

## CITOEMBRIOLOGÍA Y COMPORTAMIENTO REPRODUCTIVO DE UN CITOTIPO DIPLOIDE DE *PASPALUM HYDROPHILUM* Y SUS HÍBRIDOS CON *P. PALUSTRE* (POACEAE, PANICEAE)

ERIC J. MARTÍNEZ<sup>1</sup> & CAMILO L. QUARÍN<sup>2</sup>

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

ABSTRACT: Martínez, E. J. & Quarín, C. L. 1999. Cytoembryology and reproductive behavior of diploid *Paspalum hydrophilum* and its hybrids with *P. palustre* (Poaceae, Paniceae). *Darwiniana* 37(3-4): 243-251.

*Paspalum hydrophilum* Henrard is a tetraploid, facultative apomictic, pseudogamous and self-compatible species for which occasional diploid and triploid plants have also been found. Three new plant collections from Mato Grosso, Brasil, were cytologically and embryologically surveyed. All three accessions were diploid ( $2n = 2x = 20$ ), sexual, and allogamous due to self-incompatibility. Reciprocal crosses concerning two diploid *P. hydrophilum* accessions and one plant of diploid *P. palustre* Mez produced several interspecific hybrids. Crossability, the number of hybrids obtained for every 100 pollinated spikelets, ranged from approximately 8% to 28%. The hybrids showed regular meiotic behaviour with 10 bivalent chromosome associations at meiosis, indicating a high chromosome homology among these species. The  $F_1$  hybrids inherited self-incompatibility from both parents, attributable to pollen-pistil interactions that arrested pollen tube growth at the central axis of the stigma. Low seed fertility was observed under open pollination. Seed performance ranged up to approximately 23% when parental pollen was dusted on hybrids. This performance may allow to transfer genes among these species. Our results showed a close phylogenetic relationship between *P. hydrophilum* and *P. palustre* and indicate the feasibility of interspecific genetic exchange. Though the distribution area of *P. palustre* overlaps the more extensive area of *P. hydrophilum*, natural hybridization was not observed. Allopatry of the diploid cytotypes of these species may account for lack of natural hybridization.

Key words: *Paspalum hydrophilum*, *Paspalum palustre*, Interspecific hybrids, Genomic relationships, Breeding system.

RESUMEN: Martínez, E. J. & Quarín, C. L. 1999. Citoembriología y comportamiento reproductivo de un citotipo diploide de *Paspalum hydrophilum* y sus híbridos con *P. palustre* (Poaceae, Paniceae). *Darwiniana* 37(3-4): 243-251.

*Paspalum hydrophilum* Henrard es una especie tetraploide, apomíctica facultativa, pseudógama y autocompatible. También se ha mencionado la existencia ocasional de plantas diploides y triploides. Aquí se estudian tres nuevas colecciones de plantas originarias de Mato Grosso, Brasil. Las tres resultaron ser diploides ( $2n = 2x = 20$ ), sexuales, y alógamas debido a autoincompatibilidad. Se lograron varios híbridos interespecíficos al realizar cruzamientos recíprocos entre una planta diploide de *P. palustre* Mez y dos de las plantas de *P. hydrophilum*. La capacidad de producir híbridos varió entre el 8 y el 28% de las espiguillas polinizadas. Los híbridos logrados mostraron meiosis regular con formación de 10 bivalentes, indicando un alto grado de homología entre los cromosomas de estas especies. Los híbridos heredaron de los padres la autoincompatibilidad, y en general produjeron muy pocas semillas en polinización libre. La polinización con polen de los padres aumentó la producción de semillas, llegando en algunos casos hasta el 23% de las espiguillas polinizadas. Este nivel de fertilidad en retrocruzas indica que es posible la transferencia de genes entre estas especies. A pesar de que el área de distribución de *P. palustre* abarca parte del área general de distribución de *P. hydrophilum*, no hemos registrado en los herbarios ejemplares con características semejantes a los híbridos logrados ni hemos observado en el campo plantas que pudiesen ser consideradas híbridas.

Palabras clave: *Paspalum hydrophilum*, *Paspalum palustre*, Híbridos interespecíficos, Relaciones genómicas, Sistema reproductivo.

