al embrión y 6C al endospermo. B) Histograma de contenido de ADN de la semilla de un híbrido apomítico: 4C es del embrión y 10C del endospermo. Ambos histogramas mostraron picos adicionales (8C, 12C y 10C) producidos por núcleos del embrión y del endospermo en estadio G2 del ciclo celular.

En base a estos resultados concluimos que de los 24 híbridos analizados solamente 4 de ellos, pertenecientes a los cruzamientos: *P. plicatulum* 4PT \times *P. chaseanum* ST13894 #2, *P. guenoarum* Azulao #4, *P. guenoarum* GR19 #60, #116 mantuvieron la sexualidad al 100% por ambas técnicas utilizadas (Tabla 2). Sin embargo, los 20 restantes mostraron cierto grado de apomixis, de los cuales 7 individuos demostraron ser apomíticos facultativos tanto por clarificado de ovarios como por citometría de flujo (Tabla 2). En estos híbridos la expresión de la sexualidad, representada por los óvulos con sacos embrionarios meióticos varió de 47,76% a 95,54% (Tabla 2); pero a estos valores habría que sumarle el porcentaje de los óvulos con sacos embrionarios mixtos (SEM + SEA), por lo que el potencial para reproducirse de forma sexual sería mayor. Cabe destacar que solamente dos híbridos: #11 de *P. plicatulum* 4PT \times *P. guenoarum* Baio y el híbrido #3 de *P. plicatulum* Hojs388, presentaron además de SEM y mixtos, sacos exclusivamente apomíticos en una proporción de 7,27% y 7,96% respectivamente (Tabla 2). Las semillas de estos 7 híbridos cuando se evaluaron por citómetro mostraron que algunas se formaron por la vía apomítica y otras por la vía sexual. La presencia de semillas originadas por apomixis indica una caída significativa en las tasas de sexualidad observada, junto con una prevalencia y eficiencia reproductiva variable de la apomixis. La reducción de la sexualidad podría derivarse de aquellos óvulos con SEM solitario que no lograron formar una semilla viable, como así también a una mayor eficiencia de los sacos apomíticos en óvulos mixtos debido a que su menor tiempo de desarrollo constituye una clara ventaja que los beneficia cuando compiten por el espacio y los recursos dentro del óvulo. Otro motivo que explicaría esto, sólo en los híbridos que presentaron óvulos con sacos apomíticos exclusivamente, podría ser la mayor estabilidad en el desarrollo de los mismos por la falta de competencia con la vía sexual (Hojsgaard et al., 2013). Los restantes 13 híbridos presentaron discordancia entre las dos metodologías usadas, ya que 9 de ellos demostraron ser apomíticos facultativos bajo análisis embriológico debido

a que sus óvulos poseían además de sacos embrionarios meióticos exclusivos, sacos mixtos y en algunos casos, como en los híbridos de 4PT \times *P. chaseanum* ST13894, *P. lenticulare* V11893, *P. nicorae* PI508821 y *P. oteroi* A&V 1332, también óvulos con sacos apomícticos exclusivamente, aunque en muy baja proporción (Tabla 2). Sin embargo, cuando se analizaron sus semillas por citometría todas ellas presentaron histogramas con picos 2C+(3C) por lo que estos individuos se categorizaron como sexuales bajo este método. Esto indicaría que la capacidad sexual de estos híbridos aumentó notablemente de una fase de desarrollo a la otra, como consecuencia de que en aquellos óvulos con SEM + SEA y SEA la vía aposporosa no logró desarrollar una semilla con un embrión no reducido. Esto puede deberse a que como la meiosis es el modo predeterminado en los apomícticos (Koltunow et al., 2011), el éxito de la vía meiótica depende de las inestabilidades de las vías aposporosas. Lo contrario se observó al analizar los 4 restantes de estos últimos 13 híbridos, ya que cuando se evaluaron por la técnica de clarificado fueron clasificados como sexuales. Sin embargo, cuando se analizaron sus semillas por citómetro demostraron que se originaron tanto de forma sexual como por un proceso de aposporia, seguido de partenogénesis y pseudogamia, por lo que fueron clasificados como apomícticos facultativos. Esta discordancia en los resultados obtenidos puede deberse a que los análisis se llevaron a cabo en estados de desarrollo diferentes y como se ha demostrado en otras especies del género, la expresión de la sexualidad de una especie apomíctica facultativa decrece drásticamente, e incluso puede no expresarse, dependiendo si la determinación se hace por estudios citoembriológicos durante estadíos de la embriogénesis, si se hace por contenido de ADN en el embrión y el endospermo de semillas ya formadas, o si se estudian los perfiles genómicos de los integrantes de una progenie para determinar si todos, o qué proporción de ellos, tienen la misma constitución genética que la planta que los originó (Hojsgaard et al., 2013).

