

TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN
(Modalidad Tesina)

“Estudios citogenéticos en un posible híbrido de *Paspalum simplex* Morong y *P. urvillei* Steud.”

Tesinista: Nara Cecilia Schahovskoy

Asesora: Ing. Agr. (Dra.) María Esperanza Sartor

Lugar de trabajo: Cátedra de Genética de la Facultad de Ciencias
Agrarias, UNNE

ÍNDICE

➤ Resumen	2
➤ Introducción	3
➤ Hipótesis	5
➤ Objetivos	5
➤ Materiales y métodos	5
➤ Resultados y discusión	9
➤ Conclusiones	14
➤ Bibliografía	15
➤ Tablas	18
➤ Figuras	19

RESUMEN

La hibridación natural entre especies es un proceso que ha sido reportado en *Paspalum*. Al sur de la provincia del Chaco se colectó una planta pentaploide (5x) identificada como Q4312, la cual es morfológicamente similar a dos especies: *Paspalum simplex* y *P. urvillei*. El objetivo del trabajo fue comprobar el origen híbrido de la planta Q4312 y establecer sus posibles progenitores. Para ello se analizó la meiosis, el sistema reproductivo y la fertilidad de la planta Q4312. También se realizaron cruzamientos entre un genotipo 3x apomíctico de *P. simplex* (♀) y genotipos 4x sexuales de *P. urvillei* (♂). Durante la meiosis se observaron irregularidades en el apareamiento de los cromosomas, encontrando principalmente univalentes y bivalentes, también trivalentes, y en menor proporción tetravalentes. De 103 ovarios analizados, se observaron ovarios con sacos embrionarios meióticos (22), apospóricos (21), con ambos tipos de sacos (18) y con múltiples sacos (20); también se observaron ovarios con sacos abortados (11) e inmaduros (11). De 5560 granos de polen analizados, solo 137 resultaron viables (2,46 %). En autopolinización la producción de semillas fue nula y en polinización abierta, resultó sólo del 1,53%. En los cruzamientos forzados se polinizaron 1023 espiguillas, sin obtención de semillas viables. Estos resultados indican que la planta pentaploide Q4312 se habría originado por un raro evento de hibridación interespecífica. Si bien el genotipo Q4312 tiene la capacidad de reproducirse por apomixis facultativa, su fertilidad es muy baja, lo cual es esperable en individuos de niveles de ploidía impares y/o en híbridos interespecíficos. El hecho de no haber obtenido semillas de los cruzamientos controlados indicaría que la posibilidad de obtener híbridos entre estas especies es muy baja y que sería necesario realizar un mayor número de cruzamientos para obtener híbridos. Con estos resultados sin embargo, no es posible aún confirmar cuáles fueron las especies que le dieron origen. Serían necesarios estudios complementarios que permitieran dilucidar cuáles fueron efectivamente las especies involucradas en el proceso de formación del híbrido.

INTRODUCCIÓN

El género *Paspalum* L. comprende cerca de 330 especies distribuidas en regiones tropicales y subtropicales a templadas principalmente de América, con unas pocas especies que habitan en el viejo mundo. Este género se caracteriza por presentar especies diploides de reproducción sexual y poliploides sexuales o apomícticas (Quarin, 1992). La poliploidía abarca un amplio rango de niveles, desde triploides (Quarin y Lombardo, 1986) hasta 16-ploides (Burton, 1940). La poliploidía está presente en aproximadamente el 80% de la especies, y la mitad de estos poliploides son tetraploides. A su vez, la mayoría de los poliploides son de reproducción apomíctica (Quarin, 1992). Es decir que la apomixis, reproducción asexual por medio de semillas (Nogler, 1984) está estrechamente asociada con la poliploidía. Así como existe una gran variabilidad de niveles de ploidía y de sistemas reproductivos entre las especies del género, también dentro de una misma especie existe variabilidad para niveles de ploidía y para la forma de reproducción. En efecto, un porcentaje importante de las especies del género son multiploides. Esto significa que una misma especie contiene plantas diploides y tetraploides, pero también puede tener triploides, pentaploides o de otros niveles de ploidía (Quarin, 1992; Ortiz *et al.*, 2013).

Diversos estudios experimentales fueron llevados a cabo dentro del género *Paspalum* para tratar de dilucidar el/los procesos que dieron origen a los poliploides (Quarin y Hanna, 1980; Quarin y Norrmann, 1987; Quarin *et al.*, 1989; Quarin *et al.*, 1996; Quarin *et al.*, 2001). Algunos autores consideran que la gran mayoría de los tetraploides apomícticos de *Paspalum* son de origen autoploide (Forbes y Burton, 1961; Quarin *et al.*, 1998; Norrmann *et al.*, 1989; Quarin, 1992; Pupilli *et al.*, 1997). Sin embargo dentro del género existen especies alopoliploides de reproducción apomíctica tales como el pentaploide *Paspalum dilatatum* (Burson, 1989), o el tetraploide *P. pauciciliatum* (Smith, 1948; *P. dilatatum* var. *pauciciliatum*), pero también alopoliploides de reproducción sexual como es el caso del tetraploide *P. urvillei* (Bashaw *et al.*, 1970). Estos alopoliploides han surgido a través de procesos de hibridación entre diferentes especies dentro del género (Vaio *et al.*, 2005).

La hibridación natural entre especies ha sido reportada frecuentemente en *Paspalum*. Por ejemplo, Urbani y Quarin (1987) han estudiado un híbrido triploide natural ($2n=3x=30$) y han demostrado que el origen más probable fue el cruzamiento espontáneo entre *P. brunneum* ($2n=2x=20$) y *P. urvillei* ($2n=4x=40$). Entre otras pruebas experimentales, estos autores realizaron cruzamientos controlados entre estas especies y obtuvieron híbridos con características morfológicas y citológicas similares al híbrido natural. Otro híbrido triploide natural ($2n=3x=30$) ha

sido caracterizado por Acuña *et al.* (2000). Según los autores, este híbrido habría surgido a partir del cruzamiento entre la especie *P. lenticulare* ($2n=2x=20$) y alguna de las especies tetraploides del grupo Plicatula que crecen en las cercanías de la planta diploide.