<sup>1</sup> Becario de Perfeccionamiento, CONICET

<sup>2</sup> Miembro de la Carrera del Investigador, CONICET

## INTRODUCCIÓN

*Paspalum* L. es uno de los géneros de Gramíneas con mayor número de especies dentro de la tribu de las *Panicaceae*. Posee una amplia distribución geográfica en regiones tropicales y templado-cálidas del Nuevo Mundo. Presenta una gran variedad de formas, hábitos de crecimiento, niveles de ploidía (desde  $2x$  hasta  $16x$ ), y sistemas reproductivos. La apomixis es frecuente en los poliploides, mientras que la reproducción sexual puede presentarse tanto en diploides como en poliploides, desde la autogamia más extrema (cleistogamia) hasta alogamia debida a autoincompatibilidad (Quarín, 1992).

Barreto (1954) ubicó tentativamente a *P. palustre* Mez en el grupo informal *Virgata* de Chase (1929), al considerarla una especie muy afín a *P. wetsteinii* Hackel. Por su parte Chase (manuscrito inédito) consideró a *Paspalum hydrophilum* Henrard y a *P. palustre* integrantes del grupo *Plicatula*, en el subgrupo de especies palustres o subacuáticas. Barreto (1974) segregó *P. hydrophilum* en un nuevo grupo informal, *Modesta*, con *P. modestum* Mez y *P. boscianum* Flügge.

*Paspalum hydrophilum* se distribuye en el suroeste de Brasil, noreste de la Argentina y Paraguay. Es una especie que habita terrenos inundables o pantanosos y forma matas con tallos huecos y erectos de 1-1.5 m de altura, con poderosos rizomas arqueados, escamosos y generalmente terminados en una macolla. Posee inflorescencias de 4-10 racimos alternos y espiguillas oblongas, glabérrimas, ocráceas, plano-convexas, lemma estéril con escasos pliegues transversales y antecio castaño oscuro a la madurez.

Se han mencionado para *P. hydrophilum* citotipos tetraploides ( $2n = 4x = 40$ ) de reproducción apomítica facultativa (Quarín, 1977; Norrmann, 1981), como así también triploides (Honfi et al., 1990). Recientemente se han hecho colecciones de plantas diploides (recuentos mitóticos) en los estados de Mato Grosso y Mato Grosso do Sul, Brasil (Pozzobon, comunicación personal), y se obtuvieron esos materiales para la presente investigación.

*Paspalum palustre* posee una distribución geográfica muy pequeña, cerca de la confluencia de los ríos Paraguay y Paraná en el norte de la Argentina y sur de Paraguay (Quarín & Burson, 1991). Es una especie acuática caracterizada por largos tallos hue-

cos, multinodos, con manojos de raíces fasciculadas en los nudos. Los tallos son generalmente flotantes, aunque ante la falta de agua pueden anclarse al suelo por las raíces de los nudos. Las vainas foliares presentan grandes cámaras aeríferas y las láminas poseen un nervio central muy notable, aerenquimatoso, de color blanquecino. Posee inflorescencias fasciculadas con 8-10 racimos y espiguillas elíptico-lanceoladas, glabras, verde oliváceas durante la floración que se vuelven castañas si se desarrolla la cariopsis. El antecio es castaño oscuro a la madurez.

*Paspalum palustre* es diploide ( $2n = 2x = 20$ ) y alógama por autoincompatibilidad (Quarín & Burson, 1991). Es probable que también existan plantas tetraploides apomíticas, ya que en *Paspalum* es muy común que los diploides sexuales y autoincompatibles posean una contraparte co-específica tetraploide apomítica (Quarín, 1992).

Si bien ambas especies poseen marcadas diferencias morfológicas y en cuanto al hábitat, las mismas presentan interesantes afinidades, las que podrían indicar que es posible lograr híbridos a nivel diploide que puedan ser elevados a nivel tetraploide y estudiar en los anfiploides el sistema reproductivo. Esto sería de interés porque muchas veces se ha postulado que la hibridación interespecífica y la poliploidia se asocian con apomixis (Darlington, 1939; de Wet & Harlan, 1970; Gröber et al., 1974, 1976 citado por Asker, 1979). Por otro lado, ambas han sido incluidas en el grupo *Plicatula* donde las especies tetraploides hasta hoy estudiadas son todas apomíticas (Pritchard, 1970; Bashaw et al., 1970; Burson & Bennett, 1971).

En primer lugar, este estudio tuvo por objeto describir para *Paspalum hydrophilum*: 1) la variación exomorfológica encontrada en distintas colecciones de este citotipo, 2) el apareamiento cromosómico observado en meiosis, y 3) el método reproductivo a través del estudio de los procesos embriológicos, del sistema de polinización, y de la producción de semillas.

