

## CITOLOGIA Y METODO DE REPRODUCCION EN DOS ESPECIES DE PASPALUM (GRAMINEAE) (\*)

por GUILLERMO A. NORRMANN (\*\*)

Si bien existen bases teóricas para el uso de la apomixis en el mejoramiento genético de pasturas (Harlan, 1966; Bashaw, 1975; Voigt et. al. 1977), resta aún mucho por comprender acerca de este tipo de reproducción, en especial lo relacionado al control genético del mismo y a su papel evolutivo. El mejoramiento de especies apomícticas es posible, pero requiere un conocimiento más profundo de la citología de esas especies y de los factores que gobiernan la apomixis.

Burton (1948) estableció mediante tests de progenies que *P. notatum* F1. se reproducía apomícticamente. Investigaciones posteriores revelaron que la apomixis es frecuente en el género (Bashaw y Holt, 1958; Burson, 1975; Burson y Bennett, 1970, 1971a y 1971b; y Bashaw et. al., 1970).

El objetivo del presente trabajo es el estudio de la citología, la fertilidad y el método de reproducción de *P. regnellii* Mez y *P. hydrophilum* Henr.

*Paspalum regnellii* es una especie perenne que habita en el sur de Brasil, este de Paraguay y extremo noreste de Argentina, donde está restringida a la provincia de Misiones. *P. hydrophilum* es una especie con vigorosos rizomas indefinidos, tallos erectos y follaje tierno que vive en terrenos inundables o en pantanos en las provincias de Formosa, Chaco, norte de Santa Fe y noroeste de Corrientes en Argentina.

### MATERIAL Y METODOS

Las plantas utilizadas en este trabajo fueron establecidas por medio

(\*) Trabajo Final de Graduación, Facultad de Ciencias Agrarias, U.N.N.E., 3400 Corrientes, Argentina.

(\*\*) Instituto de Botánica del Nordeste, Casilla de Correo 209, 3400 Corrientes, Argentina.

de semillas. *P. regnellii* fue coleccionado en la localidad de Montecarlo, Misiones (Quarín n° 3657). *P. hydrophilum* proviene de la localidad de Makallé, Chaco (Quarín n° 3079). Los ejemplares herborizados se hallan depositados en el Herbario del Instituto de Botánica del Nordeste (CTES).

Los recuentos cromosómicos en mitosis se efectuaron utilizando puntas de raíces. Estas fueron pretratadas en una solución saturada de 1-bromonaftaleno durante 2 hs. y posteriormente fijadas en una mezcla de alcohol etílico absoluto y ácido láctico en proporción 5:1 durante un mínimo de 2 y un máximo de 24 hs. Para su coloración se utilizó la técnica de Feulgen. Para la meiosis se utilizaron células madres del polen (CMP) coloreadas con orceína acética o con carmín acético.

El estudio del desarrollo del saco embrionario se hizo por medio de cortes seriados de ovarios en distintos estados de madurez. En enero de 1980 se escogieron inflorescencias que cubrieran el desarrollo del saco embrionario y se las fijó durante 24 hs. en FAA (90 cc de alcohol etílico 70%, 5 cc de formaldehído y 5 cc de ácido acético glacial). De cada espiguilla se separó el ovario, disecándose así aproximadamente 200 por cada especie. Como en los estados jóvenes los ovarios son muy pequeños, éstos fueron separados con parte de la espiguilla, incluyendo anteras a fin de no perder el material en los pasos siguientes. Luego se deshidrataron por medio de una serie de alcohol butílico terciario en concentraciones crecientes y se incluyeron en parafina a fin de acondicionarlos para el corte. Los ovarios fueron seccionados longitudinalmente en cortes seriados de 15 micras de espesor. Se utilizó la doble coloración con safranina y fast-green.

La fertilidad del polen fue estimada en base al porcentaje de granos que se colorean con Lugol (yodo-yoduro de potasio al 2%). No menos de 1.000 granos fueron observados para establecer el porcentaje en cada especie.

La producción de semilla se estimó en base al porcentaje de espiguillas que desarrollaron un grano, teniendo en cuenta que en el género *Paspalum* las espiguillas son unifloras. La autopolinización se logró encerrando algunas inflorescencias en bolsas de papel sulfito antes que se inicie la antesis.

## RESULTADOS

## Citología.

La observación de varias células mitóticas permitió establecer que *P. regnellii* tiene un número zigótico de 40 cromosomas, los que durante la meiosis se aparean formando siempre 20 bivalentes (II) (Fig. 1 y Cuadro 1). La segregación en anafase I es regular, con una distribución de 20 cromosomas hacia cada polo en 27 células observadas.