Entre los antecedentes de hibridación inter específica en *Paspalum*, se han reportado además estudios que han involucrado a la especie *P. simplex* (Caponio y Quarin, 1987; Espinoza y Quarin, 1998). *Paspalum simplex* Morong pertenece al subgénero *Anachyris* y su distribución natural abarca la región fitogeográfica chaqueña, sudeste de Bolivia, oeste de Paraguay y las regiones centro norte y este de Argentina (Morrone *et al.*, 2000). Esta especie presenta diferentes citotipos y sistemas reproductivos. El citotipo diploide ($2n=2x=20$) se reproduce por sexualidad (Espinoza and Quarin 1997), mientras que el tetraploide ($2n=4x=40$) se reproduce por apomixis (reproducción asexual a través de semillas) (Nath *et al.*, 1970; Caponio y Quarin, 1987; Cáceres *et al.*, 1999). Si bien estos son los citotipos más comunes para esta especie, se han reportado también triploides sexuales y apomícticos ($2n=3x=30$) y hexaploides apomícticos ($2n=6x=60$) (Urbani *et al.*, 2002). Otra de las especies para las que se han reportado estudios de hibridación inter específica es *Paspalum urvillei* Steud. (Urbani y Quarin, 1986; Caponio y Quarin, 1990; Caponio y Quarin, 1993). Esta especie pertenece al grupo Dilatata del subgénero *Paspalum*, y si bien su distribución natural incluye el sur de Brasil, Paraguay y norte de Argentina, se encuentra naturalizada en casi todas las regiones subtropicales húmedas del mundo (Urbani y Quarin, 1987). En cuanto a su nivel de ploidía y sistema reproductivo, esta especie ha sido descripta como un alotetraploide de reproducción sexual (Bashaw *et al.*, 1970).

Paspalum simplex y *P. urvillei* comparten parte de su área de distribución, por lo que es posible encontrar ambas especies creciendo en un mismo hábitat. A 36 km al norte de Villa Ángela (Chaco), se ha coleccionado una población mixta $2x-4x$ de *P. simplex* (Urbani *et al.*, 2002), en la que se encontró además un individuo triploide de reproducción apomíctica (Urbani *et al.*, 2002). Del mismo lugar, se colectó una planta (denominada Q4312), que presentaba similitudes morfológicas tanto con *P. simplex*, como con *P. urvillei*, especie que también habita la región. A partir de recuentos cromosómicos en puntas de raíces, se pudo establecer que el genotipo Q4312 presentaba 50 cromosomas. Este raro genotipo pentaploide con similitudes morfológicas con *P. simplex* y *P. urvillei* podría haber surgido como un híbrido a partir de la fecundación de un gameto no reducido de *P. simplex* triploide ($2n=30$) por un gameto reducido de *P. urvillei* tetraploide ($n=20$).

HIPÓTESIS

La planta pentaploide Q4312 es un híbrido interespecífico natural que se originó mediante el cruzamiento espontáneo entre una planta triploide apomíctica de *P. simplex* y una planta tetraploide *P. urvillei*, mediante un raro evento de reproducción sexual que suele suceder especialmente cuando una planta apomíctica (en este caso *P. simplex*) recibe polen de una especie diferente.

OBJETIVOS

General

Comprobar el origen híbrido del genotipo pentaploide Q4312 y establecer sus posibles progenitores.

Particular

Observar la citología, la embriología y la fertilidad del genotipo pentaploide Q4312 con el fin de comprobar su origen híbrido.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Para los diferentes estudios, se utilizó la planta original del genotipo Q4312, la cual se encuentra mantenida a campo en el banco de germoplasma del Instituto de Botánica del Nordeste, ubicado en la Facultad de Ciencias Agrarias, Campus Sargento Cabral (UNNE). La planta fue multiplicada por división de mata a fin de tener material en condiciones de campo y también en macetas en el invernáculo. Se realizó el mismo procedimiento para los ejemplares de *P. simplex* y *P. urvillei* que fueron utilizados como parentales en cruzamientos controlados.

Análisis de meiosis

Para realizar el estudio de la meiosis se usaron espiguillas tomadas de inflorescencias jóvenes, fijadas en una solución 3:1 (v/v) de etanol absoluto: ácido acético por 24hs. y conservadas en etanol al 70%. A partir del aplastado de las anteras en carmín acético al 2%, se hicieron preparados citológicos permanentes con una solución de Terpentina de Venecia, en los que se observaron células madres del polen (CMP). Los preparados permanentes fueron observados con un microscopio óptico de luz transmitida y eventualmente con contraste de fases para estudiar las asociaciones cromosómicas de las células en las fases de diacinesis y metafase I; en los mismos preparados también se pudieron observar los resultados de la meiosis.

Estudio del sistema reproductivo

Para estudiar el sistema reproductivo se siguió el protocolo de clarificado de ovarios mediante Metilsalicilato descrito por Zilli *et al.* (2015). Se utilizaron inflorescencias en antesis, las que fueron fijadas en FAA (5 ml de formaldehído, 90 ml de alcohol etílico 70% y 5ml de ácido acético glacial) por 24 horas. Posteriormente, se las conservó en etanol al 70%, también por 24 horas. Los ovarios fueron luego extraídos de las espiguillas, pasados a etanol al 70%; y tratados con una solución de agua oxigenada al 3% por 2 horas. Este último tratamiento tiene como objetivo reducir la pigmentación del tejido para mejorar la visualización posterior de las estructuras internas de los ovarios. Sin embargo, en el caso del genotipo Q4312, el mismo provocó la desintegración de los mismos. Ya que naturalmente los ovarios de este genotipo presentan una escasa pigmentación, se procedió a continuar con el proceso de clarificado obviando el tratamiento con agua oxigenada. Seguidamente se colocaron los pistilos en etanol al 50%, luego al 70%, al 95%, y dos veces al 100%, siempre por 30 minutos. Luego, éstos fueron transferidos a una solución de Metilsalicilato al 50% y Etanol al 50% por 30 minutos, luego a una solución de Metilsalicilato al 75% y Etanol al 25%, también por 30 minutos y posteriormente a una solución de Metilsalicilato al 85% y Etanol al 15%, también por 30. Finalmente, el material permaneció toda la noche en metilsalicilato al 100%. Pasado este período, los ovarios fueron montados en portaobjetos y observados en microscopio de contraste por interferencia diferencial (DIC), tratando de identificar las partes del saco embrionario para diferenciarlos en sacos apospóricos, meióticos, abortados e inmaduros (Zilli *et al.*, 2015).

El modo de reproducción se estimó también por citometría de flujo mediante la determinación del contenido de ADN en el embrión y el endospermo siguiendo la metodología descrita por Matzk *et al.* (2000), con un citómetro Partec PA-II. El análisis de semillas por citometría de flujo permite discriminar aquellas semillas originadas por sexualidad de las que fueron originadas vía apomixis mediante la comparación del contenido de ADN del embrión con el ADN del endospermo. Asumiendo que el valor C se refiere al contenido de ADN nuclear de un complemento cromosómico haploide (n) de una planta y contando con la ventaja que nos proporciona la citometría de flujo para cuantificar el contenido de ADN de los tejidos del embrión y del endospermo de semillas maduras, es posible establecer el modo reproductivo de una planta (en particular de las especies del género *Paspalum*) determinando el origen de las semillas que produce esta planta en particular. Las semillas que se originan por sexualidad muestran una relación embrión/endospermo de 2C:3C, mientras que una relación 2C:5C corresponde a aquellas semillas que se originan por apomixis.

