

Mauro Meier
Diego Zappacosta
Juan Pablo Selva
Gerardo Cervigni
Viviana Echenique

Los licenciados en Ciencias Biológicas Mauro Meier y Juan Pablo Selva, becarios doctorales de CONICET-CERZOS-UNS; el Lic. en Ciencias Biológicas (MSc.) Diego Zappacosta; el Dr. Gerardo Cervigni, Investigador Asistente de CONICET-CERZOS-UNS, y la Dra. Viviana Echenique, Investigadora Independiente de CONICET-CERZOS-UNS, son docentes del Departamento de Agronomía de la UNS.
Contacto: echeniq@criba.edu.ar

La apomixis, su estudio y posibles usos

La apomixis es una forma de reproducción asexual a través de semillas que origina plantas genéticamente idénticas a la planta madre (clones). Su estudio para entender el funcionamiento, herencia y regulación a nivel génico de este fenómeno en pasto llorón puede traer grandes beneficios para la agricultura y la alimentación humana.

El término apomixis hace referencia a una forma de reproducción asexual a través de semillas que origina plantas genéticamente idénticas a la planta madre (clones). Estas semillas se forman a partir de tejidos maternos del óvulo, evitando los procesos de meiosis y fertilización. Hasta el momento este peculiar modo de reproducción ha sido descrito en más de 400 especies de plantas con flores, Monocotiledóneas y Dicotiledóneas, y no existen informes de su presencia en Gimnospermas. La distribución de la apomixis en las Angiospermas no es homogénea, ya que el 75% de las especies confirmadas pertenecen a tres familias (Asteraceae, Rosaceae y Poaceae) y está relacionada estrechamente con el nivel de ploidía (número de complementos cromosómicos presentes en una planta). A la familia Poaceae pertenece el pasto llorón, *Eragrostis curvula*, sobre el cual nuestro grupo ha comenzado a estudiar los genes que controlan el carácter hace unos pocos años. Los genotipos

diploides (si bien escasos o muy raros) son sexuales, mientras que los poliploides son apomícticos. Elucidar los mecanismos genéticos que controlan la apomixis no sólo sería de importancia para el área de la biología evolutiva, sino también para la agricultura, pues permitiría su transferencia a los principales cultivos, facilitando y abaratando los costos de producción de variedades e híbridos.

Apomixis en pasto llorón

Una de las formas en que se reproduce el pasto llorón es por apomixis diplospórica (ver recuadro en página 13)). Esta puede ser obligada o facultativa, aunque en algunos casos existe sólo reproducción sexual.

El desarrollo del saco embrionario diplospórico y sexual en *E. curvula* es esquematizado comparativamente en la Figura 1. La arqueospora en ambos casos se diferencia a partir de una célula nucelar, que en diplosporía no se dividirá meióticamente. Esta célula

inmediatamente comienza a agrandarse, siendo la vacuola calazal la que más crece volviéndose dominante y forzando al núcleo hacia el polo micropilar. El crecimiento de esta vacuola continúa hasta que el tamaño del saco embrionario es similar al saco embrionario sexual bi- o tetranucleado. Luego esta megáspora funcional elongada, tras dos divisiones mitóticas sucesivas, forma el saco embrionario tetranucleado que se compone por una ovocélula, dos sinérgidas y un núcleo polar.

¿Cómo podemos diferenciar los distintos tipos de apomixis?

El requisito fundamental para el estudio de la apomixis, en cualquiera de sus formas, es caracterizar fenotípicamente cada planta en lo que se refiere a su modo reproductivo, es decir, poder diferenciar claramente entre plantas sexuales y apomícticas. Para esta evaluación se requiere de técnicas simples y rápidas, ya que el número de plantas a evaluar suele ser