En *P. hydrophilum* ( $2n = 40$  cromosomas), las asociaciones cromosómicas más frecuentes, observadas en diacinesis y metafase I, son bivalentes y tetravalentes (IV) (Figs. 2-3 y Cuadro 1). En menor proporción se observaron monovalentes (I) y trivalentes (III). En una célula se observó un hexavalente (VI) y en otra un octovalente (VIII) (Fig. 2). La segregación cromosómica fue regular (20:20) sólo en 9 de las 28 células analizadas en anafase I. De las restantes células 12 mostraron una distribución 21:19, en una era de 23:17 y en las otras 6 se observaron cromosomas rezagados (Fig. 4). Estos, por lo general, parecen dividirse al final de la anafase I formando micronúcleos en telofase I.

**Cuadro 1:** Asociaciones cromosómicas observadas en Diacinesis y Metafase I en dos especies de *Paspalum*.

Especie	2n	Nº de CMP	Promedio y rango de variación por célula de					
			I	II	III	IV	VI	VIII
<i>P. regnellii</i>	40	122		20 (20)				
<i>P. hydrophilum</i>	40	127	0.4 (0-5)	13.8 (6-20)	0.09 (0-1)	2.9 (0-7)	0.01 (0-1)	0.01 (0-1)

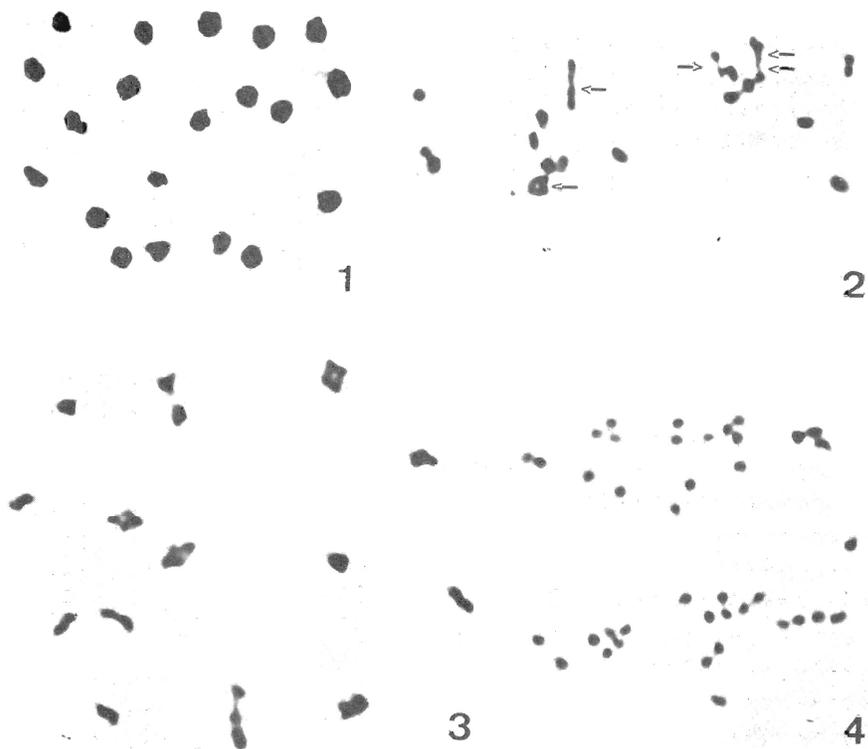


Fig. 1-4: Cromosomas meióticos en *P. regnellii* y *P. hydrophilum*. 1: *P. regnellii*, prometafase I mostrando 20 II. 2-4: *P. hydrophilum*. 2: metafase con 2 I + 9 II + 3 IV (flechas) + 1 VIII (doble flecha). 3: prometafase I con 8 II y 6 IV. 4: anafase I con un cromosoma rezagado ( x ca 1700).

#### Megasporogénesis y desarrollo del saco embrionario. (Fig. 5)

En *P. regnellii* la megasporogénesis y el desarrollo del saco embrionario siguen el modelo típico de las plantas sexuales de las Gramíneas. De una célula de la nucela se diferencia una célula arqueosporial, la que se distingue por su mayor tamaño, el citoplasma más claro, el nucleolo más grande, y por hallarse rodeada de calosa. Esta célula arqueosporial se divide meióticamente dando lugar a la formación de una tétrade lineal de megásporas. El proceso meiótico ocurre casi simultáneamente en

Especie	Megasporogénesis				Saco embrionario					%
					Desarrollo				Madurez	
<i>Paspalum regnellii</i>										100
<i>Paspalum hydrophilum</i>										16
										32
										52

Fig. 5: Esquema de la megasporogénesis y desarrollo del saco embrionario en ,. *P. regnellii* y *P. hydrophilum*.

Punteado = 2n.

En blanco = n.

