

Citogenética y biología reproductiva de *Anthaenantia lanata* (Poaceae: Panicoideae)

Maria I. de las Mercedes Hidalgo¹, Irene Caponio¹
& Guillermo A. Norrmann²

¹Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE), Facultad de Ciencias Agrarias, UNNE. Sargento Cabral 2131, 3400 Corrientes, Argentina.

²Autor para correspondencia: criadero@agr.unne.edu.ar

Resumen

Hidalgo, M. I. M., I. Caponio & G. A. Norrmann. 2007. Citogenética y biología reproductiva de *Anthaenantia lanata* (Kunth) Benth. (Poaceae: Panicoideae). *Kurtziana* 33 (2): 27-33.

Anthaenantia lanata (Kunth) Benth., generalmente citada como *Leptocoryphium lanatum* (Kunth) Nees, es una gramínea ampliamente difundida en regiones tropicales y subtropicales de América. En este trabajo se presentan recuentos y caracterización cromosómica, estudios del sistema reproductivo y fertilidad de dos poblaciones tetraploides ($2n = 4x = 40$) de Argentina. El comportamiento de los cromosomas en meiosis fue regular, con formación de asociaciones cromosómicas bivalentes y cuadrivalentes. El análisis de la ontogenia del megagametofito permitió inferir la tipología de los sacos embrionarios, los que resultaron ser monospóricos, bipolares, octonucleados y con proliferación de antípodas, por lo que corresponderían al tipo *Polygonum* var. *Poaceae*. Las poblaciones analizadas se reproducen sexualmente. Pruebas de compatibilidad polen-pistilo sugieren la existencia de un sistema de autoincompatibilidad que prácticamente impide la autofecundación, por lo que se trataría de una especie alógama por autoincompatibilidad.

Palabras claves: cariotipo, *Leptocoryphium*.

Abstract

Hidalgo, M. I. M., I. Caponio & G. A. Norrmann. 2007. Cytogenetics and reproductive biology of *Anthaenantia lanata* (Kunth) Benth. (Poaceae: Panicoideae). *Kurtziana* 33 (2): 27-33.

Anthaenantia lanata (Kunth) Benth., often cited as *Leptocoryphium lanatum* (Kunth) Nees, is a grass widely distributed in tropical and subtropical regions of America. In the present paper we describe chromosomes counts, meiotic chromosome behaviour and breeding systems in two tetraploid ($2n = 4x = 40$) populations from Argentina. Meiotic behaviour is regular, with bivalent and quadrivalent associations. The embryo sac typology of this cytotype corresponds with a *Polygonum* var. *Poaceae* type. Pollen pistil tests revealed the presence of a self-incompatibility genetic system that impedes selfpollination.

Key words: karyotype, *Leptocoryphium*.

Introducción

El género *Anthaenantia* P. Beauv. pertenece a la subfamilia *Panicoideae*, tribu *Paniceae*, subtribu *Paspalinae* (Zuloaga et al.

2003). Lo integran 4 especies americanas: *A. rufa* (Elliott) Schult., *A. villosa* (Michx.) P. Beauv., *A. villaregalis* (McVaugh & R. Guzmán) Espejo & López-Ferrari y *A. lanata* (Kunth) Benth.

En 1829 Nees crea el género *Leptocoryphium*, que diferencia de *Anthraenantia* por la forma de las espiguillas y la morfología del ápice de la lemma superior. Transfiere al mismo sólo a *A. lanata*, con lo que el género se hace monotípico con *Leptocoryphium lanatum* (Kunth) Nees como único exponente. Varios autores no fueron proclives a apoyar esta separación (Bentham, 1881; Bentham & Hooker, 1883; Hackel, 1887; Clayton & Renvoize, 1986; Webster, 1988; Espejo Serna et al., 2000; Zuloaga et al., 2003) en cambio otros como Hitchcock (1927, 1930, 1936); Rosengurt et al. (1970); Burkart (1969) y Nicora & Rúgolo de Agrasar (1987) la utilizaron, lo que provocó que coexistieran ambas acepciones de la entidad por largo tiempo. En este trabajo se adopta el criterio de Zuloaga et al. (2003) aceptando la validez de *Anthraenantia lanata* (Kunth) Benth.

