

CITOLOGIA Y METODO DE REPRODUCCION DE *Panicum* *elephantipes* (GRAMINEAE)

Por MARIO HUGO URBANI*

Summary *Cytology and reproduction of *Panicum elephantipes* (Gramineae).* The cytology, the method of reproduction and the breeding system of *Panicum elephantipes* Nees ex Trin. were studied. The species had $2n = 30$ chromosomes which associated at meiotic metaphase I primarily as 15 bivalents. This indicated that $x = 15$ is another basic chromosome number for *Panicum*, different from $x = 9$ and $x = 10$ which are the most common basic numbers in this genus. The study of megasporogenesis and megagametogenesis showed that embryo sac developed from a cytologically reduced megaspore as is typical of sexual reproducing grasses. The embryo sac was of the *Polygonum* type. Proliferation of antipodal cells was not observed. This aquatic species flowered at Corrientes, Argentina, from late February up to the second half of May. Anthesis occurred early in the afternoon and the anthers dehisced immediately after emergence. Pollen grains germinated soon after landing on the stigma papillae. Approximately three hours after pollination, the pollen tubes penetrated the pistil all the way long and introduced into the embryo sac. Pollen tube growth into the pistil after self-pollination and seed production under selfing, indicated there are no genetic barriers for self-fertilization. The breeding system and the frequent vegetative propagation by succulent floating branches, likely account for genetic uniformity in *P. elephantipes* populations.

INTRODUCCION

Panicum elephantipes Nees ex Trin. es una gramínea perenne, acuática, de muy amplia distribución en bajas latitudes, desde el Caribe y sur de México hasta las desembocaduras de los ríos Paraná y Uruguay en Sudamérica. Frecuente en los grandes ríos sudamericanos donde suele formar extensas colonias, generalmente arraigadas en el barro y con largos tallos flotantes. Otras veces forma parte de los embalsados o islas flotantes. Durante los períodos de grandes crecientes de los ríos se suelen desprender fragmentos de estas colonias y migrar arrastrados por la corriente.

Esta especie pertenece al subgénero *Panicum*, sección *Dichotomisflora* (Hitche. & Chase) Honda, la que está constituida por sólo siete especies (Zuloaga, 1987). Recuentos cromosómicos en células mitóticas en puntas de raíces permitieron a Covas (1949) establecer que *P. elephantipes* tiene $2n = 30$ cromosomas. Nuñez (1952) llega al mismo resultado y hace notar que el número cromosómico de la especie ($2n = 30$) no concuerda con el número básico típico ($x = 9$) del subgénero al que pertenece y que podría tratarse de un número básico secundario ($x = 15$).

El objetivo de este trabajo es estudiar algunos elementos del sistema genético de la especie mencionada. En primer lugar, conocer el número de cromosomas y su comportamiento en la meiosis. Segundo, establecer el sistema reproductivo de esta especie.

MATERIAL Y METODOS

El material estudiado procede de la provincia del Chaco, Argentina, y fue colectado a 2 Km al noroeste del puente interprovincial Chaco-Corrientes, a orillas del río Tragadero. El ejemplar original (Quarín y Urbani 3956) se encuentra depositado en CTES y se enviaron duplicados a: BAA, G, K, LIL y US.

El recuento cromosómico se realizó en ápices de raíces. Las raíces se pretrataron en 1-bromonaftaleno durante dos horas, se fijaron e hidrolizaron al mismo tiempo en ácido clorhídrico 1N durante 10 minutos a 60°C. Se utilizó la Fucsina básica como colorante durante una hora y se realizó el aplastado en orceína acética al 2%.

Para el estudio de la meiosis se eligieron espiguillas en las cuales, mediante coloración con carmín acético, se había detectado una antera en división meiótica. Las espiguillas con las dos anteras restantes fueron hidrolizadas en ácido clorhídrico 1N durante 8 minutos a 60°C. Se colorearon con fucsina básica durante una hora, se extrajeron

*Becario del CONICET. Instituto de Botánica del Nordeste, Facultad de Ciencias Agrarias, UNNE, Casilla de Correo 209, 3400-Corrientes, Argentina.

ambas anteras y se colocaron sobre un portaobjetos en orceña acética; se las rompió con una pequeña espátula, se eliminaron los restos de anteras y se aplastaron las células remanentes.

