

## RELACIÓN GENÓMICA ENTRE CITOTIPOS DIPLOIDES DE *PASPALUM SIMPLEX* Y *P. PROCURRENS* (POACEAE, PANICEAE)

FRANCISCO ESPINOZA & CAMILO L. QUARÍN

*Instituto de Botánica del Nordeste, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Nordeste,  
Casilla de Correo 209, 3400 Corrientes, Argentina.*

**ABSTRACT:** Espinoza, F. & Quarín, C. L. 1998. Genomic relationship between diploid cytotypes of *Paspalum simplex* and *P. procurrens* (Poaceae, Paniceae). *Darwiniana* 36: 59-63.

Interspecific crossing was conducted between diploid cytotypes of two *Paspalum* species of the subgenus Anachyris in order to investigate their genomic relationship and to evaluate the possibilities of gene exchange between these species as a tool for their genetic improvement. *Paspalum simplex* was the female parent. The  $F_1$  hybrids showed stoloniferous growth habit which is characteristic of the male parent, *P. procurrens*. Regular meiotic behavior in the  $F_1$  hybrids demonstrated that both species have significant homology in their genomes. Embryological studies and seed production analysis under self- and cross-pollinated conditions demonstrated that the hybrids, like their parents, are sexual and self-sterile but cross-compatible. Both, the high level of crossability of the parents and the degree of fertility observed in  $F_1$  hybrids and in backcross progenies, indicated the feasibility of gene exchange between these species. Morphologically, *P. simplex* and *P. procurrens* are easily recognized as different species. Notwithstanding, the high crossability and the high level of fertility observed in hybrids and backcrossed progenies contrast with the lack of intermediate forms observed in herbaria and during field trips. Diploid cytotypes of both species seem to be restricted to western areas of the phytogeographic Chaco province, from Bolivia to Argentina. However, divergent evolution likely occurred in correlation with latitude and specific soil requirements. Diploid *P. simplex* was found in the southwestern Chaco province on clayey soil while *P. procurrens* was collected in the northwest of the province, growing on sandy soil.

**Keywords:** Interspecific hybrids, *Paspalum simplex*, *Paspalum procurrens*, Paniceae, Poaceae.

**Palabras clave:** Híbridos interespecíficos, *Paspalum simplex*, *Paspalum procurrens*, Paniceae, Poaceae.

### INTRODUCCIÓN

La mayoría de las especies del género *Paspalum* (Poaceae) son originarias de las regiones tropicales y subtropicales del Nuevo Mundo. Muchas especies presentan citotipos diploides ( $2n=20$ ), sexuales y alógamos por autoincompatibilidad, y al mismo tiempo, citotipos tetraploides ( $2n=40$ ) de reproducción apomíctica, seudógamos y autofértils (Quarín, 1992). Generalmente, los citotipos tetraploides son los más frecuentes y los de más amplia distribución en cada especie (Quarín & Lombardo, 1986; Norrmann et al., 1989). Por otra parte, la reproducción apomíctica de los citotipos tetraploides es un escollo indudable para la investigación de las relaciones filogenéticas entre diferentes especies, por lo menos a través de estudios citogenéticos.

Las especies utilizadas para este estudio pertenecen al subgénero Anachyris (Nees) A. Hitchc. del género *Paspalum*, cuyas características más destacables son: la ausencia de glumas en las

espiguillas, la presencia de nervaduras longitudinales muy notables en el dorso de la lemma fértil y la forma de la espiguilla, que es cóncava del lado de la lemma estéril y muy convexa del lado de la lemma fértil.

*Paspalum simplex* Morong ex Britton es una especie de hábito erecto y, a nivel tetraploide ( $2n=4x=40$ ), es de reproducción apomíctica, seudogama y autofértil (Caponio & Quarín, 1987). Se encuentra ampliamente distribuida por toda la provincia fitogeográfica Chaqueña (norte de Argentina, Paraguay, Bolivia y extremo oeste de Brasil). Hasta ahora sólo se conoce una población diploide ( $2n=2x=20$ ) para esta especie. La misma es sexual y sus individuos son alógamos por autoincompatibilidad. Esta población se encuentra en el este de Santiago del Estero, Argentina (Espinoza & Quarín, 1997).