Contorno simple = origen en tejido arquesporial.

Contorno doble = origen en tejido nucelar.

anteras y ovarios. Inmediatamente, las tres megásporas ubicadas hacia la micrópila degeneran, quedando como funcional la que está hacia la chalaza. Esta aumenta en volumen, adquiere un citoplasma densamente coloreado y luego, mediante tres divisiones mitóticas, forma un saco octonucleado del tipo *Polygonum*. El estado octonucleado es muy breve, ya que las antípodas proliferan formando una masa de células por lo general binucleadas. Así entonces, el saco embrionario maduro presenta la siguiente constitución: la oosfera en el extremo micropilar, rodeada por dos sinérgidas ya deterioradas y con citoplasma densamente teñido; cercanos a la oosfera se ubican los cuerpos polares fácilmente detectables por sus nucleolos grandes y bien coloreados de rojo; luego, en el otro extremo del saco y separada de la oosfera y los cuerpos polares por grandes vacuolas, se encuentra una masa de antípodas en número difícil de determinar. El óvulo es anátropo.

En *P. hydrophilum*, la megasporogénesis es como en *P. regnellii*, salvo que la meiosis en la célula arquesporial ocurre con posterioridad al correspondiente proceso meiótico en las células madres del polen. Antes de que los tegumentos se desarrollen completamente, se diferencia una célula arquesporial en la nucela, la que se divide meióticamente para dar lugar a la formación de una tétrade lineal de megásporas. En algunos casos, las tres megásporas ubicadas hacia la micrópila degeneran, quedando la ubicada hacia la chalaza como funcional. Esta se divide mitóticamente formando posteriormente un saco embrionario sexual tal como ya fuera descrito para *P. regnellii*. En otros ovarios, sin embargo, se observó que las cuatro megásporas degeneran. Independientemente del posterior desarrollo o deterioro de la megáspora funcional, en gran parte de los ovarios analizados se pudo apreciar que una o algunas células nucelares adquieren un citoplasma muy denso y aumentan su volumen. Estas células se dividen para dar lugar a la formación de sacos embrionarios apospóricos; uno o algunos de éstos completan su desarrollo y el resto parecería ser aplastado por los que logran desarrollarse. Estos sacos apospóricos se caracterizan por presentar un número variable de núcleos, generalmente 3 ó 4. Carecen de antípodas, o si las hay, no es en gran número. La orientación y/o ubicación de estos sacos en el óvulo es generalmente distinta a la de

un saco normal. De esta manera, en ovarios maduros se observó un 16% de óvulos con un saco sexual, un 32% con un saco sexual y uno o más apospóricos, y un 52% con sacos apospóricos.

### Fertilidad.

En *P. regnellii* el porcentaje de granos de polen coloreados es elevado (90 %), como también lo es la producción de semillas, tanto en condiciones de polinización libre (84 %) como autopolinización obligada (80%). Tales porcentajes fueron determinados en base al recuento de por lo menos 500 espiguillas para cada caso.

En *P. hydrophilum* el porcentaje de granos de polen coloreados es del 70%. El porcentaje de espiguillas que producen semillas es muy bajo, tanto en condiciones de autopolinización (17%) como de polinización libre (23%). Ambos porcentajes fueron determinados en base al recuento de por lo menos 350 espiguillas para cada caso.

## DISCUSION

Este es el primer recuento cromosómico para *P. regnellii*. Citológicamente esta especie se comporta como un alotetraploide ( $2n = 4x = 40$ ), observándose regularmente 20 bivalentes en metafase meiótica.

Su fórmula genómica podría expresarse como RRSS, donde no existe homología entre el genomio R y el S. Del análisis de la megasporogénesis y del desarrollo del saco embrionario se deduce que esta especie se reproduce sexualmente.

Los resultados obtenidos para coloración de polen (90%) y para producción de semillas (84%), demuestran que *P. regnellii* es una especie de elevada fertilidad, lo cual no es común en el género. El porcentaje de espiguillas que producen semillas en condiciones de autopolinización obligada (80%), demuestra asimismo que es una especie auto-compatible.

El mejoramiento de *P. regnellii*, por ser una especie de reproducción sexual, puede ser llevado a cabo por métodos convencionales y, dada

su fertilidad, podría resultar de interés en cruzamientos para elucidar relaciones interespecíficas.

*P. hydrophilum* Henr. posee  $2n = 4x = 40$  cromosomas, lo que coincide con el recuento hecho por Quarín (1977). La ocurrencia de tetravalentes en meiosis sugiere la presencia de dos genomios relacionados. Dado que el promedio de tetravalentes por célula no es alto (2,9), es dable suponer que estos genomios no son totalmente homólogos. En tal sentido, podrían ser designados H H H' H', donde existe homología segmentaria entre los genomios H y H'. Las asociaciones de seis y ocho cromosomas podrían deberse a translocaciones heterocigóticas recíprocas, o bien podrían estar apoyando la idea de que el número básico ancestral en *Paspalum* debió ser  $x = 5$  (Forbes y Burton, 1961; Quarín y Hanna, 1980).

