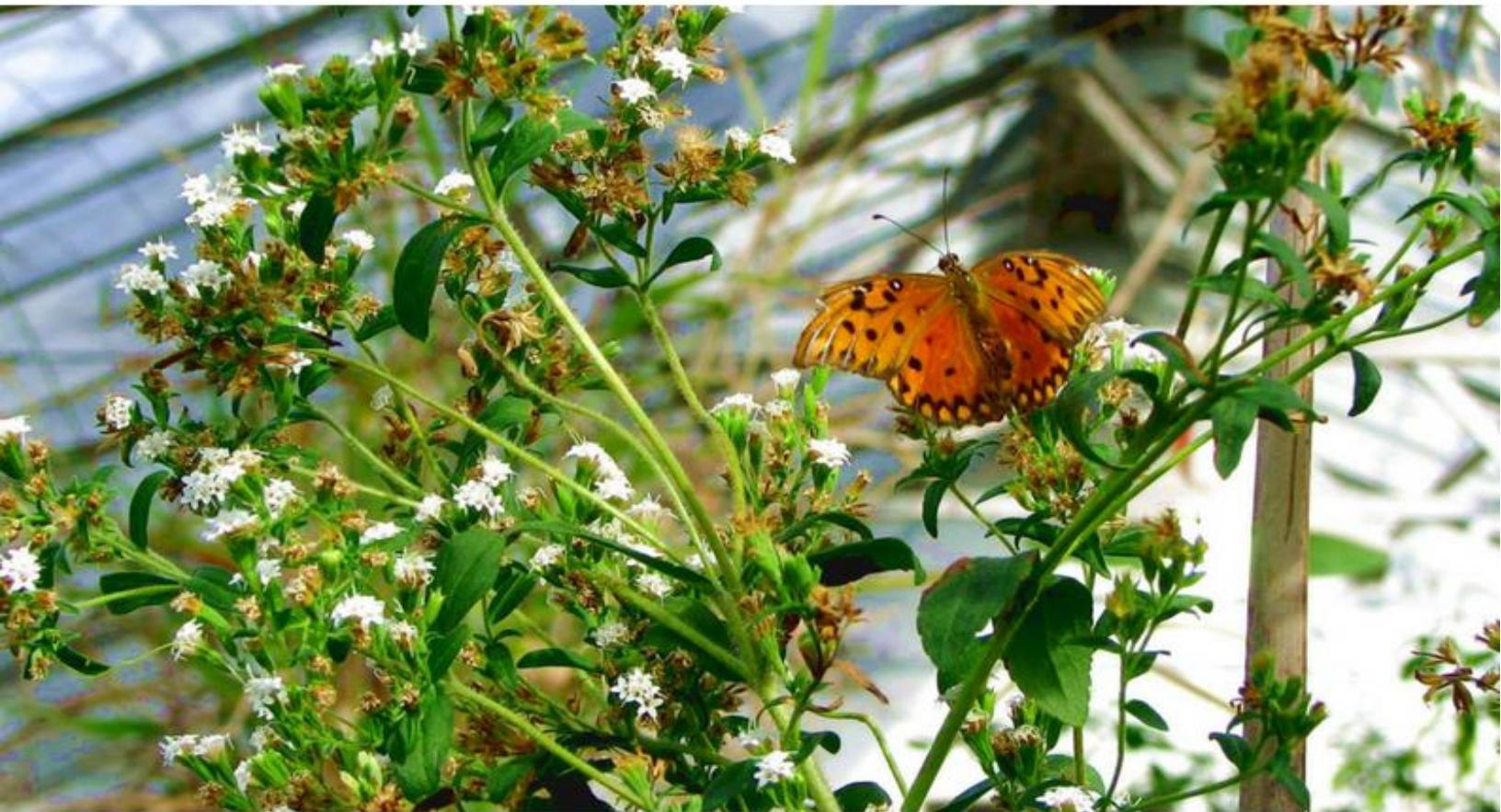




Universidad Nacional del Nordeste

“Androesterilidad generada por apoptosis en *Stevia Cav*”



Resolución N° 9.538-C.D.
Facultad de Ciencias Agrarias
2018

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar a la Secretaría general de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional del Nordeste, ya que este trabajo de investigación es resultado de una beca de pregrado otorgada en los años 2015 y 2016. A las autoridades de la Facultad de Ciencias Agrarias por permitirme realizar este trabajo. Además, un reconocimiento muy especial a mi director de beca Guillermo Norrmann y mi directora de tesis Irene Caponio que confiaron en mí a pesar de ser una reciente joven universitaria. A Mapy Hidalgo por utilizar su tiempo en sentarse conmigo y a mi jurado evaluador por su valioso aporte.

Por último quiero dedicar este trabajo a una excelente profesional, investigadora, docente, Mi Mamá que a pesar de estar involucrada en otra ciencia me guió siempre para poder dar todo de mí. También a mi Papá que creó esta vocación en mí por la agronomía y pude cumplir con ese objetivo. En fin, a todos los que pusieron un granito de arena o apoyaron en este recorrido de vida, GRACIAS.

ÍNDICE

RESUMEN	4
INTRODUCCIÓN.....	5
OBJETIVOS	9
Objetivo general:.....	9
Objetivos particulares:	9
MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
<i>Cruzamientos</i>	10
RESULTADOS	13
<i>Características citológicas de las anteras en los citotipos fértiles y estériles:</i>	14
<i>Descendencia obtenida:</i>	22
DISCUSIÓN	23
CONCLUSIONES.....	26
BIBLIOGRAFÍA	27

RESUMEN

La androesterilidad es la incapacidad de una planta para producir polen, polen fértiles o bien, en la diseminación del mismo. Esta característica es frecuente en plantas autógamas y alógamas, como resultado de mutaciones en los loci que rigen la formación y/o el desarrollo de los granos de polen y las anteras. En una población de 20 plantas de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni de diferentes orígenes, se encontró un individuo androestéril. A través de estudios histoanatómicos del desarrollo de las anteras, cruzamientos entre citotipos fértiles y estériles y análisis de la descendencia se observaron, los cambios citológicos que suceden durante la maduración de los tejidos, observándose principalmente anomalías en el tapete y tejido esporógeno. En *S. rebaudiana* las células del tapete presentan un desarrollo anormal desde el inicio de la división meiótica hasta la formación de tétrades, adquiriendo un mayor volumen y ocupando gran parte del lóculo observándose posteriormente, la degradación completa del tejido esporógeno. Estos cambios coinciden con los descriptos para *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Makaroff, C. A. y Owen, H. A. 1995) y *Helianthus annuu* L. donde la apoptosis del tapete (muerte celular programada) está relacionado a cambios en los perfiles de expresión génica asociadas a una disfunción mitocondrial. Se comprobó que la androesterilidad en este ejemplar de *S. rebaudiana*, es debida a una combinación de genes citoplasmáticos y nucleares. La frecuencia de descendientes fértiles y estériles indicaría la presencia de genes restauradores de la fertilidad.

INTRODUCCIÓN

Stevia Cav. es un género americano de la familia Asteraceae, subfamilia Asteroideae, tribu *Eupatorieae*. Esta familia es reconocida por ocupar el primer lugar en cuanto al número de especies, seguida por las Poaceae y las Fabaceae (Zuloaga et al., 2008). La provincia de Corrientes, ocupa el tercer lugar en cuanto a número de especies nativas de Asteráceas, (Katinas et al., 2007) seguido por Misiones, Jujuy y Salta (Freire et al., 2006).

