UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA, BIOQUÍMICA Y FARMACIA

CREACIÓN DE UN CALENDARIO REPRODUCTIVO FLORAL PARA ESTUDIOS DE EXPRESIÓN DE GENES EN PASTO LLORÓN (*Eragrostis curvula*)

TESINA PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS:

PRESENTADA POR:

Petrus Alexander Bisp

BAJO LA DIRECCIÓN DE:

Dr. Juan Pablo Selva

Bahía Blanca, Julio 2022

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA, BIOQUÍMICA Y FARMACIA

CREACIÓN DE UN CALENDARIO REPRODUCTIVO FLORAL PARA ESTUDIOS DE EXPRESIÓN DE GENES EN PASTO LLORÓN (*Eragrostis curvula*)

TESINA PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS:

Petrus Alexander Bisp

Juan Pablo Selva

AGRADECIMIENTOS

- A mi director, el Dr. Juan Pablo Selva, por todo el compromiso, dedicación y ayuda durante la realización del trabajo.
- A mi profesora consejera Natalia Stefanazzi, por brindarme orientación y esclarecer mis dudas a lo largo de la carrera.
- Al CERZOS por permitirme usar las instalaciones y equipamiento.
- A mi familia, que ha estado siempre brindando apoyo, y me ha permitido estudiar.
- A mi madre, por su dedicación incondicional y por todos sus consejos.
- A mis compañeros, con quienes fue posible llevar a cabo la carrera.
- A mis amigos, que estando cerca o lejos, me han alentado a continuar.
- A Lucas G. y Azul E., por sus aportes que permitieron visualizar de forma excelente los resultados.
- A todos los que de una forma u otra me hayan impulsado en esta etapa.

ÍNDICE

Agradecimientos 3
Resumen 5
Introducción 6
Características morfológicas 6
Reproducción sexual 8
Desarrollo del gametofito masculino (microgametofito) 8
Desarrollo del gametofito femenino (megagametofito) 9
Apomixis 10
Hipótesis 14
Objetivos 14
Materiales y métodos 15
Material vegetal 15
Observaciones citoembriológicas 15
Análisis 18
Resultados 19
Método de clarificación para flores de pasto llorón 19
Observaciones citoembriológicas 21
Desarrollo del saco embrionario sexual 21
Desarrollo del saco embrionario apomíctico: 23
Microsporogénesis y microgametogénesis: 23
Desarrollo del calendario reproductivo 26
Discusión 32
Conclusión 34
Bibliografía 35

RESUMEN

Eragrostis curvula (conocida como pasto llorón) es una gramínea ampliamente distribuida y muy difundida como uso para forrajes debido a su gran rusticidad y adaptabilidad a distintos tipos de suelos, generalmente en suelos más bien infértiles. Por este motivo, el interés por su estudio se ha incrementado, y más aún por su capacidad diferencial de reproducción, en la cual además de la reproducción sexual (que involucra la interacción del grano de polen con el saco embrionario para formar el fruto) posee también otro modo de reproducción conocido como apomixis, más específicamente apomixis diplospórica. Esta especie se ha convertido en un modelo para el estudio de la apomixis ya que presenta genotipos con distinto modo reproductivo (apomícticos obligados, apomícticos facultativos y sexuales). El grupo de trabajo del laboratorio de biotecnología vegetal del CERZOS ha realizado varios estudios tendientes a la dilucidación de los mecanismos moleculares de la apomixis diplospórica en pasto llorón utilizando distintos enfoques (transcriptómico, genómico y evaluando aspectos epigenéticos). Para la búsqueda de los factores asociados al carácter, es necesario poder identificar pistilos en un determinado estadio de desarrollo en los distintos genotipos de pasto llorón, para luego buscar genes diferencialmente presentes o expresados.

El objetivo del presente trabajo fue desarrollar un calendario reproductivo con información detallada de tamaño y características del desarrollo de los gametofitos masculino y femenino y de las estructuras que los contienen (antera y pistilo) en tres genotipos de pasto llorón con modo reproductivo contrastante (sexual, apomíctico facultativo y apomíctico obligado). Para lograr dicho objetivo se procedió con el estudio de las flores y se realizaron las mediciones de distintos parámetros (largo de pistilo, largo de ovario, ancho de ovario y largo de antera). A su vez se caracterizaron los estadios de cada órgano para establecer una relación entre las medidas obtenidas y el estadio de cada uno utilizando el microscopio óptico con contraste de interferencia diferencial. Luego se procedió a un análisis de los datos obtenidos y la comparación de los mismos para concluir cuál de los parámetros analizados es el más indicado para lograr la obtención de pistilos en un estadio determinado del desarrollo del megasporofito/megagametofito.

El proceso de clarificación utilizado para la microscopía de contraste de interferencia diferencial fue exitoso, permitiendo ver la anatomía interna de los ovarios y anteras, y registrar todos los estadios del desarrollo del saco embrionario y del grano de polen. Se encontraron diferencias en el tamaño de los pistilos y anteras entre los distintos genotipos. La comparación entre el desarrollo masculino y del óvulo mostró que en general los procesos de meiosis en la microsporogénesis y megasporogénesis son coincidentes. Finalmente, para la creación del calendario reproductivo se utilizó como parámetro el largo de pistilo debido a su baja variabilidad en comparación a los otros parámetros, y se separó en cuatro rangos de medidas que contienen los estadios de desarrollo del óvulo.

Este trabajo permitió describir el desarrollo reproductivo del pasto llorón y crear el calendario para realizar trabajos de análisis de expresión de forma más rápida y eficiente.

INTRODUCCIÓN

Cuando se habla de la capacidad de desarrollo de plantas forrajeras en ambientes desfavorables, *Eragrostis curvula* (pasto llorón) es una gran candidata para cumplir esta tarea. Esta gramínea, originaria de Sudáfrica y naturalizada en Argentina (Fig. 1), se destaca por poseer una extraordinaria rusticidad, una gran capacidad para prosperar en suelos pobres en fertilidad y su aptitud para consolidar suelos erosionables, incluso médanos (Covas, 1991).

Esta especie constituye un grupo polimórfico, morfológicamente diverso y no totalmente circunscripto, motivo por el cual se lo conoce como complejo *E. curvula* o *E. curvula sensu lato* (Voigt et al., 2004).

Figura 1: Pasto llorón creciendo sobre la banquina de la ruta nacional 33.

Características morfológicas

Se trata de una planta perenne, que se caracteriza por el macollaje y el crecimiento cespitoso, pudiendo alcanzar hasta los 180 cm de alto cuando está en floración, y hasta unos 50 cm de diámetro de corona (Fig. 2A). En cuanto a la inflorescencia, cuenta con una panoja formada por un eje ramificado, con ramas que varían de longitud según la variedad, sosteniendo espiguillas que contienen de 5 a 10 flores (Fig. 2B). El desarrollo de la panoja de *E. curvula* es típicamente heterocrónico. Dentro de la panoja, los raquis superiores presentan estadios más avanzados en el desarrollo que los de la base de la panoja. Dentro de los raquis las espiguillas superiores también presentan estadios más avanzados en el desarrollo que las espiguillas de la base (Fig. 2C). Sin embargo, dentro de cada espiguilla, las flores basales se encuentran más desarrolladas que las superiores (Fig. 2D). Las flores están compuestas por tres estambres (órganos sexuales masculinos, androceo) y un pistilo (órgano femenino, gineceo) con un ovario de forma redonda u ovoidal (dependiendo del estadío) y dos estilos que finalizan en dos estigmas plumosos (Fig. 2E). Ambos órganos de la flor se encuentran protegidos dentro de las glumelas. El fruto es un cariopse de forma ovoide muy pequeño (menor a 2 mm) (Covas, 1991) (Fig. 2F).

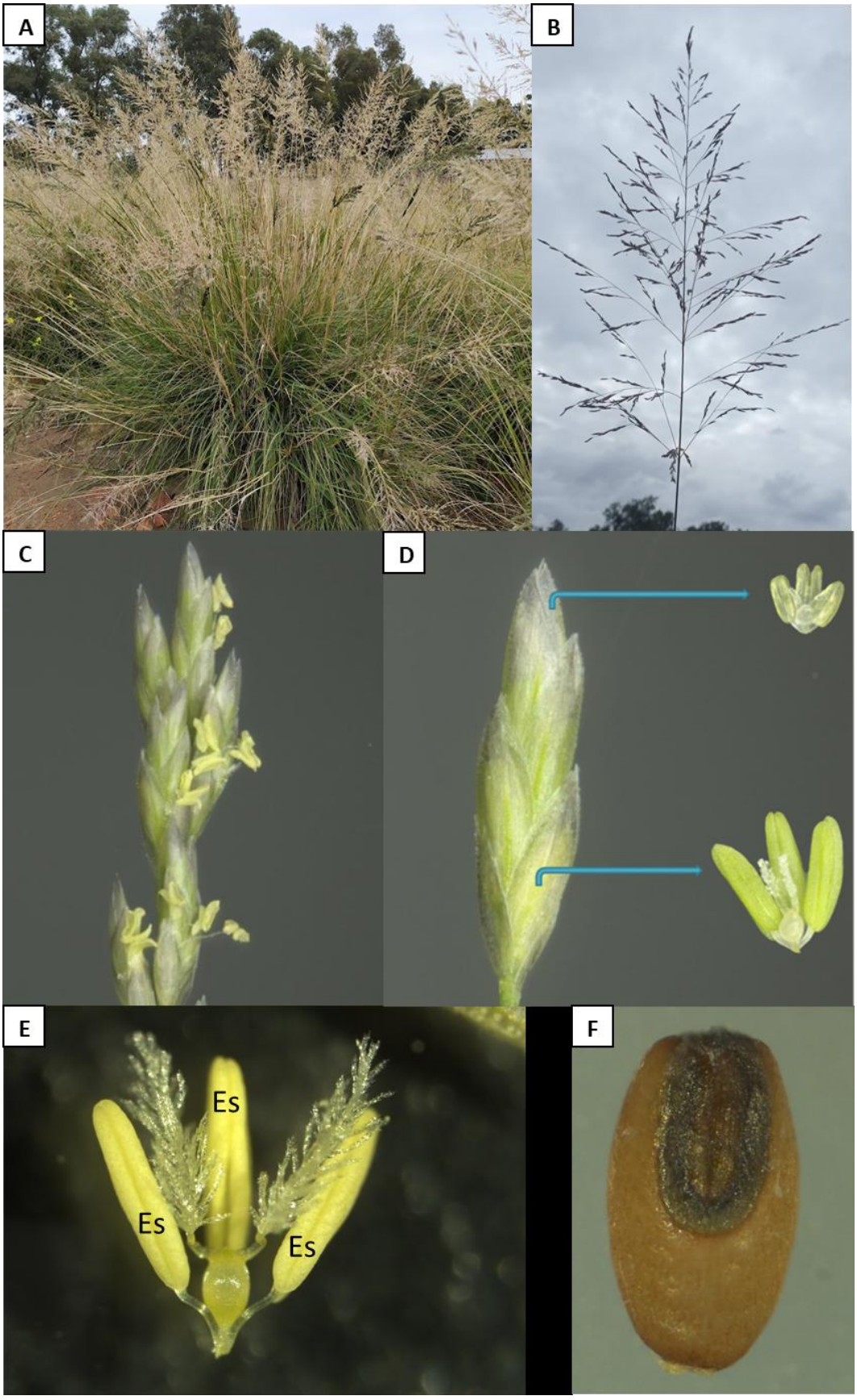


Figura 2: Características morfológicas principales de *E. curvula*. **A**: planta adulta en floración. **B:** panoja. **C:** detalle de un raquis con varias espiguillas. **D:** espiguilla, junto con las flores que la conforman. En la parte basal se encuentra la flor más madura y en la parte superior el estadio más joven, con un menor tamaño. **E:** flor, conformada por tres estambres (Es) y un pistilo central. **F:** fruto cariopse.

Reproducción sexual

Como todas las plantas pertenecientes al grupo de las plantas con flor (Angiospermas), se debe tener en cuenta el ciclo de vida que poseen las mismas, que comprende un mecanismo de alternancia de generaciones: esporofítica y gametofítica (Goldberg et al., 1994). El esporofito (que forma la mayor parte del ciclo) surge luego de la fecundación, a partir de un cigoto diploide (con dos juegos de cromosomas, uno de cada gameto) que, posteriormente, da lugar a la parte vegetativa de la planta (tallos, hojas y raíces) y a las flores que contienen a los órganos sexuales, estambres y carpelos (Goldberg et al., 1994). En estos órganos sexuales, se originan los gametofitos, femenino (saco embrionario) y masculino (granos de polen), en los cuales se formarán los gametos haploides que participarán de la fecundación, cerrando el ciclo (Yadegari y Drews, 2004; Fan et al., 2008).

Desarrollo del gametofito masculino (microgametofito)

Cada estambre (órgano sexual masculino) está formado por el filamento y la antera, dentro de la cual se forman los granos de polen mediante los procesos de microsporogénesis y microgametogénesis.

La microsporogénesis, o formación de la micróspora, inicia con el arqueosporio, tejido esporógeno que por mitosis genera las células madre del grano de polen. Estas células, también llamadas células madre de las micrósporas, reducirán la carga cromosómica mediante meiosis, generando tétradas de células haploides (micrósporas). Posteriormente, las micrósporas aumentarán de tamaño y se separarán en células individuales (Bedinger, 1992) (Fig. 3).