*Paspalum procurrens* Quarín es una especie de hábito estolonífero y, al igual que *P. simplex*, cuenta con dos citotipos: uno diploide ( $2n=2x=20$ ), de re-

producción sexual y alógamo por autoincompatibilidad (Quarín, 1993); mientras que el citotipo tetraploide ( $2n=4x=40$ ), es apomíctico, seudógamo y autofértil (Quarín, datos inéditos). Esta especie habita en el extremo oeste de la provincia fitogeográfica Chaqueña, en el Chaco Salteño semiárido y en el sureste de Bolivia (Quarín, 1993).

El objetivo de este estudio fue realizar cruzamientos interespecíficos a nivel diploide entre *P. simplex* y *P. procurrens* con el propósito de establecer si existe alguna relación filogenética entre ellas y determinar la factibilidad de transferencia génica entre ambas especies.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron plantas diploides ( $2n=20$ ) obtenidas de semillas cosechadas en sus respectivas poblaciones naturales y cultivadas en macetas. La de *P. simplex*, Quarín 4109 (BAA, CTES, K, MO, NY, SI, US) es originaria de la Estancia Los Gatos, Departamento Otumba, Santiago del Estero, Argentina; la de *P. procurrens*, Quarín 4060 (BAA, CTES, K, MO, SI, US) proviene de la Finca Pozo Largo, 10 km Sur de Joaquín V. González, Departamento Anta, Salta, Argentina.

Los cruzamientos se realizaron dentro de una cámara de niebla artificial, eliminando las anteras en el momento de la antesis ya que, en esas condiciones, no se produce la dehiscencia de las mismas. Las espiguillas castradas de esa manera fueron luego polinizadas con polen colectado del progenitor masculino. Se usó como progenitor femenino a la especie erecta (*P. simplex*) y como masculino a la especie estolonífera (*P. procurrens*).

Para estudiar la meiosis en los microsporangios de los híbridos se fijaron las inflorescencias jóvenes en una mezcla de alcohol absoluto y ácido acético glacial en proporción 3:1 durante 24 horas; luego se conservaron en alcohol 70° a 4° C. Las anteras se aplastaron sobre un portaobjetos en una gota de carmín acético al 2 % para la observación de las células madres del polen con microscopio óptico.

La fertilidad de las plantas parentales,  $F_1$ ,  $F_2$  y retrocruzadas fue evaluada a través de la producción de semillas en condiciones de autopolinización y polinización libre. La autopolinización se realizó mediante el ensobrado de las inflorescencias con papel sulfito antes del inicio de la floración; mientras que la polinización libre ocurrió en condiciones similares a las naturales. En ambos casos las panojas fueron

cosechadas en el momento oportuno de madurez.

Para determinar el comportamiento reproductivo de plantas de las  $F_1$ ,  $F_2$  y retrocruzadas se analizó el desarrollo de sacos embrionarios siguiendo la técnica de clarificado de ovarios (Herr, 1971) y posterior observación con microscopio de contraste de interferencia diferencial (DIC). Se consideraron normales los sacos que poseían una ovocélula, dos sinérgidas, una célula central binucleada, ampliamente vacuolizada, y una masa de antípodas en el extremo calazal. Se consideró que los sacos habían abortado cuando, al momento de la antesis, el óvulo no poseía saco embrionario. A veces, al momento de la apertura de las espiguillas algunos óvulos tenían sacos inmaduros, en general pequeños, con la célula central poco vacuolizada y con pocas antípodas.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se castraron 650 espiguillas de *P. simplex* y se polinizaron con polen de *P. procurrens*. El 66% de las espiguillas formaron cariopsis. Aproximadamente el 70% de las cariopsis germinaron y sólo la mitad de las plántulas fueron transplantadas al campo.

### Características fenotípicas exomorfológicas

Alrededor de 150 plántulas instaladas en el campo fueron evaluadas fenotípicamente. El hábito de crecimiento de todas ellas indicó su origen híbrido puesto que desarrollaron estolones, carácter presente en el progenitor masculino: *P. procurrens* (Figs. 1 A y 1 B). En la Tabla 1 figuran los resultados de las observaciones de las características fenotípicas realizadas en algunos híbridos y en las especies progenitoras. Las láminas foliares de los híbridos presentaron valores de longitud y de anchura intermedias entre los de los progenitores, aunque más cercanos a *P. simplex*.