El modo de reproducción se estableció por medio de estudios embriológicos. Se fijaron inflorescencias en distintos estados de desarrollo en FAA (Alcohol éflico 70°: formaldehído: ácido acético glacial; 90:5:5) y se conservaron en alcohol 70° a 5°C hasta su procesado. Este consistió en una deshidratación en una serie creciente de alcohol butírico terciario, imbibición en parafina, corte con micrófoma a 10-12 micrones de espesor y coloración con safranina y fastgreen. Para los estadios muy jóvenes se procesaron las flores envueltas en las glumelas, y para los estadios más avanzados, solamente ovarios.

La determinación del sistema reproductivo fue complementado con otros estudios. Por medio de observaciones directas realizadas en su hábitat natural o en cultivo, se determinó el orden en que las espiguillas florecen en la inflorescencia para completar su floración, el horario de la antesis, y el tiempo que transcurre entre la antesis y la caída de la espiguilla madura.

Con microscopio de epifluorescencia y aplicando el método descrito por Kho y Baër (1968), se observó la germinación de granos de polen y el desarrollo de los tubos polínicos en los pistilos. Estos estudios se hicieron después de autopolinización y también después de polinización cruzada. Se determinó la capacidad de producir semillas en condiciones de autofecundación manteniendo inflorescencias ensobradas desde antes de la antesis hasta la cosecha. Tanto los estudios con microscopía de fluorescencia como el ensobrado de las inflorescencias, tuvieron por objeto determinar si en la especie existe algún tipo de barrera genética que impida la autofecundación.

RESULTADOS Y DISCUSION

En mitosis se contaron $2n = 30$ cromosomas, en coincidencia con los recuentos previos para la especie hechos por Covas (1949) y Nuñez (1952).

Se estudiaron 90 células durante la diacinesis y metafase I de la meiosis. En 84 de ellas se observaron 15 bivalentes (Fig. 1, A). Cuatro células presentaban 14 bivalentes más 2 univalentes, probablemente producto de un bivalente separado tempranamente; y en dos células se observaron 13 bivalentes y un cuadrivalente. Este podría deberse a alguna translocación heterocigótica recíproca que debe involucrar un segmento muy pequeño puesto que el cuadrivalente aparece con muy baja frecuencia. Se observaron además 14 células en anafase I y

en todas se contaron 15 cromosomas hacia cada polo.

Las especies del subgénero *Panicum* al que pertenece *P. elephantipes*, se caracterizan, entre otras cosas, por poseer un número básico de cromosomas $x = 9$. El número zigótico de $2n = 30$ cromosomas en el material aquí estudiado, y la regularidad con que se aparean para formar generalmente 15 bivalentes en la meiosis, apoya la hipótesis de Nuñez (1952) de un nuevo número básico de $x = 15$ para la especie, y por ende para el género.

Del estudio embriológico practicado, surge que el óvulo es bitegumentado, siendo el tegumento externo de menor desarrollo que el interno. La inserción del mismo está en una amplia zona del tercio inferior de la pared posterior del ovario. Su posición inicial es más o menos perpendicular a la pared del ovario. A medida que crece se curva gradualmente hasta que el eje cáalaza-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. El tegumento interno rodea todo el óvulo, mientras que el externo sólo cubre la mitad posterior del óvulo, la que da hacia la inserción en el ovario.

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 diferencia de las células nucleares por ser de mayor tamaño y por su forma alargada, mientras que su nucleólo es más refrigente y voluminoso (Fig. 1, B). La primera división meiótica da por resultado una díade, y la segunda división, una tétrade lineal de megásporas (Fig. 1, C), tres de las cuales inmediatamente degeneran, quedando como funcional la ubicada hacia el polo calazal (Fig. 1, D). A partir de esta megáspora se desarrolla un gametofito femenino con siete células y ocho núcleos, de manera tal que al momento de la antesis se pueden observar: hacia la micrópila, la ósfera flanqueada por dos sinérgidas, un poco más arriba una célula central binucleada muy vacuolizada; y hacia el polo calazal, tres antípodas uninucleadas (Fig. 1, E). Esta descripción corresponde a un saco embrionario del tipo *Polygonum*, en el cual no se produce la proliferación de las antípodas como se considera que es característica de la familia de las gramíneas. Anton y Cocucci (1984), en una revisión del tema, clasifican a los sacos embrionarios meióticos de las gramíneas (*Poaceae*) como tipo *Polygonum* variante *Poaceae*, mencionando que el número de antípodas varía entre 6 y 300. Las únicas excepciones que