Existen aproximadamente 230 especies diferentes de *Stevia*. Mientras que en Sudamérica habitan solo 40 especies silvestres, en Argentina están presentes aproximadamente 30 de ellas (Cabrera, 1978). Sólo *S. rebaudiana* (Bert) Bertoni y *S. phlebophylla* A. Gray presentan principios edulcorantes e interés agronómico.

Stevia rebaudiana, conocida vulgarmente como “Ka’á He’e” o “yerba dulce”, crece naturalmente sólo en el NE de Paraguay, especialmente en la Sierra de Amambay, y en el sur de Brasil en el estado de Mato Grosso do Sul (Cabrera et al., 1996); habita en diferentes tipos de suelos, prefiriendo los levemente ácidos, arcillo-arenosos, húmedos (Yadav et al., 2010).

A través de estudios citoembriológicos, Caponio et al. (2016) aseguran que *S. rebaudiana* posee un sistema de reproducción sexual con presencia de un sistema génico de autoincompatibilidad, siendo una planta alógama.

Morfológicamente, *S. rebaudiana* está formada por una inflorescencia compuesta por aproximadamente 190 capítulos, cada uno con 5 flores con diferentes estadios de desarrollo. La antesis no se produce en forma simultánea sino secuencialmente en dos o tres días.

El androceo está compuesto por cinco anteras insertas en el tubo de la corola, soldadas entre sí por sus bordes rodeando al estilo (androceo sinantéreo). Cada antera con dos tecas alargadas de dehiscencia introrsa longitudinal formando un tubo (Caponio et al., 2016). El gineceo es ínfero y se encuentra soldado al receptáculo (Cabrera, 1978).

Las especies de *Stevia*, por presentar muchas variables en sus caracteres y al ser una planta alógama, su comportamiento y estabilidad fenotípica son heterogéneas pudiendo resultar difícil diferenciar unas de otras, incluso dentro de un mismo individuo. El ambiente, parecería

influir mayormente en el tamaño y forma de las hojas, relación hoja/tallo así como, en la pubescencia, color de las flores y estructura del papus (Cabrera, 1978; Jarma Orozco et al. 2011; Garcia et al. 2017).

Jie y Mu Chuan (1989), estudiaron la ultraestructura y función de los tejidos de la antera en *Stevia rebaudiana*, estableciendo que en estado de tétrades, las células tapetales adquieren su mayor grado de desarrollo. Estos autores describen, que el tapete periplasmoidal posee una ultraestructura organizada, funcional y diferentes materiales son acumulados en él. Establecen, que en etapas tempranas el tapete posee una intensa actividad, pero una vez que los materiales del plasmodio son absorbidos por las micrósporas, el tapete sufre una reorganización y las células del endotecio continuarán con la nutrición del polen.

La esterilidad masculina (MS) o androesterilidad (AS), que se observa tanto en plantas autógamas como alógamas, generalmente es definida como la condición que va desde, la falta de polen viable o fértil, hasta la completa ausencia de estambres o indehiscencia de las anteras (Gabelman, 1956; Frankel & Galun, 1977). En ciertas ocasiones, estas pueden ser también producidas por condiciones abióticas que causan stress manifestando hipertrofia de los tejidos (Gothandam et al., 2007; Dolferus et al. 2011).

Por lo general, ciertas mutaciones en cualquiera de los múltiples loci que rigen las diferentes etapas del desarrollo y formación de polen hasta la dehiscencia pueden producir anomalías en los granos de polen, en su viabilidad y hasta causar androesterilidad.

Según Elliott (1964) y Kaul (1988), los patrones de herencia de esterilidad masculina pueden ser debidos a: i) esterilidad génica masculina (GMS) controlada por genes nucleares; ii) esterilidad masculina citoplasmática (CMS) o iii) por un efecto combinado de genes nucleares y citoplasma estéril. Si se debe a genes nucleares (GMS), la regulación genética puede ser monogénica recesiva como sucede en *Lactuca sativa* L. (Hayashi, 2011), pero también podría estar controlada por genes dominantes o por interacción de alelos. En el caso de genes citoplasmáticos (CMS), la característica esencial es la transmisión de forma continua de generación en generación, siempre que se disponga de un individuo que actúe como polinizador. Como el citoplasma de la descendencia es casi

exclusivamente materno, la descendencia de las plantas androestériles siempre serán androestériles. Pero cuando la androesterilidad es debida a la combinación de genes nucleares nucleares y citoplasmáticos, la descendencia no necesariamente es estéril, porque depende específicamente del genotipo de la planta utilizada como padre al momento del cruzamiento con la planta madre androestéril.

La CMS ha sido descripta en más de 150 especies en combinación con genes asociados a genes restauradores de la fertilidad (Kaul, 1988), los que son utilizados en mejoramiento de cultivos y producción de semillas híbridas F1. En plantas con CMS, el desarrollo de las anteras puede verse seriamente afectado como en los mutantes de *Nicotiana tabacum* L. (Kaul, 2012) y en especies del género *Brassica* (Makarof, 1995). El desarrollo de las anteras es normal y la microsporogénesis se detiene durante o poco después de la meiosis. En general, el tapete sufre degradación celular durante la meiosis, seguido poco después por la muerte de la micróspora inmadura (Kaul, 1988), ya que el tejido tapetal es esencial para la provisión de nutrientes, proteínas, lípidos y polisacáridos necesarias para el desarrollo de los granos de polen.

Balk y Leaver (2001), han demostrado que en *Helianthus annuus* L. existen genotipos CMS debido a la muerte celular programada o apoptosis (PCD), asociados a componentes mitocondriales que regulan la liberación de citocromo C durante el desarrollo de la antera.

La muerte celular programada es un proceso celular fisiológico involucrado en la eliminación selectiva de células; se produce durante el desarrollo y se puede definir como la muerte celular resultante de la activación de una vía bioquímica específica que está bajo el control de la célula, y por lo tanto es un proceso de apoptosis. Este proceso de deterioro está regulado por múltiples genes involucrados en diferentes etapas del desarrollo del tapete, lo que está ampliamente estudiado por Parish & Li (2010) en *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.

Stevia rebaudiana se propaga naturalmente por aquenios pero también, se utilizan técnicas alternativas, sencillas y económicas, que permiten la propagación masiva de genotipos selectos, como son los esquejes o acodos (Cueva Chávez, 2016). De este modo, el contar con un ejemplar androestéril (AS) es de gran utilidad y una interesante posibilidad para desarrollar planes de mejoramiento genético, proporcionando así un medio eficaz para

simplificar la formación de híbridos a través de cruzamientos intra o interespecíficos, como así también para la mejora de caracteres deseables, resistencias e incrementar el rendimiento agrícola-industrial.

En la actualidad, la producción de *S. rebaudiana* es una excelente alternativa como edulcorante, ya que puede endulzar hasta 300 veces más que el azúcar de caña, sin generar efectos secundarios ni liberar calorías al ser consumido.