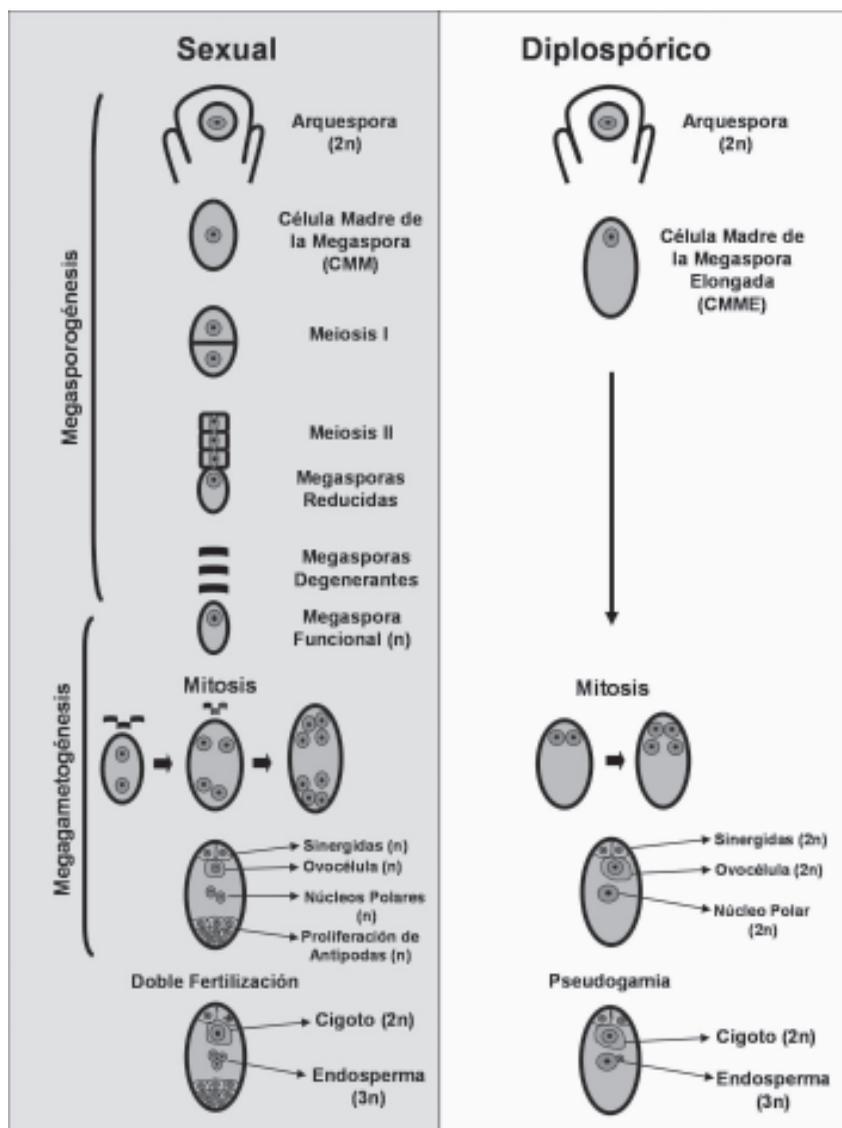


Figura 1. Megasporogénesis y megagametogénesis en el pasto llorón. Proceso sexual y diplospórico.

grande. Básicamente, las técnicas pueden clasificarse como cualitativas o cuantitativas. Las primeras permiten abordar el estudio de la apomixis considerándolo simple, reduciendo la complejidad del fenómeno desde el momento mismo de la obtención de datos, es decir, se clasificaría una planta como sexual o apomíctica. Por el contrario, las técnicas cuantitativas ofrecen mejor y mayor información, permitiendo realizar mejores y más amplias inferencias sobre el carácter. Esto significa que no se trata de una cuestión de todo o

nada, sino que hay grados. Por ello estas últimas técnicas son las más difíciles y tediosas de aplicar.

La citoembriología es una técnica que posibilita una evaluación cuantitativa, pues permite el conteo microscópico de sacos embrionarios clasificados en sexuales o apomícticos. La evaluación puede realizarse a través de tinciones histológicas como el azul de anilina (Figuras 2 y 3) o de clarificación, esta última de más fácil aplicación. En cualquier caso, el número de sacos que deben ser

evaluados con algunas de estas técnicas es elevado. En ello radica la dificultad de su aplicación.