La microgametogénesis comprende el desarrollo del grano de polen (Fig. 3). Para ello, la micróspora aumenta de tamaño y se genera una vacuola que acompaña el crecimiento del grano, desplazando el núcleo hacia la pared de la micróspora. Posteriormente, el núcleo se divide asimétricamente formando la célula generativa y la vegetativa que constituyen el grano de polen maduro. La célula generativa posee un núcleo condensado y menos citoplasma que la vegetativa y, en el momento de la fecundación, volverá a dividirse formando dos núcleos espermáticos, que fecundarán a la ovocélula y a la célula central, danto lugar a la formación del cigoto y del endosperma, respectivamente. La célula vegetativa cumple la función de formar y permitir el crecimiento del tubo polínico (Mc Cormick, 1993).

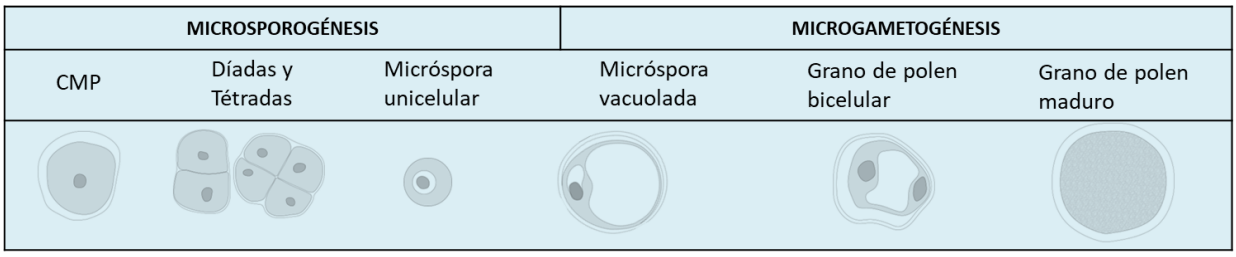


Figura 3: Microsporogénesis y microgametogénesis en *Eragrostis curvula*. CMP: célula madre del polen.

Desarrollo del gametofito femenino (megagametofito)

En *E curvula*, como en todas la Poáceas, el gineceo está formado por un único pistilo compuesto por dos carpelos unidos (gamocarpelar). En el interior del ovario se encuentra el óvulo, unido a la pared del ovario mediante el funículo. Cada óvulo está recubierto por dos capas tegumentarias que convergen dejando una abertura, denominada micrópilo, que permite el ingreso del tubo polínico durante la fecundación. En el extremo opuesto del óvulo, se encuentra la chalaza. En el interior del óvulo se desarrolla la nucela, una masa de tejido compacto en la que se diferenciará la célula madre de la megáspora (CMM) (Bhojwani y Bhatnagar, 1983).

El desarrollo del gametofito femenino, denominado saco embrionario, se lleva a cabo mediante los procesos de megasporogénesis y megagametogénesis (Fig. 4). Durante la megasporogénesis, la CMM (2n) se diferencia en el interior de la nucela, y más tarde se divide meióticamente generando cuatro células haploides (megásporas), que generalmente adoptan una disposición lineal (tétrada). Dentro de los diferentes modelos de división que podemos encontrar en el desarrollo del saco embrionario en diversas especies, *E. curvula* presenta un tipo de división monospórica, en la cual, de las 4 megásporas formadas, las tres que se encuentran cercanas al micrópilo sufren muerte celular y degeneran, quedando así una megáspora funcional (MF) en el extremo chalazal. (Yadegari y Drews, 2004). La megagametogénesis comprende la formación y el crecimiento del saco embrionario, de modo que la MF comienza a realizar divisiones mitóticas, formando un saco inmaduro o joven binucleado, luego tetranucleado y por último octonucleado, primeramente sin citocinesis, y luego, generando un saco maduro con células diferenciadas: tres antípodas en el extremo chalazal, una célula central binucleada (con dos núcleos llamados núcleos polares) y dos sinérgidas y una ovocélula en el extremo micropilar (Fig. 4). Este patrón de desarrollo es descrito como tipo-*Polygonum*. En *Eragrostis* las antípodas continúan dividiéndose por lo que se ve una proliferación de antípodas en el polo chalazal (Vorster et al., 1984).

Una vez formados ambos gametofitos (femeninos y masculinos), se lleva a cabo la doble fecundación, que implica primeramente el transporte del grano de polen hacia el estigma del pistilo, donde germina formando el tubo polínico, el cual crece a lo largo del estilo hasta llegar al micrópilo donde se liberan los núcleos espermáticos (n). Uno, fecundará a la ovocélula (n) dando el cigoto (2n) y el otro, se fusionará a los núcleos polares (centrales) formando el endosperma (3n). Posteriormente, a través de múltiples divisiones mitóticas, se originará una semilla madura conteniendo al embrión y el endosperma. (Yadegari y Drews, 2004).

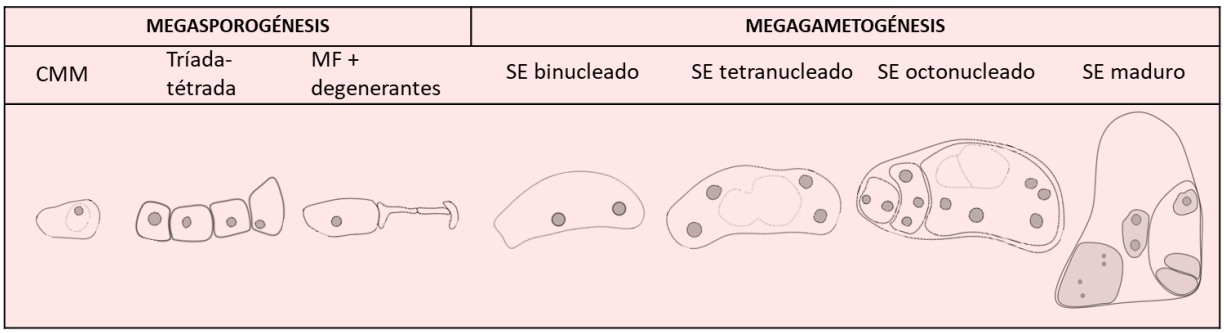


Figura 4: Megasporogénesis y Megagametogénesis del saco embrionario sexual de *Eragrostis curvula*. Los extremos micropilar y chalazal se encuentran en la parte derecha e izquierda, respectivamente, desde la célula madre de la megáspora (CMM) hasta el saco embrionario (SE). En el saco embrionario maduro octonucleado, la región chalazal y micropilar se reubican ambos hacia la parte inferior del saco debido al crecimiento y maduración provocando la curvatura del saco y las estructuras que lo rodean.

Apomixis

El desarrollo mencionado anteriormente forma parte de la reproducción sexual, de modo que se necesita la unión de los dos gametos para la formación del cigoto y la semilla. *Eragrostis curvula* posee, además, un modo particular de reproducción conocido como apomixis. Este tipo de reproducción permite a la planta madre dejar descendencia en forma de semilla sin requerir la meiosis de la CMM ni tampoco la fertilización de la ovocélula, generando individuos idénticos (clones) a la planta progenitora (Nogler, 1984). Éste es un carácter que se encuentra en unas 400 especies de Angiospermas y se supone que surgió a partir de una desregulación del proceso sexual (Hojsgaard et al., 2014).

En este proceso asexual, a partir del ovario se pueden originar los componentes de la semilla por tres mecanismos: Diplosporía, Aposporía y Embrionía adventicia. Los dos primeros son considerados mecanismos gametofíticos y son procesos que se inician muy temprano en el desarrollo del óvulo. Esto ocurre en el momento de la diferenciación de la CMM en el mecanismo diplospórico y luego de la diferenciación de dicha célula en la aposporía. Diplosporía y aposporía resultan en la formación de un saco embrionario sin reducción meiótica y el embrión se desarrolla a partir de una ovocélula, en este caso 2n, que se encuentra dentro de dicho megagametofito no reducido. La embrionía adventicia se considera un mecanismo esporofítico, ya que se forman embriones pero, a partir de los tejidos externos del óvulo (2n), sin mediar la formación de un megagametofito previo (Crane, 2001).

Un factor que se debe tener en cuenta en el proceso de apomixis es que ocurre sólo en el gametofito femenino, mientras que para la formación de los granos de polen se sigue la ruta de desarrollo sexual, con su correspondiente división meiótica. Generalmente para la formación del endosperma de la semilla, se requiere de la unión del/los núcleos polares con un núcleo espermático del polen, mientras que el embrión, por otra parte, se desarrolla por partenogénesis sin fecundación. Este mecanismo es conocido como pseudogamia, y junto con la diplosporía son características que aparecen en *E. curvula.* (Meier et al., 2008).

En la apomixis gametofítica, a diferencia de la reproducción sexual, el saco embrionario se forma en ausencia de meiosis (apomeiosis), y por lo tanto dicho saco embrionario y los componentes que se encuentran dentro del mismo no están reducidos, son diploides (2n) (Fig. 6). En el desarrollo del saco embrionario apomíctico diplospórico de *E. curvula*, la CMM, no se divide (apomeiosis), pero sí crece en tamaño, denominándose este estadio como célula madre de la megáspora elongada (CMME, Fig. 5). Ésta, luego sufre dos divisiones mitóticas que darán lugar a un saco embrionario tetranucleado, conformado por dos sinérgidas, un núcleo polar y la ovocélula (Fig. 5 y 6). La ovocélula (2n) no es fecundada y desarrolla espontáneamente un embrión por partenogénesis (Savidan, 2000). Este tipo particular de saco embrionario fue descrito por Crane (2001) como apomixis tipo *Eragrostis*.

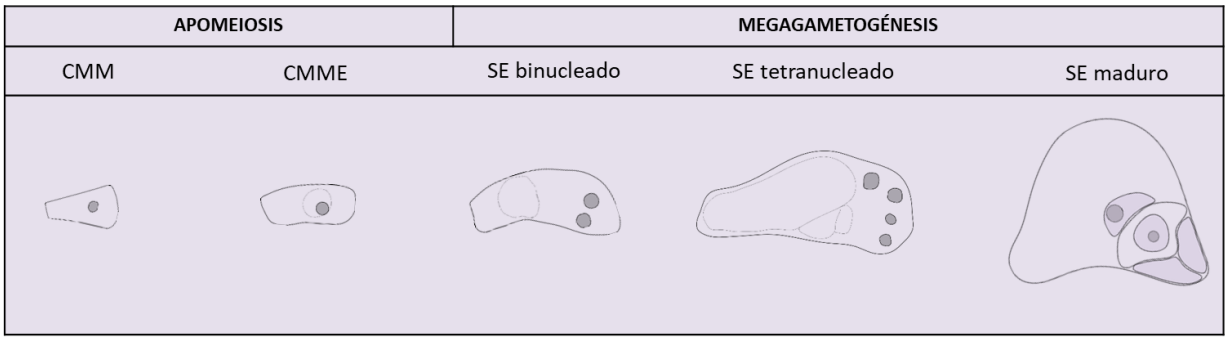


Figura 5: Apomeiosis y megagametogénesis en *E. curvula.* Los extremos micropilar y chalazal se encuentran en la parte derecha e izquierda, respectivamente, desde la célula madre de la megáspora (CMM) hasta el saco embrionario (SE) octonucleado. En el saco maduro, la región chalazal y micropilar se reubican ambos hacia la parte inferior del saco debido al crecimiento y maduración provocando la curvatura del saco y las estructuras que lo rodean. CMME: Célula madre de la megáspora elongada.