La expansión de la tendencia naturalista y orgánica de los hábitos alimentarios de los últimos años, ayudó al consumo por parte de la población y por ende al aumento de la producción y competitividad del mercado. Su producción resalta sustancialmente por sus propiedades medicinales y culinarias para las industrias alimenticias, cosméticas y farmacéuticas. En consecuencia, se sitúa entre los rubros alternativos de mayor rentabilidad por superficie cultivada.

En la Argentina, el cultivo ocupa entre 300 y 400 hectáreas de superficie. La provincia de Misiones concentra alrededor del 70% de los cultivos de *Stevia*, perteneciendo la mayor parte a la Cooperativa Tabacalera de Misiones y el resto se encuentra distribuido en las provincias de Buenos Aires, Entre Ríos, Corrientes y Jujuy. Sólo el 10 % de la superficie total cultivada está bajo riego.

El rendimiento promedio de hojas secas por año, es de 1.500 kilogramos por hectárea pudiendo obtenerse, bajo condiciones de riego, entre 3.000 a 5.000 kilogramos por hectárea por año (Panza, 2016).

Cabe aclarar que este trabajo tiene el propósito de generar un importante aporte al conocimiento, en relación a la androesterilidad de *S. rebaudiana*.

OBJETIVOS

Objetivo general:

- Analizar y establecer las causas del carácter de androesterilidad en este citotipo de *Stevia rebaudiana*.

Objetivos particulares:

- Definir y comparar a partir de cortes histológicos las causas probables de androesterilidad en este ejemplar.
- Establecer a través de cruzamientos interespecíficos entre AS (androestéril) x F (líneas fértiles) para obtención de híbridos y posterior análisis de las progenies para establecer si el carácter es heredable.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se trabajó con una colección viva de *Stevia rebaudiana* perteneciente a la cátedra de Genética y Mejoramiento Genético, de la Facultad de Ciencias Agrarias de la UNNE.

La muestra estuvo integrada por una planta androestéril y plantas normales.

Aproximadamente 120 capítulos fueron fijados en una solución de FAA (etanol 70 %, ácido acético glacial y formaldehído 40%: 9: 5: 5 durante 24 horas, posteriormente el material se conservó en alcohol 70% a 4° C, hasta el momento del disecado. Estas fijaciones se realizaron durante primavera-verano y en otoño de la campaña 2015-2016.

Luego se procedió al disecado de las anteras en diferentes estadios de desarrollo clasificándolas en: E₁ (célula madre de las micrósporas), E₂ (división meiótica), E₃ (granos de polen joven), E₄ (granos de polen maduro).

Posteriormente este material se deshidrató en una serie de alcohol butírico terciario y se embebieron en parafina para seccionarlos en micrótomo a un espesor de 12 micras. Seguidamente se realizó la tinción con safranina-fast green (Johansen, 1940).

Los preparados fueron observados y fotografiados mediante el uso de un microscopio de Leica DM2500 y Leica 500 provisto de cámara digital.

Cruzamientos

Para obtener la descendencia, se realizaron cruzamientos controlados considerando la fenología descripta por Caponio et al. (2016). Se procedió a utilizar la planta androestéril como madre y genotipos fértiles, como proveedores de granos de polen.

Los capítulos polinizados se mantuvieron aislados, ensobrados con tul para evitar la contaminación y se los protegió en una cámara hasta el momento de la madurez de los aquenios.

Se procedió a la cosecha de 130 aquenios desarrollados y se sembraron el 21 de octubre de 2015.

La siembra de los aquenios se realizó al voleo y superficial en una bandeja de 40 cm x 20 cm sin separaciones. Para favorecer la germinación, se utilizó un sustrato comercial esterilizado y humedad constante, ya que *S. rebaudiana*, al ser originaria de una zona semi-húmeda posee una resistencia baja a la sequía. La temperatura óptima de germinación es de 20°C y el pH debe oscilar entre 5.5 y 7.5 por lo que se recurrió a la medición constante de ambos parámetros.

Stevia rebaudiana es poco exigente en nutrientes y con tan solo la utilización del sustrato se obtuvo el primer brote a la semana de la siembra.

La bandeja se colocó bajo media sombra al 65% para evitar la luz directa y protegerla de los daños que puede ocasionar la insolación.

En el mes de noviembre de ese año, las plantas habían producido aproximadamente 6 hojas y una altura de 7 cm, las cuales se trasplantaron a macetas y se mantuvieron en condiciones controladas de humedad y temperatura dentro del invernáculo (Fig. 1).



Fig. 1. Trasplante a macetas de los ejemplares de *Stevia* obtenidos en los cruzamientos.

En todos los casos fue necesario realizar controles preventivos con fungicida Mancozeb (etileno bis ditiocarbamato de manganeso coordinado con iones de zinc) con una concentración de 80 gr cada 100 gr de producto formulado para evitar la presencia de *Phytophthora*, *Rhizoctonia* y *Oidium* sp. La aplicación se realizó con una pulverizadora manual y la dosis fue de 100g / 100L de agua.

Las plantas obtenidas a través de los cruzamientos se estudiaron entre los meses de septiembre – abril, coincidiendo con la temporada de floración de las mismas dentro del invernáculo (Fig. 2 y 3).



Fig. 2. Ejemplar AS x AF N° 6.
Etapa de pre-anthesis.



Fig. 3. Ejemplar AS x AF N° 5.
Etapa de flor abierta.

Se tomaron muestras de las anteras de pimpollos florales de cada planta, el día anterior de la antesis. Utilizando los métodos indirectos de coloración con carmín glicerina (Marks, 1954) se determinó la presencia o ausencia de granos de polen.

RESULTADOS

En *S. rebaudiana* se observó que cada capítulo presenta 5 flores, con pequeñas diferencias temporales en el desarrollo (Caponio et al. 2016); el androceo esta compuesto por cinco anteras soldadas entre sí por sus bordes formando un tubo alrededor del estilo y cinco filamentos libres (androceo sinantéreo) las anteras son tetrasporangiadas con dehiscencia longitudinal introrsa (Cabrera, 1978).

Al momento de la antesis se observó, que las anteras del citotipo fértil poseían granos de polen maduro (Fig. 4), en cambio, las anteras del citotipo androestéril estaban completamente vacias, sin granos de polen maduro en su interior (Fig. 5).



Fig. 4. Anteras con presencia de granos de polen maduro.



Fig. 5. Anteras con ausencia total de granos de polen.

El ejemplar androestéril, en condiciones controladas de invernáculo en las temporadas de floración 2015-2016 nunca se observó granos de polen en las anteras, mientras que las anteras de los citotipos fériles producían granos de polen (Fig. 4 y 5).

Características citológicas de las anteras en los citotipos fértiles y estériles:

En el estadío E₁ (célula madre de las micrósporas) se observaron detalladamente cada capa de la pared anteral, epidermis, endotecio, capa media y tapete (Fig. 6). No se encontraron diferencias entre el citotipo fértil y el citotipo estéril.