Los análisis de progenie permiten determinar el grado de apomixis o de amfimixis (sexualidad) de una planta a través del análisis de su progenie (Figuras 4 y 5). Se analizan aproximadamente 10-15 plantas utilizando marcadores moleculares y se determina el grado de uniformidad o variabilidad. Si esta progenie es uniforme, la planta se clasifica como apomíctica (cada planta representa un clon de la planta madre). Por el contrario, si la progenie presenta algún grado de variabilidad genética es porque la planta madre presenta algún grado de sexualidad.

Apomixis y agricultura

A pesar de su amplia distribución en las plantas con flores, la apomixis no está presente en muchas especies de interés agronómico, a excepción de varias gramíneas forrajeras, la mandioca, el manzano, los cítricos, el mango y la frutilla. Si este carácter se pudiera transferir a cultivos de interés agronómico como arroz y maíz, se tornaría una herramienta sumamente útil para el mejoramiento genético. Su utilización ayudaría a incrementar tanto la cantidad como la calidad de alimentos debido a que genotipos superiores, variedades o híbridos, serían fijados en poco tiempo.

En teoría cualquier combinación genética que llevara los factores determinantes de la apomixis podría ser mantenido y multiplicado como

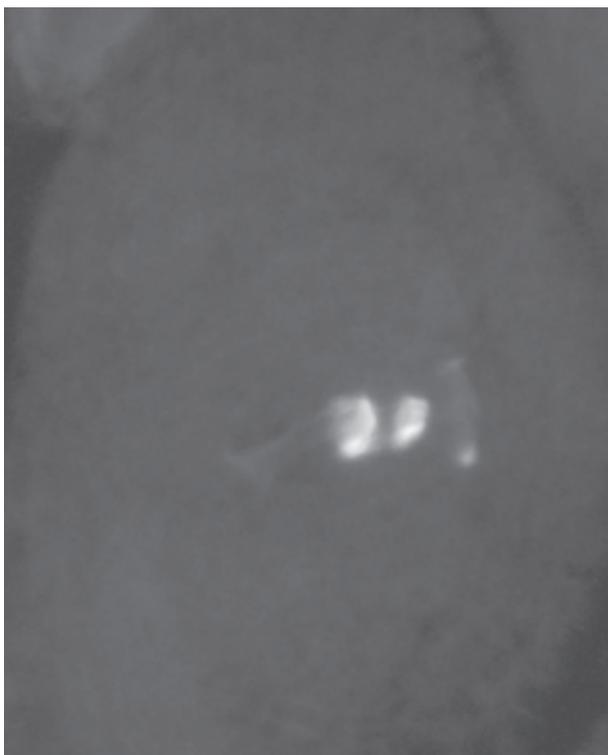


Figura 2. Saco embrionario sexual de *E. curvula* en el que se ven las tres células degenerantes.