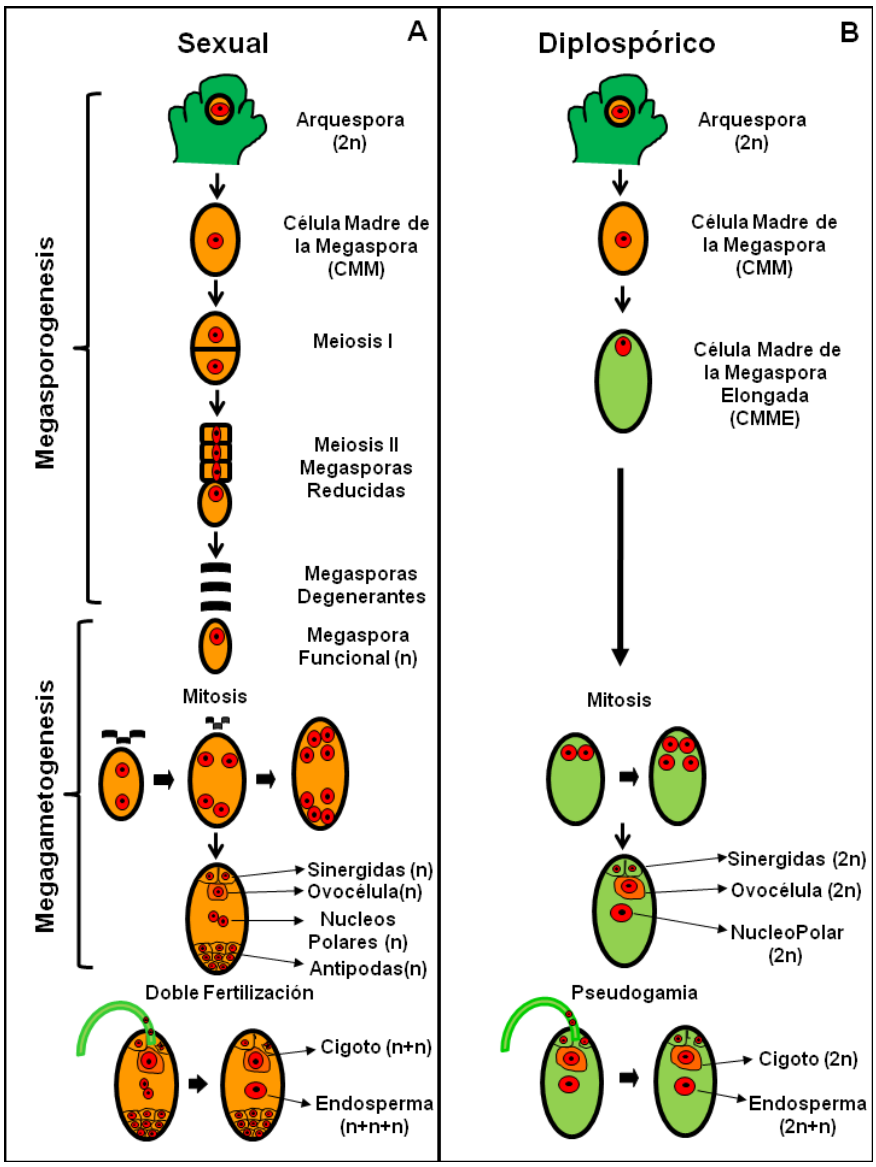


Figura 6: Comparación de la Megasporogénesis y megagametogénesis en un proceso sexual (A) y uno apomíctico diplospórico (B) de pasto llorón. Modificado de Meier et al., (2008).

En *E. curvula* las dos formas de reproducción por semilla (sexual y apomíctica), no son excluyentes una de la otra, pudiendo darse así una apomixis facultativa, de modo que ambos tipos de reproducción coexisten en la misma planta, incluso en flores vecinas dentro de la misma espiguilla. La frecuencia de sacos embrionarios sexuales y apomícticos es variable en una misma planta y en distintos genotipos o variedades considerados, siendo la regulación de este carácter posiblemente debida a efectos epigenéticos (Selva et al., 2017; Rodrigo et al., 2017; Garbus et al., 2019). A su vez, diferentes cultivares dentro del pasto llorón presentan distintas ploidías. Con un número básico de cromosomas X=10 (cantidad de conjuntos cromosomales) los cultivares van desde diploides (2n=2X=20) hasta octoploides (2n=8X=80) (Carnahan y Hill, 1961). Estas diferencias en la ploidía también se relacionan con los modos reproductivos, donde las plantas diploides presentan reproducción sexual, mientras que los poliploides son apomícticos facultativos u obligados (Asker y Jerling, 1992; Savidan, 2000).

El pasto llorón se ha convertido en un modelo para el estudio de la apomixis ya que presenta genotipos con distinto modo reproductivo (apomícticos obligados, apomícticos facultativos y sexuales) y por su tipo particular de desarrollo de la semilla que posee la misma relación de ploidía embrión-endosperma en ambos procesos, sexual y apomíctico (Voigt y Bashaw, 1976). El modo reproductivo de esta especie ha sido estudiado utilizando enfoques transcriptómicos (Cervigni et al., 2008; Selva et al., 2012; Garbus et al., 2017), aspectos epigenéticos (Zappacosta et al., 2014; Rodrigo et al., 2017; Selva et al., 2017; Garbus et al., 2019; Selva et al., 2020) y genómicos (Carballo et al., 2019; Zappacosta et al., 2019).

En el pasto llorón, una misma célula (célula madre de la megáspora) sufre meiosis en el proceso sexual, o apomeiosis (ausencia de meiosis) en el proceso apomíctico, y se cree que es en esa etapa temprana del desarrollo donde se define por cuál de los dos procesos se formará la semilla. Por ello, es crítico poder contar con material en ese estadio, así como en los estadios previos y posteriores, para estudios transcriptómicos que nos permitan comprender las bases genéticas del carácter.

Conocer en detalle el desarrollo del saco embrionario en los distintos genotipos apomícticos y sexuales de *E. curvula* permitirá separar de forma precisa los distintos estadios del desarrollo y poder estudiar su expresión génica individualmente a través de la secuenciación de ARN, como así también el estudio de los mecanismos de control molecular mediante la identificación de los genes específicos que desencadenan y regulan el desarrollo sexual y apomíctico. Dichos conocimientos permitirían a futuro la manipulación del carácter para su introgresión en especies de producción agrícola con características reproductivas sexuales, mediante la utilización de técnicas de ingeniería genética.

HIPÓTESIS

Como punto de partida para realizar el estudio se postuló la siguiente hipótesis:

“Existe una correlación entre el tamaño y morfología de los pistilos y las anteras con el estadio de megasporogénesis y megagametogénesis, cuya asociación permitiría una rápida selección del material para su utilización en protocolos de análisis de la expresión de genes”.

OBJETIVOS

Como objetivo general para este trabajo, se planteó desarrollar un calendario reproductivo con información detallada de tamaño y características del desarrollo de los gametofitos masculino y femenino y las estructuras que los contienen en distintos materiales de pasto llorón, para su uso en el estudio de los distintos componentes de la apomixis.

Los objetivos específicos fueron:

1. Lograr una colección de muestras de espiguillas de tres genotipos de pasto llorón con modos de reproducción contrastante (apomíctico obligado, apomíctico facultativo y sexual) en distintas etapas de desarrollo.

2. Realizar la disección bajo lupa de los pistilos y anteras.

3. Observar y registrar los parámetros de crecimiento y desarrollo del pistilo, el óvulo y las anteras.

4. Registrar, utilizando la técnica de contraste de interferencia diferencial (DIC, por sus siglas en inglés), el estadio de desarrollo femenino y masculino de la flor.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se utilizaron distintos genotipos de *E. curvula* con características reproductivas diferenciales: Don Walter (apomíctico facultativo), Tanganyika (apomíctico obligado) y OTA-S (sexual) los cuales están presentes en la colección de germoplasma existente en el CERZOS-CCT Bahía Blanca. Las plantas utilizadas en esta tesis son plantas adultas que se encuentran en el invernadero del CERZOS.

Observaciones citoembriológicas

Las panojas se colectaron en el momento de presentar los primeros signos de antesis, donde es posible encontrar todo el rango de desarrollo del saco embrionario, desde la célula arquesporial hasta la posible fertilización (Meier et al., 2011). Las mismas se fijaron en FAA (4% formaldehído, 50% etanol, 5% ácido acético glacial, 41% agua destilada) y luego de al menos 24 horas se transfirieron a etanol 70%. Las espiguillas fueron separadas de la panoja bajo lupa Leica S8APO equipada con una cámara digital Leica MC120 HD.

Se eligió la técnica de clarificación con salicilato de metilo siguiendo el protocolo descrito por Young et al. (1979) con pequeñas modificaciones. Esta técnica de clarificación tiene varias ventajas por sobre las técnicas histológicas tradicionales de inclusión, corte con micrótomo y coloración en las que todo el proceso abarca varios días. En cambio, en la técnica de clarificación con salicilato de metilo el tiempo que se necesita entre la colecta del material y la observación del mismo bajo microscopio es relativamente corto. Brevemente, las espiguillas en etanol 70% se incubaron durante 60 minutos en agitación a temperatura ambiente en las siguientes soluciones: etanol 95%; etanol 95% con eosina 2% (sólo 30 minutos), etanol 100%; etanol/salicilato de metilo 75%/25%; etanol/salicilato de metilo 50%/50%, etanol/salicilato de metilo 25%/75% y salicilato de metilo 100%. Por último, se diseccionaron las espiguillas para extraer los pistilos y anteras, y se montaron en salicilato de metilo 100% para su observación. Alternativamente se ensayaron otras dos estrategias de disección, las mismas fueron: 1) diseccionar las espiguillas *in vivo*, previo al protocolo de fijación y clarificación y 2) diseccionar las espiguillas luego de la fijación, cuando las mismas se encuentran en etanol 70%.

Los óvulos y anteras se observaron con un microscopio Leica DM2500 LED equipado con un sistema de contraste de interferencia diferencial (DIC) y una cámara digital (Leica MC170 HD). Esta técnica de microscopía óptica, produce imágenes de la muestra con apariencia tridimensional. Debido a que los pistilos poseen dos estigmas plumosos, al colocar los mismos en el portaobjetos adoptan una posición frontal o posterior de modo que el óvulo se ve frontal o de forma posterior (Fig. 7). Para la correcta observación del óvulo es importante lograr colocar el pistilo en posición sagital. De esta forma se puede observar la distribución de los núcleos en el saco embrionario de manera más clara y eficiente, como así también el tamaño de los tegumentos. Para lograr esta observación se utiliza un

portaobjetos con dos cubreobjetos, los cuales hacen de soporte para los pistilos y anteras. Los cubreobjetos se montan sobre el portaobjetos dejando un espacio a modo de “canaleta”, que permite ubicar a los pistilos de forma correcta para su vista sagital, luego se coloca un tercer cubreobjetos tapando la “canaleta” para realizar las observaciones al microscopio (Fig. 8).

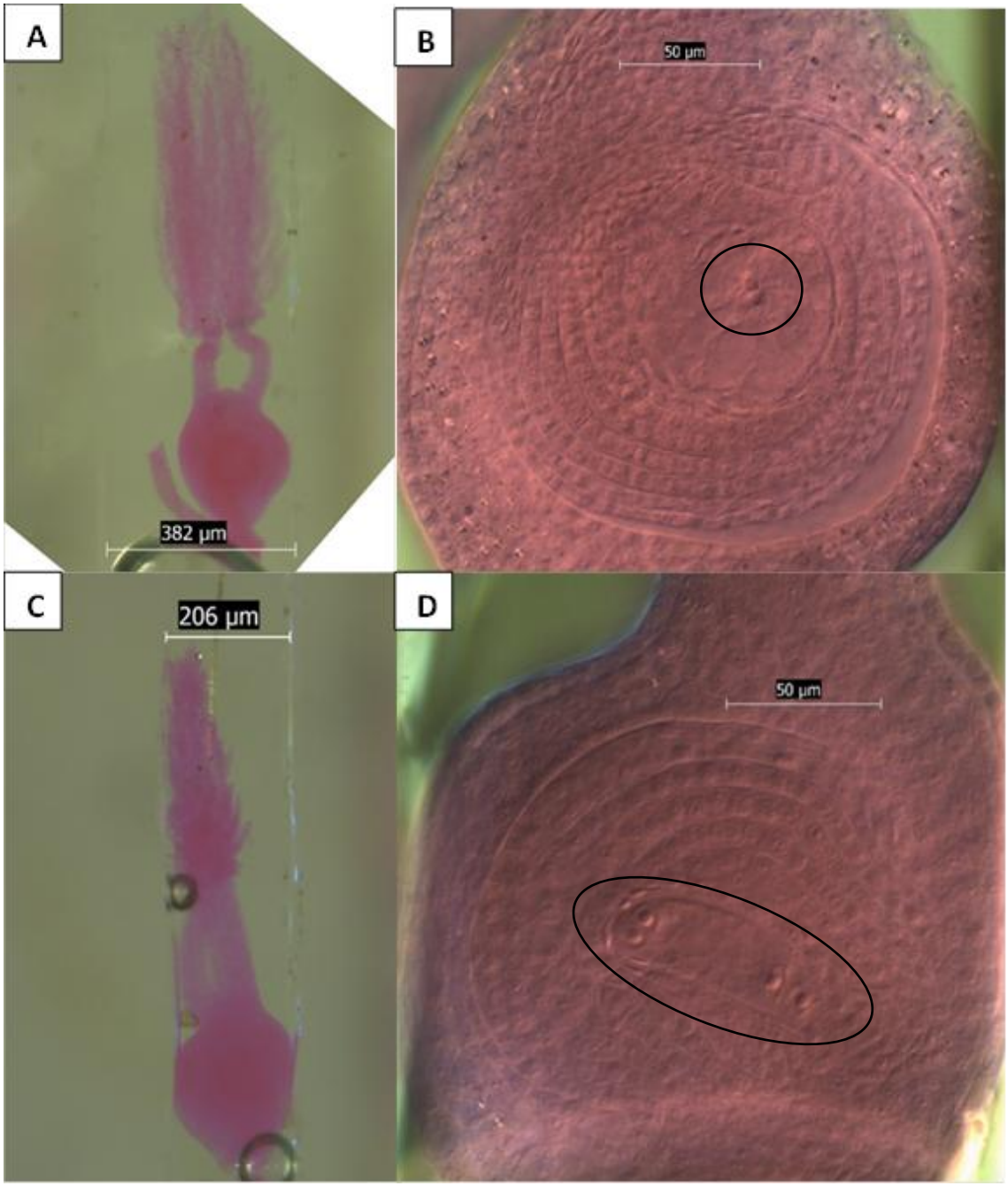


Figura 7: Comparación entre las posiciones frontal (A-B) y sagital (C-D) del pistilo. En la imagen B, se observa el saco embrionario octonucleado del pistilo de la imagen A, pero en este plano sólo se observan los núcleos polares. En la imagen C se observa un pistilo puesto de costado dentro de la “canaleta”. En la imagen D, se puede observar el saco embrionario tetranucleado en posición sagital perteneciente al pistilo de la imagen C. Esta posición permite la observación de todos los núcleos del saco embrionario en un mismo plano.