Se analizaron individualmente semillas maduras del genotipo Q4312, las cuales se encontraban conservadas en el banco de semillas de la Catedra de Genética. Los cariopses fueron cortados con una hoja de afeitar en 0,5 mL de “buffer” para extracción nuclear, y fueron incubados durante 2 minutos. La solución fue pasada por un filtro de 30 μ m y transferida a un tubo en el cual se adicionó 1,5 mL del “buffer” de tinción fluorescente conteniendo 4 α 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Los “buffers” de extracción y tinción son parte de un kit comercial CyStain UV Precise P Partec, Münster, Germany. Las suspensiones fueron analizadas pasándolas a través de un citómetro de flujo, con el detector operando a 355nm y los datos fueron analizados con el paquete de software de computación PA-II Partec FloMax.

Fertilidad

Fertilidad masculina

La fertilidad masculina del genotipo pentaploide Q4312 se estimó en base a la viabilidad de los granos de polen, evaluando la misma a través del método indirecto de coloración de sustancias de reservas (en este caso para almidón) con Lugol (yodo-yoduro de potasio al 2%). Para ello, se tomaron inflorescencias al momento de la antesis y se extrajeron las anteras de las espiguillas. Las anteras fueron luego aplastadas sobre un portaobjetos con una gota de Lugol, removiendo los restos de tejidos y dejando solamente los granos de polen. Los granos fueron observados con

microscopio óptico. Se distinguieron granos viables y no viables, porque los primeros fueron pigmentados tomando un color marrón oscuro, mientras que los no viables no se colorearon.

Adicionalmente, para analizar la estructura, forma y tamaño de los granos de polen, se realizó el clarificado con Metilsalicilato de anteras, siguiendo el mismo protocolo que el utilizado para el clarificado de ovarios (Zilli *et al.*, 2015).

Fertilidad femenina

Para determinar la fertilidad femenina se observó la proporción de espiguillas que formaron granos en condiciones de autopolinización y de polinización libre. La autopolinización se realizó ensobrando inflorescencias del genotipo Q4312 con sobres de papel sulfito un día antes del inicio de la antesis, para prevenir el ingreso de polen extraño y así obligar a las espiguillas a auto polinizarse. Estas inflorescencias permanecieron ensobradas hasta la maduración de las semillas. En las polinizaciones libres, las inflorescencias fueron ensobradas una vez finalizada la antesis de todas las espiguillas, permaneciendo en dichas condiciones hasta completar su maduración; posteriormente, los sobres fueron colectados. Luego de cosechadas, las semillas fueron secadas a estufa a 37° C durante 24 horas, y seguidamente las espiguillas fueron separadas manualmente y clasificadas como llenas o vacías utilizando un soplador de semillas.

Cruzamientos

Adicionalmente, se realizaron cruzamientos inter específicos entre los posibles progenitores, usando como parental femenino al genotipo triploide apomíctico de *Paspalum simplex* U45, y como parental masculino diversos genotipos tetraploides sexuales *Paspalum urvillei* colectados dentro del área de distribución de la especie. Para la realización de los cruzamientos, se utilizó una cámara de niebla artificial en donde se procedió a la emasculación de las espiguillas siguiendo el método de Burton (1948), con el fin de evitar la autopolinización.

Paspalum simplex se caracteriza por iniciar su antesis antes de las 8:00 horas., por lo que previo a dicho horario, las inflorescencias de las plantas madre fueron aisladas usando sobres de papel sulfito para evitar la contaminación con polen de genotipos extraños. Por otro lado, durante la mañana, se colectó el polen del genotipo masculino en sobres de papel sulfito. Luego de producirse la antesis de la planta madre, se espolvoreó el polen sobre los estigmas, y se aisló nuevamente a la inflorescencia. Este proceso se repitió durante 17 días, hasta que la planta madre

completara la antesis de todas las espiguillas de la inflorescencia. Las inflorescencias polinizadas permanecieron ensobradas durante aproximadamente 30 días hasta el momento de la cosecha. Posterior a la cosecha, las inflorescencias fueron secadas en estufa a 37°C durante 24 horas y luego manualmente se separaron las espiguillas y se clasificaron como vacías o llenas utilizando un soplador de semillas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis de la meiosis

En total se realizaron 16 preparados permanentes en los que se observaron desde células madres del polen en Profase I temprana hasta microsporas (Fig. 1).

Para analizar el tipo de asociaciones cromosómicas y su relación con el grado de homología entre genomas, se realizó el análisis de células en Diacinesis (Profase I). En un total de 10 células analizadas, se observaron desde asociaciones univalentes hasta tetravalentes (Tabla 1, Fig. 1A). En promedio, se observó una mayor frecuencia de asociaciones bivalentes y univalentes (9,1 y 6,4 respectivamente). Por célula, se observaron entre 4 y 12 bivalentes, mientras que en el caso de los univalentes se observaron entre 1 y 11. Asociaciones trivalentes y tetravalentes fueron encontradas en una menor frecuencia (4,2 y 3, 2 respectivamente), con un rango de 1 a 7 trivalentes y de 1 a 4 tetravalentes por célula.

Durante la Metafase I, se observó que la mayoría de los cromosomas se ubicaron en el plano ecuatorial. Sin embargo algunos permanecieron fuera de este plano (Fig. 1B). En la Anafase I, se observó un comportamiento generalmente regular en donde parte de los cromosomas se desplazaban hacia los polos de la célula, permaneciendo en el plano ecuatorial un grupo de cromosomas rezagados (Fig. 1C). Al final de la Telofase I se observó que inclusive aquellos cromosomas rezagados completaban su desplazamiento hacia alguno de los polos (Fig. 1D, 1E). Se observó además la presencia de micronúcleos en las díadas formadas. Finalizada la segunda etapa de la meiosis, se observaron microsporas en número y tamaño variable, desde díadas hasta péntadas e inclusive hexas (Fig. 1F-1L).

La irregularidad observada durante la meiosis del genotipo Q4312, y las anomalías encontradas en las microsporas producidas, sugieren un origen híbrido para esta planta. Resultados similares fueron observados en otros híbridos interespecíficos naturales y artificiales

en *Paspalum*. Por ejemplo, un comportamiento meiótico similar fue observado en híbridos entre *P. intermedium* x *P. urvillei* y *P. dilatatum* x *P. paniculatum* (Burson, 1979) y en un posible híbrido natural entre especies del grupo *Plicatula* (Acuña *et al.*, 2000).

