

ESTUDIOS SOBRE CITOLOGÍA, SISTEMA REPRODUCTIVO Y COMPATIBILIDAD POLEN-PISTILO DE *Panicum dichotomiflorum* Y *Paspalum fasciculatum* (GRAMINEAE: PANICEAE)

MARIO H. URBANI

Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Nordeste, Sargento Cabral 2131, 3400 Corrientes,
Argentina.

ABSTRACT: Urbani, M. H. 1996. Studies about cytology, reproductive system and pollen-pistil compatibility in *Panicum dichotomiflorum* and *Paspalum fasciculatum* (Gramineae, Paniceae). *Darwiniana* 34: 193-198.

Chromosome counts and meiotic chromosome behavior confirmed previous results for both species. One accession of *Panicum dichotomiflorum* Michaux, from Corrientes, Argentina, had $2n=4x=36$ chromosomes with regular meiotic behavior. Three accessions of *Paspalum fasciculatum* Willd. ex Fluegge, two from Mato Grosso state, Brazil, and one from Chaco province, Argentina, had $2n=2x=20$ chromosomes. This is the first report of the method of reproduction for both species. Embryological studies and observations on flowering habits and seed production indicated that *Panicum dichotomiflorum*, which is an annual species, reproduced sexually. Its floral arrangement, the flowering habit, and the lack of a genetic barrier to prevent self-fertilization suggested that the species reproduced mainly by autogamy. The three accessions of the perennial species *Paspalum fasciculatum* were sexual and self-incompatible. Since most diploid sexual self-incompatible species of the genus *Paspalum* usually have an apomictic tetraploid co-specific counterpart, it is possible that apomictic tetraploid races of *Paspalum fasciculatum* may also exist.

INTRODUCCIÓN

Los estudios realizados en las últimas décadas sobre citogenética y reproducción en gramíneas pertenecientes a la tribu de las Paníceas han demostrado una gran variación de sistemas reproductivos, los que van desde la sexualidad y alogamia en algunas especies diploides, sexualidad y autogamia en diploides y poliploides, hasta apomixis gametofítica en especies poliploides (Quarín, 1992).

Panicum y *Paspalum* son los géneros con mayor número de especies dentro de la tribu de las Paníceas. Considerable información se ha reunido respecto al sistema reproductivo de estos géneros. Mucho de lo que se sabe sobre citogenética y apomixis en especies de Paníceas se debe a los estudios realizados en estos 2 géneros (ver por ejemplo Bashaw et al, 1970; Savidan, 1978; Burson, 1975, 1983; Norrmann et al. 1989; Quarín, 1992). En *Paspalum* es frecuente la existencia de diferentes citotipos en una misma espe-

cie, cada citotipo con un sistema reproductivo distinto (Norrmann et al., 1989; Quarín, 1994). Esto también sucede en *Panicum* (Savidan y Pernés, 1982).

Panicum dichotomiflorum Michaux es una especie anual con una amplia distribución americana, desde Canadá hasta la Argentina. Está asociada a terrenos muy húmedos y frecuentemente se instala como maleza, a partir de semillas, en tierras modificadas o cultivadas (Hitchcock & Chase, 1910; Allem & Valls, 1987; Zuloaga, 1989). En el noreste de Argentina se la encuentra como una maleza habitual en cabeceras y "taipas" de arrozceras.

Paspalum fasciculatum Willdenow ex Flüge es una gramínea perenne y robusta, y se encuentra estrechamente relacionada al sistema hidrográfico de América desde el sur de México hasta Argentina. Vive en albardones, islas y bañados (Palacios, 1969). Posee tallos largos, multinodos, que arraigan en contacto con el suelo y en ocasiones se apoyan sobre la vegetación costera o sobre la ma-

raña que sus mismos tallos forman. Su expansión está ligada a su capacidad de dispersarse flotando durante las grandes crecientes de los ríos, para luego establecerse en la costa inundable húmeda cuando el nivel de los mismos descende.

El objetivo de este trabajo fue el estudio de algunos elementos del sistema genético de estas dos especies. Esto incluyó la determinación del número de cromosomas, el análisis de las configuraciones cromosómicas en meiosis y el estudio del sistema reproductivo.