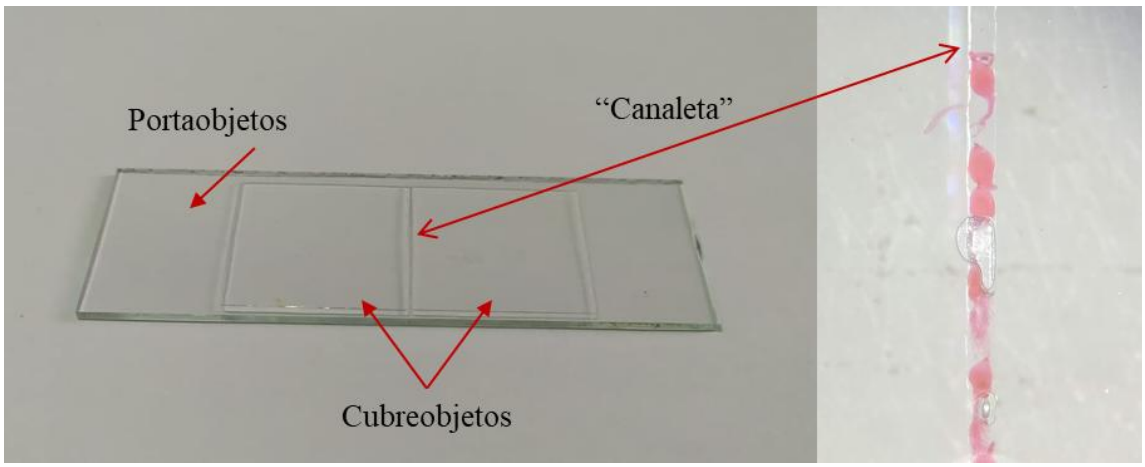


Figura 8: Metodología seguida para la observación de los pistilos (derecha) bajo microscopio (combinación de portaobjeto y cubreobjetos, izquierda).

Para diferenciar entre procesos sexuales y apomícticos y las distintas etapas de desarrollo se tuvo en cuenta la presencia o no de meiosis o degenerantes y la cantidad y posición de los núcleos en el saco embrionario (Meier et al., 2011).

En el desarrollo sexual femenino se diferenciaron al menos seis estadios:

I) Célula madre de la megáspora (CMM).
II) Formación de diadas y tétrada por división de la CMM (meiosis).
III) Megáspora funcional con presencia de megásporas degenerantes (MF).
IV) Saco embrionario binucleado después de la primera división mitótica (SE2).
V) Saco embrionario tetranucleado (segunda mitosis, SE4). Saco embrionario octonucleado (tercera mitosis, SE8). Luego de la tercera mitosis las antípodas continúan dividiéndose y el saco embrionario continúa creciendo, produciéndose la celularización (saco embrionario octonucleado joven (SE8-J).
VI) Saco embrionario totalmente desarrollado (saco maduro, SE8-M).

En el proceso apomíctico se pueden diferenciar al menos cuatro estadios en el óvulo:

I) Célula madre de la megáspora (CMM).
II) Elongación y vacuolización de la CMM con ausencia de meiosis (CMME).
III) Saco embrionario apomíctico binucleado (primera mitosis, SA2), a diferencia del saco binucleado sexual, en el apomíctico los dos núcleos se dividen sobre el lado micropilar, dejando una gran vacuola sobre el extremo chalazal. En el saco sexual, la vacuola es central, y deja un núcleo en el extremo micropilar y otro en el extremo chalazal.
IV) Saco embrionario apomíctico tetranucleado (segunda mitosis, SA4). A diferencia del saco embrionario tetranucleado sexual, en este caso los núcleos están en el extremo micropilar. En el saco apomíctico de *E. curvula* ésta es la última división mitótica que se produce. Al igual

que el saco embrionario sexual, el saco embrionario continúa creciendo, produciéndose la celularización del mismo (saco apomíctico tetranucleado joven, SA4-J).

V) Saco embrionario totalmente desarrollado (saco maduro, SA4-M).

También se registró el desarrollo reproductivo masculino, que es el mismo tanto en genotipos apomícticos como sexuales. En este caso se pueden diferenciar al menos cinco etapas de desarrollo en la antera:

I) Célula madre de la micróspora (CMMi).
II) Meiosis, incluyendo díada y tétrada (meiosis).
III) Micróspora unicelular sin vacuola visible.
IV) Micróspora unicelular vacuolada.
V) Grano de polen bicelular.

Se analizaron dos panojas para cada uno de los tres genotipos de las plantas ubicadas en invernáculo de las cuales se diseccionaron en total 17 espiguillas para cada una. De éstas se realizaron observaciones en un total de 255 flores (muestreando los pistilos y anteras de cada una) con al menos 5 observaciones para cada uno de los estadios por genotipo. Para cada etapa del desarrollo se tomaron los parámetros morfológicos de largo y ancho de ovario, largo del pistilo y largo de antera para la creación del calendario reproductivo. Para realizar las mediciones se utilizó un ocular equipado con un retículo 10 mm/0.1 mm, como así también el software Leica LAS EZ para la adquisición de las imágenes en lupa y microscopio y su posterior análisis.

Análisis

Para la recolección de los datos, su selección y su posterior análisis, así como también la realización de tablas y figuras con gráficos comparativos, se utilizó el programa Microsoft Office Excel (versión 2019).

RESULTADOS

Método de clarificación para flores de pasto llorón

Esta técnica resultó ser apropiada para diferenciar los distintos estadios del desarrollo del saco embrionario apomíctico y sexual y del microgametofito masculino.

La disección de las flores en vivo (Fig. 9 A) permitió una mejor manipulación y un trabajo de disección más cómodo, pero luego de la disección había que mantener las flores separadas para su fijación-clarificación y registro de estadios para poder correlacionar los parámetros morfológicos con el estadio del desarrollo de los órganos. Además, se debía proceder con rapidez ya que luego de extraídas las espiguillas, estas comenzaban a deshidratarse. La disección de las flores de espiguillas fijadas (Fig. 9 B) resultó ser más ventajosa sobre la estrategia de fijación en vivo ya que podía trabajarse en cualquier momento con las mismas y las disecciones podían realizarse en largos periodos de tiempo, permitiendo analizar detenidamente y registrar los parámetros morfológicos de cada flor al momento de diseccionarla, pero la desventaja que presentaba, al igual que la estrategia de disección en vivo, es que debían mantenerse las flores separadas para su clarificación. Por último, la disección de espiguillas ya clarificadas permitió trabajar con las mismas sin límite de tiempo y se pudo realizar las mediciones de los parámetros morfológicos y las observaciones de estadio del desarrollo de los órganos en el mismo momento. La única desventaja que presentó esta estrategia fue que resultó un poco más laboriosa la disección de las espiguillas debido al estado de rigidez que adquieren luego del proceso de fijación-clarificación, y la extracción de los pistilos demoró más tiempo, en comparación con las estrategias previas. De esta forma, de las tres estrategias ensayadas para obtener los pistilos y anteras para su observación se eligió trabajar con las espiguillas ya clarificadas para su disección (Fig. 9 C), la toma de los parámetros morfológicos y el registro de los estadios de desarrollo de los órganos.

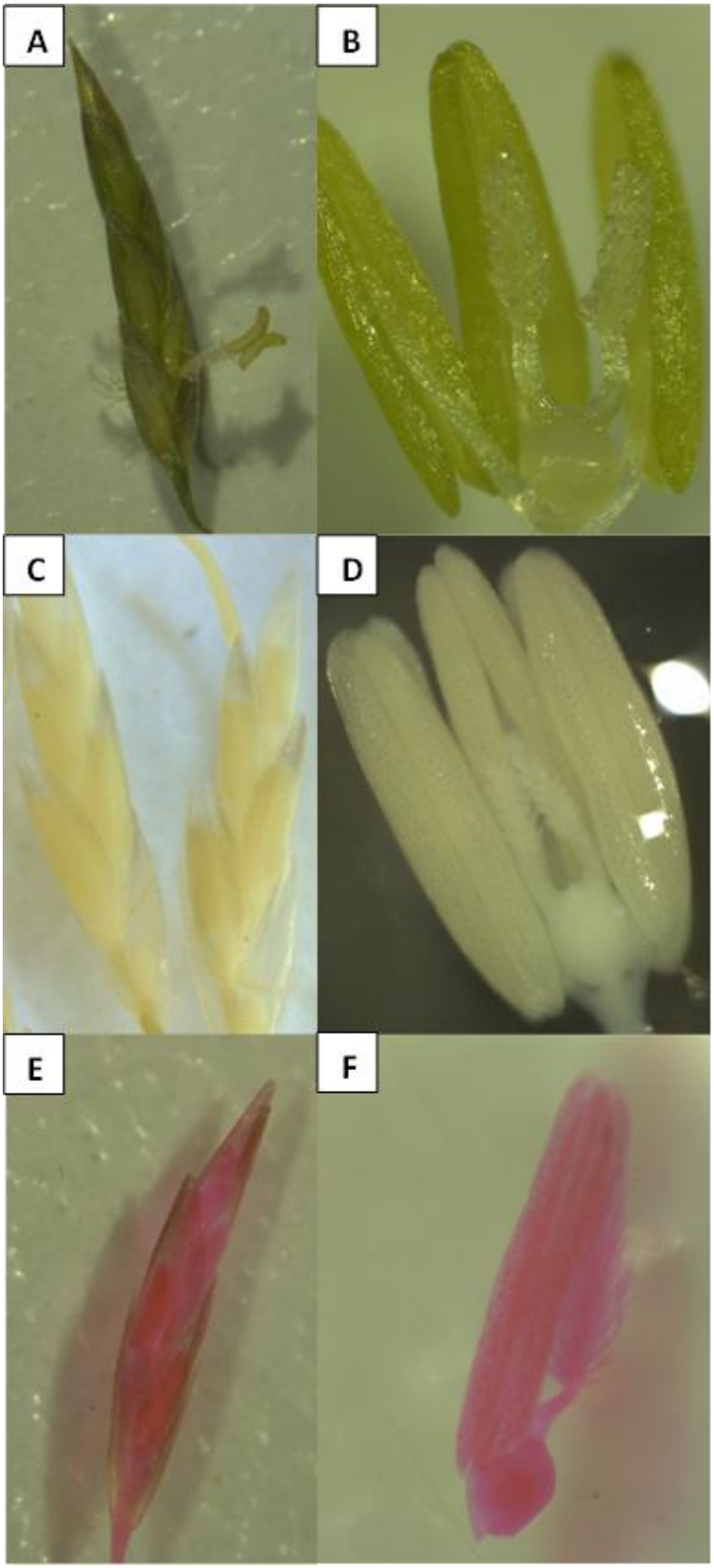


Figura 9: Comparación de espiguillas y pistilos de *E. curvula* aislados en vivo (A, B), previamente fijados (C, D) o previamente clarificados (E, F).

Observaciones citoembriológicas

Desarrollo del saco embrionario sexual

Como se mencionó previamente, el saco embrionario sexual en *Eragrostis* es del tipo *Polygonum*. La célula arquesporial se diferencia de una célula hipodérmica de la nucela, la misma se agranda y da lugar a la CMM. En esta etapa, se pueden observar los primordios del tegumento interno (Fig. 10 A). La CMM forma una tétrada de megásporas por división meiótica, de las cuales sólo la megáspora en posición chalazal es funcional (MF) y las otras degeneran, en esta etapa ya se pueden observar tanto el tegumento interno como el externo creciendo y se define la apertura micropilar (Fig. 10 C). La meiosis ocurre en un lapso muy corto de tiempo y es difícil encontrar tétradas bien definidas debido a que las megásporas del polo micropilar rápidamente comienzan a degenerar y reducir su tamaño. La MF comienza a crecer en tamaño y sufre la primera división mitótica, dando lugar a un saco embrionario binucleado (SE2). El SE2 continúa el crecimiento y se genera una gran vacuola central dejando un núcleo hacia el polo chalazal y otro núcleo hacia el polo micropilar (Fig. 10 D). Luego de la formación de la gran vacuola central el SE2 sufre la segunda división mitótica y da lugar a un saco embrionario tetranucleado (SE4, Fig. 10 E). Posteriormente, el SE4 sufre la tercera y última mitosis generando un saco octonucleado (SE8). La totalidad de los núcleos en el saco embrionario octonucleado es difícil de observar debido a que pueden estar en más de un plano, además los núcleos del polo chalazal (las tres antípodas) continúan con al menos una división más (Fig. 10 F). Por último, el saco se celulariza, la gran vacuola central crece hacia el extremo superior y la rotación del saco hace que el extremo micropilar y el chalazal se junten en la parte inferior (Fig. 10 G). En esta etapa del desarrollo es difícil la observación de los núcleos de las sinérgidas y antípodas y sólo persisten los núcleos polares y la ovocélula.