Los híbridos formaron inflorescencias que por su tamaño se asemejaban a las de *P. simplex*. Los valores promedios tanto en lo concerniente a la longitud del eje floral como al número de racimos superaron, aunque no significativamente, a los valores observados en *P. simplex*.

También fueron analizadas 40 plantas  $F_2$ , obtenidas por polinización libre de las  $F_1$ . La mayoría (37) fueron rastreras y solo 3 mostraron hábito erecto. Por otra parte, de las 60 plantas analizadas de un retrocruzamiento, 27 fueron erectas y 33 rastreras. Esto indicaría que el carácter estolonífero es dominante y muy probablemente monogénico.

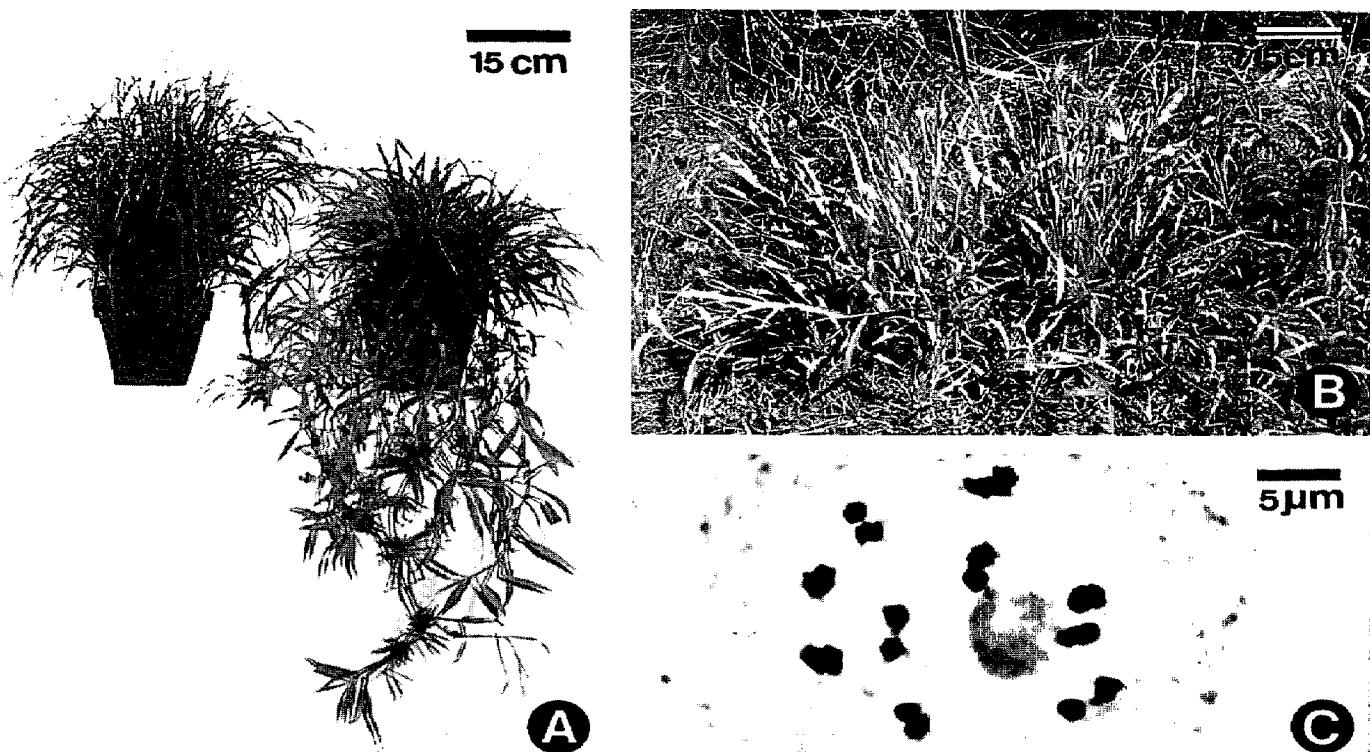


Fig. 1.- *Paspalum simplex*, *P. procurrens* y sus híbridos interespecíficos. A: planta cespitosa típica de *P. simplex* (izquierda) y planta estolonífera de *P. procurrens* (derecha). B: híbridos  $F_1$  de *P. simplex* x *P. procurrens* que muestran su hábito de crecimiento rastrero a causa de sus tallos estoloníferos. C: diacinesis de una célula meiótica de un híbrido  $F_1$  con 10 asociaciones cromosómicas bivalentes.