MATERIAL Y MÉTODOS

El material estudiado se obtuvo en parte mediante colecciones propias y en parte fue provisto por el Dr. José F.M. Valls del Banco de Germoplasma del Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnología, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria, Brasília, Brasil.

El origen y la identificación del material están expresados en la Tabla 1. De *Panicum dichotomiflorum* se trajeron 3 plantas de la misma procedencia, mientras que cada una de las accesiones de *Paspalum fasciculatum* representaba un clon diferente por haber sido cultivadas a partir de un trozo de tallo. Para cada material se hizo un testigo de herbario. Se depositó el original en el Herbario CTES y se enviaron duplicados a US, BAA y otros.

Para el recuento cromosómico, el estudio de la meiosis, el sistema reproductivo por cortes seria-

dos de ovarios con doble coloración y la compatibilidad polen-pistilo en autopolinización y en polinización cruzada, se utilizaron las técnicas descritas anteriormente (Urbani, 1990). El sistema reproductivo por cortes seriados se analizó en las accesiones 3934 y 4152.

La meiosis de *Panicum dichotomiflorum* fue analizada en diacinesis y metafase I y se estudiaron 56 células, y en la accesión (3934) de *Paspalum fasciculatum* se estudiaron 50 células en diacinesis y metafase I y 16 células en anafase I.

Adicionalmente, se completaron los estudios embriológicos en ambas especies mediante la observación de sacos embrionarios maduros (accesiones 4074 y 4152) por medio del clarificado de ovarios y su observación con microscopía de contraste diferencial interferencial (DIC) según la técnica descrita por Crane & Carman (1987).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Mitosis

En *Panicum dichotomiflorum* se observaron $2n = 36$ cromosomas. Recuentos previos indicaban 2 niveles de ploidía para esta especie: tetraploide con $2n = 36$ cromosomas (Brown, 1948; Davidse & Pohl, 1974, sub *Panicum chloroticum*) y hexaploide con $2n = 54$ (Church, 1929; Gould, 1958 y 1968; Probatova & Sokolovskaya, 1983).

Las 3 accesiones de *Paspalum fasciculatum* resultaron con $2n = 20$ cromosomas en coincidencia con estudios previos (Pohl & Davidse, 1971) realizados en material original de Costa Rica.

Tabla 1. Procedencia del material estudiado.

Especie	Ejemplar de herbario leg. Quarín y Urbani	Origen
<i>Panicum dichotomiflorum</i>	4074	Argentina, Corrientes, El Sombrerito, Estación Experimental Agropecuaria, INTA.
<i>Paspalum fasciculatum</i>	3934	Brasil, Mato Grosso, Cáceres, margem direita do río Paraguai, germoplasma BRA-007498 (leg. Valls et al. 9368).
	3935	Brasil, Mato Grosso, Barrão de Melgaço, río Cuiabá, germoplasma BRA-002364 (leg. Allem y Vieira 2523).
	4152	Argentina, Chaco, camino de acceso al Puerto Antequera.

Meiosis

Cuando se estudió la meiosis de *Panicum dichotomiflorum*, se observó que los cromosomas se asociaron regularmente formando siempre 18 bivalentes (Fig. 1). Esta especie pertenece a la sección *Dichotomiflora* del género *Panicum* en la cual el número cromosómico básico es $x = 9$. Los 18 bivalentes observados en la meiosis indican que muy probablemente se trata de una especie de origen alotetraploide.

En *Paspalum fasciculatum* se observó en el 96 % de los casos 10 bivalentes (Fig. 2), y en el 4 % restante, 9 bivalentes más 2 univalentes. En anafase I se observaron siempre 10 cromosomas migrando hacia cada polo. Considerando que $x = 10$ es el número básico más común para el género *Paspalum*, esta especie es diploide ($2n = 2x = 20$) con meiosis regular.