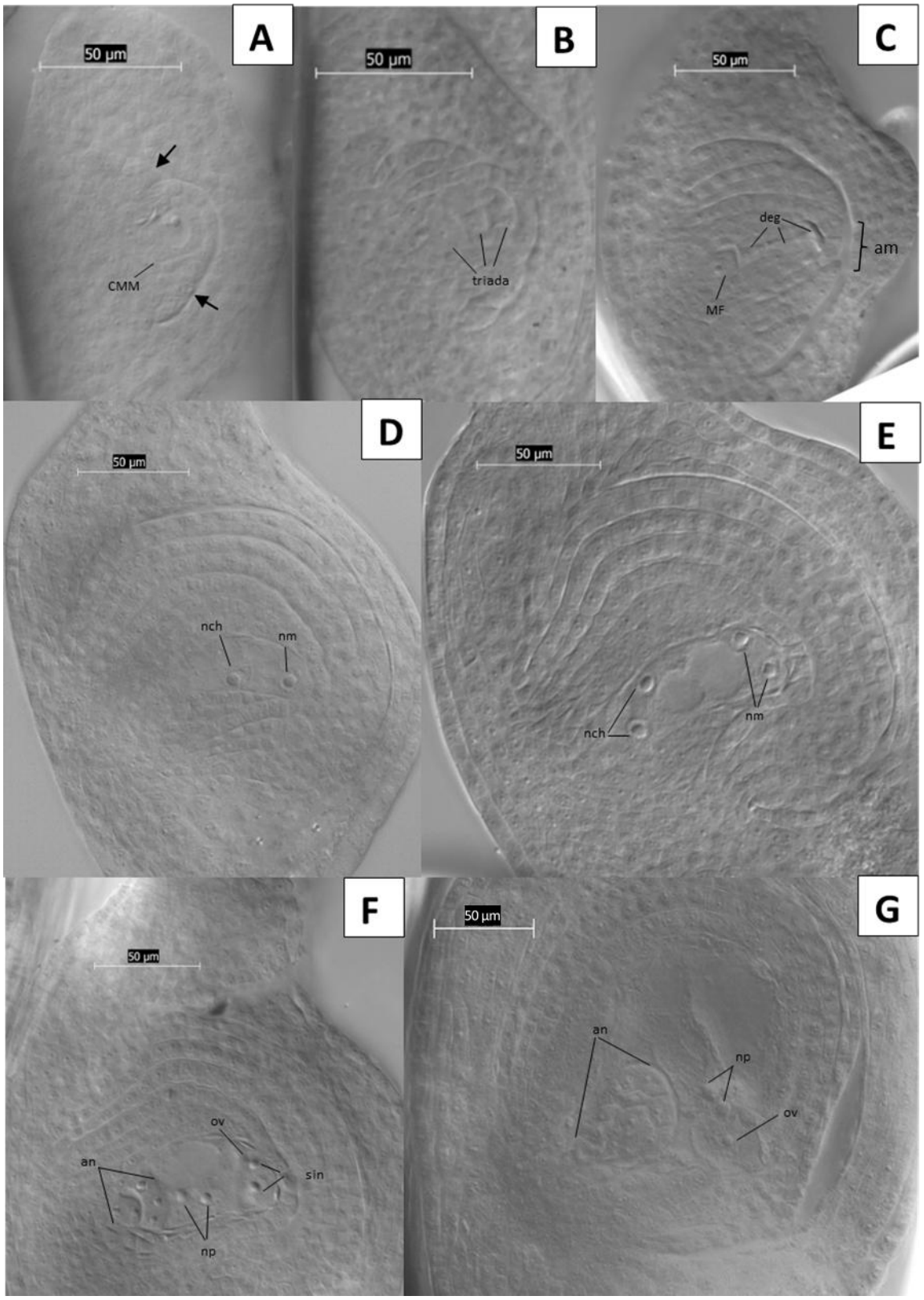


Figura 10: Desarrollo del saco embrionario sexual de *E. curvula*, observado bajo microscopio óptico mediante contraste de interferencia diferencial. Megasporogénesis (A-C) y megagametogénesis (D-F). (A) CMM; (B) Tríada en degeneración; (C) Megáspora funcional + degenerantes; (D) Saco binucleado; (E) Saco tetranucleado; (F) Saco octonucleado; (G) Saco embrionario maduro. Las flechas marcan los primordios tegumentarios; am:apertura micropilar,an: antípodas, CMM: célula madre de la megáspora, deg: degenerantes, MF: megáspora funcional, nch: núcleos chalazales, np: núcleos polares, nm: núcleos micropilares, ov: ovocélula, sin: sinérgidas.

Desarrollo del saco embrionario apomíctico:

Como fue mencionado previamente, el saco embrionario apomíctico está formado sólo por cuatro células y fue descrito por Crane (2001) como de tipo *Eragrostis*. Al igual que en el proceso sexual, la célula arquesporial se diferencia de una célula hipodérmica de la nucela, y la misma se agranda y da lugar a la CMM (Fig. 11 A). En este punto del desarrollo la CMM no sufre meiosis como en el desarrollo sexual y no se forma la tétrada de megásporas. En cambio, la CMM comienza a elongarse y crecer, desplazando el núcleo hacia el polo micropilar y desarrollando una gran vacuola hacia el extremo chalazal (CMME, Fig. 11 B). Esta etapa del desarrollo se prolonga bastante en el tiempo y durante este período crece el saco embrionario por vacuolización. Una vez que la célula crece se produce la primera mitosis, generando el saco apomíctico binucleado (SA2, Fig. 11 C). Luego de esta etapa los núcleos hacen una segunda y última mitosis, la cual puede ser asincrónica, dando lugar primero a un saco trinucleado para luego formar el saco con cuatro núcleos (SA4) (Fig. 11 D). Al igual que en el proceso sexual, el saco continúa creciendo y se celulariza, desplazando la vacuola hacia la parte superior del ovario y juntando los extremos micropilar y chalazal (Fig. 11 E).

Microsporogénesis y microgametogénesis:

Tanto en los genotipos sexuales como en los apomícticos los procesos masculinos de esporogénesis y gametogénesis siguen la vía sexual. Las células arquesporiales (Fig. 12 A) dan origen a las células madres de las microsporas (CMMi, Fig. 12 B) que durante la microsporogénesis se dividen por meiosis dando origen en primer lugar a una díada (meiosis I) y luego a una tétrada de micrósporas (meiosis II) (Fig. 12 C). Posteriormente, en la microgametogénesis, luego de desagregarse las tétradas, las microsporas (Fig. 12 D) comienzan a agrandarse por crecimiento de la vacuola interna (Fig. 12 E). Estas microsporas vacuoladas luego sufren la división de su núcleo en dos núcleos, polar y vegetativo (Fig. 12 F) y luego se producen cambios propios de la maduración, formando el grano de polen maduro (Fig. 12 G).

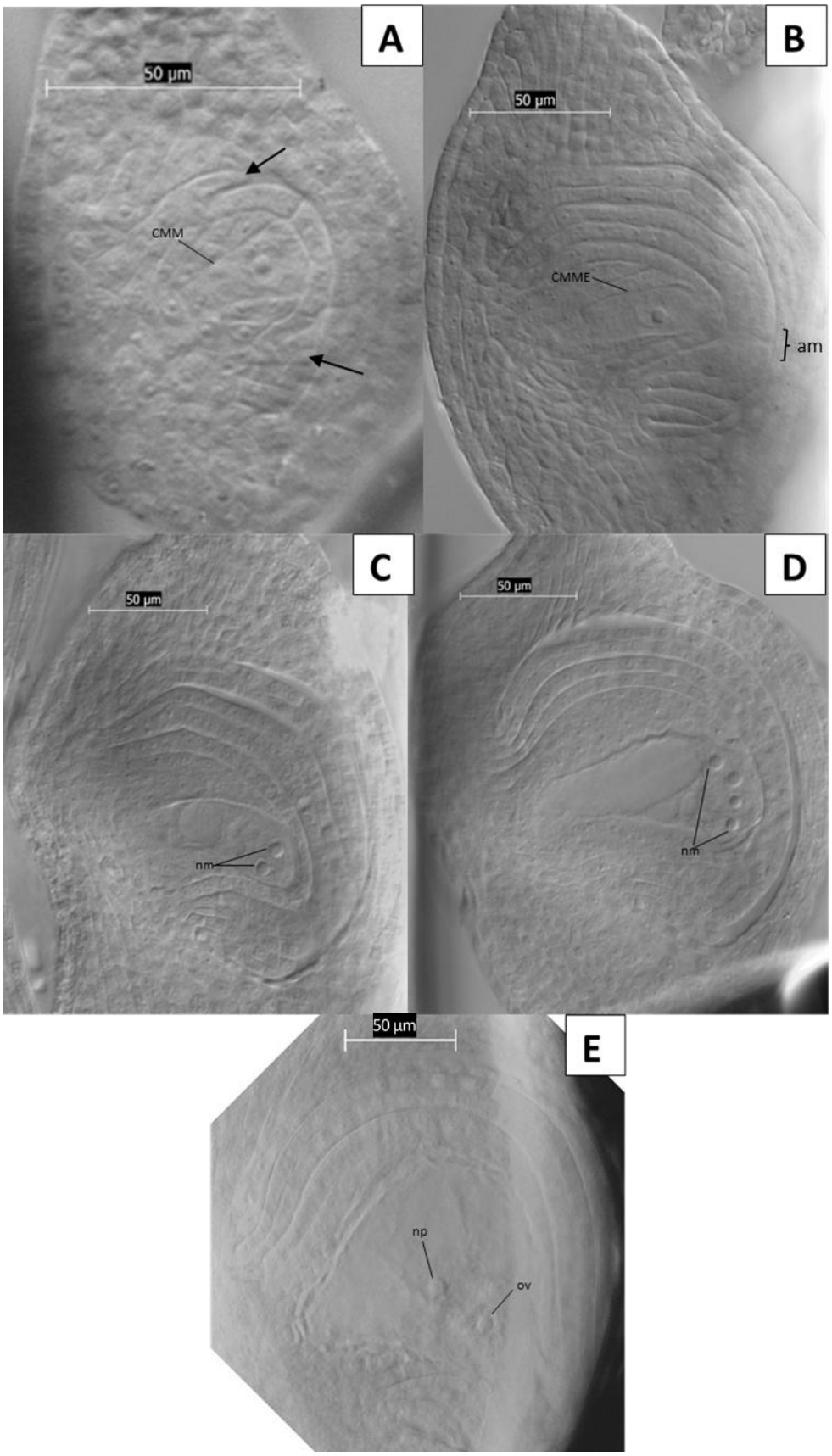
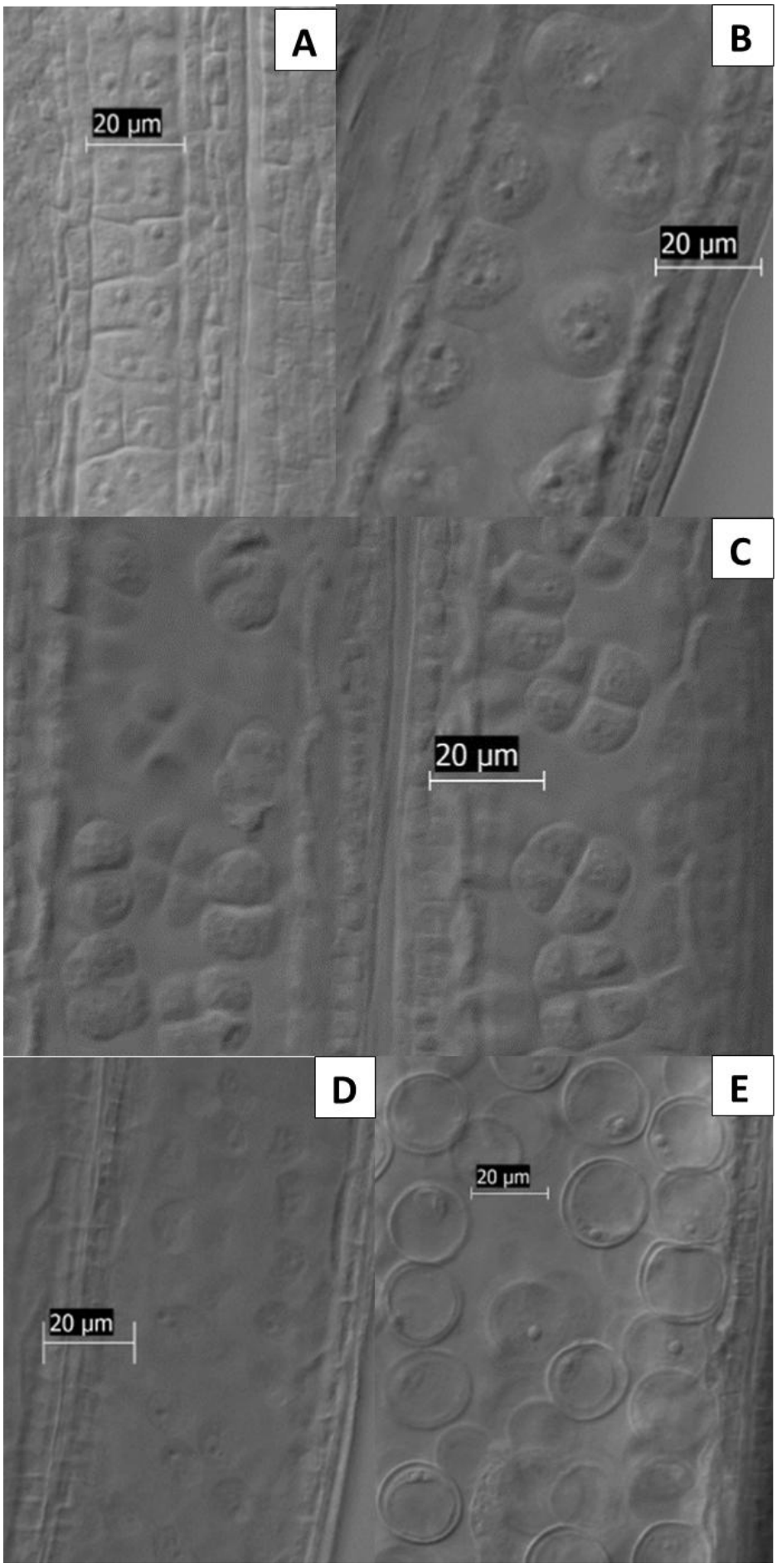


Figura 11: Desarrollo del saco embrionario apomíctico de *E. curvula*, observado bajo microscopio óptico mediante contraste de interferencia diferencial. Apomeiosis - megagametogénesis (A-E). (A) Célula madre de la megáspora (CMM); (B) Célula madre de la megáspora elongada (CMME); (C) Saco binucleado; (D) Saco tetranucleado; (E) Saco embrionario maduro. Las flechas marcan los primordios tegumentarios; am: apertura micropilar, nm: núcleos micropilares, np: núcleo polar, ov: ovocélula, sin: sinérgidas.