Anthraenantia lanata (Kunth) Benth. se distribuye desde México hasta la Argentina, Uruguay y Brasil. Su hábitat natural son los suelos secos, arenosos, de praderas vírgenes, laderas de pastoreo normal, desapareciendo en los piquetes y campos muy cargados (Burkart, 1969; Nicora & Rúgolo de Agrasar, 1987). Es considerada una buena forrajera natural, apetecida por el ganado y medianamente productiva (Rosengurt et al., 1960).

Los antecedentes citológicos existentes en el género *Anthraenantia* son escasos, conociéndose dos recuentos cromosómicos para *A. lanata* (sub *Leptocoryphium*): (i) un citotipo tetraploide con $2n=4x=40$ cromosomas (Nuñez, 1952), procedente de Pergamino, Provincia de Buenos Aires, Argentina; (ii) y un citotipo diploide con $2n=2x=20$ cromosomas, proveniente de la región de Chiquitania, Departamento de Santa Cruz, Bolivia (Killeen, 1990).

No existen datos sobre biología reproductiva de esta especie ni de otras del género. Cabe destacar que *Anthraenantia* se ubica dentro de la subtribu *Paspalinae* junto al género *Paspalum*, que posee variadas estrategias reproductivas incluyendo diploides sexuales autoincompatibles y tetraploides apomíticos pseudógamos (Quarín & Norrmann, 1987). En el presente trabajo se da a conocer información sobre cromosomas, reproducción y fertilidad en individuos tetraploides ($2n = 4x = 40$) del nordeste de Argentina. Se espera que esta información sea

de utilidad para la adecuada recolección de germoplasma y el correcto manejo de la especie en planes de mejora genética.

Materiales y Métodos

El material estudiado proviene de dos poblaciones naturales del nordeste argentino, de las cuales se recolectaron semillas y se transplantaron matas para su cultivo en el invernáculo y en el Jardín Experimental de la Facultad de Ciencias Agrarias (UNNE) durante el período de estudio. Los ejemplares de herbario correspondientes se encuentran depositados en CTES y sus datos de procedencia son los siguientes:

ARGENTINA. **Prov. Corrientes:** Dpto. Capital: localidad El Riachuelo ($27^{\circ} 35' 53''$ S; $58^{\circ} 44' 32''$ W), Caponio (C) 68. **Prov. Entre Ríos:** Dpto. Colón: Colón, El Palmar ($31^{\circ} 52' 10''$ S; $58^{\circ} 18' 30''$ W), Caponio (C) 117.

Los recuentos cromosómicos se realizaron en ápices de raicillas tratadas en solución saturada de \pm -bromonaftaleno durante 2,30 h, sin fijación previa y teñidas mediante la técnica de Feulgen (ver Jong, 1997).

El cariotipo fue realizado en base a fotografías de las metafases mitóticas obtenidas, estimándose los siguientes parámetros morfométricos: longitud brazo corto (s); longitud brazo largo (l); longitud total de cada cromosoma (c), donde $c=s+l$; longitud cromosómica promedio (LM); longitud total del cariotipo (LTC); rango cromosómico; índice centromérico (IC), donde $IC=100\ s/c$ y razón promedio entre brazos (AR)= $“(s/l)/n$. La nomenclatura utilizada para la descripción del cariotipo es la propuesta por Levan et al. (1964).

El idiograma se obtuvo sobre la base de las medias de las longitudes de los cromosomas y de los índices centroméricos. Los cromosomas fueron ordenados por grupos de mayor a menor, según su tamaño. Cada cromosoma del idiograma representa a los cromosomas que por su similitud fueron agrupados de a 4.