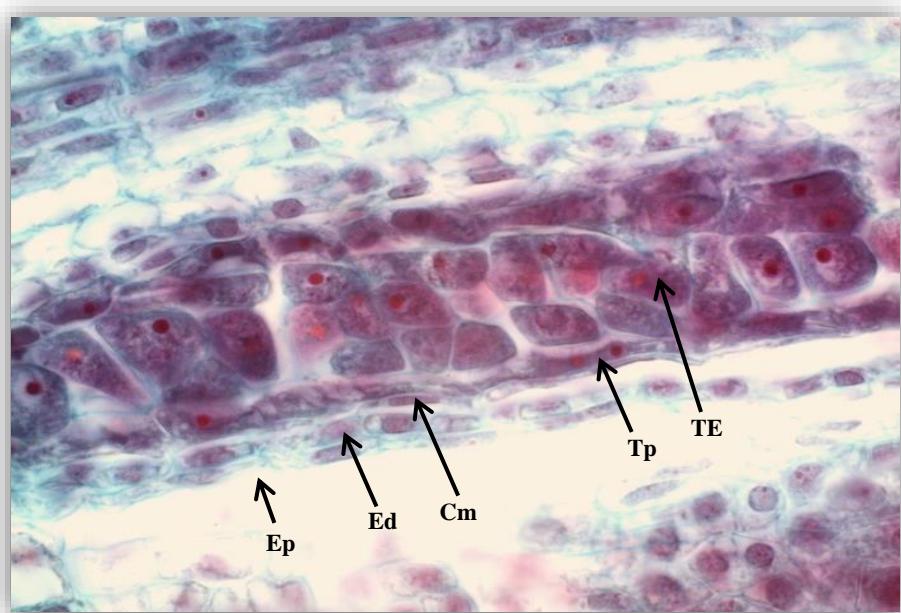


Fig. 6. Detalle de corte longitudinal de las capas de una antera fértil en el estadio E₁. **Ep** (epidermis), **Ed** (endotecio), **Cm** (capa media), **Tp** (células del tapete) y **TE** (tejido esporógeno).

En el estadío E₂ (división meiótica) se observó que en el citotipo fértil, las células de la epidermis que recubren completamente la antera, comienzan a producir un adelgazamiento de sus paredes. Esta disminución de la contextura de la pared, es normal en el desarrollo de las anteras en la mayoría de los vegetales. También se observó que las células del endotecio con paredes desigualmente engrosadas, comenzaron a aumentar de tamaño y a engrosar sus paredes a medida que las anteras iban madurando.

La capa media, es una capa de células parenquimáticas muy delgadas, que en las plantas fértiles se las observaron como células comprimidas.

En ambos citotipos, el tapete rodea a las células madres del polen (microsporocitos), es de tipo periplasmoidal o ameboidal invasivo y las células del tapete son binucleadas al

comienzo de las divisiones meióticas. A medida que avanzaba este proceso, el tapete presentaba células con citoplasma intensamente coloreado y polinucleados.

En el citotipo estéril durante el estadío E₂, se observó diferencias en las células del tapete. Se observó un adelgazamiento de las paredes de las células epidérmicas, en cambio, las células del endotecio mostraron un engrosamiento norotio e irregular de sus paredes. Las células de la capa media poco perceptible, extremadamente comprimidas.

Al comienzo del E₂, se observó que las células del tapete aumentaron su tamaño vaculizándose, presentando un citoplasma densamente coloreado y sus paredes diferenciadas. Aparentemente en este estadío se detiene la división meiótica mientras que el tapete continua su desarrollo llegando a ocupar la mayor parte del lóculo (Fig: 7 E). Se observaron células en distinto grado de división y meiocitos en la región central del lóculo (Fig. 7 B, C y D).

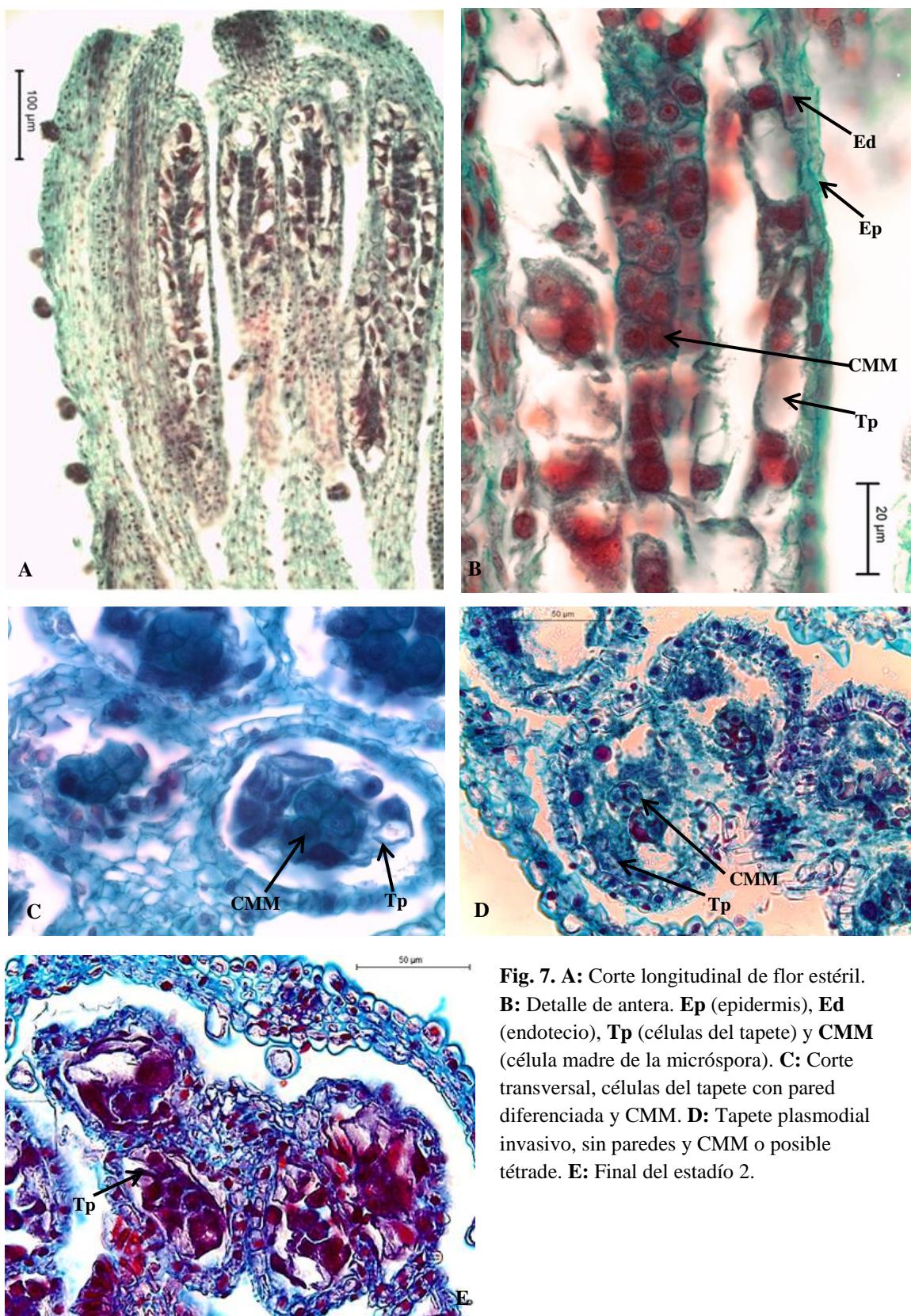


Fig. 7. A: Corte longitudinal de flor estéril.
B: Detalle de antera. **Ep** (epidermis), **Ed** (endotecio), **Tp** (células del tapete) y **CMM** (célula madre de la micróspora). C: Corte transversal, células del tapete con pared diferenciada y **CMM**. D: Tapete plasmodial invasivo, sin paredes y **CMM** o posible tétrade. E: Final del estadío 2.

