



**Dra. Silvina Pessino¹; Dr. Juan Pablo Ortiz²; Dra. Viviana Echenique³
Dra. Ana González⁴; Dr. Guillermo Seijo⁴; Ing. Camilo Quarín⁴**

¹Cátedra Química Orgánica
²Cátedra Química Biológica
Facultad de Ciencias Agrarias
Universidad Nacional de Rosario
³CERZOS-CONICET. UNS
⁴IBONE-CONICET. UNNE
pessino@arnet.com.ar

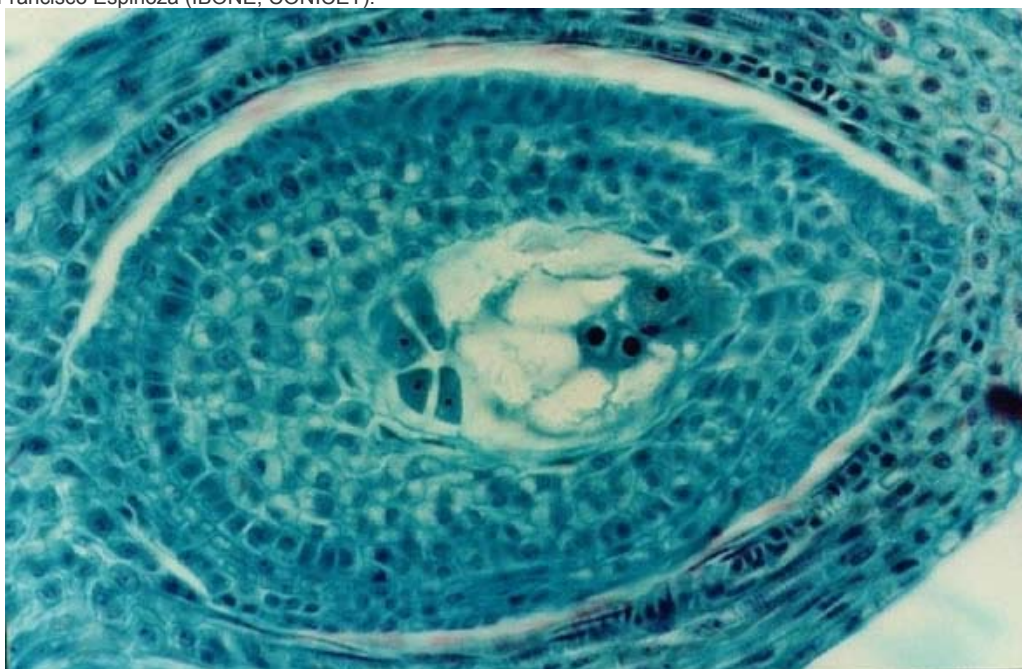
Apomixis: una herramienta poderosa para el mejoramiento

La apomixis es una forma de reproducción clonal a partir de la formación de semillas que portan un embrión genéticamente idéntico a la planta materna. Este modo de reproducción aparece naturalmente en muchas especies de plantas como las frutillas, la manzana, los cítricos, el mango, la mandioca y numerosas gramíneas forrajeras como el pasto horqueta (*Paspalum notatum*) y el pasto llorón (*Eragrostis curvula*).

Las plantas apomíticas no realizan las etapas normales de la reproducción sexual: no reducen a la mitad el contenido de cromosomas durante la formación de las células reproductivas (gametas), ni tampoco llevan a cabo la fecundación, salvo para generar en algunos casos el endosperma de las semillas. Los embriones se originan a partir de células maternas, pero lo hacen siempre dentro de los confines del óvulo. Se forma así una semilla verdadera y perfecta, que contiene adentro un individuo idéntico a la planta materna.

Durante la reproducción sexual una célula del óvulo (célula madre de la megáspora) inicia un proceso de reducción meiótica que concluye con la formación de cuatro megasporas haploides. En la mayoría de las angiospermas sólo una de las megasporas es funcional (las demás degeneran) y se divide por mitosis para formar un saco embrionario octanucleado integrado por una célula huevo, dos sinérgidas, dos núcleos polares y tres antípodas.