El análisis de la megasporogénesis y desarrollo del saco embrionario indican que esta especie es apomíctica facultativa. El sistema de reproducción de esta especie es, por lo tanto, muy semejante al de los autotetraploides inducidos de *P. hexastachyum* (Quarín y Hanna, 1980).

La producción de semilla es pobre (23%), lo que podría ser debido a un efecto nocivo de la competencia por el espacio en el desarrollo ulterior de los sacos embrionarios. Esto es, el crecimiento simultáneo de embriones y endospermas en un óvulo con varios sacos embrionarios, podría determinar el deterioro de todas las estructuras en formación.

### Summary

Microsporogenesis, megasporogenesis, embryo sac development, and fertility were studied in *P. regnellii* Mez and *P. hydrophilum* Henr.

The chromosome number of *P. regnellii* ( $2n = 40$ ) is reported for the first time. Bivalent chromosome pairing suggests allotetraploid origin for this species with RRSS genome formula. There is no homology between R and S genomes. Cytological data suggest that *P. hydrophilum* ( $2n = 40$ ) has a H H H' H' genome formula with segmental homology between H and H' genomes. Observations on megasporogenesis

and embryo sac development indicate that *P. regnellii* reproduces sexually and *P. hydrophilum* by means of facultative apomixis.

### Agradecimientos

Deseo agradecer al Ing. Agr. Camilo Quarín por la sugerencia del tema, el asesoramiento brindado y su colaboración en el desarrollo de este trabajo. Al Ing. Agr. Aveliano Fernández por su ayuda en el estudio de algunas células y en el manejo de técnicas de coloración. Al director del Instituto de Botánica del Nordeste Ing. Agr. Antonio Krapovickas, y a sus integrantes, por las facilidades brindadas para la realización de este trabajo.

### Bibliografía

- Bashaw, E.C. 1975. Problems and possibilities of apomixis in the improvement of tropical forage grasses. p. 23-30. *In* E.C. Doll and G.O. Mott (eds.) Tropical Forages in Livestock Production Systems. Agron. Special Publ. 24. Am. Soc. of Agron., Madison, WI.
- Bashaw, E.C. and E.C. Holt. 1958. Megasporogenesis embryosac development and embryogenesis in dellisgrass, *Paspalum dilatatum*. Agron. J. 50: 755-756.
- Bashaw, E.C.; A. W. Hovin and E.C. Holt. 1970. Apomixis, its evolutionary significance and utilization in plant breeding. p. 245-248. *In* Int. Grassland Cong. Proc., 11th (Queensland, Australia).
- Burson, B.L. 1975. Cytology of some apomictic *Paspalum* species. Crop Sci. 15: 229-232.
- Burson, B.L.; and H.W. Bennett. 1970. Cytology and reproduction of three *Paspalum* species. J. Hered. 61: 129-132.
- Burson, B.L.; and H.W. Bennett. 1971a. Chromosome numbers, megasporogenesis, and mode of reproduction of seven *Paspalum*

- species. *Crop Sci.* 11: 292-294.
- Burson, B.L.; and H.W. Bennett, 1971b. Meiotic and reproductive behaviour of some introduced *Paspalum* species. *J. Miss. Acad. Sci.* 17: 5-8.
- Burton, G.W. 1948. The method of reproduction in common bahia-grass *Paspalum notatum*, *J. Am. Soc. Agron.* 40: 443-452.
- Forbes Jr., I.; and G.W. Burton. 1961. Cytology of diploids, natural and induced tetraploids, and intraspecies hybrids of bahia-grass *Paspalum notatum* Flugge. *Crop Sci.* 1: 402-406.
- Harlan, J.R. 1966. The use of apomixis in the improvement of tropical and subtropical grasses. *Int. Grassland Congr., Proc. 9th* (Sao Paulo, Brazil) 1: 191-193.
- Quarín, C. 1977. Recuentos cromosómicos en gramíneas de Argentina Subtropical. *Hickenia* 1: 73-78.
- Quarín, C. and W.W. Hanna. 1980. Effect of three ploidy levels on meiosis and mode of reproduction in *Paspalum hexastachyum*. *Crop Sci.* 20: 69-75.
- Voigt, P.W.; B.L. Burson and M.C. Engelke. 1977. Breeding apomictic grasses. p. 104-112. *In Proc. 34th Southern Pasture and Forage Crop Improvement Conf.*