Megasporogénesis, desarrollo de saco embrionario y fertilidad

En el estudio embriológico de *Panicum dichotomiflorum* se observó que el óvulo es bitegmentado, siendo el tegumento externo de menor desarrollo que el interno. La inserción del óvulo se ubica en una amplia zona de la pared posterior del ovario. Su posición inicial es más o menos perpendicular a la pared del ovario. A medida que crece, el óvulo se curva gradualmente hasta que el eje calaza-micrópila alcanza una posición casi paralela al eje longitudinal del ovario cuando comienza el desarrollo del saco embrionario. De esta manera, la micrópila queda ubicada hacia la base del ovario. A la madurez, el tegumento interno rodea todo el óvulo, mientras que el externo solo lo cubre en la mitad proximal.

La meiosis no es simultánea en anteras y óvulos. La actividad meiótica ocurre primero en las anteras, y cuando se completa la tétrade de micrósporas y comienzan a formarse los granos de polen, empieza la meiosis en la célula madre de las megásporas (CMM). Esta célula se encuentra contigua a la primera capa del nucelo y se diferencia de las células del tejido nucelar por su mayor tamaño, por su forma alargada y el gran volumen de su nucléolo. En todos los óvulos analizados, la primera división meiótica tiene por resultado una díade, mientras que la segunda división ocurre siempre en la célula de la díade ubicada hacia la calaza y a veces en la célula ubicada hacia la micrópila. Si la segunda división meiótica no ocurre en la díade micropilar, el producto final de la meiosis es una tríade en lugar de la tradicional tétrade lineal de megásporas. De todas maneras, la megáspora funcional es la calazal mientras que las 2 o 3 restantes degeneran.

A partir de la megáspora funcional se desarrolla un gametófito con 7 células y 8 núcleos, de manera que en el momento de la antesis se puede observar: hacia la micrópila, la oosfera flanqueada por 2 sinérgidas; luego 1 célula central binucleada muy vacuolizada; y hacia el polo calazal, 3 antípodas uninucleadas (Figs. 3 y 4). Esto corresponde a un saco embrionario del tipo *Polygonum*. *Panicum dichotomiflorum* pertenece al subgénero *Panicum*, sección *Dichotomiflora* al igual que *P. elephantipes*, especie que también tiene sacos embrionarios del tipo *Polygonum* sin la típica proliferación de antípodas de las Gramíneas (Urbani, 1990).

La meiosis y la megagametogénesis de *Paspalum fasciculatum* resultaron muy seme-

Tabla 2. Floración, compatibilidad polen-pistilo y producción de semilla de *Panicum dichotomiflorum* y *Paspalum fasciculatum*.

Especie y accesión	Período de Floración	Horario de antesis	Producción de semilla (%)		Tiempo entre polinización y maduración del fruto (días)	Compatibilidad polen-pistilo
			Autopolinización	Polinización cruzada		
<i>P. dichotomiflorum</i> 4074	Octubre-Mayo	8:00-9:00	73,8	75,1	7	+
<i>P. fasciculatum</i> 3934 y 3935	Diciembre-Mayo	13:00-14:00	0	33	9	-



Fig. 1 y 2: Microfotografías de cromosomas meióticos de *Panicum dichotomiflorum* y *Paspalum fasciculatum*. 1: *P. dichotomiflorum*, metafase I con 18 II. 2: *P. fasciculatum*, diacinesis con 10 II. (x 1.200)