Como se sabe por estudios previos (Martelotto et al., 2007; Rodríguez et al., 2012), existe una estrecha relación entre apomixis y poliploidía. Luego de la poliploidización el genoma de *Paspalum* es genética y epigenéticamente modificado en regiones que codifican retrotrasposones y seudogenes lo que lleva como consecuencia a efectos moduladores de la expresión génica, lo que podría explicar la aparición de individuos apomícticos facultativos dentro de la población sintética tetraploide sexual ya que se ha visto que en *P. notatum* la duplicación por colchicina del genoma de una planta diploide sexual produce poliploides tanto sexuales como apomícticos facultativos (Quarin et al., 2001). Esto indicaría que los determinantes de la apomixis se encuentran presentes a nivel diploide, pero están silenciados. Entonces, se plantea la posibilidad de que, al menos en *Paspalum*, exista para la apomixis un mecanismo de activación dependiente de la dosis génica que involucre a otros loci que controlen la expresión del carácter mediante efectos de interacción génica.

6.2 Determinación del modo reproductivo de nuevos híbridos analizados

La determinación del sistema reproductivo de los 7 nuevos híbridos correspondientes a 6 especies y a 7 accesiones diferentes (los que no formaron parte de la población de policruzamiento) se llevó a cabo mediante las dos técnicas ya mencionadas. Se evaluaron entre 157 y 234 ovarios maduros en estudios citoembriológicos y entre 23 a 35 semillas por citometría de flujo. El análisis por ambas técnicas demostró que ninguno de los 7 individuos fueron 100% sexual ya que en todos se observó algún grado de apomixis (Tabla 3). Todos fueron clasificados como apomícticos facultativos cuando se analizaron sus ovarios por la técnica de clarificado debido a que poseían sacos embrionarios meióticos ya sea solitarios o acompañados de sacos embrionarios apospóricos. El porcentaje de SEM exclusivos varió de 60,36% a 89,81% y se debería sumarle el porcentaje de ovarios mixtos para indicar el potencial de sexualidad de los mismos. Solo 3 híbridos presentaron óvulos con sacos apomícticos exclusivos, sin embargo, en una proporción baja, e incluso menor a lo observado en los híbridos que formaron parte del policruzamiento.

Por otro lado, cuando se analizaron sus semillas por citometría se observaron diferencias entre los híbridos, 4 de ellos presentaron histogramas con picos $2C+(3C)$, como así también $2C+(5C)$ por lo que se puede afirmar que se originaron tanto por vía sexual como por apomixis. El hecho de tener semillas de origen apomíctico indica que en algunos casos los sacos apospóricos son buenos competidores, ya que la gran mayoría de estas semillas provendrían de óvulos mixtos donde las dos vías están activas. La ventaja competitiva de la aposporia se debe a que la partenogénesis permite la iniciación embrionaria precoz, cuando la polinización desencadena el desarrollo del endospermo en aquellos óvulos de especies pseudogámicas, por lo que el crecimiento del embrión asexual es mucho más avanzado que el del sexual (Hojsgaard et al., 2013). En los restantes 3 híbridos el 100% de sus semillas mostraron histogramas con picos $2C+(3C)$ por lo que fueron clasificados como sexuales. Si bien ninguno logró formar semillas por la vía apomíctica, la presencia de sacos apospóricos indicaría que hay segregación para el modo reproductivo.