En segundo lugar, se produjeron híbridos interespecíficos recíprocos a nivel diploide entre *P. palustre* y *P. hydrophilum* con el objeto de: 1) establecer las relaciones genómicas que pudieran existir entre las especies, y 2) determinar la factibilidad de introgresión génica.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Las plantas utilizadas y sus correspondientes lugares de origen están descritas en la Tabla 1. Las tres plantas de *P. hydrophilum* fueron coleccionadas en localidades del estado de Mato Grosso do Sul, Brasil, por los Dres. J. F. M. Valls (V-10508 y V-10370) y A. Pott (P-2114), y los ejemplares de herbario están depositados en CEN. Estas colecciones están cultivadas en terrenos de la Facultad de Ciencias Agrarias, Corrientes, donde dos de ellas se herborizaron nuevamente y recibieron números de colección de uno de nosotros (Quarín), y se depositaron en el herbario CTES. El detalle de los números asignados es: Q-4173 corresponde a P-2114 y Q-4174 corresponde a V-10508. Por otra parte, la accesión Q-3648 de *P. palustre* también se mantiene en cultivo y pertenece a la colección hecha en las cercanías del puerto de Antequeras, Chaco, Argentina.

El número cromosómico para cada accesión fue determinado por recuento de cromosomas somáticos en aplastados de ápices de raíces, pretratadas con una solución saturada de alfabromonaftaleno durante dos horas, fijadas e hidrolizadas en ácido clorhídrico 1N a 60 °C y coloreadas con Feulgen.

Se realizaron cruzamientos recíprocos utilizando solo dos plantas de *Paspalum hydrophilum* (V-10508 y P-2114) y una de *P. palustre* (Q-3648). Los cruzamientos se realizaron en el campo y consistieron en polinizar espiguillas en antesis, sin previa castración, durante la mañana temprano y por cuatro a cinco días seguidos, hasta completar toda la inflorescencia. Las inflorescencias fueron aisladas antes de la antesis mediante un sobre de papel sulfito y se mantuvieron en esa condición después de la polinización y hasta la madurez de las cariopsis.

Se analizaron características exomorfológicas de los padres y de los híbridos  $F_1$ , tales como la longitud y anchura de la lámina foliar, longitud, diámetro y número de nudos de los tallos florales; número de racimos por inflorescencia, longitud del racimo apical y basal; longitud del eje central de la inflorescencia; y largo y ancho de las espiguillas. Estas observaciones permitieron identificar rápidamente en la progenie cuáles eran las plantas híbridas.

Para el estudio de la meiosis, tanto de los padres como de los híbridos, se coleccionaron inflores-

encias jóvenes, las que fueron fijadas en una solución de alcohol absoluto y ácido acético en proporción 3:1 durante 24 horas y luego conservadas en etanol 70° a 5° C. Las células madres del polen (CMPs) fueron coloreadas con carmín acético 2% y examinadas mediante un microscopio con contraste de fases.

Los estudios relacionados con el sistema reproductivo de los padres y de algunos híbridos incluyeron: análisis citoembriológicos, determinación de la compatibilidad polen-pistilo, viabilidad del polen y producción de semillas en diferentes condiciones de polinización.

Para el estudio de la megasporogénesis y el desarrollo de los sacos embrionarios se fijaron inflorescencias en FAA (etanol 70°: ácido acético glacial: formaldehído 37%, 18:1:1), con espiguillas en diferentes estados de desarrollo; éstas fueron removidas de las inflorescencias, deshidratadas en una serie de alcohol butílico terciario, embebidas en parafina, seccionadas a 12  $\mu$ m, coloreadas con safranina-fast green, y examinadas mediante un microscopio de luz transmitida. En los híbridos solamente se analizaron los sacos embrionarios maduros mediante la técnica de clarificado de ovarios de Herr (1971) y posterior observación mediante un microscopio de contraste de interferencia diferencial (DIC).

La viabilidad del polen fue determinada en forma indirecta en función de la coloración de los granos de polen con lugol (Iodo - Ioduro de Potasio al 1%). Se observó un mínimo de 500 granos de polen de cada progenitor y de algunos híbridos.

La compatibilidad polen-pistilo fue determinada mediante la técnica de Kho & Baër (1968).

La producción de semillas fue medida en condiciones de autopolinización, polinización libre y polinización manual. La autopolinización se logró aislando las inflorescencias previamente a la antesis, mediante sobres de papel transparente, permaneciendo de esta manera hasta la madurez de las semillas. La producción de semillas en polinización libre consistió en permitir que los híbridos se cruzaran libremente para luego ensobrar las inflorescencias antes de la madurez de las semillas. La polinización manual consistió en la polinización diaria de inflorescencias con polen recolectado de otros genotipos. En el caso de los híbridos también fueron polinizados con polen de los progenitores.