En el citotipo fétil durante el estadío E₃ (granos de polen jóvenes), se observó que las células epidérmicas mantienen sus paredes delgadas hasta finalizar este estadío (Fig. 8 B).

Las células endodérmicas continuaron con el engrosamiento de sus paredes hasta observarse los granos de polen inmaduros (Fig: 8 A, B y C).

Se observó que las células de la capa media desaparecieron completamente al comienzo de esta etapa (Fig: 8 A).

Al comienzo del estadío E₃, las paredes de las células del tapete se encontraron diferenciadas y rodeando a las micrósporas (Fig: 8 A). A medida que avanza el proceso de desarrollo del grano de polen, se fragmentan las paredes de las células tapetales (Fig: 8 B) y los protoplastos sobresalen en el lóculo fusionándose para formar un periplasmodio cenocítico (Fig: 8 C).

Cuando las micrósporas desarrollaron la exina, se observó el citoplasma del tapete periplasmoidal menos condensado y al finalizar el estadío, sus restos fueron depositados en los granos de polen. En la parte central de la antera, se observaron granos de polen jóvenes. (Fig: 8 B, C y D)

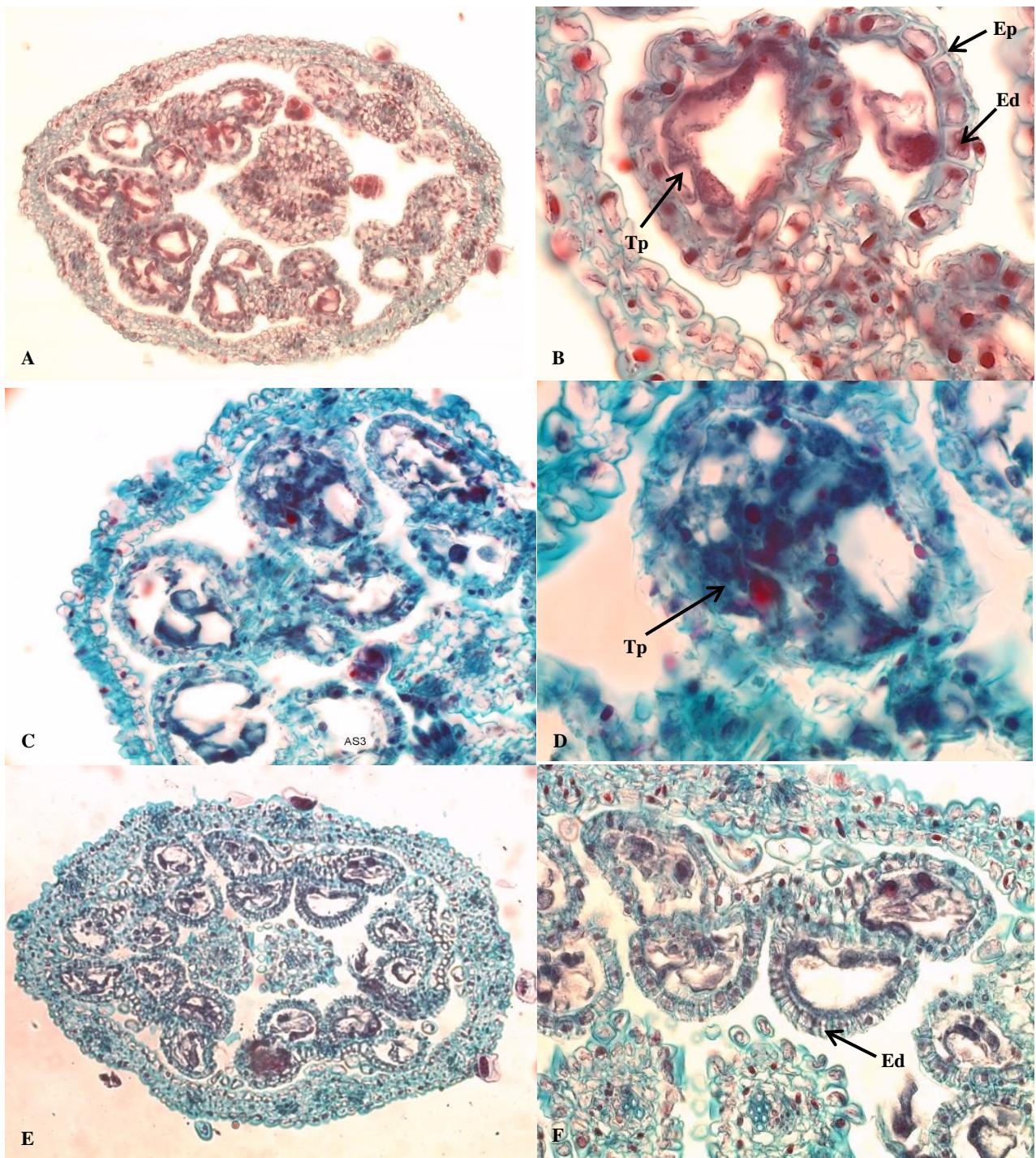


Fig 9: Secuencia de maduración de las anteras del citotipo estéril en el estadio 3. **A:** Corte transversal de la flor. **B:** Detalle de una antera **Ep** (Epidermis), **Ed** (Endodermis) y **Tp** (Tapete periplasmoidal). **C:** Corte transversal de flor estéril. **D:** Detalle de la antera con tapete periplasmoidal multinucleado. **E:** Corte transversal de flor estéril. **F:** Detalle de antera, endotecio engrosado.

En el citotipo fétil durante el estadío E₄ (grano de polen maduro con exina desarrollada al momento de la antesis), se observaron células epidérmicas totalmente adelgazadas. El endotecio presentó un considerable engrosamiento, que luego por la fisiología de sus paredes produjo la apertura de la antera, originando el estomio. No se observaron células de la capa media ni de tejido del tapete periplasmoidal. En el centro de las tecas se observaron granos de polen maduros que coincidieron con la descripción realizada por Caponio et al. (2016).

Los granos de polen de *S. rebaudiana* son 3-colporados, isopolares y radiosimétricos; esferoidales, pequeños, de 15-20 µm de diámetro con endoaperturas pequeñas y lalongadas (alargadas en sentido transversal). Poseen una exina de 1,5 µm de espesor, micro-equinada con espinas menores. Los granos se mantienen unidos formando másulas grumosas y adhesivas al momento de la antesis.