Tabla 3. Determinación del modo reproductivo por la técnica de clarificado de ovarios y citometría de flujo de híbridos obtenidos de cruzamientos entre *P. plicatulum* 4PT × 6 genotipos silvestres, tetraploides apomícticos. SEM: sacos embrionarios meióticos; SEA: sacos embrionarios apospóricos; SEM+SEA: sacos embrionarios mixtos; SEa: sacos embrionarios anormales; Apo. fac.: apomícticos facultativos; Sex.: sexuales.

Cruzamientos	Tipo de sacos embrionarios					Contenido de ADN del Embrión + (endosperma)			Modo reproductivo	
	Nº de ovarios	SEM (%)	SEA (%)	SEM + SEA (%)	Sea (%)	Nº de semillas	2C+(3C) (%)	2C+(5C) (%)	Embriología	Citometría
<i>P. plicatulum</i> 4PT										
× <i>P. atratum</i> cv. Cambá #55	234	85,04	0,43	2,99	11,54	35	85,71	14,29	Apo fac	Apo fac
× <i>P. atratum</i> U44 #3	222	60,36	0,00	4,05	35,59	30	90,00	10,00	Apo fac	Apo fac
× <i>P. compressifolium</i> AK40811 #1	206	79,13	0,00	2,43	18,45	23	100	0,00	Apo fac	Sex
× <i>P. glaucescens</i> Q4337 #6	223	87,44	0,90	0,90	10,76	30	100	0,00	Apo fac	Sex
× <i>P. guenoarum</i> BO107 #3	216	89,81	0,00	0,93	9,26	30	100	0,00	Apo fac	Sex
× <i>P. lenticulare</i> BO190 #1	157	79,62	1,91	15,92	2,55	30	83,33	16,67	Apo fac	Apo fac
× <i>P. wrightii</i> Q4351 #27	218	61,93	0,00	0,46	37,61	30	90,00	10,00	Apo fac	Apo fac

6.3 Policruzamiento

Luego de haber corroborado el modo reproductivo de los 24 individuos que formaron parte de la población de policruzamiento, solamente 4 híbridos correspondientes a los cruzamientos: *P. plicatulum* 4PT \times *P. chaseanum* ST13894 #2, *P. guenoarum* Azulao #4, *P. guenoarum* GR19 #60, #116 mantuvieron la sexualidad al 100% (Tabla 2). Cabe destacar que en estos cruzamientos están involucradas únicamente tres especies (*P. plicatulum*, *P. chaseanum* y *P. guenoarum*), lo que representa una fuerte disminución de la cantidad de especies incluidas en la población de policruzamiento inicial (Novo et al., 2020) y con ella la variabilidad genética existente. Sumado a esto, la ausencia de nuevos híbridos de reproducción sexual (Tabla 3), no nos permitió poder formar un nuevo pool de plantas sexuales tetraploides y por lo tanto realizar el policruzamiento. Por lo que queda para estudios posteriores por un lado corroborar el sistema reproductivo de los 26 híbridos que no se incluyeron en este trabajo y por el otro realizar nuevos cruzamientos intra e interespecíficos usando como madre a las plantas tetraploides sexuales de *P. plicatulum* 4PT y *P. chaseanum* obtenidas mediante duplicación cromosómica (Novo et al., 2023); evaluar el sistema reproductivo de las progenies y seleccionarlos en base al vigor y fertilidad.

7. CONCLUSIONES

- Se corroboró el modo reproductivo de 24 híbridos que participaron de la población de policruzamiento, de los cuales 4 correspondientes a los cruzamientos: *P. plicatulum* 4PT \times *P. chaseanum* ST13894 #2, *P. guenoarum* Azulao #4, *P. guenoarum* GR19 #60, #116 mantuvieron la sexualidad al 100%.
- Se determinó el sistema reproductivo de 7 nuevos híbridos correspondientes a 6 especies y a 7 accesiones diferentes, los cuales ninguno demostró ser 100% sexual.
- La disminución de híbridos sexuales de la población de policruzamiento original y la ausencia de nuevos genotipos sexuales no permitió formar un nuevo pool de plantas sexuales tetraploides, cruzarlas entre ellas y de esa forma ampliar la diversidad genética existente.