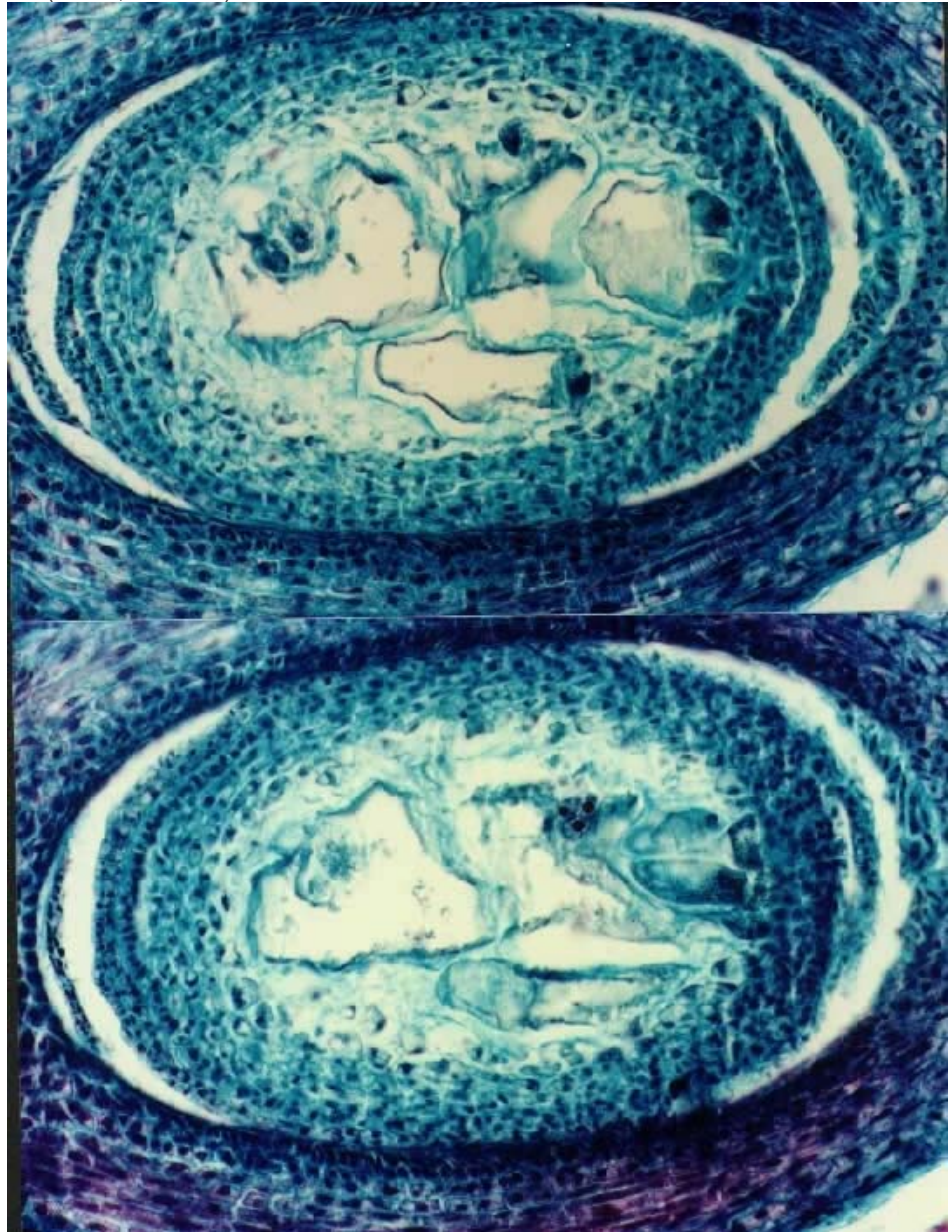
Figura 1: Saco embrionario reducido de un genotipo sexual de *Paspalum notatum*. En el extremo micropilar se observa la célula huevo rodeada por las sinérgidas. Hacia el centro del saco se observan los dos núcleos polares. En el extremo de la chalaza se observan 4 antípodas. La foto fue gentilmente cedida por el Dr. Francisco Espinoza (IBONE, CONICET).