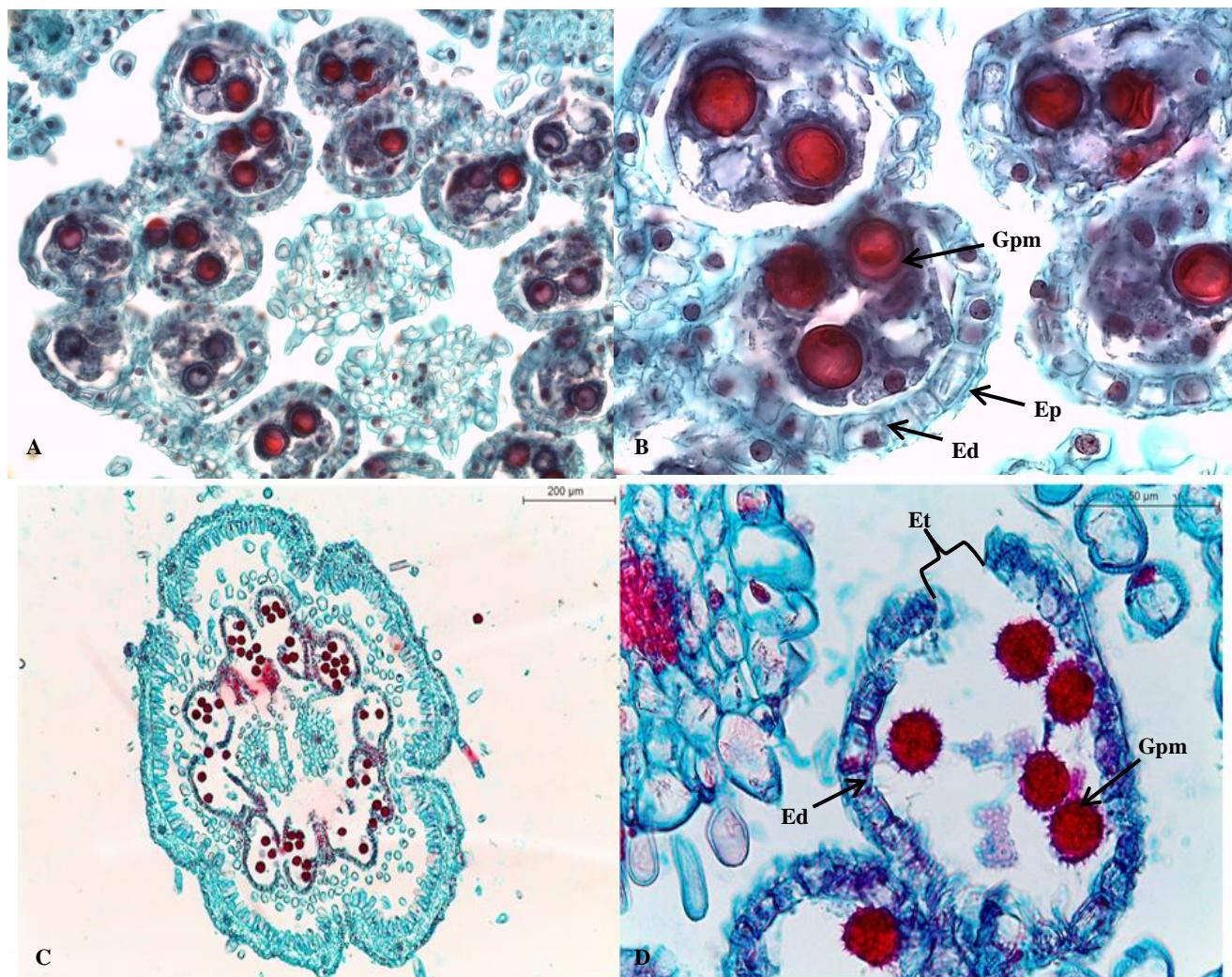


Fig. 10. A: Corte transversal de flor fértil en estado de grano de polen maduro con exina bien desarrollada. B: Detalle de antera, Ep (Epidermis) Ed (endotecio), Gpm (grano de polen tricolporado, isopolares y radiosimetricos) y Et (estomio).

En el citotipo estéril en el estadío E₄, las anteras presentaron una capa de células epidérmicas muy delgadas. La pared del endotecio continuó engrosándose. Se observó el contenido del tapete periplasmoidal en el lóculo de la antera muy condensado, densamente coloreado, amorfo, aplastado y comprimido entre las paredes de la antera. (Fig. 13. A y B).

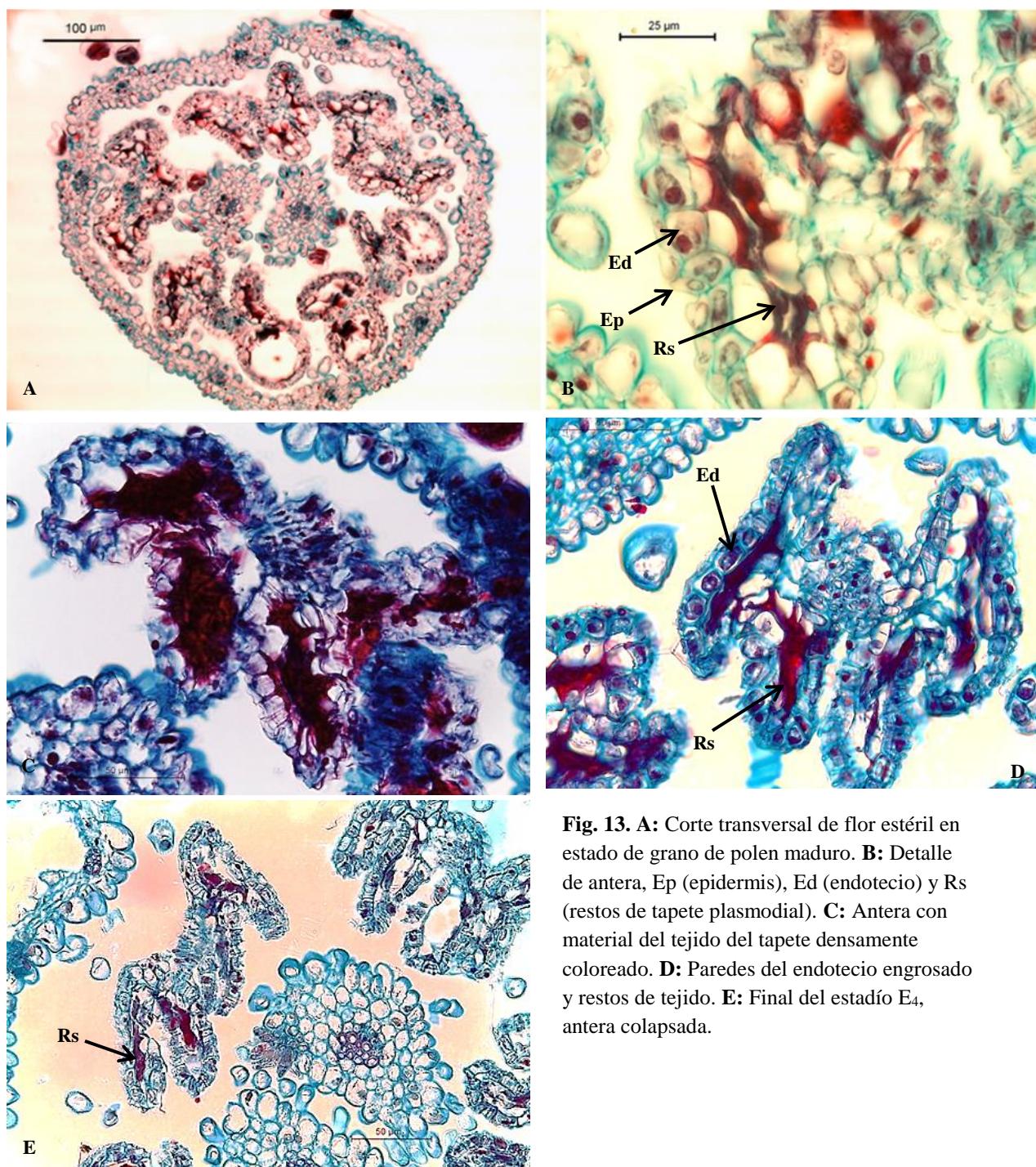


Fig. 13. A: Corte transversal de flor estéril en estado de grano de polen maduro. B: Detalle de antera, Ep (epidermis), Ed (endotecio) y Rs (restos de tapete plasmoidal). C: Antera con material del tejido del tapete densamente coloreado. D: Paredes del endotecio engrosado y restos de tejido. E: Final del estadío E₄, antera colapsada.