La hipótesis planteada en esta tesina sugiere además que, según sus características morfológicas, el genotipo Q4312 podría haberse originado de la hibridación natural entre una planta autotriploide apomíctica de *P. simplex* y una planta alotetraploide sexual de *P. urvillei*. Estudios previos han demostrado que en el genotipo triploide U45 de *P. simplex*, los cromosomas se asocian formando preferentemente trivalentes (Urbani comunicación personal) mientras que en diferentes genotipos tetraploides de *P. urvillei* se ha observado que los cromosomas se asocian formando 20 bivalentes, ya que se trata de un alotetraploide, cuya fórmula genómica es IIIJ (Bashaw *et al.*, 1970; Burson, 1979) Sería de esperar entonces, que durante la meiosis del supuesto híbrido, los cromosomas se asociaran formando 20 univalentes correspondientes a los cromosomas aportados por *P. urvillei* y hasta 10 trivalentes correspondientes a los cromosomas aportados por *P. simplex*. Sin embargo, los datos obtenidos en esta tesina indican que el híbrido presenta mayormente asociaciones bivalentes entre cromosomas durante la meiosis. Existen diferentes hipótesis que explicarían este comportamiento. Una de ellas sería la existencia de cierto grado de homeología entre algunos cromosomas de los genomas I y J que habría aportado *P. urvillei*. Esta hipótesis fue propuesta por Caponio y Quarin (1987) al estudiar un híbrido interespecífico entre *P. simplex* tetraploide y *P. dilatatum* pentaploide. Esta última especie también contiene los genomas I y J y en el híbrido, también se observó la presencia de un mayor número de bivalentes con respecto a lo esperado. Sin embargo, Pitman *et al.* (1984) han propuesto que el apareamiento entre cromosomas no- homólogos podría estar influenciado genéticamente por los cromosomas del progenitor autopoliploide. Los resultados aquí obtenidos no permiten confirmar una u otra hipótesis. Sería necesario por un lado, analizar un mayor número de CMP y por el otro, realizar estudios complementarios que permitieran definir cuál de las explicaciones sería la más acertada.

La presencia de asociaciones múltiples tri y tetraivalentes podrían estar indicando un cierto grado de homología entre los genomas aportados por ambos parentales. Sin embargo, sería necesario confirmar con certeza cuáles fueron las especies que dieron origen a este híbrido para poder analizar las relaciones genómicas entre especies.

Sistema reproductivo

Análisis de sistema reproductivo por clarificado de ovarios

En total se analizaron 103 ovarios, en los cuales pudo observarse una diversidad de tipos de sacos embrionarios. El 41,74% de los ovarios analizados presentó un único saco embrionario. De éstos, la mitad fueron clasificados como sacos embrionarios meióticos y la otra mitad como sacos apospóricos (Fig. 3A y 3B). Un 36,89% de los ovarios presentó más de un saco embrionario, portando en general un saco meiótico y uno a más sacos apospóricos (Fig. 3C y 3D). El 21,35% restante de los ovarios presentó sacos inmaduros o abortados. Estos resultados indican que Q4312 posee la capacidad de producir semillas por apomixis facultativa, es decir que puede producir semillas por apomixis pero también por sexualidad.

Análisis de sistema reproductivo por citometría de flujo

Se analizaron un total de 17 semillas individuales. Sin embargo, sólo pudo determinarse la relación del contenido relativo de ADN del embrión y del endospermo en 11 semillas (Tabla 3). De las semillas analizadas, 8 presentaron una relación de contenido de ADN embrión: endospermo 2C:3C (embrión 5x: endospermo 7x), lo cual indica que estas semillas se originaron a partir de un saco embrionario meiótico por sexualidad. Las 3 semillas restantes presentaron una relación 2C:5C (embrión 5x: endospermo 12x), indicando que las mismas se originaron por apomixis a partir de un saco embrionario apospórico.

El análisis de clarificado por un lado, nos permitió determinar el o los tipos de sacos embrionarios que produce el genotipo Q4312, mientras que el análisis de citometría de flujo nos permitió analizar cuál de esos sacos embrionarios pudo efectivamente originar una semilla. En base a los resultados, fue posible inferir que la planta Q4312 se reproduce por apomixis facultativa, ya que se han encontrado ovarios con uno o varios sacos apospóricos, pero también se han observado ovarios portando sacos embrionarios meióticos. Por otra parte, el hecho de haber determinado que el 72% de las semillas analizadas por citometría tienen un origen sexual y el 28% restante tiene un origen apomíctico, indicaría que ambas formas de reproducción estarían funcionando para producir descendencia.

Si tenemos en cuenta ambos tipos de análisis del sistema reproductivo, podemos observar que, utilizando la técnica de clarificado, el número de ovarios que contienen sacos apospóricos es mucho mayor al número de ovarios que contienen sacos meióticos. Sin embargo, esta relación se

invirtió cuando se analizaron semillas maduras. Probablemente esta diferencia se haya dado debido al bajo número de semillas analizadas (11), en comparación con el número de ovarios estudiados (103). Para poder realizar una comparación más acertada, sería necesario aumentar el número de semillas analizadas por citometría de flujo.

Fertilidad masculina

Para poder extraer el polen de las anteras fue necesario cortarlas con un bisturí, ya que no se produjo la dehiscencia de las mismas. Este comportamiento ha sido reportado para otros casos de hibridación interespecífica en *Paspalum*, como es el caso de un híbrido triploide natural estudiado por Urbani y Quarín (1986), el cual se habría formado por cruzamiento entre *P. brunneum* y *P. urvillei* y de un híbrido natural también triploide estudiado por Acuña y Quarín (2000) el cual se habría originado por cruzamiento entre *P. lenticulare* y alguna de las especies del grupo *Plicatula*.

En total se observaron 5.560 granos de polen, de los cuales solo 137 fueron viables (2,46%) (Fig. 4). En cuanto al tamaño, los granos de polen presentaron variaciones, lo cual fue coincidente con los resultados observados en el análisis de la meiosis, en donde se observó variación en el tamaño de las microsporas. La mayoría de los granos que presentaron coloración (es decir que eran viables) tenían entre 25µm y 30µm de diámetro. Sin embargo, los granos más pequeños (de aproximadamente 15µm) no presentaron coloración (Fig. 4B; 4C). Al analizar los granos de polen por clarificado, los resultados fueron similares (Fig. 4D). Estas observaciones estarían indicando que los granos de polen poseen diferentes números cromosómicos, producto de una meiosis irregular, lo que estaría afectando su viabilidad.