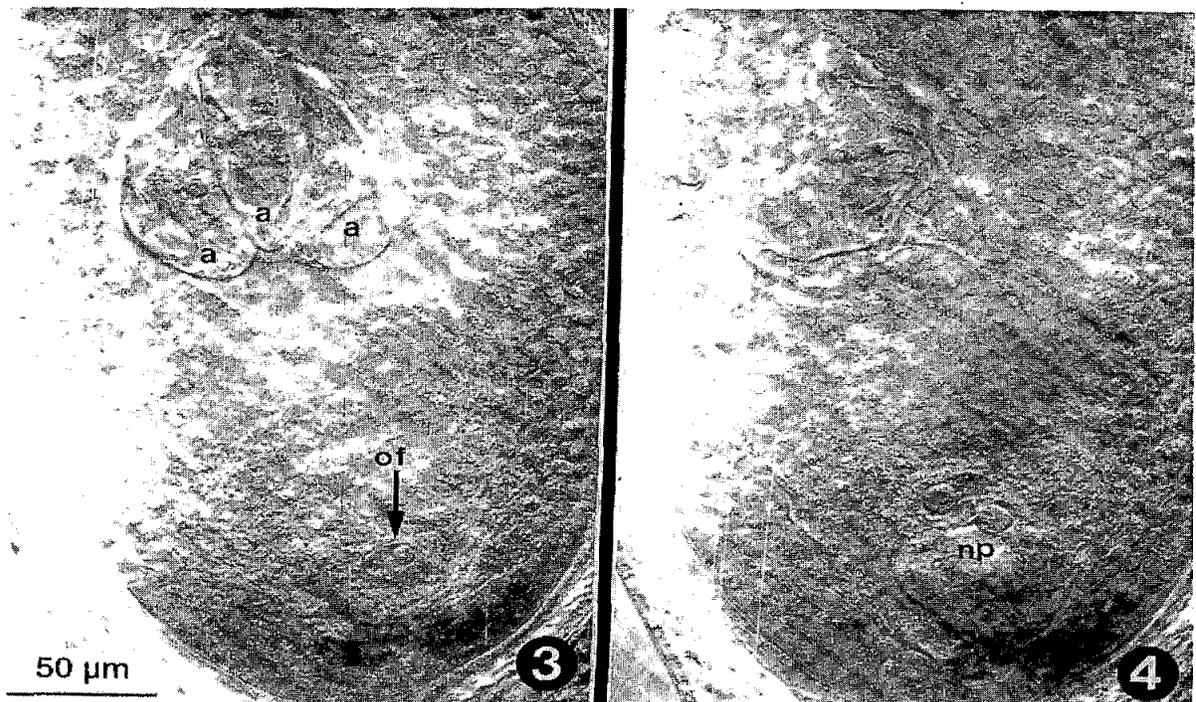


Fig. 3 y 4: Microfotografías obtenidas con contraste diferencial interferencial de un ovario clarificado de *Panicum dichotomiflorum*. Las fotografías representan diferentes planos de enfoque del mismo ovario, y muestran un saco embrionario donde se observan tres antípodas (a), la oosfera (of) y los dos núcleos polares (np) de la célula central. (x 330)

jantes a los de *Panicum dichotomiflorum*. Las únicas diferencias destacables fueron: 1) en *P. fasciculatum* la segunda división de la meiosis siempre ocurrió en las 2 díades y por lo tanto el producto final fue en todos los casos una tétrade lineal de megásporas, de la cuales las 3 ubicadas hacia la micrópila degeneraron. 2) en *P. fasciculatum* siempre existió proliferación de antípodas y así el saco embrionario resultó del tipo *Polygonum* en su variante Poaceae según fue definida por Anton & Cocucci (1984). 3) en uno de los óvulos maduros de la accesión 3934 se observaron dos sacos embrionarios, uno de ellos era del tipo *Polygonum* con proliferación de antípodas y el otro, más pequeño, era binucleado y semejante a un saco apospórico con desarrollo incompleto.

La Tabla 2 contiene datos de floración y producción de semillas. Ambas especies tienen un amplio período de floración que va desde octubre a mayo en *Panicum dichotomiflorum* y desde mediados de diciembre a principios de mayo en *Paspalum fasciculatum*. En las 2 especies, la apertura de las espiguillas durante la antesis expone simultáneamente estigmas y anteras. La espiguilla permanece abierta durante aproximadamente 15 minutos y en ese lapso se produce la dehiscencia de las anteras y la liberación del polen. La antesis en *P. dichotomiflorum* es matutina, mientras que en *P. fasciculatum* se produce 1 o 2 horas después del mediodía.