Tabla 1.- Origen e identificación del material estudiado.

Especie	Identificación	Localidad de origen
<i>Paspalum hydrophilum</i> Henrard	V-10508	BRASIL. Mato Grosso. Nossa Senhora do Livramento.
	V-10370	BRASIL. Mato Grosso do Sul. Corumbá.
	P-2114	BRASIL. Mato Grosso do Sul. localidad desconocida.
<i>Paspalum palustre</i> Mez	Q-3648	ARGENTINA. Chaco. Antequeras.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### I. *Paspalum hydrophilum*

#### *Características exomorfológicas*

La observación de las características exomorfológicas y el hábito de crecimiento demostró que las tres plantas estudiadas son una buena representación de la gran variación existente en esta especie (Tabla 2). La planta de la colección V-10508 forma una mata bien erecta, con inflorescencias, racimos y espiguillas levemente menores a las otras plantas. Por su parte, la planta P-2114 forma una mata abierta, con muchos tallos decumbentes y láminas foliares levemente más largas y anchas que V-10508, pero menores que en V-10370. Las inflorescencias de P-2114 tienen mayor número y longitud de racimos, con una mayor separación entre los racimos basales y apicales, además de espiguillas levemente más largas que V-10508. La accesión V-10370 forma matas erectas al igual que V-10508, pero se diferencia de la misma por poseer láminas foliares más largas y anchas, además de tallos florales más robustos e inflorescencias con racimos más largos.

#### *Meiosis*

Las tres accesiones estudiadas V-10508, V-10370 y P-2114 son diploides ( $2n = 2x = 20$ ) y poseen una meiosis regular con asociaciones de 10 bivalentes por célula madre del polen (CMP) (Tabla 3). En siete CMP de la accesión V-10508 se observaron 2 univalentes y 9 bivalentes. No obstante, la anafase I tuvo una segregación cromosómica regular sin que se observen cromosomas rezagados.

#### *Megasporogénesis y Megagametogénesis*

Es similar en las tres accesiones estudiadas. La célula madre de las megásporas (CMM) es alargada en dirección micrópila-calaza. La división meiótica da origen a una tétrade lineal de megásporas. Inmediatamente las tres megásporas ubicadas hacia la micrópila degeneran, mientras que la ubicada hacia el extremo calazal constituye la megáspora funcio-

nal. Por medio de tres divisiones mitóticas consecutivas se forma un saco embrionario meiótico del tipo *Polygonum*, caracterizado por una oósfera, dos sinérgidas, una célula central con dos núcleos y tres antípodas. Estas últimas, luego de varias divisiones mitóticas dan origen a una masa de antípodas, característica de la mayoría de las gramíneas.

La observación de 100 óvulos maduros, clarificados y observados con óptica DIC, reveló que en la accesión V-10508 el 53 % contenía un saco embrionario maduro; mientras que el 47 % restante mostraba sacos inmaduros, poco desarrollados o abortados (Tabla 4). Por otro lado la accesión P-2114 tenía un 72 % de sacos meióticos, mientras que en el 38 % restante fueron inmaduros y abortados. En ningún óvulo analizado se observó la presencia de sacos embrionarios no reducidos de tipo apospórico. Esto demuestra que las razas diploides ( $2n = 2x = 20$ ) de *P. hydrophilum* son de reproducción sexual.

#### *Fertilidad*

La viabilidad del polen solo pudo medirse en las dos accesiones utilizadas en los cruzamientos (V-10508 y P-2114), debido a que la planta V-10370 no floreció adecuadamente. Los valores promedios para ambas plantas fueron del 60 % de granos coloreados con lugol (yodo-ioduro de potasio).

La compatibilidad polen-pistilo medida en condiciones de autopolinización demostró que los granos de polen germinaron en escaso número y los pocos tubos polínicos observados, sólo llegaban al eje del estigma. Por el contrario, en polinización cruzada, se observó una gran cantidad de granos de polen germinados, cuyos tubos polínicos penetraban en el óvulo a través de la micrópila.