#### *Meiosis*

Se estudió la división meiótica en los microsporangios de los híbridos y se observó que el apareamiento y la distribución de los cromosomas fueron normales.

Se examinaron 200 células madres del polen en diacinesis y metafase I en cinco híbridos y siempre los cromosomas se asociaron formando 10 bivalentes (Fig. 1C). Esta meiosis regular de los híbridos, similar a la observada en sus progenitores (Espinoza & Quarín, 1997; Quarín, 1993), indica que ambas especies comparten genomas altamente homólogos.

#### *Fertilidad*

Los híbridos  $F_1$  produjeron abundante polen y las anteras se abrieron normalmente en el momento de la antesis.

Las observaciones realizadas con microscopía de contraste de interferencia diferencial permitieron determinar que los sacos embrionarios, en general, tuvieron un desarrollo normal en plantas de la  $F_1$ , la

$F_2$  y la retrocruza de  $F_1$  por *P. simplex* (Tabla 2). Para corroborar si esta normalidad observada tanto en la producción de polen como en el desarrollo de los sacos embrionarios se relacionaba con efectiva fertilidad, se analizó la producción de semillas en  $F_1$ ,  $F_2$  y retrocruzas (Tabla 3).

En los híbridos  $F_1$  la producción de semillas en condiciones de autopolinización fue muy baja (0.5 %); cuando la polinización fue libre, el 62 % de las espiguillas produjeron semilla. Esto demuestra, por un lado, que los híbridos son en gran medida autoincompatibles como lo son las especies progenitoras; por otro lado, el grado de fertilidad de los híbridos se debe muy probablemente a la afinidad genética de los progenitores. La producción de semillas de las plantas  $F_2$  y retrocruzas fue similar aunque algo inferior a la observada en híbridos  $F_1$ . Este hecho indica que es factible transferir genes entre estas dos especies, puesto que existe un alto grado de fertilidad en los híbridos y es posible retrocruzarlos.

Tabla 1.- Algunas características fenotípicas exomorfológicas de *P. simplex*, *P. procurrens* y de diez híbridos F<sub>1</sub> tomados al azar. Para cada carácter se consigna el valor promedio y, entre paréntesis, su rango de variación.

Carácter	<i>P. simplex</i> (Q-4109) progenitor femenino	<i>P. procurrens</i> (Q-4060) progenitor masculino	Híbridos F <sub>1</sub>
Tipo de tallo	erecto	con estolones	con estolones
Anchura de lámina foliar (cm) <sup>a</sup>	1,05 (0,7-1,6)	1,8 (1,3-2,4)	1,3 (1-1,6)
Longitud de lámina foliar (cm) <sup>a</sup>	31 (27-37)	17 (10-23)	26,5 (21-31)
Nro. de racimos por inflorescencias	21 (13-32)	14 (13-16)	23 (14-38)
Longitud de la inflorescencia (cm)	17 (12-25)	11 (7,5-13)	17,3 (14-21)

<sup>a</sup> Se midieron láminas de hojas ubicadas en la mitad inferior de la caña.

Tabla 2.- Análisis de sacos embrionarios mediante la observación de óvulos maduros con microscopía DIC en algunas plantas F<sub>1</sub> híbridas *P. simplex* × *P. procurrens*, F<sub>2</sub> y de retrocruzas por *P. simplex*.

Cruzamientos	Nro. de ovarios observados	Porcentaje de sacos embrionarios		
		normales	abortados	inmaduros
F <sub>1</sub>	106	98,6	10,4	-
F <sub>2</sub>	123	78,0	12,2	9,8
Retrocruza	130	83,1	14,6	2,3

Tabla 3.- Fertilidad de los híbridos *P. simplex* (Q-4109) × *P. procurrens* (Q-4060). Porcentaje de flores que formaron semillas en F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> y retrocruzas por *P. simplex* en diferentes condiciones de polinización y en comparación con los progenitores.