Fertilidad femenina

Producción de semillas en condiciones de autopolinización

Para evaluar la producción de semillas por autopolinización se ensobraron tres inflorescencias de la planta Q4312. En total se contabilizaron 6.008 espiguillas, de las cuales el 100% resultaron vacías.

Producción de semillas en condiciones de polinización libre

Al analizar la capacidad de la planta Q4312 para producir semillas en polinización libre, se observó que de 3.659 espiguillas contabilizadas, solamente 56 estaban llenas (1,53%).

Estos resultados indicarían que el genotipo Q4312 presenta una fertilidad muy reducida en polinización libre, siendo nula cuando se la somete a autopolinización. La reducción drástica y/o ausencia de fertilidad es una característica que ha sido encontrada también en otros híbridos interespecíficos de *Paspalum* que han sido estudiados (Urbani y Quarin, 1986; Caponio y Quarin, 1987; Acuña y Quarin, 2000). Por otra parte se ha determinado que, al igual que el genotipo Q4312, algunos de estos híbridos poseen la capacidad de producir sacos embrionarios apospóricos (Caponio y Quarin, 1987; Acuña y Quarin, 2000). Esto indicaría que, a pesar de tener la posibilidad de dejar descendencia sin la necesidad de la fertilización para formar el embrión, estos híbridos no pueden escapar a la esterilidad.

A partir del estudio de un híbrido triploide natural entre *P. brunneum* y *P. urvillei*, y en base a otros antecedentes, Urbani y Quarin (1986) han propuesto que *P. urvillei* es una especie que se hibrida fácilmente con otras especies del género, pero que los híbridos que se forman son total o casi totalmente estériles. Si consideramos que el genotipo Q4312 también presenta una fertilidad muy reducida y características morfológicas que lo asemejan a *P. urvillei*, la participación de esta especie en la formación del híbrido parece ser una alternativa posible.

Cruzamientos

En total se polinizaron 1.023 espiguillas del genotipo triploide apomíctico U45 de *Paspalum simplex* con polen proveniente de plantas tetraploides de *P. urvillei*. A pesar de haber realizado varios intentos, no se logró obtener semillas a partir de dicho cruzamiento. Existen antecedentes de cruzamientos controlados entre diferentes especies de *Paspalum*, en los que también se han reportado valores muy bajos de obtención de plantas híbridas. Por ejemplo en un cruzamiento controlado entre *Paspalum durifolium* (2x) y *P. intermedium* (4x), solo se obtuvo un 0,46% de semillas llenas y de éstas, sólo una planta 3x sobrevivió (Quarin, 1994). En otro cruzamiento entre *P. brunneum* y *P. urvillei* también la efectividad del cruzamiento fue muy baja (1, 15%) (Urbani y Quarin, 1987).

Los resultados obtenidos en esta tesina podrían estar indicando que el genotipo pentaploide Q4312 se habría originado por un raro evento de hibridación interespecífica, y que la posibilidad de obtener híbridos entre *P. simplex* y *P. urvillei* sería muy baja. Un aspecto que habría comprometido también la posibilidad de obtener semillas del cruzamiento controlado es el hecho

de que, al realizar las emasculaciones, aumentan las chances de dañar las flores y se reduce aún más la posibilidad de obtener semillas.

Por otro lado, no es posible confirmar que estas dos especies hayan sido efectivamente las que participaron en el cruzamiento. Para ello sería necesario realizar más cruzamientos para tratar de obtener híbridos artificiales, los que luego podrían ser comparados con el híbrido natural.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en esta tesina nos permiten concluir que la planta pentaploide Q4312 es un híbrido interespecífico. Este híbrido tiene una muy baja fertilidad y posee la capacidad de reproducirse por apomixis facultativa.

Con estos resultados sin embargo, no es posible aún confirmar cuáles fueron las especies que le dieron origen. Serían necesarios estudios complementarios que permitieran dilucidar cuáles fueron efectivamente las especies involucradas en el proceso de formación del híbrido. Estos estudios deberían incluir nuevos intentos de cruzamiento entre las posibles especies parentales y posterior comparación de las características morfológicas de los híbridos obtenidos con el híbrido natural. Además sería conveniente aumentar el número de células analizadas en diacinesis para corroborar las asociaciones de los cromosomas durante la meiosis, tanto del híbrido natural como de los híbridos sintéticos.

BIBLIOGRAFÍA

- Acuña CA, Martínez EJ, Quarin CL (2000). Un triploide espontáneo en *Paspalum* y su implicancia en estudios evolutivos del género. Reunión de Comunicaciones Científicas y Técnicas, Universidad Nacional del Nordeste.
- Bashaw EC, Hovin AW, Holt EC (1970). Apomixis, its evolutionary significance and utilization in plant breeding. In: Norman MJT (ed) In: Proceedings of eleventh international Grasslands congress. University of Queensland Press, St Lucia, pp 245–248.
- Burson BL (1979). Cytogenetics of *Paspalum urvillei* x *P. intermedium* and *Paspalum dilatatum* x *P. paniculatum* híbridos. *Crop Science* 19, 534-538.
- Burson BL (1989) Phylogenetic of apomictic *Paspalum dilatatum*. Proceedings of the XVI International Grassland Congress. Nice, France pp. 413-414.
- Burton GW (1940). A cytological study of some species in the genus *Paspalum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60:193–197.
- Burton GW (1948). The method of reproduction in common Bahiagrass, *Paspalum notatum*. *American Society of Agronomy* 40:443-452.
- Cáceres ME, Pupilli F, Quarin CL, Arcioni S (1999). Feulgen-DNA densitometry of embryo sacs permits discrimination between sexual and apomictic plants in *Paspalum simplex*. *Euphytica* 110: 161–167.
- Caponio I, Quarin CL (1987). El sistema genético de *Paspalum simplex* y de un híbrido interespecífico con *P. dilatatum*. *Kurtziana* 19: 35–45.
- Caponio I, Quarin CL (1990). Intra- and interspecific hybridization between Dallisgrass and Vaseygrass. *Crop Science* 30:362-364.
- Caponio I, Quarin CL (1993). Cytology and reproduction of *Paspalum densum* and its genomic relationship with *P. intermedium* and *P. urvillei*. *Journal of heredity* 84:220-222.
- Espinoza F, Quarin CL (1997). Cytoembryology of *Paspalum chaseanum* and sexual diploid biotypes of two apomictic *Paspalum* species. *Australian Journal of Botany* 45: 871–877.
- Espinoza F, Quarin CL (1998). Relación genómica entre citotipos diploides de *Paspalum simplex* y *P. procurrens* (Poaceae, Paniceae). *Darwiniana* 36(1-4): 59-63.
- Forbes I Jr, Burton GW (1961). Cytology of diploids, natural and induced tetraploids, and intraspecies hybrids of bahiagrass, *Paspalum notatum* Flugge. *Crop Science* 1: 402-406.
- Matzk F, Meister A, Schubert I (2000). An efficient screen for reproductive pathways using mature seeds of monocots and dicots. *The Plant Journal* 21:97-108.