La producción de semillas en autopolinización fue prácticamente nula, lo cual confirma el carácter de autoincompatibilidad determinado en la reacción polen-pistilo. En polinización manual se observaron porcentajes de producción de semillas del 23% y 12.2 % para V-10508 y P-2114 respectivamente (Ta-

Tabla 2.- Características morfológicas de *P. hydrophilum*, *P. palustre* y sus respectivos híbridos. Todos los datos numéricos son promedios. En el caso de los padres, los datos se tomaron de una sola planta, y en el caso de los híbridos, corresponden a cuatro plantas de cada combinación híbrida, tomadas al azar.

Especie o híbrido	Lámina foliar Longitud (cm)	Ancho (cm)	Caña floral Diámetro (mm)	Nro. de espigas	Nro. de racimos	Long. basal (cm)	Long. apical (cm)	Long. de espiga (mm)	Long. de espiguilla (mm)
<i>P. hydrophilum</i> V-10508	31,3	0,6	2,5	13	8	3,9	7,0	2,0	1,3
<i>P. hydrophilum</i> P-2114	35,0	0,8	3,0	10	10	5,0	10,5	2,5	1,2
<i>P. palustre</i> Q-3648	33,5	0,8	3,0	13	10	9,3	6,4	3,0	1,5
<i>P. hydrophilum</i> V-10508 x <i>P. palustre</i> Q-3648	18,9	0,6	4,4	13	7	6,4	6,4	2,5	1,5
<i>P. palustre</i> Q-3648 x <i>P. hydrophilum</i> V-10508	25,3	0,9	3,0	18	8	5,1	7,4	2,4	1,4
<i>P. palustre</i> Q-3648 x <i>P. hydrophilum</i> P-2114	18,8	0,7	4,0	14	8,5	5,4	5,5	2,6	1,5
<i>P. hydrophilum</i> P-2114 x <i>P. palustre</i> Q-3648	14,4	0,6	4,2	13	9,7	5,4	6,1	2,5	1,4

bla 5). El bajo valor de la accesión V-10370 se debió a una pobre floración, probablemente relacionada con las condiciones de cultivo. Los valores de polinización libre fueron muy bajos y también pudieron estar relacionados con dichas condiciones y al hecho de que solo había tres plantas en cultivo.

Este estudio determinó que las tres accesiones de *P. hydrophilum* son diploides, sexuales y autoestériles. Este hallazgo es importante ya que en esta especie existen tetraploides naturales de reproducción apomítica (Norrmann, 1981); como así también triploides (Honfi et al., 1990). En *Paspalum* es muy característica la presencia de especies con razas diploides, de reproducción sexual y autoincompatibles, con contrapartes coespecíficas autotetraploides, apomíticas,seudógamas y autofértiles (Quarín, 1992). De acuerdo a Quarín (1992) los autoploides probablemente se originen en dos etapas; en primer lugar, una gameta femenina no reducida (2n) de una planta diploide es fecundada por una gameta masculina normal (n) para formar un triploide (2n + n = 3x). Estos triploides eventuales surgidos en poblaciones diploides, pueden ocasionalmente producir descendientes B<sub>III</sub> al ser polinizados por plantas diploides (2n + n = 4x). En el caso de *P. hydrophilum* se han encontrado de hecho triploides naturales (Honfi et al. 1990). Por otra parte, en otras especies de *Paspalum* y en condiciones experimentales se produjeron híbridos

triploides y tetraploides cuando plantas diploides fueron polinizadas con polen de un tetraploide apomítico (Quarín et al. 1984). Con estos mecanismos estas especies concretan el intercambio génico entre las razas diploides sexuales y las tetraploides apomíticas de manera semejante a los ciclos diploide-tetraploide-dihaploide observados en otras gramíneas como *Oryzanthium* (de Wet, 1968) y *Panicum* (Savidan & Fernès, 1982)

**II. Híbridos**

*Capacidad de cruzamiento*

Un total de 109 flores de *P. hydrophilum* (V-10508) fueron polinizadas con polen de *P. palustre* (Q-3648) y se obtuvieron 127 plantas, todas de origen híbrido (capacidad de cruzamiento: 11,5 %). Para el cruzamiento recíproco, se polinizaron 178 flores y se obtuvieron 59 plantas, de las cuales 50 fueron híbridos (capacidad de cruzamiento: 28.1 %), mientras que las 9 restantes tenían las características fenotípicas de la especie que actuó como madre, por lo que se consideró que se habían originado por autofecundación. Por otra parte, se polinizaron 23 espiguillas de *P. hydrophilum* (P-2114) con polen de *P. palustre* (Q-3648) y se obtuvieron 3 híbridos (capacidad de cruzamiento: 13.0 %). En el cruzamiento recíproco se polinizaron 64 espiguillas y se obtuvieron 5 híbridos (capacidad de cruzamiento: 7.8 %).