Para el estudio de la microsporogénesis se fijaron inflorescencias jóvenes en alcohol absoluto (3): ácido acético glacial (1), durante 24 horas y se conservaron en alcohol 70% a 4° C. Las células madres del polen se colorearon con carmín acético al 2 %.

El modo de reproducción fue determinado al estudiar la megasporogénesis y megagametogénesis, para lo cual se fijaron inflorescencias en diferentes estados de desarrollo, en una solución de FAA (etanol 70%, ácido acético, formaldehído, 18:1:1)

durante 24 horas y se conservaron en alcohol 70% a 4° C. La deshidratación se realizó en una serie de alcohol butírico terciario y posteriormente se incluyeron en parafina. Los cortes seriados se realizaron a 12 ¼m de espesor utilizándose una doble coloración safranina-fast green (Johansen, 1940).

La fertilidad de los granos de polen se evaluó a través del análisis de germinación y penetración de los tubos polínicos a través del estigma, estilo y ovario, utilizándose la técnica de Kho & Baër (1968) bajo microscopio de epifluorescencia.

La producción de cariopsis se determinó bajo tres condiciones de polinización: (i) autopolinización, con restricción absoluta a la entrada de polen foráneo durante la floración, lo que se logró ensobrando inflorescencias en bolsas de papel sulfito y aislando las plantas en invernáculo; (ii) polinización cruzada forzada, asegurando la presencia de polen foráneo, lo que se logró espolvoreando manualmente las flores del material Caponio 117 con polen del material Caponio 68; (iii) polinización libre.

Se contaron más de 500 espiguillas por planta durante dos períodos de floración para cada tipo de tratamiento, confirmandose la presencia o ausencia de cariopsis en la totalidad de las espiguillas obtenidas, bajo microscopio estereoscópico, y expresándolo como porcentaje de espiguillas que producen frutos.

Resultados y Discusión

Citología

Los recuentos cromosómicos realizados en este trabajo indican que las poblaciones C 68 y C 117 están constituidas por individuos con $2n = 4x = 40$ cromosomas (Fig.1). Los cromosomas se aparean formando predominantemente asociaciones bivalentes y cuadrivalentes (detalles en Tabla 1). Se observó la presencia de cromosomas accesorios o cromosomas “B”

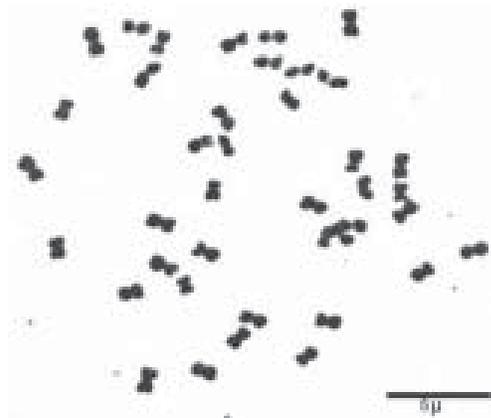


Fig. 1.- Metafase mitótica de *Anthaenantia lanata* ($2n=4x=40$). Barra 5 μ m.

en ambas poblaciones (ver Tabla 1). Los cromosomas B se diferenciaron por su tamaño, notoriamente más pequeños que el resto de los cromosomas, y porque no se aparean entre sí ni con el complemento común (Fig. 2).

Las dos poblaciones aquí estudiadas corresponden a un único citotipo tetraploide, con cromosomas pequeños y un cariotipo simétrico, siendo la longitud total del cariotipo de 45.15 μ m y la longitud promedio de los cromosomas de 1.12 μ m. El cromosoma más pequeño mide 0.68 μ m y el más grande 1.33 μ m. Aplicando la nomenclatura propuesta por Levan et al. (1964) para la descripción del cariotipo, la fórmula cariotípica básica para *A. lanata* es $1M + 9m$. Se observó un satélite en el brazo corto del cromosoma nº 7 (Fig.3).