Cruzamientos	Producción de semillas (en porcentaje)	
	Autopolinización	Polinización libre
<i>P. simplex</i> <sup>a</sup>	0,6	72,5
<i>P. procurrens</i> <sup>b</sup>	< 0,25	≈ 50
F <sub>1</sub> <sup>c</sup>	0,5	62
F <sub>2</sub> <sup>c</sup>	0,1	43
Retrocruza <sup>c</sup>	0,5	58

<sup>a</sup> Espinoza & Quarín, 1997

<sup>b</sup> Quarín, 1993

<sup>c</sup> Promedio de cinco plantas

## CONCLUSIONES

El normal apareamiento y distribución cromosómica durante la meiosis de los híbridos interespecíficos *P. simplex* x *P. procurrens* indica que ambas especies tienen genomas con elevada homología. El buen nivel de fertilidad de los híbridos en la primera y segunda generación y también en retrocruzadas indica que la introgresión es totalmente factible. Sorprende el hecho que estas dos especies, que a nivel diploide son sexuales y alógamas, hayan logrado mantener caminos evolutivos separados. Ciertamente, debe existir una barrera a la introgresión. Esa barrera, a nivel tetraploide podría estar relacionada con el sistema reproductivo. En efecto, el citotipo tetraploide de *P. simplex* es apomíctico (Caponio & Quarín, 1987); lo mismo que las plantas tetraploidoides de *P. procurrens* que se conocen (Quarín, datos inéditos). Ambas especies son nativas de la provincia fitogeográfica Chaqueña donde *P. simplex* tiene una amplia distribución mientras que *P. procurrens* parece estar restringido al Chaco Salteño semiárido y sureste de Bolivia.

Sin embargo, la única población diploide de *P. simplex* que se conoce (utilizada en este trabajo) es del este de Santiago del Estero, a más de 400 km al sureste de las poblaciones diploides de *P. procurrens* nativas del sureste de Salta.

Es posible que el aislamiento sea ecológico y esté dado por requerimientos edáficos diferentes. De hecho, *P. procurrens* es originario de los albardones arenosos de los afluentes de los ríos Bermejo y Pilcomayo, mientras que *P. simplex* diploide fue encontrado en suelos arcillosos de abras y desmontes en quebrachales del este santiagueño.

*Paspalum simplex* y *P. procurrens* son las dos únicas especies del subgénero Anachyris para las cuales se conocen citotipos diploides sexuales. El área de origen de estos citotipos diploides sería el

extremo oeste, semiárido, de la provincia fitogeográfica Chaqueña. Ambos citotipos deben haber participado en el origen y evolución del subgénero Anachyris, cuyas especies se distribuyen por toda América, desde México hasta el norte y centro de Argentina.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado en la Cátedra de Genética y Fitotecnia de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Nordeste (UNNE) y fue subsidiado por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y por la Secretaría General de Ciencia y Técnica de la UNNE.

## BIBLIOGRAFÍA

- Caponio, I. & Quarín C. L. 1987. El sistema genético de *Paspalum simplex* y de un híbrido interespecífico con *P. dilatatum*. *Kurtziana* 19: 35-45.  
Espinosa, F. & Quarín C. L. 1997. Cytoembryology of *Paspalum chaseanum* and sexual diploid biotypes of two apomictic *Paspalum* species. *Austral. J. Bot.* 45: 871-977.  
Herr, J. M. 1971. A new clearing squash technique for the study of ovule development in angiosperms. *Amer. J. Bot.* 58: 785-790.  
Norrmann, G. A., Quarín C. L. & Burson B. L. 1989. Cytogenetics and reproductive behavior of different chromosome races in six *Paspalum* species. *J. Heredity* 80: 24-28.  
Quarín C. L. 1992. The nature of apomixis and its origin in Panicoide grasses. *Apomixis Newslett.* 5: 8-15.  
—. 1993. Morfología, citología y sistema reproductivo de una nueva especie de gramínea: *Paspalum procurrens*. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 29: 73-76.  
— & Lombardo E. P. 1986. Niveles de ploidía y distribución geográfica de *Paspalum quadrifarium* (Gramineae). *Mendelianae* 7: 101-107.

Original recibido el 20 de julio de 1998; aceptado el 25 de septiembre de 1998.