Tabla 3.- Promedio de asociaciones cromosómicas por célula madre del polen (CMP) en diacinesis y metafase I de la meiosis de *Paspalum palustre*, de tres accesiones de *P. hydrophilum* (V-10508, V-10370 y P-2114) y de sus híbridos interespecíficos.

(<sup>a</sup>) Tomado de Quarín & Burson (1991)

#### *Características exomorfológicas*

La mayoría de los híbridos obtenidos mostraron buen vigor vegetativo. Todos exhibieron características exomorfológicas intermedias entre ambos padres (Tabla 2), lo cual facilitó su identificación y su diferenciación de las pocas plantas que surgieron por autofecundación.

#### *Meiosis*

Los híbridos, en todas sus combinaciones, mostraron una meiosis regular con asociaciones cromosómicas de 10 bivalentes en diacinesis y metafase I (Fig. 1). En algunos de ellos se observó la presencia de univalentes, pero en muy bajo porcentaje (Tabla 3). La anafase I fue regular sin que se observen cromosomas rezagados. Esto demuestra que ambas especies poseen genomas altamente homólogos.

#### *Embriología*

Todos los híbridos analizados se caracterizaron por la presencia de sacos embrionarios meióticos, aunque algunos de ellos poseían valores elevados de sacos inmaduros, poco desarrollados, u óvulos carentes de sacos embrionarios (abortados). En general, el porcentaje de óvulos con sacos meióticos bien desarrollados, para los distintos híbridos, varió entre valores cercanos al 22 y 52 por ciento (Tabla

4). No se observó actividad nucelar que pudiera indicar desarrollo de sacos apospóricos en ninguno de los óvulos de las 5 plantas analizadas. Esto demuestra que los híbridos son de reproducción sexual al igual que sus progenitores.

#### *Fertilidad*

La fertilidad del polen fue variable, desde un 25 % para un híbrido de *P. palustre* Q-3648 x *P. hydrophilum* V-10508 hasta un 79 % para uno del cruzamiento recíproco. Por otra parte, las plantas sometidas a autopolinización mostraron un escaso número de granos de polen germinados sobre los estigmas y los tubos polínicos nunca se desarrollaron más allá del eje central de los mismos. En polinización cruzada los granos de polen germinaban en gran número y varios tubos polínicos penetraron por la micrópila del óvulo.

La producción de semillas en condiciones de autopolinización fue prácticamente nula para todas las combinaciones híbridas, lo cual concuerda con la reacción de autoincompatibilidad polen-pistilo observada al autopolinizarlas. Los valores en polinización manual (por otro genotipo) y polinización libre fueron muy variables y en general bastante bajos (Tabla 5). La baja fertilidad seguramente se originó en factores intrínsecos propios de la hibridación interespecífica. Por otra parte, el hecho de

Tabla 4.- Tipos de sacos embrionarios en óvulos maduros de *Paspalum hydrophilum* y sus híbridos con *P. palustre*. Abreviaturas: SEM = Saco embrionario meiótico. SEI = Saco embrionario inmaduro en el momento de la antesis; SEAb = Saco embrionario ausente o abortado.

Tabla 5.- Porcentajes de producción de semillas bajo diferentes condiciones de polinización en *Paspalum hydrophilum* y sus híbridos con *P. palustre*. Promedio y variación (entre paréntesis) de (a) tres, (b) cuatro, (c) seis y (d) siete plantas; (e) dato de una sola planta.

Especie o híbrido	Nro. de plantas estudiadas	Autopolinización Óvulos analizados	Polinización controlada (de óvulo)		Polinización libre
			SEM	SEI	
<i>Paspalum hydrophilum</i>					
V-10508	1	0,800	53,0	2,1 <sup>c</sup>	10,0 - 37,0
P-2114	1	0,000	72,0	12,2 <sup>c</sup>	8,0 - 1,520,0
<i>P. hydrophilum</i> x <i>P. palustre</i>					
V-10508 x Q-3648	2	2,1 (0,8-4,6) <sup>a</sup>	47,6	1,1 (0-1,7) <sup>a</sup>	38,7 - 5,1 (0,9-13,6) <sup>b</sup>
P-2114 x Q-3648	1	1,9 <sup>c</sup>		1,2 <sup>c</sup>	-
Q-3648 x V-10508	2	147	22,4		37,4 - 40,2
Q-3648 x P-2114	1	0,8 (0,8-0,8) <sup>c</sup>	52,3	0,1 (0-0,5) <sup>d</sup>	26,2 - 2,921,3
Retrocruzadas <i>P. hydrophilum</i> x <i>P. Palustre</i>					
[P-2114 x Q-3648] x Q-3648				14,5 <sup>e</sup>	
[V-10508 x Q-3648] x V-10508				3,9 <sup>e</sup>	
Retrocruzadas <i>P. palustre</i> x <i>P. Hydrophilum</i>					
[Q-3648 x V-10508] x Q-3648				22,7 <sup>e</sup>	
[Q-3648 x P-2114] x Q-3648				7,3 <sup>e</sup>	