A
20 µm
B
20 µm
C
20 µm
D
20 µm
E
20 µm

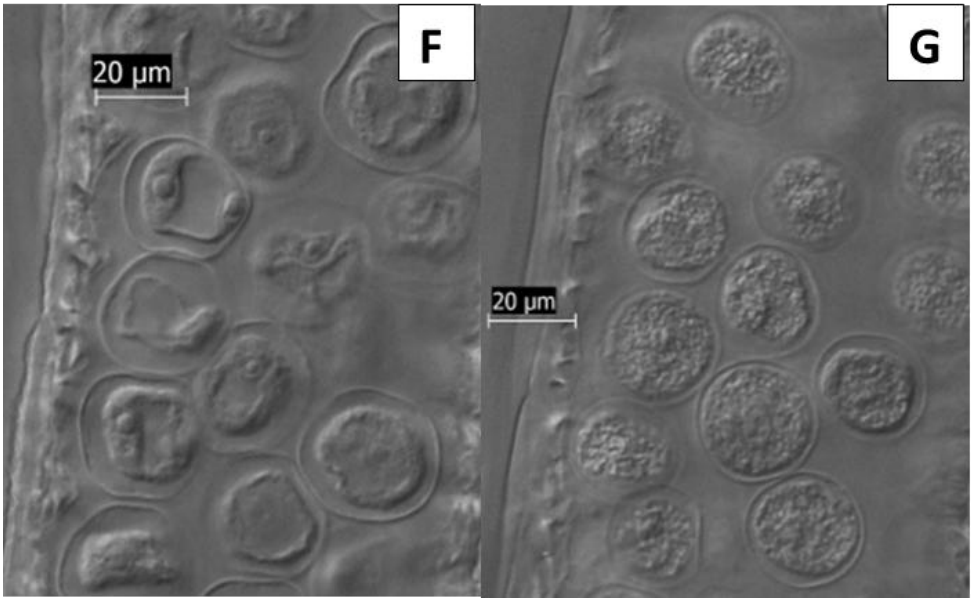


Figura 12: Desarrollo del gametofito masculino de *E. curvula*, observado bajo microscopio óptico mediante contraste de interferencia diferencial. Microsporogénesis (A-D) y microgametogénesis (E-G). (A) Células arquesporiales del polen; (B) Célula madre del polen; (C) Díadas/tétradas; (D) Micróspora unicelular sin vacuolar; (E) Micróspora unicelular vacuolada; (F) Micróspora binucleada; (G) Polen maduro.

Desarrollo del calendario reproductivo

Parámetros analizados

Para la creación del calendario reproductivo se tuvieron en cuenta tres parámetros de crecimiento en el órgano femenino (ancho de ovario, largo de ovario y largo de pistilo), y un parámetro de crecimiento en el órgano masculino (largo de antera). En conjunto, estos parámetros fueron relacionados con el estadio de desarrollo que se observaba dentro de cada pistilo para los tres genotipos analizados.

El parámetro más fácil de registrar fue el largo de antera, seguido por el largo de pistilo. El ancho y largo de ovario no fueron parámetros adecuados para los estadios tempranos del desarrollo debido a que son estructuras muy pequeñas. Por el contrario, en estadios avanzados el largo del ovario fue un parámetro adecuado, siendo el largo de pistilo un parámetro un poco más variable debido a que los estilos de los mismos comienzan a curvarse dentro del antecio por falta de espacio, dificultando la medición o quedando fuera de la escala del retículo, al igual que las anteras.

El total de los datos registrados se puede observar en la Tabla 1, donde están distribuidos según el genotipo, estadio considerado y parámetros analizados. En general, se pudo observar un incremento de tamaño de los órganos sexuales a medida que avanzan los estadios de desarrollo en todos los genotipos estudiados. Este incremento fue acompañado de un cambio morfológico en los mismos; las anteras y los pistilos comienzan a adquirir mayor porte, el ovario tiende a ovalarse y sus estigmas desarrollan su aspecto plumoso a medida que avanzan en el desarrollo.

Al observar el desarrollo de cada genotipo se pudo evidenciar que cada uno tiene su propia variación en el tamaño de los órganos a lo largo del desarrollo (Tabla 1). Para todos los parámetros analizados, los promedios obtenidos mostraron que Tanganyika presentó los mayores tamaños de los órganos en los estadios iniciales (arquespora y CMM). Sin embargo, en los estadios más avanzados, se encontró que Don Walter presentó en general un tamaño mayor de pistilo, seguido del genotipo OTA, y Tanganyika presentando los menores tamaños. Analizando el tamaño de antera, OTA presentó los mayores tamaños en los estadios más avanzados.

A su vez, cada genotipo también presentó distintos niveles de variación dentro de cada estadio. En este caso, en general las variaciones fueron pequeñas para todos los parámetros en los estadios iniciales, incrementándose en los estadios avanzados. El parámetro más variable fue el largo de antera, desde el estadio arquesporial hasta el saco maduro se pudo observar una gran variabilidad para todos los estadios y en los tres genotipos.

Correlación entre desarrollo masculino y femenino

Se analizó el estadio del microgametofito dentro de la antera y el estadio del megagametofito dentro del pistilo, tanto para el genotipo sexual (OTA) como para los dos genotipos apomícticos. Se pudo observar en el genotipo sexual que en el pistilo suele producirse la meiosis de la CMM antes de que las CMMi comiencen a dividirse, evidenciando un leve retraso en el desarrollo masculino o un comienzo temprano en el desarrollo femenino. En cambio, el genotipo apomíctico facultativo Don Walter presentó meiosis en la antera en coincidencia con el momento de la meiosis femenina. La Tabla 2 contiene los datos registrados para los tres genotipos, y como puede observarse en esta tabla, aunque existe una cierta variación en la que un estadio de polen puede corresponderse a más de un estadio del óvulo, los porcentajes de coincidencia son elevados no solo para los primeros estadios, coincidencia en la megasporogénesis y microsporogénesis, sino también en general para los estadios de desarrollo de cada órgano, indicando una maduración de ambos en simultáneo. Cabe mencionarse que en el desarrollo apomíctico, el estadio de CMME se correlaciona mayoritariamente con tres estadios del desarrollo masculino, evidenciando que el estadio de CMME abarca un tiempo importante en el desarrollo del óvulo.

Tabla 1: Parámetros de crecimiento del gineceo y androceo para el estudio y caracterización de los distintos genotipos estudiados de *E. curvula* (µm).. CMM: célula madre de la megáspora, CMME: célula madre de la megáspora elongada, D.E: desvío estándar, MF+deg: megáspora funcional con degenerantes, SA2: saco embrionario apomíctico binucleado, SA4-J: saco embrionario apomíctico tetranucleado joven, SE2: saco embrionario sexual binucleado, SE4: saco embrionario sexual tetranucleado, SE8-J: saco embrionario sexual octonucleado joven.

Parámetro de crecimiento (µm)	Genotipos	Arquespora				CMM				Meiosis				CMME/MF+deg				SE2				SA2/SE4				SA4-J/SE8-J				Saco maduro			
		Media	±	D.E.	n	Media	±	D.E.	n	Media	±	D.E.	n	Media	±	D.E.	n	Media	±	D.E.	n	Media	±	D.E.	n	Media	±	D.E.	n	Media	±	D.E.	n
Largo Pistilo	Don Walter	210,06	±	57,52	9	328,56	±	43,56	10	440,07	±	82,23	5	627,78	±	131,95	18	-	±	-	0	889,44	±	10,84	3	1135,19	±	120,30	9	1360,69	±	192,40	18
	Tanganyika	214,93	±	56,62	12	375,91	±	65,31	7	-	±	-	0	595,83	±	132,51	24	-	±	-	0	774,01	±	148,19	4	930,54	±	63,19	14	1000,45	±	51,88	10
	OTA	-	±	-	0	287,04	±	58,44	8	415,35	±	35,37	11	561,06	±	119,19	20	733,57	±	51,70	7	928,67	±	118,52	5	1077,83	±	154,13	5	1220,97	±	140,66	6
Largo Ovario	Don Walter	104,78	±	12,39	9	138,51	±	16,32	10	185,40	±	30,54	5	214,21	±	31,69	19	-	±	-	0	280,00	±	13,64	4	305,83	±	10,95	8	386,25	±	72,10	22
	Tanganyika	108,56	±	15,31	14	153,63	±	29,48	10	-	±	-	0	214,25	±	35,30	25	-	±	-	0	255,21	±	28,59	4	287,41	±	34,32	14	308,90	±	43,25	16
	OTA	-	±	-	0	154,36	±	26,22	11	189,03	±	9,80	11	226,16	±	28,11	21	276,79	±	9,84	7	294,33	±	25,92	5	334,50	±	8,73	5	361,67	±	50,81	9
Ancho Ovario	Don Walter	74,82	±	5,79	3	94,05	±	10,16	8	103,70	±	8,17	5	144,08	±	23,80	18	-	±	-	0	179,76	±	22,23	4	181,37	±	30,24	7	239,13	±	20,37	20
	Tanganyika	94,19	±	19,62	7	113,87	±	22,83	7	-	±	-	0	149,07	±	23,24	19	-	±	-	0	188,26	±	-	1	190,50	±	18,00	6	210,62	±	23,08	11
	OTA	-	±	-	0	96,44	±	18,11	8	118,16	±	12,55	10	152,97	±	20,91	20	169,15	±	23,77	6	182,93	±	24,98	5	220,20	±	12,73	5	236,21	±	19,78	9
Largo Antera	Don Walter	235,11	±	73,73	6	388,75	±	96,76	6	561,50	±	144,09	5	807,76	±	139,27	19	-	±	-	0	1057,78	±	98,18	3	1095,25	±	87,43	10	1217,50	±	61,34	15
	Tanganyika	246,29	±	85,89	14	451,21	±	152,82	11	-	±	-	0	704,70	±	132,25	21	-	±	-	0	960,22	±	200,04	3	986,67	±	113,11	14	956,38	±	90,02	12
	OTA	-	±	-	0	337,17	±	110,00	9	516,30	±	71,55	9	809,56	±	134,38	21	1009,79	±	65,07	8	1170,42	±	113,78	6	1190,28	±	42,81	6	1281,67	±	71,68	8

Tabla 2: Comparación de los estadios masculinos y su relación con el desarrollo sexual y apomíctico del saco embrionario. Los valores indican la cantidad de anteras en cada estadio del desarrollo masculino que coinciden con cada uno de los estadios del desarrollo del óvulo de la misma flor. Se indica, además, la mayor coincidencia (porcentaje que representa el mayor valor, en negrita, en relación al total de observaciones). Arq: arquespora, CMP: célula madre del polen, CMM: célula madre de la megáspora, MF+deg: megáspora funcional con degenerantes, SA2: saco embrionario apomíctico binucleado, SA4-J: saco embrionario apomíctico tetranucleado joven, SE2: saco embrionario sexual binucleado, SE4: saco embrionario sexual tetranucleado, SE8-J: saco embrionario sexual octonucleado joven.