En condiciones de autopolinización obligada *Paspalum fasciculatum* no produce semillas aunque sí lo hace cuando se le permite ser polinizada por algún genotipo diferente. Aquí se estudiaron las accesiones 3934 y 3935. Ambas resultaron estériles cuando florecieron en aislamiento pero produjeron semillas cuando se interpolinizaron. Las plantas de *Panicum dichotomiflorum* produjeron semillas tanto en autopolinización como en polinización abierta. Estos datos sugieren la existencia en *P. fasciculatum* de un sistema genético que controla la compatibilidad polen-pistilo y de esta manera la especie es alógama por autoincompatibilidad, mientras que *P. dichotomiflorum* carece de este sistema y cada individuo es autofértil. Esto fue corroborado con el estudio del desarrollo de los tubos polínicos en autopolinización y en polinización cruzada. Las observaciones permitieron ver tubos polínicos en la región de la micrópila tanto en *P. dichotomiflorum* con ambos sistemas de polinización como en *P.*

fasciculatum después de polinización cruzada. Sin embargo, en *P. fasciculatum* autopolinizado, los tubos polínicos de los granos germinados penetraron las papilas de los estigmas y se desarrollaron hasta el eje central de los mismos pero no lograron penetrar en los estilos.

Los procesos de la megasporogénesis y megagametogénesis indican que las 2 especies aquí estudiadas se reproducen sexualmente. La presencia ocasional de un segundo saco embrionario, de probable origen apospórico, en un óvulo de *Paspalum fasciculatum* confirma este fenómeno en especies diploides del género *Paspalum* como ya fue mencionado para otras especies (Norrman et al., 1989).

En *Paspalum* son frecuentes las especies con más de un nivel de ploidía. Particularmente frecuentes son las especies con citotipos diploides sexuales y autoincompatibles y citotipos autotetraploides apomícticos, seudógamos y autocompatibles (Quarín, 1992). El material estudiado de *Paspalum fasciculatum* comprende 2 accesiones de diferentes localidades de Mato Grosso, Brasil, y 1 de la costa del río Paraná en Chaco, Argentina. Las 3 son diploides al igual que el material originario de 2 localidades de Costa Rica que fuera estudiado anteriormente (Pohl & Davidse, 1971). Puesto que el material aquí estudiado es autoincompatible, es de suponer que también puede existir un citotipo tetraploide apomíctico como es común en muchas otras especies diploides autoincompatibles del género.

De acuerdo Hitchcock & Chase (1910) *Panicum dichotomiflorum*, es una especie muy polimorfa en cuanto a características de pilosidad, tamaño de las espiguillas y hábito de las plantas. Además, estos autores incluyen 15 nombres como sinónimos de *P. dichotomiflorum*. El sistema reproductivo de esta especie no había sido estudiado anteriormente. Los datos obtenidos indican que es de reproducción sexual, con una disposición de las piezas florales y un sistema de floración que favorece la autogamia.

Si consideramos la amplia dispersión panamericana de la especie, podemos atribuir el gran polimorfismo detectado en estudios taxonómicos (Hitchcock & Chase, 1910; Zuloaga, 1989) al desarrollo de líneas, probablemente con alto grado de homocigosis, pero con grandes diferencias genotípicas entre las poblaciones.

El sistema reproductivo de *Paspalum fasci-*

culatum tampoco había sido estudiado anteriormente. Los datos obtenidos indican que es diploide, sexual y alógama por autoincompatibilidad. Esto haría suponer que en las poblaciones se debería encontrar una importante diversidad de fenotipos. Sin embargo, la población observada en Chaco (accesión 4152) parece ser bastante uniforme. Esto probablemente indique que la multiplicación vegetativa a través de largos tallos que arraigan en sus nudos al contacto con el barro, y que eventualmente se desplazan flotando durante las crecientes de los ríos, es más frecuente que la reproducción por semillas. Por otra parte, el porcentaje de espiguillas que forman semillas es bajo (33 %) aún cuando se interpolinizaron 2 accesiones (3934 y 3935) que se supone corresponden a genotipos diferentes por tener distintas procedencias.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado en la Cátedra de Genética y Fitotecnia de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Nordeste (UNNE) y fue subsidiado en parte por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas y en parte por la Secretaría General de Ciencia y Técnica de la UNNE. El autor agradece al Ing. Camilo Quarín la sugerencia del tema y la lectura crítica del manuscrito.