que los valores de fertilidad además de ser bajos, sean también muy variables, puede deberse a causas diversas: 1) factores inherentes a los genotipos paternos, ya que algunos eran más fértiles que otros; 2) las condiciones del proceso de polinización, tales como el efecto del ensobrado y el exceso de manipulación debido al largo período necesario para completar toda la polinización de una inflorescencia; 3) en polinización libre, el escaso número de

plantas analizadas (Tabla 5).

Cuando los híbridos fueron retrocruzados (polinización manual) con polen de los respectivos padres, se obtuvieron valores de producción de semilla que variaron entre 3.9 y 22.7% (Tabla 5). Estos valores, si bien son bajos, son por otra parte similares a los obtenidos en las tres plantas de *P. hydrophilum* con polinización controlada (Tabla 5), aunque difieren considerablemente del 49.5% ob-

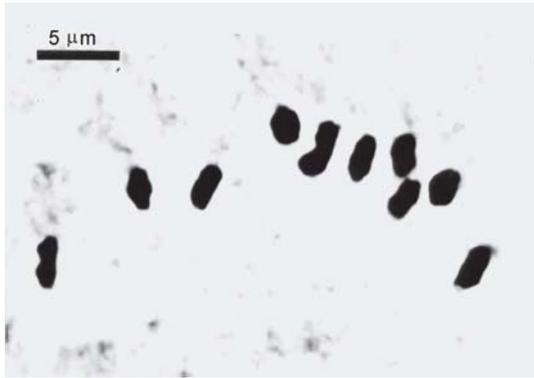


Fig. 1.- Diez bivalentes en metafase I de la meiosis del híbrido  $F_1$  N° 15 entre *Paspalum palustre* (Q-3648) y *P. hydrophilum* (V-10508).

servado en polinización cruzada en *P. palustre* (Quarín & Burson, 1991). La baja producción de semillas de las tres plantas de *P. hydrophilum* probablemente se deba a las condiciones de cultivo, sin el anegamiento donde normalmente crecen en su hábitat natural. La escasa producción de semillas de las retrocruzas podrían tener la misma causa, o tal vez se deba a condiciones intrínsecas de baja fertilidad debido a la hibridación interespecífica.

A pesar de la alta esterilidad observada bajo condiciones experimentales, en el campo de cultivo de las  $F_1$  se observó una buena resiembra natural. Esto pudo deberse al hecho que cada planta produce una gran cantidad de inflorescencias (entre 40 y 60) y a su vez cada una de éstas posee un gran número de espiguillas (entre 1000 y 2000).

## CONCLUSIONES

Nuestros resultados indican que a pesar de las grandes diferencias que existen a nivel morfológico y en cuanto a los hábitats específicos, *P. hydrophilum* y *P. palustre* son dos especies que se hibridan fácilmente y que sus genomas poseen una alta homología cromosómica. Sin embargo, la escasa fertilidad de los híbridos indica una importante divergencia evolutiva. Por otra parte, el grado de fertilidad observado, aunque es bajo, es suficiente para permitir trabajos de transferencia de genes en programas de fitomejoramiento. Esto es especialmente factible si se considera que en algunas retrocruzas se observó una fertilidad superior al 20 %. Por otra parte, la resiembra ( $F_2$ ) observada en el terreno donde se cultivaron las  $F_1$  apoya esta afirmación.

Con el material diploide y sexual ahora disponible de *P. hydrophilum* se abre la posibilidad de duplicar los cromosomas, con la finalidad de obtener tetraploides sexuales, que nos permitan usarlos como progenitores femeninos, en cruzamientos con biotipos tetraploides apomícticos, aumentando la variabilidad y fijando la heterosis a nivel tetraploide.