8. BIBLIOGRAFÍA

Aguilera PM, Sartor ME, Galdeano F, Espinoza F & Quarin CL. 2011. Interspecific tetraploid hybrids between two forage grass species: sexual *Paspalum plicatulum* and apomictic *P. guenoarum*. Crop Sci 51:1544-1550.

Aguilera PM, Galdeano F, Quarin CL, Ortiz JPA & Espinoza F. 2015. Inheritance of aposporous apomixis in interspecific hybrids derived from sexual *Paspalum plicatulum* and apomictic *Paspalum guenoarum*. Crop Sci 55:1-10.

Bashaw EC, Hovin AW, Holt EC. 1970. Apomixis its evolutionary significance and utilization in plant breeding. In: Norman MJT Ed. Proceed11th

Burson BL & Bennett HW. 1971. Meiotic and reproductive behavior of some introduced *Paspalum* species. J Mississippi Acad Sci 17:5-8.

Carrizo JM, Novo PE, Galdeano F, Wagner AW, Quarin CL & Espinoza F. 2018. A novel sexual tetraploid plant induced from a diploid cytotype of *Paspalum chaseanum* (Poaceae). International Congress of Genetics.

Chase A. 1929. Manuscrito inédito. Hichcock & Chase Library, Smithsonian Institution Washington DC.

Espinoza F & Quarin CL. 1997. Cytoembryology of *Paspalum chaseanum* and sexual diploid biotypes of two apomictic *Paspalum* species. Aust J Bot 45:871-877.

Espinoza F, Urbani MH, Martínez EJ, Quarin CL. 2001. The breeding system of three *Paspalum* species with forage potential. Tropical Grass 35: 211-217.

Hojsgaard DH, Sartor ME, Cáceres ME & Pupilli F. 2013. Harnessing apomictic reproduction in grasses: what we have learned from *Paspalum*. Ann Bot 112:767-787.

Koltunow AN, Johnson SD, Rodrigues JCM, Okada T, Hu Y, Tsuchiya T, Wilson S, Fletcher P, Ito K, Suzuki G. 2011. Sexual reproduction is the default mode in apomictic *Hieracium* subgenus *Pilosella*, in which two dominant loci function to enable apomixis. Plant J. 66: 890-902.

Lutz SA, Novo PE, Quarin CL, Espinoza F. 2017. Híbridos interespecíficos entre *Paspalum plicatulum* y *P. glaucescens*. XLVI Congreso Argentino de Genética. IV Jornada Regional NOA.

Martelotto LG, Ortiz JPA, Stein J, Espinoza F, Quarin CL, Pessino SC. 2007. Genome rearrangements derived from autopolyploidization in *Paspalum* sp. Plant Sci 172:970-977.

Martínez EJ & Quarin CL. 1999. Citoembriología y comportamiento reproductivo de un citotipo diploide de *Paspalum hydrophyllum* y sus híbridos con *P. palustre* (Poaceae, Paniceae). Darwiniana 37:243-251

Martínez EJ, Urbani MH, Quarin CL & Ortiz JPA. 2001. Inheritance of apospory in Bahiagrass *Paspalum notatum*. Hereditas 135:19-25.

Matzk F, Meister A & Schubert I. 2000. An efficient screen for reproductive pathways using mature seeds of monocots and dicots. Plant J. 21:97-108.

Novo PE, Espinoza F & Quarin CL. 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.

Novo PE, Valls JFM, Galdeano F, Honfi AI, Espinoza F & Quarin CL. 2015. Interspecific hybrids between *Paspalum plicatulum* and *P. oteroi*: a key tool for forage breeding. *Scientia Agricola* 73: 356-362.

Novo PE. 2016. Transferencia génica desde especies tetraploides apomícticas hacia híbridos tetraploides sexuales de origen experimental en el grupo Plicatula de *Paspalum*. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Agrarias, UNNE.

Novo PE, Acuña CA, Quarin CL, Urbani MH, Marcon F, Espinoza F. 2017. Hybridization and heterosis in the Plicatula group of *Paspalum*. *Euphytica*. 213:198.