Descendencia obtenida:

De 130 aquenios cosechados, se sembraron solo aquellos que formaron semilla (57). A los 7 días de sembrados los aquenios comenzaron a germinar. Del total germinado (37), solo sobrevivieron y llegaron a florecer 22 plantas. De éstas, 10 plantas presentaron el mismo sistema de androesterilidad que la planta madre, mientras que las 12 plantas restantes fueron fértiles como el progenitor masculino.



Fig. 16. Ejemplar 5, obtenido del cruzamiento AS x AF en diferentes estados de crecimiento.

DISCUSIÓN

La ausencia de polen en este citotipo de *S. rebaudiana* fue constante a lo largo del año y en diferentes condiciones controladas; por lo que se descarta la posibilidad de que el tipo de androesterilidad que presenta este citotipo fuera debido a estrés, como sucede en el caso de *Oryza sativa* L. (Gothandam et al. 2007) que a temperaturas inferiores a 16° C disminuye la viabilidad del polen a causa de una pérdida funcional del tejido del tapete.

Generalmente las capas medias o intermedias son transitorias o efímeras y se comprimen, aplastan u obliteran incluso antes de que el microsporangio esté completamente maduro y listo para dehiscencia. En *Nigella damascena* y en *Lilium*, las capas intermedias contribuyen al desarrollo del polen persistiendo hasta la dehiscencia de la antera. (Bhandari et al. 1984).

El tapete está involucrado en tres aspectos diferentes del desarrollo del grano de polen, en la nutrición de las micrósporas, formación de exina, y síntesis y liberación de materiales que forman parte de la deposición de la trifina y de pollenkitt (Bhandari, 1984). Por lo que, todo tipo de alteración que se produzca en este tejido podría ser causa de androesterilidad. En el caso del citotipo estéril en estudio, se observaron alteraciones en el tejido del tapete periplasmoidal en etapas tempranas del desarrollo, coincidiendo con el estadío E₂ (división meiótica).

El deterioro y muerte del tejido de tapete es esencial para la provisión de muchas moléculas necesarias para el desarrollo de los granos de polen, incluyendo nutrientes, proteínas, lípidos y polisacáridos. Este proceso está regulado por varios genes interactuando en diferentes etapas del desarrollo del tapete, lo que está concretamente demostrado en *Arabidopsis thaliana* (Parish & Li 2010), existiendo una regulación en la transcripción de diversos genes durante el desarrollo.

Los cambios observados en la células del tapete y desintegración de los meiocitos en este citotipo MS, coinciden con los descriptos por Parish & Li (2010), para la mutación DYT1 (disfunctional tapetum 1), que produce cambios en los en los perfiles de expresión génica de algunas hormonas y proteasas desde la formación de los primordios de las anteras y en las

células madre de la micróspora, que se debería a genes relacionados a una disfunción mitocondrial del gen AMS regulado por el mismo gen DYT1.

Jie y Mu Chuan (1989), estudiando la ultraestructura de las anteras de *S. rebaudiana* y la función de los tejidos de éstas, observaron que en la fase de tétrades, la capa media se adelgaza y las células del tapete alcanzan el más alto grado de desarrollo, produciéndose una reorganización de las células del tapete. Posteriormente, se liberan componentes lipídicos y cubren la exina del grano de polen a la vez que se produce un engrosamiento de las células del endotecio (Piffanelli & Murphy, 1998). En el citotipo fértil estudiado, la estructura de la antera coincide con lo descripto por Mu Chuan et al. (1989) en cuanto a las características de la capa media y células del tapete.

En otros casos de androesterilidad en vegetales como lo observado por Raj (1969), en *Sorghum sp.* las células tapetales se agrandan prematura y considerablemente, ocluyendo todo el saco polínico. Laser y Lersten (1972), en *Sorghum sp* demostraron que el aborto de las micrósporas se produce generalmente en etapas pre o post-meióticas.

En *Helianthus annuus*, Horner y Rogers (1974), observaron que cuando las células tapetales funcionan mal, como ser el aumento de la vacuolación, el crecimiento celular y la falta de citoplasma denso, se detiene el desarrollo de las micrósporas. Balk & Leaver (2006), observaron también *H. annuus* que las mitocondrias cumplen una función muy importante en la desintegración y en la PCD. Demostraron a través de marcadores morfológicos y bioquímicos de apoptosis, que el citoplasma de PET1-CMS en *H. annuus* causa una PCD prematura de las células tapetales, que luego se extiende a otros tejidos de las anteras. Esta es una mutación mitocondrial relacionada al citocromo C. La activación del citocromo C precede a una condensación celular, fragmentación del ADN, una disminución de la integridad de la membrana mitocondrial y la relación de control de respiración. Esta información, da fuertes evidencias que las mitocondrias causan la inducción prematura de la PCD de las células del tapete, provocando la muerte de las micrósporas.

Por los resultados obtenidos en *S. rebaudiana* del citotipo MS, si bien no llegamos a determinar en qué etapa o momento se detiene el proceso meiótico, se observó que el tapete se desarrolla precozmente respecto a la división meiótica y no se alcanza a formar granos de polen. Según lo observado en los cortes anatómicos en el desarrollo de la antera, son similares a los descriptos por Parish & Li (2010), Raj (1969), Horner y Rogers (1974) y Balk & Leaver (2006).

Si bien la estructura de las anteras del citotipo MS de *Stevia* presenta características similares a la estructura de las células del tapete en *H. annuus*, durante el proceso meiótico y desintegración de las micrósporas, se observa un sistema de esterilidad masculina relacionado a genes citoplasmáticos en éste citotipo androestéril; pero se necesitarán realizar estudios de ultraestructura y marcadores moleculares para confirmar la actividad mitocondrial en el proceso de apoptosis.

Se pudo comprobar a través de este estudio que el citotipo MS, posee un tipo de androesterilidad citoplasmática relacionada a los citocromos C que causan el desarrollo precoz del tapete con el posterior deterioro de los meiocitos; siendo un proceso apoptótico similar al descripto por Balk & Leaver (2001) en *Helianthus annuus* para el gen mutante PET1-CMS y por Parish & Li (2010) en *Arabidiopsis thaliana* para el gen DYT1.