Desarrollo del saco embrionario	Estadio del óvulo	Desarrollo masculino					
		Arq/CMP	Díada/Tétrada	Micr. unicelular	Micr. vacuolada	Micr. binucleada	Grano maduro
Sexual	Arq/CMM	**17**	0	0	0	0	0
	Meiosis	3	**4**	0	0	0	0
	MF+ deg	2	4	**8**	6	0	0
	SE2	0	0	1	**6**	0	1
	SE4	0	0	0	**3**	1	1
	SE8-J	0	0	0	1	**4**	2
	Saco maduro	0	0	0	0	1	**7**
Mayor coincidencia (%)		77,3	50,0	88,9	62,5	66,7	63,6
Apomíctico	Arq/CMM	**26**	0	3	1	0	0
	CMME	4	**6**	**5**	**15**	2	1
	SA2	0	0	1	2	0	0
	SA4-J	0	0	0	5	**13**	10
	Saco maduro	0	0	0	1	5	**18**
Mayor coincidencia (%)		86,7	100,0	55,6	62,5	65,0	62,1

Análisis comparativo

Se realizaron cuatro análisis comparativos de los distintos estadios del desarrollo dentro del óvulo en relación a los parámetros de crecimiento analizados: largo de pistilo vs. estadio del óvulo (Fig. 13 A), largo de ovario vs. estadio del óvulo (Fig. 13 B), ancho de ovario vs. estadio del óvulo (Fig. 13 C) y largo de antera vs. estadio del óvulo (Fig. 13 D). Se pudo observar que en todos ellos existe una dispersión de los rangos en relación a los estadios, encontrando superposición entre el tamaño de los cuatro parámetros analizados y los estadios del desarrollo del óvulo, por lo que para un mismo tamaño es posible encontrar más de un estadio. De este modo, a fin de cumplir con el objetivo de identificar estadios de desarrollo del óvulo en relación a un determinado tamaño de los órganos sexuales analizados, es necesario reducir el número de estadios a diferenciar hasta que sean excluyentes los rangos para cada estadio, pudiendo así, tener la mayor seguridad posible de encontrar el estadio que se desea muestrear tomando un tamaño de órgano sexual determinado.

Si observamos la dispersión de datos para los primeros estadios del óvulo, arquéspora y CMM, el largo de pistilo y el largo de ovario son los dos parámetros que presentan menos dispersión entre estadios, en comparación con largo de antera y ancho de ovario. Por lo tanto, el largo de pistilo sería el parámetro más conveniente para separar estos estadios de los estadios posteriores, debido a que el largo de ovario es un parámetro más difícil de medir ya que es muy pequeño en estadios tempranos del desarrollo. Sin embargo, para la creación del calendario reproductivo se optó por utilizar los rangos del largo de pistilo a fin de simplificar el uso del mismo para su futura utilización en la toma de muestras de pistilos para análisis moleculares.

En la Figura 14 se observa el calendario reproductivo detallado para el desarrollo sexual y apomíctico del saco embrionario junto con los rangos de largo de pistilo para cada grupo determinado. El primer grupo, comprende pistilos con óvulos en estadios de célula arquesporial y CMM e incluye el estadio pre-meiótico o pre-apomeiótico para los genotipos sexuales y apomícticos, respectivamente, es decir estadios previos al ingreso en un proceso apomíctico o sexual. El grupo siguiente, es el post-meiótico temprano (sexual) o post-apomeiótico temprano (apomíctico) y comprende pistilos en estadio de tétradas meióticas y MF (sexual) y CMME (apomíctico). El tercer grupo es el post-meiótico tardío (sexual) o post-apomeiótico tardío (apomíctico) y comprende pistilos en estadios de saco embrionario joven desde SE2 a SE8-J (sexual) y SA2 a SA4-J (apomíctico). Por último, el cuarto grupo comprende los pistilos con saco embrionario maduro, previos a la antesis o en antesis.

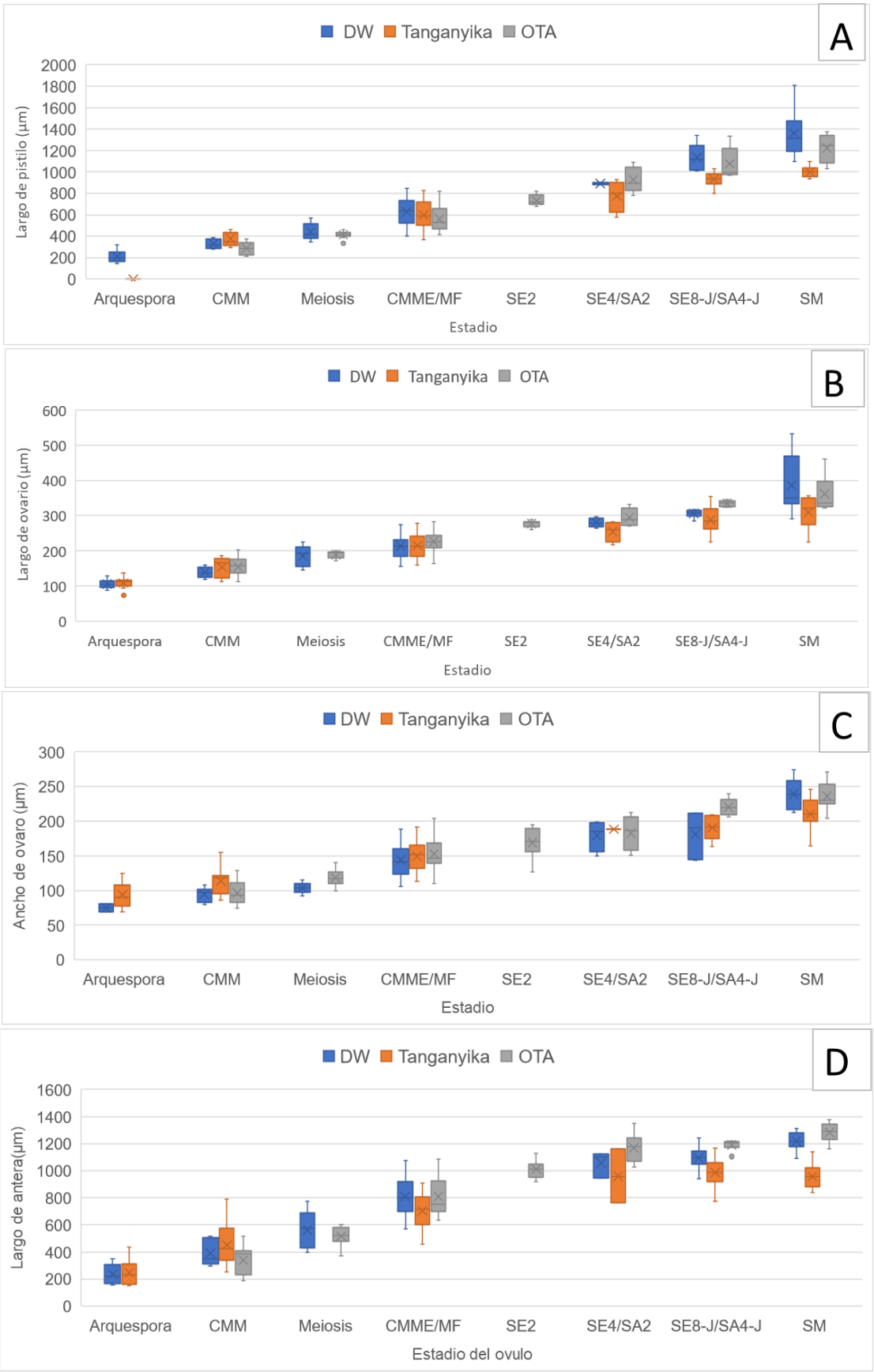


Figura 13: Relación entre distintos parámetros del pistilo y de la antera y los distintos estadios de desarrollo del óvulo para los genotipos Don Walter, Tanganyika y OTA. (A) Largo de pistilo vs. estadio del óvulo; (B) Largo de ovario vs. estadio del óvulo; (C) Ancho de ovario vs. estadio del óvulo; (D) Largo de antera vs. estadio del óvulo. CMM: célula madre de la megáspora, CMME: célula madre de la megáspora elongada, MF: megáspora funcional, SA2: saco apomíctico binucleado, SA4-J: saco apomíctico joven tetranucleado, SE2: saco embrionario sexual binucleado, SE4: saco embrionario sexual tetranucleado, SE8-J: saco embrionario sexual joven octonucleado, SM: saco embrionario maduro. Los gráficos de cajas fueron construidos a modo de ilustrar la variabilidad de las medidas tomadas para cada estadio de cada genotipo.

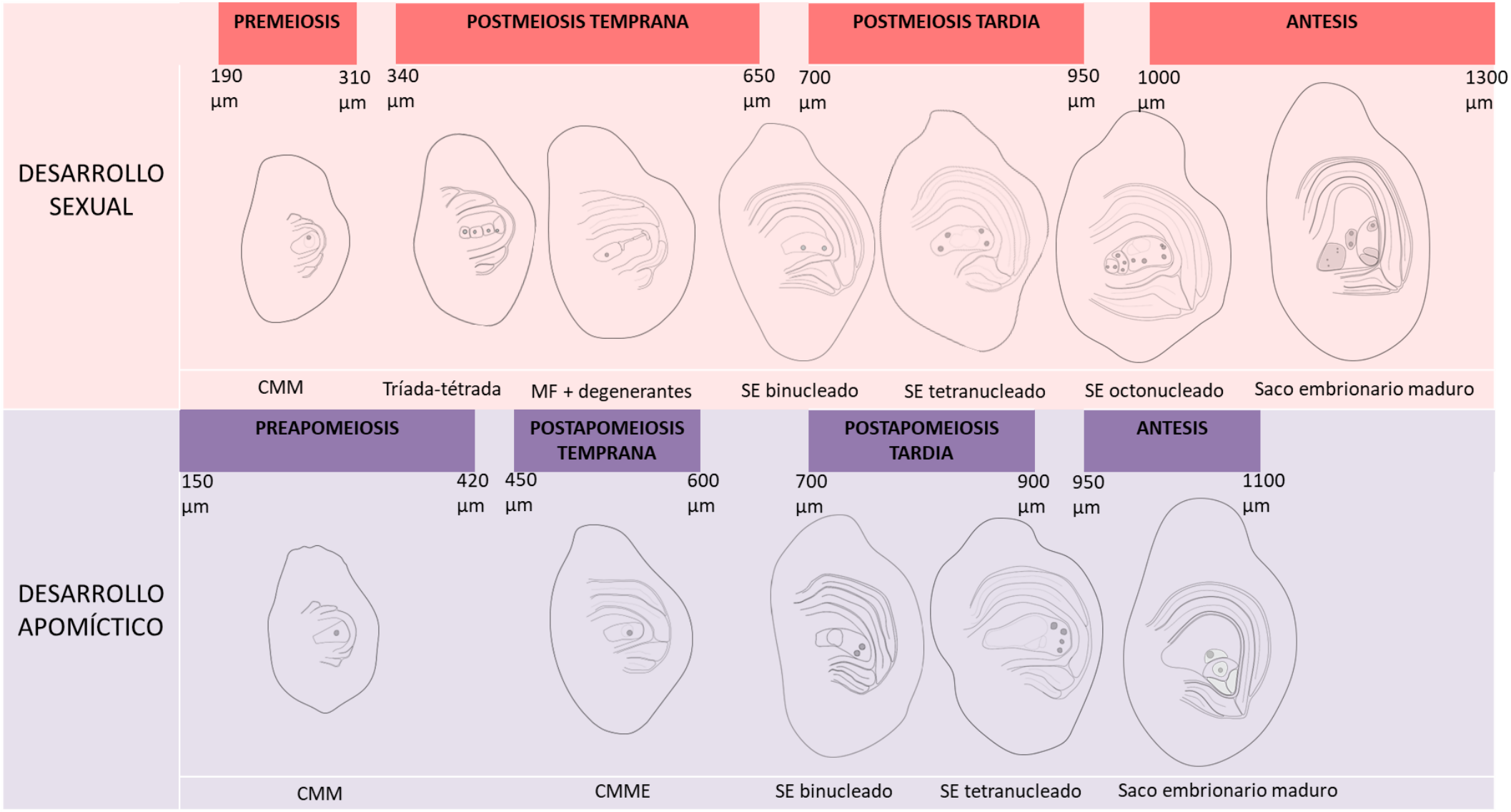


Figura 14: Calendario reproductivo de *E. curvula*. Cada color representa el tipo desarrollo del saco embrionario: en rosa, desarrollo sexual y en violeta, desarrollo apomíctico. Los rangos (coloreados más intensamente) definidos para cada estadio se basaron en las medidas efectivas del largo de pistilo (µm) de las flores en las que se puede encontrar dicho estadio. CMM: célula madre de la megáspora, CMME: célula madre de la megáspora elongada, SE: Saco embrionario.

DISCUSIÓN

Primeramente, es de importancia aclarar que hasta el momento no se había realizado un calendario reproductivo para *E. curvula*, siendo este trabajo el primero de esta índole para esta especie. No obstante, se han realizado calendarios para otras especies tales como *Paspalum rufum* (Sóliman et al., 2019) y *Cenchrus americanu* (Singh et al., 2022), permitiendo acceder fácilmente a técnicas y metodologías presentes en este trabajo.

La separación de los estadios se realizó en base al desarrollo propio del saco embrionario, teniendo en cuenta la cantidad de núcleos y la posición y tamaño del tejido circundante (como la nucela y los tegumentos del óvulo).