Megasporogénesis y Megagametogénesis

La ontogenia del megagametofito comienza con la diferenciación de una célula subepidérmica en el tejido nucelar del óvulo: la arquéspora o

Tabla 1

Promedios y rangos de asociaciones cromosómicas en *Anthaenantia lanata*. C: Caponio

| | Promedios y rangos de variación | | | | |
|---------------------|---------------------------------|----------------|--------------|--------------|------------|
| | I | II | III | IV | B's |
| C 117 Entre Ríos | - | 8.15 (6-14) | - | 5.7 (3-8) | 3 (2-4) |
| C 68 Riachuelo | 0.2 (0-1) | 8.8 (6-12) | 0.2 (0-1) | 5.6 (4-7) | 3 (2-4) |

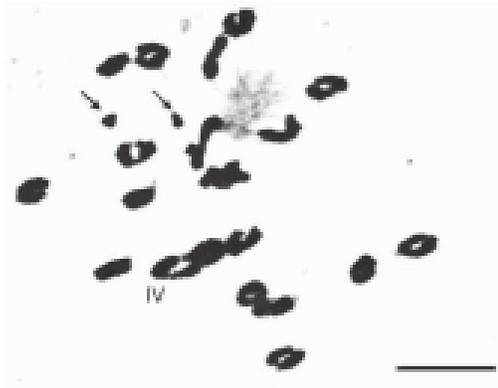


Fig. 2.- Diacinesis de *Anthaenantia lanata* ($n = 18 \text{ II} + 1 \text{ IV} + 2 \text{ B}$). Los cromosomas B se indican con flechas. IV: cuadrivalente. Barra 5 μm .

célula madre de la megáspora (CMM). Cuando se inicia la división meiótica, el óvulo comienza a crecer y se curva gradualmente hacia delante, adquiriendo la forma característica de un óvulo hemicampilótropo (Bocquet & Bersier, 1960).

La CMM después de la primera división meiótica origina una diáda, donde ambas células son semejantes en volumen y características. Después de la segunda división meiótica, resulta una tétrada lineal de megásporas. Posteriormente se produce el deterioro de tres de las megásporas, quedando sólo una megáspora funcional en posición calazal que dará origen al megagametofito femenino.

Finalizado el proceso meiótico, la megáspora funcional comienza su proceso de diferenciación y desarrollo aumentando su volumen, el citoplasma se vuelve denso con pequeñas vacuolas dispersas, el núcleo presenta un nucleolo notable diferenciándose fácilmente del resto de las células nucleares vecinas. Luego de la primera división mitótica de la megáspora,

las vacuolas primarias se fusionan formando una gran vacuola central que separa a los núcleos quedando así un saco embrionario binucleado, polarizado, con un núcleo en cada polo separados por la vacuola central. Estos núcleos vuelven a dividirse y después de este segundo ciclo cariocinético resulta un saco embrionario 4-nucleado donde permanece la vacuola central.

Luego del tercer ciclo cariocinético en el saco embrionario quedan 4 núcleos ubicados en el polo micropilar y 4 núcleos ubicados en el polo calazal, separados por la gran vacuola central, formándose un saco embrionario 8-nucleado maduro.

La célula central se ubica ocupando el mayor volumen del saco embrionario, extendiéndose desde el extremo inferior del aparato oosférico ubicado en la región micropilar, hasta alcanzar a las células antípodas en la región calazal. Dicha célula aloja a los 2 núcleos polares, que son voluminosos, bien definidos, con nucleolos muy notables.