- Morrone O, Denham SS, Aliscioni SS, Zuloaga FO (2000). Revisión de las especies de *Paspalum* (Panicoideae: Paniceae), subgénero *Anachyris*. *Candollea* 55: 105–135.
- Nath J, Swaminathan MS, Mehra KL (1970). Cytological studies in the tribe Paniceae. *Cytologia* 35: 111–131.
- Nogler GA (1984). Gametophytic apomixis. In: Johri BM (ed) *Embryology of angiosperms*. Springer, Berlin, pp 475–518.
- Norrman GA, Quarin CL, Burson BL (1989). Cytogenetics and reproductive behaviour of different chromosome races in six *Paspalum* species. *Journal of heredity* 80:24-28.
- Ortiz JPA, Quarin CL, Pessino SC, Acuña C, Martínez EJ, Espinoza F, Hojsgaard DH, Sartor ME, Cáceres ME, Pupilli F (2013). Harnessing apomictic reproduction in grasses: what we have learned from *Paspalum*. *Annals of Botany* 112: 767–787.
- Pitman MW, BL Burson, Bashaw EC (1984). Cytogenetic relationships between *Paspalum* species with base chromosome numbers of $x=6$ and 10. *Agronomy Abstracts* pp 83.
- Pupilli F, Cáceres ME, Quarin CL, S Arcioni (1997). Segregation analysis of RFLP markers reveals a tetrasomic inheritance in apomictic *Paspalum simplex*. *Genome* 40: 822-828.
- Quarin CL (1992). The nature of apomixis and its origin in panicoid grasses. *Apomixis Newsletter* 5:8–15.
- Quarin CL, Espinoza F, Martínez EJ, Pessino SC, Bovo OA (2001). A rice of ploidy level induces the expression of apomixis in *Paspalum notatum*. *Sexual Plant Reproduction* 13:243-249.
- Quarin CL, Hanna WW (1980). Effect of three ploidy levels on meiosis and mode of reproduction in *Paspalum hexastachyum*. *Crop Science* 20:69–75.
- Quarin CL, Lombardo EP (1986). Niveles de ploidía y distribución geográfica de *Paspalum quadrifarium* (Gramineae). *Mendeliana* 7:101–107.
- Quarin CL, Norrmann GA (1987). Cytology and reproductive behavior of *Paspalum equitans*, *P. ionanthum*, and their hybrids between two cytotypes of *Paspalum notatum* and *P. cromyorrhizon*. *Botanical Gazette*.
- Quarin CL, Norrmann GA, Espinoza F (1998). Evidence for autopolyploidy in apomictic *Paspalum rufum*. *Hereditas* 129: 119-124.
- Quarin C, Norrmann G, Urbani M (1989). Polyploidization in aposporous *Paspalum* species. *Apomixis Newsl* 1:28–29
- 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.

- Smith BW (1948). Hybridity and apomixis in the perennial grass, *Paspalum dilatatum*. *Genetics* 33: 628-629.
- Urbani MH, Quarin CL (1986). Estudios citogenéticos en un híbrido natural y en híbridos controlados de *Paspalum brunneum* X *P. urvillei*. *Mendeliana* 8 (1): 53-63.
- Urbani MH, Quarin CL, Espinoza F, Penteado MIO, Rodrigues IF (2002). Cytogeography and reproduction of the *Paspalum simplex* polyploid complex. *Plant Systematics and Evolution* 236: 99–105.
- Vaio M, Speranza P, Valls JFM, Guerra M, Mazzella C (2005) Localization of the 5S and 45S rDNA Sites and cpDNA Sequence Analysis in Species of the Quadrifaria Group of *Paspalum* (Poaceae, Paniceae). *Annals of Botany* 96: 191–200.
- Zilli AL, Brugnoli EA, Marcón F, Billa MB, Rios EF, Martinez EJ, Acuña CA (2015). Heterosis and Expressivity of Apospory in Tetraploid Bahiagrass Hybrids. *Crop Science* 55:1189-1201.

TABLAS

Tabla 1: Asociaciones cromosómicas observadas en diacinesis y metafase I de la meiosis del genotipo Q4312. I: univalentes; II: bivalentes; III: trivalentes; IV: tetravalentes.

Genotipo	2n	CMP analizadas (nº)	Configuración cromosómica por célula madre del polen (CMP)							
			Promedio por CMP				Rango por CMP			
			I	II	III	IV	I	II	III	IV
Q4312	50	10	6,4	9,1	4,2	3,2	(1-11)	(4-12)	(1-7)	(1-5)

Tabla 2: observación de sacos embrionarios del genotipo Q4312. SEM: Sacos embrionarios meióticos; SEA: Sacos embrionarios apospóricos.

Genotipo Q4312		Nº de ovarios portando				
Nº total de ovarios analizados	S.E.M.	S.E.A.	S.E.M. + S.E.A.	Abortados	Inmaduros	Sacos múltiples
103	22	21	18	11	11	20

Tabla 3: Modo reproductivo del genotipo Q4312 inferido a partir del análisis por citometría de flujo en semillas maduras, de la relación de contenido de ADN del embrión y el endospermo.

Genotipo Q4312	Relación contenido de ADN embrión + endospermo	Origen de las semillas
Nº de Semillas		
8	2C + 3C	Sexual
3	2C + 5C	Apomíctico

Tabla 4: Producción de semillas en autopolinización y polinización libre del Genotipo Q4312.