La variabilidad de las estructuras reproductivas encontradas en los tres genotipos, permite establecer un patrón de desarrollo característico, aunque no permite realizar las diferenciaciones esperadas de todos los estadios planteados, por lo que se decidió agrupar los mismos en cuatro grupos/rangos de tamaños: pre-meiosis/pre-apomeiosis, post-meiosis/post-apomeiosis temprana, post-meiosis/post-apomeiosis tardía y antesis.

La pre-meiosis/ pre-apomeiosis, como su nombre lo indica, comprende la CMM previo a la división meiótica en el sexual y previo a la elongación de la misma en el apomíctico. Post-meiosis/post-apomeiosis temprana comprende los estadios de meiosis y formación de la MF en el genotipo sexual y la elongación de la CMM en el genotipo apomíctico. El grupo post-meiosis/post-apomeiosis tardía comprende el saco embrionario joven, que fue considerado como el conjunto de estadios que comprenden desde la división de la megáspora funcional (en el sexual) /célula madre de la megáspora elongada (en el apomíctico), hasta saco embrionario octonucleado. Por último, el cuarto grupo comprende el saco embrionario maduro (sexual o apomíctico), considerando la presencia de una vacuola bien formada, una gran curvatura del saco embrionario, haciendo que se acerquen en la base del saco el polo micropilar y chalazal. Este estadio es coincidente en su mayoría con la antesis o previo a la antesis cuando ya se encuentran los granos de polen maduros dentro de las anteras, por lo que se lo denominó antesis.

Los parámetros de crecimiento más sencillos de tomar en lupa con el retículo fueron el largo de antera, seguido por el largo de pistilo. Debido a que el largo de pistilo presentó menor variación entre estadios se optó por usar el mismo para la creación del calendario reproductivo. El parámetro ancho de ovario fue el más variable con respecto a los estadios del óvulo; fue el más difícil de registrar con el retículo debido a la necesidad de ubicar el pistilo exactamente en posición sagital, sin realizar daños al momento de la disección ni al momento del montaje (por ejemplo, por aplastamiento) y es debido a ello y a la posición de los ovarios al momento de la

toma de datos, que presentara tal dispersión. Por último, el largo de ovario no presentó tanta dispersión de tamaños respecto el estadio dentro del mismo, pero es un parámetro difícil de registrar en estadios tempranos del desarrollo por su pequeño tamaño.

Las variaciones obtenidas pueden deberse a múltiples causas como las condiciones de crecimiento de las plantas donde se tomaron las inflorescencias, la época del año (se sabe que hay cambios en la frecuencia del porcentaje de sacos apomícticos y sexuales a lo largo del periodo de floración (Rebozzio et al., 2011), situaciones de estrés en la planta al momento de tomar la inflorescencia (está documentada la respuesta a estrés en la frecuencia de sacos apomícticos y sexuales) (Rodrigo et al., 2017, Selva et al., 2020).

Teniendo en cuenta todo lo mencionado anteriormente, se puede decir que existe una correlación entre el tamaño y la morfología de los pistilos y anteras con los procesos de megasporogénesis y megagametogénesis, corroborando la hipótesis planteada en este trabajo.

CONCLUSIÓN

El trabajo realizado permite obtener una aproximación de lo que ocurre en el modelo de desarrollo reproductivo de *E. curvula*, con el cual es posible realizar comparaciones con muestras que se obtienen a campo y rápidamente poder establecer una asignación de estadio a cada pistilo, siempre con un margen de error, pero favoreciendo la obtención de muestras en el estadio deseado.

La creación del calendario reproductivo y su separación en grupos de estadios de desarrollo del saco embrionario de acuerdo al tamaño de los pistilos correspondientes, la recolección de pistilos puede ser realizada de una forma más rápida y eficiente, reduciendo el tiempo de trabajo. A su vez la caracterización de los estadios permite realizar futuras comparaciones con diversos genotipos e incluso con otras especies para poder realizar nuevos análisis.

BIBLIOGRAFÍA

Asker, S. y L. Jerling (1992). *Apomixis in plants*. CRC Press, Boca Raton, USA.

Bedinger, P. (1992). The remarkable biology of pollen. *Plant Cell* 4: 879-887.

Berger, F., Y. Hamamura, M. Ingouff y T. Higashiyama. (2008). Double fertilization-caught in the act. *Trends in Plant Science* 13: 437-443.

Bhojwani S.S. y S.P. Bhatnagar. (1983). *The embryology of angiosperms*. Vikas Publishing House Pvt. Ltd., New Delhi, India.

Boavida, L.C., A.M. Vieira, J.D. Becker y J.A. Feijó. (2005). Gametophyte interaction and sexual reproduction: how plants make a zygote. *International Journal of Developmental Biology* 49: 615-632.

Carballo J., Santos B., Zappacosta D., Garbus I., Selva J.P., Gallo C.A., Díaz A., Albertini E., Caccamo M. y Echenique V. (2019). A high-quality genome of *Eragrostis curvula* grass provides insights into Poaceae evolution and supports new strategies to enhance forage quality. *Scientific reports* 9: 1-15.

Carnahan H.L. & H.D Hill. (1961). Cytology and genetics of forage grasses. *Botanical Review* 27: 1-162.

Cervigni G.D., Paniego N., Díaz M., Selva J.P., Zappacosta D., Zanazzi D., Landerreche I., Martelotto L., Felitti S., Pessino S. y Viviana E. (2008). Expressed sequence tag analysis and development of gene associated markers in a near-isogenic plant system of Eragrostis curvula. *Plant Molecular Biology* 67: 1–10.

Conner JA, Ozias-Akins P. (2017) Apomixis: engineering the ability to harness hybrid vigor in crop plants. Plant Germline Development. Humana Press, New York, NY., pag. 17-34.

Covas, G. (1991). Taxonomía y morfología del pasto llorón, *Eragrostis curvula* (Schrad. Nees) con referencia sobre otras especies cultivadas de *Eragrostis*. En: Fernández, O.A., R.E. Brevedan & A. Gargano (editores): *El pasto llorón. Su biología y manejo*. CERZOS, Bahía Blanca. pag. 7-17.

Crane, C.F. (2001). Classification of apomictic mechanisms. En: Savidan, Y., Carman, J.G., Dresselhaus, T., (eds): *The Flowering of Apomixis: From Mechanisms to Genetic Engineering*. ClMMYT, IRD, European Commission OC VI (FAIR): México, México, pag. 24–43.

Dresselhaus, T. (2006). Cell-cell communication during double fertilization. *Current Opinion in Plant Biology* 9: 41-47.

Doyle, J.A. y M.J. Donoghue. (1986). Seed plant phylogeny and the origin of the angiosperms: an experimental cladistic approach. *Botanical Review* 52: 321-431.

Dumas, C. y P. Rogowsky. (2008). Fertilization and early seed formation. *Comptes Rendus Biologies* 10: 715-725.

Endress, K. (2011). Angiosperm ovules: diversity, development, evolution. *Annals of Botany* 107: 1465-1489.

Fan, Y.F., L. Jiang, H.Q. Gong y C.M. Liu. (2008). Sexual reproduction in higher plants I: Fertilization and the initiation of zygotic program. *Journal of Integrative Plant Biology* 50: 860-867.

Garbus, I., Romero J., Selva J.P., Pasten M.C., Chinestra C., Carballo J., Zappacosta D. y Echenique V. (2017). De novo transcriptome sequencing and assembly from apomictic and sexual *Eragrostis curvula* genotypes. *PLoS ONE*, 12: e0185595.

Garbus I., J.P. Selva, M.C. Pasten, A.M. Bellido, J. Carballo, E. Albertini y V. Echenique. (2019). Characterization and discovery of miRNA and miRNA targets from apomictic and sexual genotypes of *Eragrostis curvula*. *BMC Genomics* 20: 839.

Goldberg, R.B., De Paiva, G. y Yadegari, R. (1994). Plant embryogenesis: zygote to seed. *Science,* 266: 605-614.

Gutiérrez-Mora, A., A.G. González-Gutiérrez, B. Rodríguez-Garay, A. Ascencio-Cabral y L. Li-Wei. (2012). Plant Somatic Embryogenesis: Some Useful Considerations. *Embryogenesis*, 229-248.

Hojsgaard D., Klatt S., Baier R., Carman J.G. y Hörandl E. (2014). Taxonomy and biogeography of apomixis in angiosperms and associated biodiversity characteristics. *Critical Reviews in Plant Sciences* 33: 414-427.

Li, W. y H. Ma (2002). Gametophyte development. Current Biology 12: R718-R721.

Maheshwari, P. (1937). A critical review of the types of embryo sacs in angiosperms. *New Phytologist* 36: 359-417.

Meier M.S., Zappacosta D., Selva J.P., Pessino S. y Echenique V. (2011). Evaluation of different methods for assessing the reproductive mode of weeping lovegrass plants, *Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees. *Australian Journal of Botany* 59: 253-261.

Meier M., Zappacosta D., Selva J.P., Cervigni G. y Echenique V. (2008). La apomixis, su estudio y posibles usos. *AgroUNS* 9: 10-13.

Mc Cormick, S. (1993). Male gametophyte development. *Plant Cell* 5: 1265-1275.

Mc Cormick, S. (2004). Control of male gametophyte development. *Plant Cell* 16: S142- S153.

Nogler, G. (1984). Gametophytic apomixis. En: *Embryology of angiosperms*, BM Johri (ed.), pag. 475-518.

Rebozzio R.N., Sartor M.E., Quarin C.L. y Espinoza F. (2011). Residual sexuality and its seasonal variation in natural apomictic *Paspalum notatum* accessions. *Biologia Plantarum* 55, 391.

Reddy S.M., M. Madhusudana Rao, A. Srinivas Reddy, M. Mehender Reddy y S. Janardhana Chary. (2004). *University Botany III: angiosperms, plant embryology and plant physiology*. New Age International, New Delhi.

Rodrigo, J.M., D.C. Zappacosta, J.P. Selva, I. Garbus, E. Albertini y Echenique V. (2017). Apomixis frequency under stress conditions in weeping lovegrass (*Eragrostis curvula*). *PloS One* 12: e0175852.

Savidan, Y. (2000). Apomixis: genetics and breeding. *Plant breeding reviews*18: 13-86.

Selva J.P., Pessino S., Meier M. y Echenique V. (2012). Identification of candidate genes related to polyploidy and/or apomixis in *Eragrostis curvula*. American Journal of Plant Science 3: 403–416.

Selva J.P., Siena L., Rodrigo J.M., Garbusb I., Zappacosta D., Romero J.R., Ortiz J.P.A., Pessino S., Leblanc O. y Echenique V. (2017). Temporal and spatial expression of genes involved in DNA methylation during reproductive development of sexual and apomictic *Eragrostis curvula. Scientific Reports* 7: 15092.

Selva J.P., Zappacosta D., Carballo J., Rodrigo J.M., Bellido A., Gallo C.A., Gallardo J., y V. Echenique. (2020). Genes modulating the increase in sexuality in the facultative diplosporous grass *Eragrostis curvula* under water stress conditions. *Genes* 11: 969.

Singh H.D., Sharma M., Mohapatra P. Goel S. Jagannath A. y Agarwal M. (2022). Establishment of a correlation between pistil size and female gametophyte developmental stages in apomictic and sexual lines of *Cenchrus americanu* (L.) Morrone. *Vegetos* 1-7.

Soliman M., Espinoza F., Ortiz J.P. A. y Delgado L. (2018) Heterochronic reproductive developmental processes between diploid and tetraploid cytotypes of *Paspalum rufum. Annals of Botany* 123: 901-915.

Soltis, P.S. y D.E. Soltis. (2004). The origin and diversification of angiosperms. *American Journal of Botany* 91: 1614-1626.

Soltis, P.S., D.E. Soltis, M.W. Chase, P.K. Endress y P.R. Crane. (2004). The diversification of flowering plants. En: *Assembling the tree of life*, J. Crancraft y M.J. Donoghue (eds.). Oxford, University Press, pag. 154-167.

Vorster T.B. y Liebenberg H. (1984) Classification of embryo sacs in the *Eragrostis curvula* complex. *Bothalia* 15:167–174.

Willemse M.T. M. y J.L. van Went. (1984). The female gametophyte. En: *Embryology of Angiosperms*. B.M. Johri (ed.). Springer-Verlag, Berlin, pag. 159–196

Yang, W. C., D. Q. Shi, y Y. H. Chen. (2010). Female gametophyte development in flowering plants. *Annual Review of Plant Biology* 61: 89-108.

Yadegari, R. y G. N. Drews. (2004). Female gametophyte development. *Plant Cell* 16: S133-S141.

Zappacosta D., Ochogavía A., Rodrigo J.M., Romero J.R., Meier M., Garbus I., Pessino S.C. y Echenique V. (2014) Increased apomixis expression concurrent with genetic and epigenetic variation in a newly synthesized *Eragrostis curvula* polyploid. *Scientific Reports* 4: 1–7.

Zappacosta D., Gallardo J., Carballo J., Meier M., Rodrigo J.M., Gallo C.A., Selva J.P., Stein J., Ortiz J.P., Albertini E. y V. Echenique (2019). A high-density linkage map of the forage grass *Eragrostis curvula* and localization of the diplospory locus. *Frontiers in Plant Science* 10: 918.