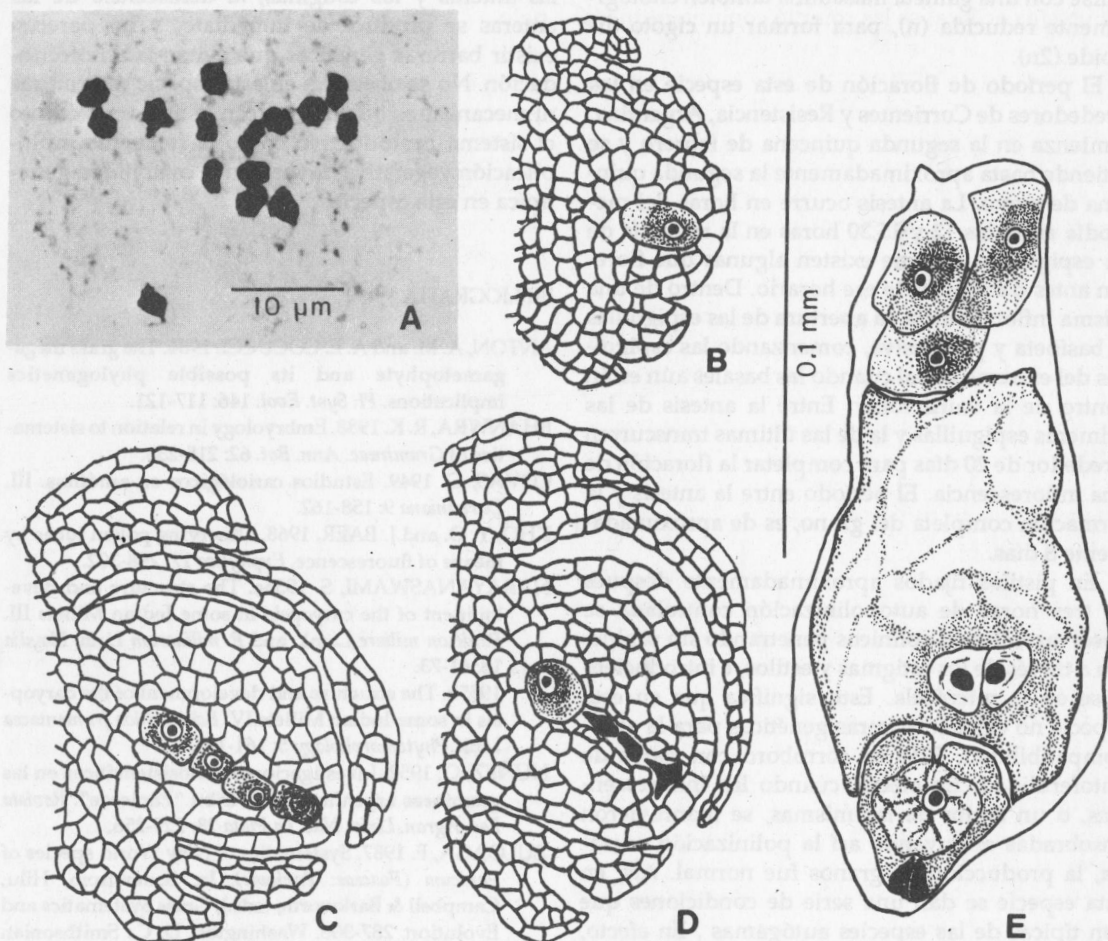


Fig. 1.— Algunos estados de microsporogénesis, megasporogénesis y megagametogénesis en *Panicum elephantipes*. A: Metafase I de una meiosis masculina mostrando 15 bivalentes ($2n = 30$). B: Célula madre de las megásporas en un corte longitudinal por un óvulo joven. C: Tétrade de megásporas. D: Megáspora funcional hacia la cálaza y las restantes en proceso de degeneración. E: Megagametófito al momento de la antesis, en el que se observan: hacia arriba tres antípodas, luego una célula central binucleada, muy vacuolizada, y hacia abajo el aparato oosférico; en las sinérgidas no se observan sus respectivos núcleos.