Otro hecho interesante es que no hemos observado en los herbarios ni en el campo plantas con características morfológicas que pudieran indicar hibridación o introgresión entre estas dos especies. El área de distribución de *P. palustre* es relativamente pequeña y se superpone con el área de *P. hydrophilum* que es mayor. Son especies simpátricas, pero las únicas colecciones de plantas diploides de *P. hydrophilum* son originarias de los estados de Mato Grosso y Mato Grosso do Sul, Brasil, y están fuera del área de distribución general de *P. palustre*. Según nuestros resultados, la introgresión debería ser posible, pero el aislamiento geográfico de los citotipos diploides debe ser el principal factor que evita el cruzamiento natural entre estas dos especies. Por otra parte, el citotipo tetraploide apomíctico de *P. hydrophilum* se distribuye en simpatría con poblaciones diploides de *P. palustre* en regiones de Argentina y Paraguay, cercanos a la confluencia de los ríos Paraguay y Paraná, pero en este caso la barrera a la introgresión debe estar constituida por los niveles de ploidía, el carácter apomíctico de *P. hydrophilum* tetraploide, y ciertos requerimientos específicos respecto al hábitat, pues *P. palustre* forma parte de los embalsados, camalotales y carrizales de los ríos, mientras que *P. hydrophilum* crece en terrenos bajos de inundación periódica.

## AGRADECIMIENTOS

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

## BIBLIOGRAFÍA

- Asker, S. 1979. Progress in apomixis research. *Hereditas* 91:231-240.
- Barreto, I. L. 1954. Las especies afines a *Paspalum virgatum* de la América del Sur. *Revista Argent. Agron.* 21: 125-142.

- 1974. O gênero *Paspalum* (Gramineae) no Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Tese – Livre Docência – Faculdade de Agronomia, Porto alegre) 258 pp.
- Bashaw, A. W., Hovin, A.W. & Holt, E.C. 1970. Apomixis, its evolutionary significance and utilization in plant breeding. *Proceedings 11<sup>th</sup> International Grassland Congress*. University of Queensland Press, St. Lucia, pp. 245-248.
- Burson, B. L. & Bennett, H. W. 1971. Meiotic and reproductive behaviour of some introduced *Paspalum* species. *J. Mississipi Acad. Sci.* 17: 5-8.
- Chase, A. 1929. The North American Species of *Paspalum*. *Contrib. U.S. Natl. Herb.*, 28:1-310.
- Inéd. *Revision of the South American species of the genus Paspalum*. Hitchcock and Chase Library. Botany Department, Smithsonian Institution, Washington, DC.
- Darlington, C. D. 1939. *The evolution of the genetic systems*. Cambridge University Press, London.
- de Wet, J. M. J. 1968. Diploid-tetraploid-haploid cycles and the origin of variability in *Dichanthium* agamospecies. *Evolution* 22: 394-397.
- & Harlan, J. R. 1970. Apomixis, polyploidy and speciation in *Dichanthium*. *Evolution* 24: 270-277.
- Herr, J. M. 1971. A new clearing squash technique for the study of ovule development in angiosperms. *Amer. J. Bot.* 58: 785-790.
- Honfi, A. I., Quarín, C. L. & Valls, J. F.M. 1990. Estudios cariológicos en gramíneas sudamericanas. *Darwiniana* 30:87-94.
- Kho, Y. O. & Baër, J. 1968. Observing pollen by means of fluorescence. *Euphytica* 17: 298-302.
- Norrmann, G. A. 1981. Citología y método de reproducción en dos especies de *Paspalum* (Gramineae). *Bonplandia* 5(17): 149-158.
- Quarín, C. L. 1977. Recuentos cromosómicos en gramíneas de Argentina subtropical. *Hickenia* 1: 73-78.
- 1992. The nature of apomixis and its origin in panicoid grasses. *Apomixis Newsl.* 5: 8-15.
- & Burson, B. L. 1991. Cytology of sexual and apomictic *Paspalum* species. *Cytologia* 56: 223-228.
- Burson, B. L. & Burton G. W. 1984. Cytology of intra- and interspecific hybrids between two cytotypes of *Paspalum notatum* and *P.cromyorrhizon*. *Bot. Gaz.* 145:420-426.
- Pritchard, A. J. 1970. Meiosis and embryo sac development in *Urochloa mosambicensis* and three *Paspalum* species. *Austral. J. Agric. Res.* 21: 649-652.
- Savidan, Y. & Pernès, J. 1982. Diploid-tetraploid-dihaploid cycles and the evolution of *Panicum maximum* Jacq. *Evolution* 36: 596-600.

Original recibido el 26 de marzo de 1999; aceptado el 28 de septiembre de 1999.