En la región micropilar el aparato oosférico queda constituido por dos sinérgidas y una oosfera. Estas tres células muestran un arreglo triangular: la oosfera se presenta como una célula de gran tamaño flanqueada por las dos sinérgidas y ubicada algo por debajo de éstas. La oosfera se extiende hasta el límite de la célula central sobrepasando la longitud de las sinérgidas; su núcleo ubicado en la parte inferior es voluminoso, con nucleolo notable alojado en un citoplasma denso. En el extremo micropilar de las sinérgidas, en contacto con la pared celular del saco embrionario, se observa un engrosamiento de dicha pared formando una estructura en bandas que corresponde al aparato filiforme, constituido

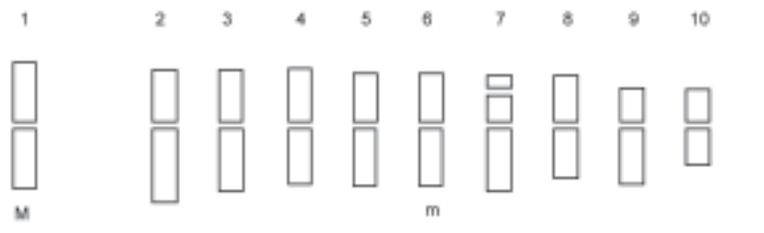


Fig. 3.- Idiograma de *Anthaenantia lanata*. Barra: 1,50 μm .

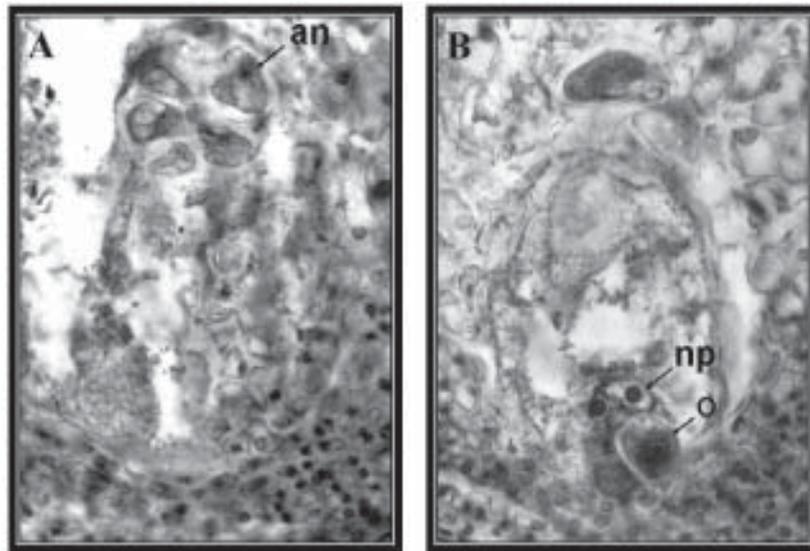


Fig. 4.- Dos vistas de un saco embrionario de *Anthaenania lanata*. Mostrando en A antípodas proliferadas (an) y en B los núcleos polares (np) y la oosfera (o).

por una masa de proyecciones de pared que se extienden dentro del citoplasma.

En el polo calazal del saco embrionario se observan las antípodas que si bien en un principio son 3, a medida que el saco embrionario va desarrollándose éstas proliferan formando una masa de células uninucleadas semejantes entre sí (Fig. 4 A), con núcleos pequeños, pudiéndose contar al momento de la antesis hasta 10 células.

En un estado más avanzado del desarrollo del saco embrionario, los dos núcleos polares migran hacia el centro de la célula media (Fig. 4 B), donde permanecen juntos dentro de un citoplasma rodeado por vacuolas. Queda así conformado un saco embrionario del tipo *Polygonum* var. *Poaceae* (Anton & Cocucci, 1984).

Tabla 2
Germinación y crecimiento de los tubos polínicos hasta 6 horas después de realizadas las polinizaciones. C: Caponio

| | Tiempo después de la polinización (horas) | Cantidad relativa de granos de polen germinados hasta | | |
|-------------------------------|---|---|--------|--------|
| | | Estigma | Estilo | Ovario |
| C 117 Colón, Entre Ríos | 2 | + | - | - |
| | 4 | ++ | + | - |
| | 6 | ++++ | ++ | - |
| C 68 Riachuelo | 2 | + | + | - |
| | 4 | ++ | + | - |
| | 6 | ++++ | +++ | - |
| Entre Ríos x Riachuelo | 2 | ++ | + | - |
| | 4 | +++ | +++ | ++ |
| | 6 | +++++ | ++++ | ++++ |