BIBLIOGRAFÍA

- Allem, A. C. & Valls, J. M. F. 1987. *Recursos forrageiros nativos do pantanal mato-grossense*. 339 p. EMBRAPA-CENARGEM. Brasilia, DF.
- Anton, A. M. & Cocucci, A. 1984. The grass megagametophyte and its possible phylogenetics implications. *Pl. Syst. Evol.* 146: 117-121.
- Bashaw, E.C., Hovin, A. & Holt, E. C. 1970. Apomixis, its evolutionary significance and utilization in plant breeding. In M.T.J. Norman (ed.) *Proceed. 11th Internatl. Grassl. Congress.* University of Queensland Press, St. Lucia, pp. 245-248.
- Brown, W.V. 1948. A cytological study in the *Gramineae*. *Amer. J. Bot.* 35: 382-395.
- Burson, B.L. 1971. Chromosome numbers, microsporogenesis, and mode of reproduction of seven *Paspalum* species. *Crop Sci.* 11: 292-294.
- _____. 1975. Cytology of some apomictic *Paspalum* species. *Crop Sci.* 15: 229-232.
- _____. 1983. Phylogenetic investigation of *Paspalum dilatatum* and related species In J.A. Smith and V.W. Hays (Eds.) *Proceed. 14th Internatl. Grassl. Congress.* Westview Press, Boulder, Colorado, pp. 170-173.
- Crane, C. F. & Carman, J. G. 1987. Mechanisms of apomixis in *Elymus rectisetus* from eastern Australia and New Zealand. *Amer. J. Bot.* 74(4): 477-496.
- Church, G. L. 1929. Meiotic phenomena in certain *Gramineae*. *Bot. Gaz.* 88: 63-84.
- Davidse, G. & Pohl, R.W. 1974. Chromosome numbers, meiotic behavior and notes on tropical American grasses (*Gramineae*). *Canad. J. Bot.* 52: 317-328.
- Gould, F. W. 1958. Chromosome numbers in southwestern grasses. *Amer. J. Bot.* 45: 757-767.
- _____. 1968. Chromosome numbers of Texas grasses. *Canad. J. Bot.* 46: 1315-1325.
- Hitchcock, A.S. & Chase, A. 1910. The North American species of *Panicum*. *Contr. U. S. Natl. Herb.* 15: 1-396.
- Normann, G.A., Quarín, C. L. & Burson, B. L. 1989. Cytogenetics and reproductive behavior of different chromosome races in six *Paspalum* species. *J. Hered.* 80: 24-28.
- Palacios, R. A. 1969. *Panicum*, en Burkart, A., *Flora Ilustrada de Entre Ríos (Argentina), Gramíneas*. Colec. Cient. I.N.T.A. 6 (2): 277-324.
- Pohl, R. W. & Davidse, G. 1971. Chromosome numbers of Costa Rican grasses. *Brittonia* 23: 293-324.
- Protova, N. S. & Sokolovskaya, A. P. 1983. Chromosome numbers in *Adoxaceae, Chlorantaceae, Cupressaceae, Juncaceae, Poaceae*. *Bot. Zurn.* 68(12): 1683.
- Quarín, C.L. 1992. The nature of apomixis and its origin in Panicoid grasses. *Apomixis Newsl.* 5: 8-15.
- _____. 1994. The tetraploid cytotype of *Paspalum durifolium*: cytology, reproductive behavior and its relationship to diploid *P. intermedium*. *Hereditas* 121: 115-118.
- Savidan, Y. 1978. L'apomixie gamétophytique chez les Graminées et son utilisation en amélioration des plantes. *Ann. Amélior. Plantes*, 28: 1-9.
- Savidan, Y. & Pernes, J. 1982. Diploid-tetraploid-dihaploid cycles and the evolution of *Panicum maximum* Jacq. *Evolution* 36: 596-600.
- Urbani, M. H. 1990. Citología y método de reproducción de *Panicum elephantipes* (*Gramineae*). *Bol. Soc. Argent. Bot.* 26: 205-208.
- Zuloaga, F. O. 1989. El género *Panicum* (Poa-ceae: Paniceae) en la República Argentina. III. *Darwiniana* 29: 289-370.

Original recibido el 18 de mayo de 1995; aceptado el 3 de mayo de 1996.