mencionan Anton y Cocucci son *Panicum miliare* Lam. en el cual Narayanaswami (1955a) encontró sacos embrionarios estrictamente del tipo *Polygonum*, sin proliferación de antípodas, y *Echinochloa frumentacea* (Roxb.) Link., para la cual Narayanaswami (1955b) describe un saco embrionario con tres antípodas 2-3 nucleadas. Sin embargo, Bhanwra (1988) menciona varias especies de gramíneas, pertenecientes a diferentes subfamilias, que poseen sacos embrionarios con solamente tres

antípodas. Estos datos, conjuntamente con lo aquí observado en *P. elephantipes*, podrían estar indicando que los sacos embrionarios del tipo *Polygonum*, estrictamente 8-nucleados, son más frecuentes de lo que se suponía en esta familia.

La megasporogénesis y la megagametogénesis de esta especie son características de las gramíneas de reproducción sexual. En efecto, ambos procesos concluyen en la formación de la gameta femenina, la óosfera, citológicamente reducida (n). Esta debe

unirse con una gameta masculina también citológicamente reducida (n), para formar un cigoto diploide (2n).

El período de floración de esta especie en los alrededores de Corrientes y Resistencia, Argentina, comienza en la segunda quincena de febrero y se extiende hasta aproximadamente la segunda quincena de mayo. La antesis ocurre en horas del mediodía entre las 12 y 15,30 horas en la mayoría de las espiguillas, aunque existen algunas que florecen antes o después de ese horario. Dentro de una misma inflorescencia, la apertura de las espiguillas es basípeta y progresiva, comenzando las espiguillas del extremo distal cuando las basales aún están dentro de la vaina foliar. Entre la antesis de las primeras espiguillas y la de las últimas transcurren alrededor de 20 días para completar la floración de una inflorescencia. El período entre la antesis y la formación completa del grano, es de aproximadamente 8 días.

En pistilos fijados aproximadamente después de tres horas de autopolinización controlada se observaron tubos polínicos penetrando sin problema a través de los estigmas y estilos, e introduciéndose en la micrópila. Esto significa que en esta especie no existen barreras genéticas para la auto-compatibilidad. Esto se corroboró con datos de autofertilidad. En efecto, cuando las inflorescencias, o un sector de las mismas, se mantuvieron ensobradas excluyendo así la polinización cruzada, la producción de granos fue normal. Así, en esta especie se dan una serie de condiciones que son típicas de las especies autógamas. En efecto, de la espiguilla uniflora emergen simultáneamente

las anteras y los estigmas, la dehiscencia de las anteras se produce de inmediato, y no parecen existir barreras genéticas que eviten la autofecundación. No se observan en esta especie estructuras ni mecanismos que favorezcan la alogamia. Tanto el sistema reproductivo como la frecuente multiplicación vegetativa, favorecen la estabilidad genotípica en esta especie.

BIBLIOGRAFIA

- ANTON, A. M. and A. E. COCUCCHI. 1984. The grass megagametophyte and its possible phylogenetic implications. *Pl. Syst. Evol.* 146: 117-121.
- BHANWRA, R. K. 1988. Embryology in relation to systematics of *Gramineae*. *Ann. Bot.* 62: 215-233.
- COVAS, G. 1949. Estudios cariológicos en antófitas. III. *Darwiniana* 9: 158-162.
- KHO, Y. O. and J. BAER. 1968. Observing pollen tubes by means of fluorescence. *Euphytica* 17: 298-302.
- NARAYANASWAMI, S. 1955a. The structure and development of the caryopsis in some Indian Millets III. *Panicum miliare* Lamk. and *P. miliaceum* Linn. *Lloydia* 18: 61-73.
- 1955b. The structure and development of the caryopsis in some Indian Millets IV. *Echinochloa frumentacea* Link. *Phytomorphology* 5: 161-171.
- NUÑEZ, O. 1952. Investigaciones cariosistemáticas en las gramíneas argentinas de la tribu "Paniceae". *Revista Fac. Agron. Univ. Nac. La Plata* 28: 229-256.
- ZULOAGA, F. 1987. Systematics of New World species of *Panicum* (Poaceae: Paniceae). In: Soderstrom, Hilu, Campbell & Barkworth, (eds.), *Grass Systematics and Evolution*: 287-306. Washington, D. C.: Smithsonian Institution Press.