Fertilidad

El estudio del desarrollo de tubos polínicos, sobre estigmas, estilos y ovarios bajo diferentes condiciones de polinización, se detalla en la Tabla 2. Bajo condiciones de autopolinización, se observó que a las dos horas de polinización, la mayoría de los granos de polen habían emitido un tubo polínico de longitud igual al diámetro del grano de polen. Dentro de las 4 horas posteriores a la polinización, estos tubos polínicos presentaron una longitud de 2-3 veces el diámetro del grano de polen, pero en ningún caso se observó que llegaran hasta el ovario. La misma situación se observó a las 6 horas de la polinización. Bajo condiciones de polinización cruzada forzada se observó que en las 6 horas posteriores a la polinización la mayoría de los tubos polínicos que se desarrollaron llegaban a la región micropilar del ovario.

Producción de cariopsis

Bajo condiciones de polinización libre, el 20% de las espiguillas de la población C 68 y el 23,6 % de las espiguillas de la población C 117 formaron cariopsis. En condiciones de polinización forzada, en ambas poblaciones la producción de cariopsis aumentó 41,66 % y 67,4 % respectivamente. Esta diferencia se puede explicar por una mejor provisión de polen en la condición forzada. En condiciones de autopolinización, menos del 2 % de las espiguillas produjeron cariopsis (Tabla 3).

Conclusiones

A. lanata es una especie con citotipos diploides y tetraploides. El análisis de la

morfología de los cromosomas en poblaciones tetraploides sugiere una arquitectura genómica de 10 cromosomas, cada uno representado cuatro veces. Esta observación es sustentada asimismo por el comportamiento de los cromosomas en la meiosis, con asociaciones cuadrivalentes que evidencian ese grado de homología. Se sugiere que este citotipo se habría originado por autoduplicación a partir de un citotipo diploide.

Por otra parte, el número cromosómico básico encontrado en *A. lanata* $x = 10$ es consistente con la ubicación de *Anthaenantia* dentro de la subtribu *Paspalinae*.

El modelo de megasporogénesis y el posterior desarrollo del saco embrionario indican que su sistema de reproducción es sexual. Los resultados obtenidos referentes a la relación polen pistilo bajo fluorescencia confirman que *A. lanata* posee un sistema de autoincompatibilidad con determinación génica que reduce considerablemente la tasa de autofecundación y define su sistema de reproducción como alogamia por autoincompatibilidad.

Dado que no existe información publicada sobre elementos de la biología reproductiva en otras especies de *Anthaenantia*, nuestro estudio constituye la primera cita de eventos reproductivos en este particular género americano.

Referencias bibliográficas

- Anton, A. M. & A. E. Cocucci. 1984. The grass megagametophyte and its possible phylogenetic implications. *Plant Syst. Evol.* 146:117-121.
- Bentham, G. 1881. Notes on Gramineae. *J. Linn. Soc. Bot.* 19:39
- Bentham, G. & J. D. Hooker. 1883. *Gen. pl.* 3 (2) [*Gramineae*]: 1074-1215.

Tabla 3
Producción de semillas expresadas en %. C: Caponio

| | Polinización | | Autopolinización Inflorescencias aisladas |
|---------------------|--------------|---------|--|
| | libre | forzada | |
| C 117 Entre Ríos | 23.6 | 67.4 | 0.59 |
| C 68 Riachuelo | 20 | 41.66 | 1.29 |