Genotipo Q4312	%Producción de semillas	
	Autopolinización	Polinización libre
Vacías	2319	3603
Llenas	0	56

FIGURAS

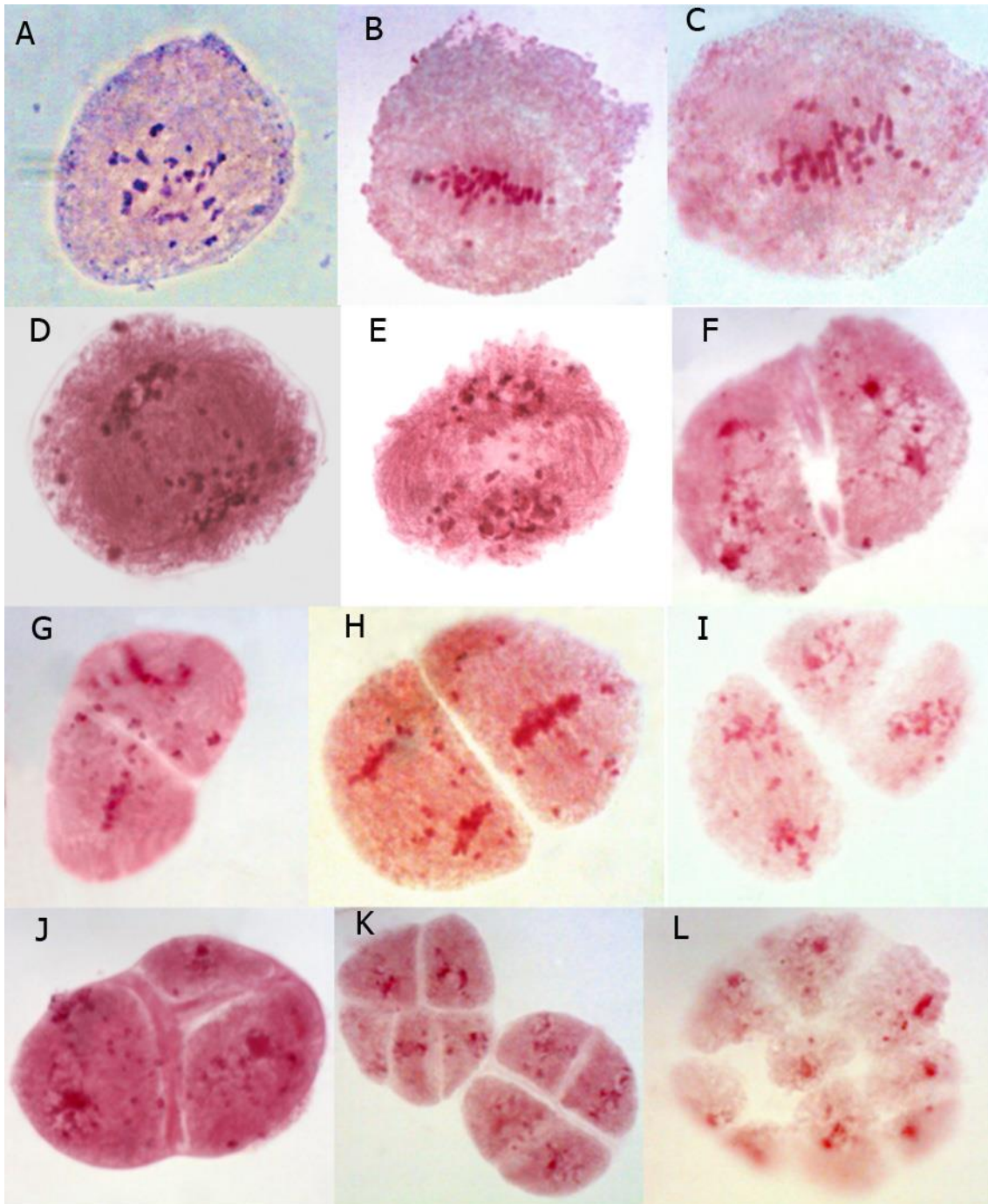


Figura 1. Meiosis del genotipo Q4312. A: Profase I; B: Metafase I; C: inicio de anafase I; D y E: Telofase I; F: Profase II; G: Profase-Metafase II; H: Metafase- y Anafase II; I: Anafase-Telofase II; J: Tríada; K: Tétrada y péntada; L: Políada.

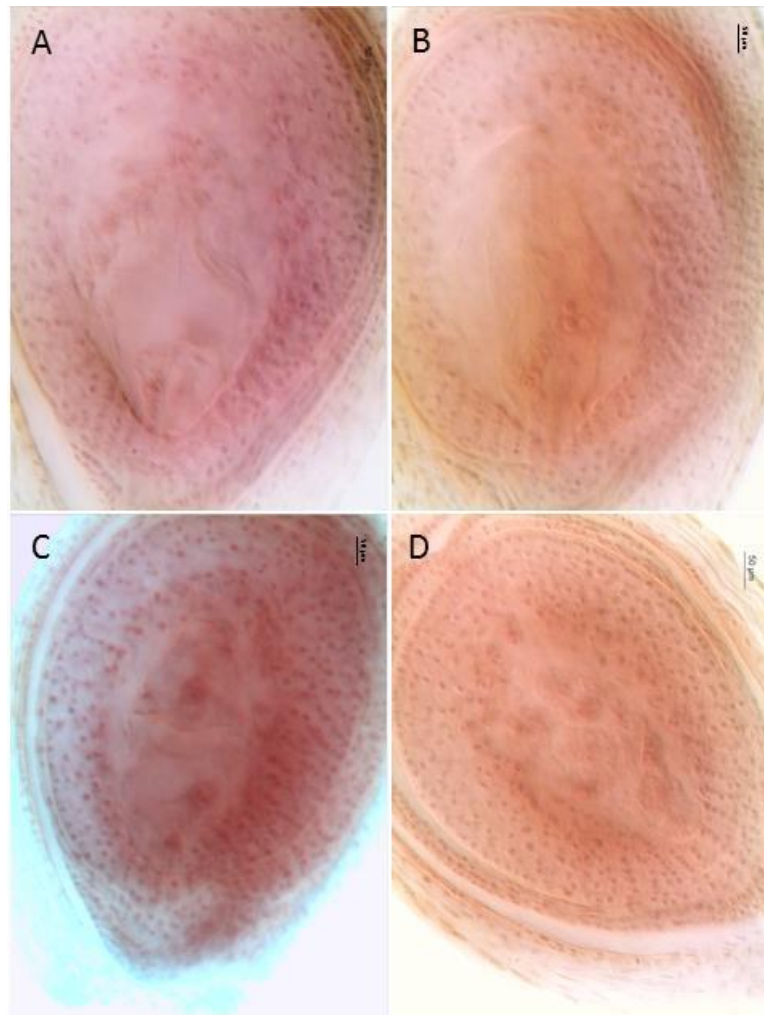


Figura 2. Análisis citoembriológico del genotipo Q4312. A) Ovario con un saco embrionario meiótico; B) Ovario con un saco embrionario apospórico; C) Ovario con dos sacos embrionarios apospóricos; D) Ovario con múltiples sacos embrionarios.