Durante la reproducción apomítica de tipo gametofítica se forma siempre un saco embrionario no reducido, cuyas células contienen el número de cromosomas típico de las células somáticas. Por ejemplo en la

reproducción apomítica apospórica algunas células de la nucela se dividen por mitosis para formar uno o varios sacos embrionarios no reducidos, que contienen una célula huevo, las sinérgidas y núcleos polares y pueden o no poseer antípodas, según el caso.

Figura 2: Sacos embrionarios no reducidos de un genotipo apomítico de *Paspalum notatum*. Se trata de un corte seriado del mismo óvulo. Se distinguen varios sacos en el mismo óvulo, que se originaron en distintas células nucelares. Es notable la ausencia de antípodas. La foto fue gentilmente cedida por el Dr. Francisco Espinoza (IBONE, CONICET).



Mientras la célula huevo reducida de una planta sexual espera la fecundación para formar el cigoto y luego el embrión, la célula huevo no reducida de las plantas apomíticas inicia la formación del embrión por partenogénesis, sin esperar la fecundación. A veces la fecundación es necesaria para formar el endosperma (pseudogamia), pero otras veces éste se desarrolla en forma autónoma.

La introducción de la apomixis en los cultivos mayores (maíz, arroz, sorgo y otros) permitiría propagar en forma clonal a los híbridos, perpetuando su vigor en forma indefinida. Pero también permitiría obtener nuevos híbridos interespecíficos e intergenéricos con mucha facilidad, ya que la apomixis elimina las restricciones en la reproducción que impone el proceso de reducción de cromosomas durante la formación de las células reproductivas. Por otra parte, sería sencillo mantener líneas puras sin necesidad de aislamiento físico. Se facilitaría la tecnología de transgénicos, ya que una vez introducido un transgen en un fondo genético apomítico no sería necesario realizar retrocruzamientos para que sea heredado de manera uniforme por la progenie. Además, el uso programado del carácter permitiría reproducir por semillas muchas especies que actualmente se propagan por métodos vegetativos.

La apomixis representa un beneficio potencial enorme para la agricultura de los países en desarrollo y sus muchos posibles usos varían de acuerdo a la región considerada. Asia necesita urgentemente nuevas variedades de sus principales cereales (principalmente arroz) que posean un mayor potencial de rendimiento que las usadas actualmente, ya que deberá duplicar su producción en los próximos 50 años utilizando el mismo área de cultivo. Uno de los principales obstáculos que enfrenta la producción de arroz híbrido de mayor calidad es la imposibilidad de realizar cruzamientos viables de las variedades mejoradas con otras salvajes portadoras de genes de interés agronómico. La introducción de la apomixis en el arroz facilitaría enormemente la producción de arroz híbrido, ya que ésta eliminaría las etapas propias de la reproducción sexual (que no pueden llevarse a cabo correctamente en los híbridos) y permitiría propagar clonalmente a los mismos por innumerables generaciones. El beneficio potencial calculado para la generación de arroz híbrido usando la tecnología de apomixis fue calculado entre 2,5 y 4 billones de dólares anuales. En el IRRI (International Rice Research Institute, Filipinas) se llevan a cabo desde hace varios años intentos por transferir la apomixis al arroz.

Asimismo en África y Latinoamérica se requiere un gran número de variedades mejoradas de diferentes cultivos (entre ellos algunos tan importantes como el maíz), cada uno de ellos bien adaptados a los diferentes nichos ecológicos propios de esos continentes. Los agricultores africanos y latinoamericanos podrían beneficiarse enormemente por el uso de las semillas híbridas de cultivos que se autorepliquen por apomixis conservando todo su potencial en forma indefinida generación tras generación, y por la reproducción por semillas de especies como la papa. En el CIMMYT (Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo, México), la Universidad del Estado de Utah, USA y la Universidad de Georgia, Tifton, Georgia, USA se hacen intentos por introducir el carácter en el maíz, el trigo y el mijo.