El hecho de obtener descendencia fértil y estéril en el cruzamiento realizado, son indicios de que en este citotipo existe un sistema génico nuclear restaurador de la fertilidad. Si consideramos la frecuencia de descendientes fértiles vs. estériles de aproximadamente tipo 1:1, podríamos asegurar que tanto el citotipo androestéril como el androfértil utilizados en los cruzamientos, serían heterocigotas para los genes nucleares restauradores de la fertilidad.

CONCLUSIONES

En el citotipo androesteril de *S. rebaudiana* estudiado, es evidente que desde etapas iniciales existen alteraciones en el proceso del desarrollo y formación de los granos de polen. Los resultados histológicos obtenidos en este trabajo indicarían que la causa de androestrilidad es debida a la muerte celular programada del tejido del tapete asociada a genes citoplasmáticos como sucede en los casos citados como antecedentes.

Sin embargo, al analizar la descendencia de los cruzamientos realizados se puede inferir que existen también genes nucleares restauradores de la fertilidad y tanto el material fértil como estéril utilizados son genotípicamente heterocigota para estos genes.

Por lo que se puede concluir que la androestrilidad en *S. rebaudiana*, es debida a un efecto combinado de genes citoplasmáticos y nucleares.

BIBLIOGRAFÍA

Balk, J., y C. J. Leaver. (2001). The PET1-CMS mitochondrial mutation in sunflower is associated with premature programmed cell death and cytochrome c release. *The Plant Cell* 13(8): 1803-1818.

Bhandari, N. N. (1984). The Microsporangium. En B. Johri, *Embryology of Angiosperms* (págs. 53-121). Berlin Heidelberg- New York-Tokyo: Springer-Verlag.

Cabrera, A. (1978). Flora de Jujuy. X Compositae . Buenos Aires- Argentina: Colecc. Científica del INTA.

Cabrera, A. H. (1996). Flora del Paraguay (Vol. 25). Ginebra: Conservatoire et Jardin botaniques de la Ville de Genève- Missouri Botanical Garden.

Caponio I., S. C Torres., G. Andersson y G. A. Norrmann. (2016). Biología reproductiva de *Stevia rebaudiana* (Asteraceae). *Bonpladisia* 25(1): 59-71.

Cueva Chávez, V. A. (2016). Estudio de rentabilidad del cultivo de estevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) en Trujillo, La Libertad. Universidad Nacional de Trujillo.

Dolferus, R., X. Ji,, y R. A. Richards (2011). Abiotic stress and control of grain number in cereals. *Plant Science* 181(4): 331-341.

Elliott, Fred C. (1964). Citogenética y mejoramiento de plantas. Editorial Continental. Pp 474.

Frankel, R., y E. Galun (1977). Pollination mechanisms, reproduction and plant breeding. Springer Verlag- New York. 281 pp

Freire, S. E., E. Urtubey, G. Sancho, N. D. Bayón, L. Katinas, , D. G. Gutiérrez, y G. Delucchi (2006). Inventario de la biodiversidad vegetal de la provincia de Misiones: Asteraceae. *Darwiniana* 44(2): 375-452.

Gabelman, W. H. (1956). Male sterility in vegetable breeding. In *Genetics in plant breeding*. Brook-haven Symposia in Biology . Pp. 113-122.

García, Y. S., R. M. Hernández-Hernández, E. Ramírez, M. E. Sánchez , C. Belosevic, I. González I. y R. Vaamonde (2017). Caracterización de un cultivar de *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni (Asteraceae-Eupatorieae) a partir de morfología vegetativa, reproductiva y morfoanatomía foliar. Revistas de investigación, 92(41): 96-114.

Gothandam, K. M., E. S. Kim, y Y. Y. Chung (2007). Ultrastructural study of rice tapetum under low-temperature stress. Journal of Plant Biology 50(4): 396-402.

Hayashi, M., A. Ujiie, H. Serizawa, H. Sassa, H. Kakui, T. Oda, y T. Koba (2011). Development of SCAR and CAPS markers linked to a recessive male sterility gene in lettuce (*Lactuca sativa* L.). Euphytica 180(3): 429-436.

Horner Jr, H. T. y M. A. Rogers (1974). A comparative light and electron microscopic study of microsporogenesis in male-fertile and cytoplasmic male-sterile pepper (*Capsicum annuum*). Canadian Journal of Botany 52(3): 435-441.

Jarma Orozco, A., Araméndiz Tatis, H., y A. Cleves Leguízamo (2011). Estabilidad fenotípica y densidades de planta de genotipos de estevia (*Stevia rebaudiana* Bert.) en la región Caribe de Colombia. Acta Agronómica, 60(2): 165-175.

Jie, G., C. Mu-chuan, W. De-yao (1989). The ultrastructure and function of the anther wall in *Stevia rebaudiana* bertoni. Acta Biologiae Experimentalis Sinica, 1989-03. Institute of Cell Biology, Xiamen University.

Johansen, D. (1940). Plant Microtechnique. McGraw-Hill Book Company, Inc. N.York and London. 511 pp.

Katinas, L., D. G. Gutiérrez, M. A. Grossi, y J. V. Crisci (2007). Panorama de la familia *Asteraceae* (= Compositae) en la República Argentina. Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica 42(1-2): 113-129.

Kaul, M. L. H, (1988). Male sterility in higher plants. Monographs on theoretical and applied genetics, Vol. 10. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York.

Kaul, M. L. (2012). Male sterility in higher plants (Vol. 10). Springer Science & Business Media.

Laser, K. D., y N. R. Lersten (1972). Anatomy and cytology of microsporogenesis in cytoplasmic male sterile angiosperms. *The Botanical Review* 38(3): 425-454.

Makaroff, C. A. y H. A. Owen (1995). Ultrastructure of microsporogenesis and microgametogenesis in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. ecotype Wassilewskija (Brassicaceae). *Protoplasma* 185(1-2): 7-21.

Marks, G. (1954). An acetocarmine glycerol jelly for use in pollen fertility counts. *Stain Technology* 29, 277.

Panza, L. J. (2016). Estudio de mercado y recopilación de algunos datos productivos de *Stevia rebaudiana* Bertoni en Córdoba Capital (Bachelor's thesis).

Papini, A., S. Mosti y L. Brighigna (1999). Programmed-cell-death events during tapetum development of Angiosperms. *Protoplasma* 207(3): 213–221.

Parish, R. W., y S. F. Li (2010). Death of a tapetum: a programme of developmental altruism. *Plant Science* 178(2): 73-89.

Piffanelli, P., y D. J. Murphy. (1998). Novel organelles and targeting mechanisms in the anther tapetum. *Trends in Plant Science* 3(7): 250-252.

Raj AY. (1969). Histological studies in male-sterile and male-fertile Sorghum. *Indian J Genet Plant Breed* 28:335-341.

Yadav, A., S. Singh, D. Dhyani, y P. Ahuja (2010). A review on the improvement of *Stevia* (*Stevia rebaudiana* Bertoni). *Canadian Journal of Plant Science* 91: 1-27.

Zuloaga, F. O., O. Morrone, y M. J. Belgrano (2008). Catalogue of the vascular plants of the southern cone (Argentina, southern Brazil, Chile, Paraguay and Uruguay). Volume 2: Dicotyledoneae: *Acanthaceae-Fabaceae* (Abarema-Schizolobium). Missouri botanical garden Press.