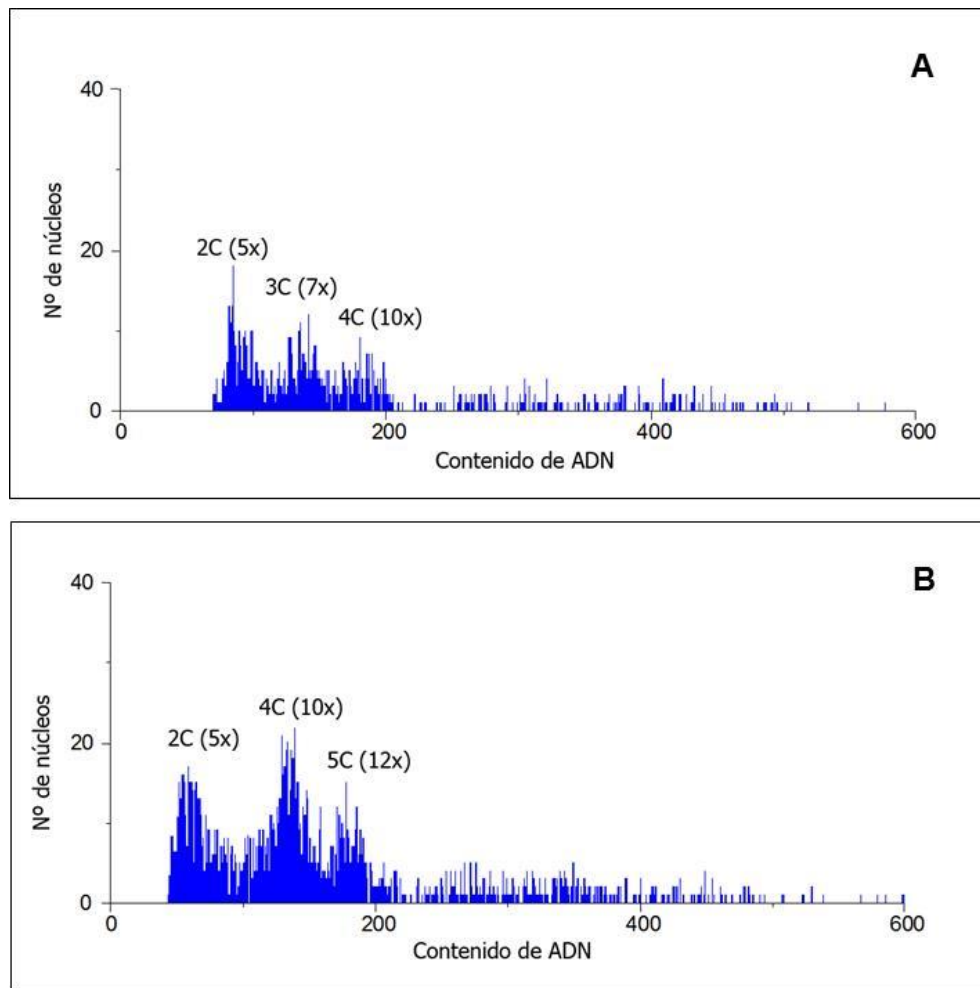


Figura 3. Histogramas de citometría de flujo en semillas individuales mostrando diferentes relaciones de contenido de ADN entre el embrión y endospermo. A) Histograma de una semilla mostrando una relación embrión 2C (5x): endospermo 3C (7x) originada a partir de la doble fertilización de un saco embrionario meiótico; B) Histograma de una semilla mostrando una relación embrión 2C (5x): endospermo 5C (12x) originada a partir de un saco embrionario apospórico que por partenogénesis de la ovocélula forma un embrión y por fecundación de la célula central binucleada forma el endospermo. Los picos indicados como 4C corresponden a los núcleos de las células del embrión que se encuentran en fase G2 después de la replicación del ADN.

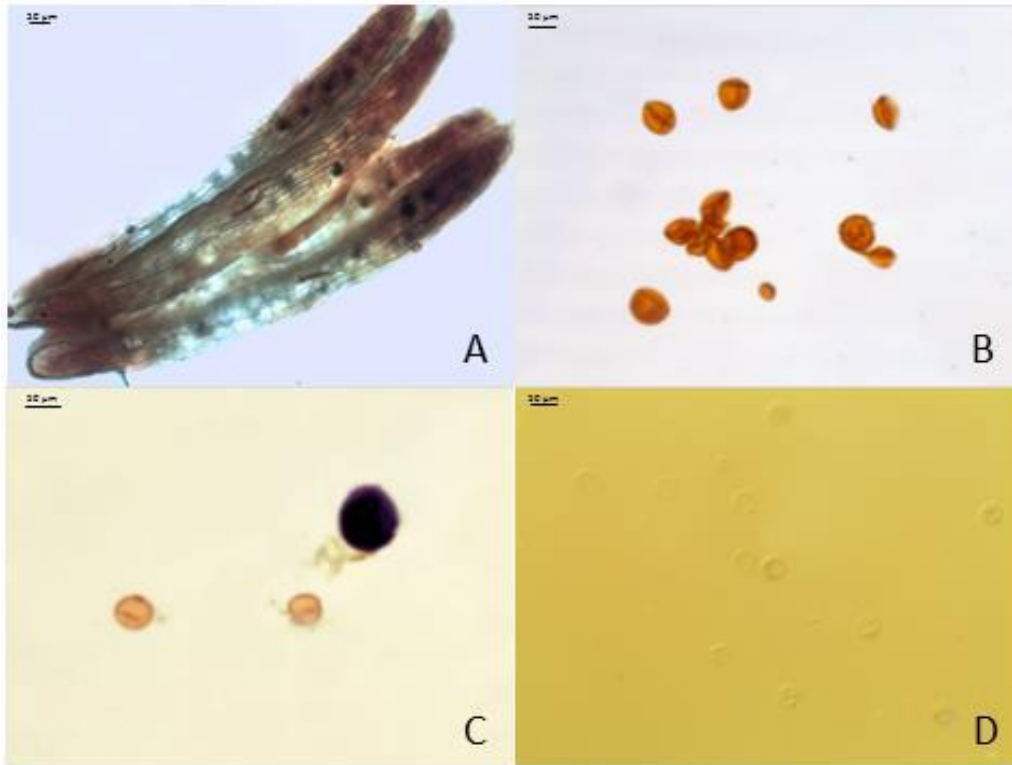


Figura 4. Análisis de viabilidad de polen del genotipo Q4312 con la técnica de tinción con Lugol y por clarificado con Metilsalicilato. A) Anteras completas indehiscentes en donde se observan algunos pocos granos de polen coloreados; B) Granos de polen sin colorear y de diferentes tamaños; C) Granos de polen pequeños sin colorear y un grano de polen de mayor tamaño coloreado; D) Granos de polen clarificados en donde se observan granos en su mayoría vacíos y de diferentes tamaños.