Sexualidad versus Apomixis

Las estrategias de manipulación de la apomixis deben desarrollarse cuidadosamente para impedir que el carácter se disperse en forma indiscriminada a variedades sexuales salvajes, disminuyendo la variabilidad genética y el potencial evolutivo de las especies en cuestión. Las plantas utilizan la sexualidad para mantener la variabilidad genética dentro de sus poblaciones, ya que este modo de reproducción implica la recombinación o rearrreglo de genes durante el proceso de formación de las células reproductivas (gametas) seguida de la reunión en un mismo individuo de genes recombinados provenientes de los progenitores femenino y masculino. Así, cada individuo generado de la reproducción sexual es único. Esta variabilidad es sumamente importante para la evolución y supervivencia de las especies.

Las plantas apomícticas naturales no prescinden en absoluto de las ventajas de la sexualidad. Utilizan variadas estrategias para mantener tanto su capacidad de variar cuando es necesario como de reproducirse velozmente en forma clonal si esto resulta conveniente. Muchas plantas apomícticas forman una parte de su progenie por sexualidad y otra por apomixis. Otras usan una táctica más refinada aún: presentan individuos de dos tipos diferentes, los que tienen un número bajo de cromosomas (diploides) se reproducen por sexualidad y los que tienen un número alto de cromosomas (poliploides) se reproducen clonalmente por apomixis. Los individuos sexuales pueden eventualmente duplicar su número de cromosomas y convertirse en individuos apomícticos poliploides. Esta estrategia compleja de reproducción (conocida como "estrategia Henry Ford", en memoria del creador de los conocidos automóviles) le permite a la planta generar variabilidad a niveles diploides hasta producir un individuo de características superiores, cuya número de cromosomas es luego duplicado para reproducirlo muy eficientemente en forma clonal. Tal como hizo alguna vez el famoso americano ensayando miles de modelos infructuosos hasta producir el exitosísimo Ford T, que vendió por millones en todos los rincones del mundo. No debe extrañarnos entonces que las plantas apomícticas hayan invadido y ocupado velozmente todas las áreas del planeta que quedaron disponibles luego de la última glaciación, y que muchas de ellas sean consideradas malezas por su muy eficiente velocidad de propagación.

En el caso de utilizarse una tecnología para generar híbridos clonales por la manipulación de la apomixis es esencial confinar el carácter exclusivamente a los individuos a cultivar, evitando su dispersión descontrolada a las especies salvajes. Entre las varias estrategias a utilizar para lograr este objetivo está la de introducir el carácter en individuos macho-estériles que no produzcan polen. La planta podría entonces reproducirse eficientemente en forma clonal, sin generar polen que pueda dispersar los genes fuera del sistema cerrado del cultivo. De hecho existen numerosas especies apomícticas autónomas, donde tanto el embrión como el endosperma son generados sin necesidad de fecundación.

Investigación de las bases moleculares de la apomixis

Como sucede con cualquier otro carácter de interés agronómico, la manipulación de la apomixis aplicada al mejoramiento requiere de un conocimiento detallado de sus bases moleculares. O sea, cuáles son los genes involucrados en el desarrollo del carácter y cuáles las vías metabólicas afectadas.

Nuestro grupo se dedica a estudiar cuáles son los genes y las vías moleculares involucradas en la reproducción apomíctica. Este trabajo se realiza en el marco de una colaboración entre la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Rosario (FCA UNR) el CERZOS (Centro de Recursos Naturales de la Zona Semiárida, CONICET, Bahía Blanca) y el IBONE (Instituto de Botánica del Nordeste, CONICET, Corrientes). Inicialmente se identificó el locus genómico que controla la apomixis apospórica en el pasto africano *Brachiaria brizantha*. Luego se llevó a cabo una caracterización genética de más de 40 accesiones del pasto apomíctico *Paspalum notatum*, originarias de diferentes países de América. Esta caracterización detallada nos permitió seleccionar genotipos apropiados para obtener cruzamientos con el fin de realizar un mapa genético completo de la especie *Paspalum notatum*.