- Bocquet, G. & J. D. Bersier. 1960. La valeur systématique de l'ovule: développements tératologiques. *Archives des Sciences, Genève*. 13 (4):475-496.
- Burkart, A. 1969. Flora ilustrada de Entre Ríos, Argentina. *Colección Científica del I.N.T.A.*, Tomo IV, II. Buenos Aires.
- Clayton, W. D. & S. A. Renvoize. 1986. *Genera Graminum, grasses of the World*. Kew Bull. Addit. Ser. 13: 1-389.
- Hackel, E. 1887. Gramineae, en *Engl. u Prantl. Nat. Pfl.-Fam*. Leipzig. 2 (2):1-97.
- Hitchcock, A. S. Espejo Serna, A., A. R. López-Ferrari & J. Valdés-Reyna. 2000. Poaceae. Monocotiledóneas Mexicanas: una Sinopsis Florística 10: 7-236.
- Hitchcock, A. S. 1927. En *Contributions from the United States National Herbarium*. 24, Part 8. "The Grasses of Ecuador, Perú and Bolivia". Pg. 423.
- Hitchcock, A. S. 1930. In *Contribution from the United States National Herbarium*. 24, Part 9. "The Grasses of Central America" pg. 619.
- Hitchcock, A. S. 1936. In *United States Department of Agriculture*. "Manual of the Grasses of the West Indies". *Miscellaneous Publication* N° 243. pg.163.
- Johansen, D. A. 1940. Plant Microtechnique. *McGraw-Hill Book Company, Inc*. New York and London. 511 pp.
- Jong, K. 1997. Laboratory manual of plant cytological techniques. *Royal Botanic Garden, Edinburgh*.
- Kho, Y. & J. Baër. 1968. Observing pollen tubes by means of fluorescence. *Euphytica* 17: 298-302.
- Killeen, T. 1990. The Grasses of Chiquitania. Santa Cruz, Bolivia. *Ann. Missouri Bot. Gard*. 77: 125-201.
- Levan, A., K. Fredga & A. A. Sandberg. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*. 52 (2): 201-220.
- Nicora, E. & Z. Rúgolo de Agrasar. 1987. *Los géneros de gramíneas de América Austral (Argentina, Chile, Uruguay y áreas limítrofes de Bolivia, Paraguay y Brasil)*. Ed. Hemisferio Sur, Buenos Aires. 611 pp.
- Núñez, O. 1952. Investigaciones cariosistémicas en las Gramíneas argentinas de la tribu "Paniceae". *Revista Fac. Agronomía (tercera época)*. Tomo XXVIII. Eva Perón, Buenos Aires. Argentina. 229-256.
- Quarín, C. L. & G. A. Norrmann. 1987. Relaciones entre el número de cromosomas, su comportamiento en la meiosis y el sistema reproductivo del género *Paspalum*. *Anales IV Congreso Latinoam. Bot*. 3: 25-34. Bogotá.
- Rosengurtt, B., B. R. Arrillaga & B. Sierra de Soriano. 1960. Caracteres vegetativos y forrajeros de 175 gramíneas del Uruguay. *Revista Facultad Agronomía, Montevideo*. 47: 1-168.
- Rosengurtt, B., B. R. Arrillaga & P. Izaguirre. 1970. *Gramíneas Uruguayas*. Montevideo. Universidad de la República. 489 p.
- Webster, R. D. 1988. Genera of North American Paniceae (Poaceae: Panicoideae). *Syst. Bot*. 13, N° 4: 576-609.
- Zuloaga, F. O., O. Morrone & L. M. Giussani. 2000. A Cladistic Analysis of the Paniceae: a Preliminary Approach. In S. W. L. Jacobs and J. Everett. *Grasses: Systematics and Evolution*, 123-135. CSIRO Publishing, Collinwood, Victoria, Australia.
- Zuloaga, F. O., O. Morrone, G. Davidse, T. S. Filgueiras, P. M. Peterson, R. J. Soreng & E. J. Judziewicz. 2003. In *Catalogue of New World Grasses (Poaceae): III. Subfamilies Panicoideae, Aristidoideae, Arundinoideae, and Danthonioideae*. Smithsonian Institution. Contributions from the United States National Herbarium 46: 1-662.

Original recibido el 15 de septiembre de 2007;
 primera decisión: 6 de noviembre de 2007;
 aceptado el 27 de diciembre de 2007.
 Editor responsable: L. Galetto.