Novo PE, Galdeano F, Espinoza F, Quarin CL. 2019. Cytogenetic relationships, polyploid origin and taxonomic in *Paspalum* species: inter- and intraspecific hybrids between a sexual synthetic autotetraploid and five wild apomictic tetraploid species. *Plant Biol*. 21: 267-277.

Novo PE, Acuña CA, Urbani MH, Galdeano F, Espinoza F, Quarin CL. 2020a. Genetic transfer from several apomictic tetraploid *Paspalum* species to an elite group of sexual plants. *Crop Sci*.60:1997-2007.

Novo S. 2020b. Evaluación genética de una progenie de *Paspalum plicatulum* × *Paspalum wrightii*, dos especies del grupo Plicatula, del género *Paspalum*. Trabajo final de graduación. Facultad de Ciencias Agrarias, UNNE.

Novo PE, Carrizo JM, Villalba AI, Quarin CL, Espinoza F. 2023. A sexual highly diploidized autotetraploid plant induced from the diploid cytotype of *Paspalum chaseanum* Parodi. *Crop Sci* 63:176-185.

Ortiz, JPA, Quarin CL, Pessino SC, Acuña CA, Martínez EJ, Espinoza F, Hojsgaard DH, Sartor ME, Cáceres ME & Pupilli F. 2013. Harnessing apomictic reproduction in grasses: what we have learned from *Paspalum*. *Ann Bot* 112:767-787.

Pritchard AJ. 1970. Meiosis and embryo sac development in *Urochloa mosambicensis* and three *Paspalum* species. *Aust J Agric Res* 21:648-652.

Quarin, CL. 1992. The nature of apomixis and its origin in Panicoid grasses. *Apomixis Newsletter* 5:8-15.

Quarin CL, Pozzobon MT & Valls JFM. 1996. Cytology and reproductive behaviour of diploid tetraploid and hexaploid germplasm accessions of a wild forage grass: *Paspalum compressifolium*. *Euphytica* 90:345-349.

Quarin CL, Valls JFM & Urbani MH. 1997. Cytological and reproductive behaviour of *Paspalum atratum* a promising forage grass for the tropics. *Tropical Grassl* 31:114-116.

Quarin CL, Espinoza F, Martínez EJ, Pessino SC & Bovo OA. 2001. A rise of ploidy level induces the expression of apomixis in *Paspalum notatum*. *Sex Plant Reprod* 13:243-249.

Rodríguez MP, Cervigni GDL, Quarin CL, Ortiz JPA. 2012. Frequencies and variation in cytosine methylation patterns in diploid and tetraploid cytotypes of *Paspalum notatum*. *Biol Plantarum* 56:276-282.

Ruiz Díaz GS, Novo PE, Wagner AW, Quarin CL, Vidoz ML, Espinoza F. 2019. Hibridaciones interespecíficas mediante inducción de floración extemporánea en una planta tetraploide sexual de *Paspalum plicatulum*. XVII Congreso Latinoamericano de Genética, XLVII Congreso Argentino de Genética.

Sartor ME, Quarin CL & Espinoza F. 2009. Mode of reproduction of colchicines induced *Paspalum plicatulum* tetraploids. Crop Sci 49:1270-1276.

Saura F. 1941. Cariología de algunas especies del género *Paspalum*. Inst Genét Fac Agron Vet Univ Buenos Aires 2:41-48.

Savidan Y. 1975. Héredité de l'apomixie. Contribution à l'étude de l'héredité de l'apomixie sur *Panicum maximum* Jacq. (analyse des sacs embryonnaires). Cah ORSTOM Sér Biol 10:91-95.

Stein J, Quarin CL, Martínez EJ, Pessino SC & Ortiz JPA. 2004. Tetraploid races of *Paspalum notatum* show polysomic inheritance and preferential chromosome pairing around the apospory-controlling locus. Theor Appl Genet 109:186-191.

Valle CB do & Glenke C. 1993. Towards defining the inheritance of apomixis in *Brachiaria*. Apomixis Newsl 6:24-25.

Young BA, Sherwood RT, Bashaw EC. 1979. Cleared-pistil and thick sectioning techniques for detecting aposporous apomixis in grasses. Can. J. Bot. 57:1668-1672.