Figura 3: Población utilizada para el mapeo genético y localización del locus que gobierna a la apomixis en *Paspalum notatum*. Esta familia fue generada a partir del cruzamiento entre una planta madre sexual (parental pistilado) y un dador de polen apomíctico. La población es segregante para el carácter apomixis. A partir de ella se generó un mapa genético completo de *Paspalum notatum* a nivel tetraploide y se caracterizó la región

genómica que dispara la reproducción asexual en esta especie.



Un mapa genético es un esquema de la posición que ocupan los genes dentro de los cromosomas. Utilizando marcadores moleculares se desarrollaron mapas genéticos completos a nivel diploide y tetraploide.

Figura 4: Construcción del mapa genético de *Paspalum notatum*. En la foto se observa un patrón de bandeo correspondiente a marcadores moleculares de AFLP (Amplification Fragment Length Polymorphisms) obtenido a partir de la población de mapeo. Cada calle del gel corresponde a una planta de la familia segregante utilizada.



Se determinó que en *P. notatum* el/los gen/es que controlan la apomixis se encuentran localizados en un sector de un cromosoma que ha sufrido una alteración (posiblemente una inversión). Los genes ubicados cerca y dentro de esta región están inactivados, dando origen a la apomixis. Se caracterizó a nivel molecular el desarrollo en los órganos reproductivos de plantas apomícticas de *Paspalum notatum* y de *Eragrostis curvula* (pasto llorón), comparándolo con el de las plantas sexuales. De esa manera logramos identificar numerosos genes que presentaban actividad o estaban inhibidos (silenciados) únicamente en la planta apomíctica. Algunos de estos genes se hallan localizados dentro de la región genómica que gobierna el carácter. Los genes descubiertos son una “caja de herramientas” con la que se puede intentar manipular el carácter apomixis para utilizarlo en beneficio de la agricultura. Se han iniciado experimentos para modificar la expresión de los genes identificados en plantas de pasto horqueta.

Además de los Dres. Pessino, Ortiz, Echenique, González, Seijo y el Ing. Quarin, integran este grupo de investigación las Dras Silvana Felitti y Juliana Stein, las becarias de CONICET Bioq. Natalia Laspina, Lic. Ana Ochogavía, Lic. Maricel Podio, Lic. Lorena Siena y Lic. María Pía Rodríguez (FCA UNR), el Dr. Gerardo Cervigni y el Lic. Juan Pablo Selva (CÉRZOS) el Dr. Francisco Espinoza, el Dr. Eric Martínez, la Lic. Romina Rebozio, la Ing. Marita Sartor y la Ing. Florencia Galdeano (IBONE).

Bibliografía

- Cardone S, Polci P, Selva JP, Mecchia M, Pessino SC, Herrmann P, Cambi V, Voigt P, Spangenberg G and Echenique V (2006) Novel genotypes of the subtropical grass *Eragrostis curvula* for the analysis of apomixis (diplospory). *Euphytica* 151 (2) 263-272.
- Cervigni GD, Paniego N, Pessino S, Selva JP, Zappacosta D, Spangenberg G, Echenique VC (2008) Gene expression in diplosporous and sexual *Eragrostis curvula* genotypes with differing ploidy levels. *Plant Mol. Biol.* 67: 11-23.
- Cervigni GD, Paniego N, Díaz M, Selva JP, Zappacosta D, Zanazzi D, Landerreche I, Felitti S, Pessino S, Spangenberg G, Echenique VC (2008) Expressed sequence tag analysis and development of gene associated markers in a near-isogenic plant system of *Eragrostis curvula*. *Plant Mol. Biol.* 67: 1-10.

- Daurelio L, Espinoza F, Pessino SC, Quarín CL. (Bahia grass) Genetic diversity in sexual diploid and apomictic tetraploid populations of *Paspalum notatum* situated in sympatry or allopatry. *Plant System. Evol.* 244: 189-199.
- Espinoza F, LD Daurelio, SC Pessino, CL Quarín and EM Valle (2006) Genetic characterization of *Paspalum notatum* accessions by AFLP markers. *Plant System. Evol.* 258:147-159.
- Espinoza F, SC Pessino, CL Quarín, EM Valle (2002) Effect of pollination timing in the rate of apomictic reproduction revealed by RAPD markers. *Annals of Botany*, 89:165-170.
- Laspina NV, Vega T, Seijo G, González AM, Martelotto LG, Stein J, Podio M, Ortiz JPA, Echenique VC, Quarín CL, Pessino SC (2008) Gene expression analysis at the onset of aposporous apomixis in *Paspalum notatum*. *Plant Mol. Biol.* 67: 615-628.
- Martelotto LG, Ortiz JPA, Stein J, Espinoza F, Quarín CL, Pessino SC (2007) Genome variation induced by a change of the ploidy level in *P. notatum*. *Plant Sci.* 172-5: 970-977.
- Martelotto LG, Ortiz JPA, Stein J, Espinoza F, Quarín CL, Pessino SC (2005) A comprehensive analysis of gene expression alterations in a newly synthesized *Paspalum notatum* autotetraploid. *Plant Sci.* 169 1: 211-220.
- Mecchia MA, Ochogavía A, Selva JP, Laspina N, Felitti S, Martelotto LG, Spangenberg G, Echenique V, Pessino SC (2007) Genome polymorphisms and gene differential expression in a 'back-and-forth' ploidy-altered series of weeping lovegrass (*Eragrostis curvula*). *J. Plant Physiol.* 164-8 1051-1061.
- Ortiz JPA and SC Pessino. Apomixis and its potential role in agriculture (2002) *Agr. Biotech Net*, Vol 4 February, ABN 081.
- Ortiz JPA, Pessino SC, Leblanc O, Hayward MD, Quarín CL (1997) Genetic fingerprinting for determining the mode of reproduction in *Paspalum notatum*, a subtropical apomictic forage grass. *Theor. Appl. Genet.* 95:850-856.
- Ortiz JPA, SC Pessino, V Bhat, MD Hayward, CL Quarín (2001). A genetic linkage map of diploid *Paspalum notatum*. *Crop Sci.* 41: 823-830.
- Pessino SC, Espinoza F, Martínez EJ, Ortiz JPA, Valle EM, Quarín CL (2001) Isolation of cDNA clones differentially expressed in flowers of apomictic and sexual *Paspalum notatum*. *Hereditas* 134: 35-42.
- Pessino SC, Evans C, Ortiz JPA, Armstead I, do Valle CB, Hayward MD (1998) A genetic map of the apospory region in *Brachiaria* hybrids: identification of two markers closely associated with the trait. *Hereditas* 128: 153-158.
- Pessino SC, Ortiz JPA, Leblanc O, do Valle CB, Evans C, Hayward MD (1997) Identification of a maize linkage group related to apomixis in *Brachiaria*. *Theor. Appl. Genet.* 94: 439-444.
- Quarín CL, F Espinoza, EJ Martínez, SC Pessino, OA Bovo (2001) A rise of ploidy level induces the expression of apomixis in *Paspalum notatum*. *Sexual Plant Reprod.* 13:243-249.
- Stein J, Pessino SC, Martínez EJ, Rodríguez MP, Siena LA, Quarín CL and Ortiz JPA (2007) A framework genetic map of apomictic tetraploid *Paspalum notatum* (Bahia grass) based on single-dose molecular markers. *Mol. Breed.* 20: 153-166.
- Stein J, Quarín CL, Martínez EJ, Pessino SC, Ortiz JPA (2004) Tetraploid races of *Paspalum notatum* show polysomic inheritance with preferential chromosome pairing and suppression of recombination around the apospory-controlling locus. *Theor. Appl. Genet.* 109 (1): 186-191.