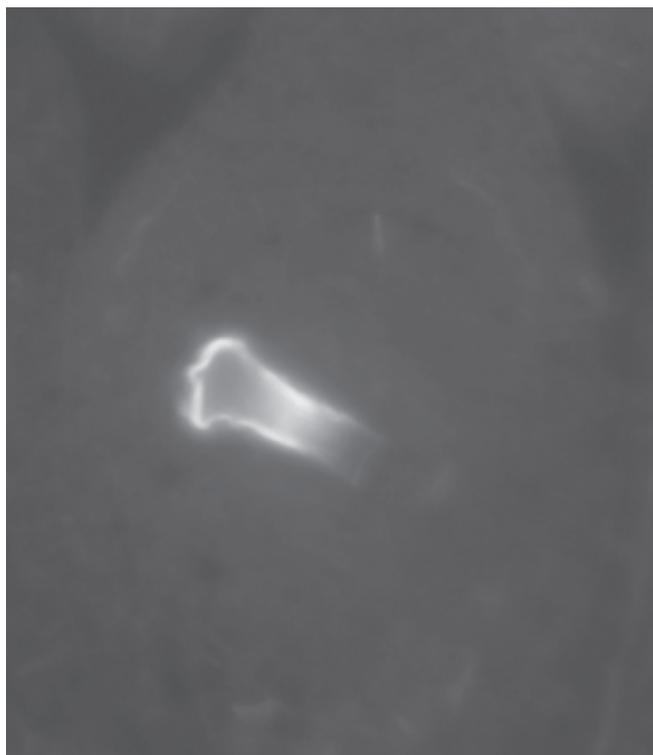


Figura 3. Saco embrionario diplospórico de *E. curvula* en el que se observa una célula madre de la megáspora elongada.

una réplica exacta por innumerables generaciones por medio de semillas. La perspectiva de clonar genotipos superiores híbridos podría representar una ayuda importante para los productores agropecuarios de los países en desarrollo, permitiéndoles sostener altos rendimientos año tras año usando parte de las semillas cosechadas sin pérdida en la producción debido a la segregación de caracteres y la depresión por endogamia.

Entre otras ventajas, la expresión de la apomixis reduciría al mínimo el aislamiento físico requerido para preservar líneas genéticas homocigotas. Nuevos híbridos interespecíficos e intergenéricos podrían ser obtenidos y propagados fácilmente, permitiendo el desarrollo de genotipos mejor adaptados a los distintos ambientes. Sin embargo, aunque la apomixis en la naturaleza, en algunos casos, podría estar sujeta a un control genético de herencia simple, existen limitaciones para su

incorporación a cultivos sexuales mediante el mejoramiento tradicional.

La ingeniería genética de plantas podría brindar la posibilidad de obtener genotipos apomícticos. Otra ventaja de la ingeniería genética es que una vez obtenida una planta transgénica que a su vez fuera apomíctica, ésta fijaría inmediatamente el nuevo carácter, convirtiéndose en nuevo cultivar luego de su multiplicación.

La comprensión del fenómeno

La utilización de la genómica funcional (estudio de la función de todos los genes de un organismo o de un órgano en particular) para analizar los mecanismos genéticos que subyacen tanto en la reproducción sexual como en la apomixis, prometen aumentar nuestra comprensión de la reproducción y el desarrollo de las plantas. Estos conocimientos seguramente contribuirán al descubrimiento de

metodologías que permitan la utilización de la apomixis en beneficio de la agricultura y la alimentación humana.

Para iniciar este estudio en pasto llorón se contaba con plantas obtenidas por el laboratorio de Biotecnología del CERZOS (Centro de Recursos Naturales Renovables de la Zona Semiárida) mediante una técnica que induce mutaciones utilizando cultivo de tejidos *in vitro*, denominada variación somaclonal. Estos materiales vegetales fueron registrados como cultivares en colaboración con la Asociación de Cooperativas Argentinas. Utilizando nuevas técnicas de secuenciado a gran escala, el grupo ha logrado identificar algunas secuencias involucradas en el carácter y elaborado algunas hipótesis acerca de los mecanismos involucrados en su expresión. Entre ellas, que la autoploidización genera cambios importantes en el genoma de esta gramínea a nivel genético y epigenético.

Tipos de apomixis

Los procesos de desarrollo por los que se obtiene una semilla apomíctica pueden dividirse en tres mecanismos, la diplosporía, la aposporía y la embriogénesis adventicia. Los dos primeros se clasifican como apomixis gametofítica, que es un proceso por el cual se forma un megagametofito diploide sin necesidad de fertilización. La embriogénesis adventicia consiste en la formación de embriones somáticos a partir de los tejidos externos del óvulo. Una de las diferencias entre los mecanismos de apomixis radica en el tiempo en que se inicia el desarrollo del óvulo en relación al proceso sexual típico. La diplosporía y la aposporía se inician temprano en el desarrollo del óvulo; por el contrario, la embriogénesis adventicia usualmente ocurre en óvulos maduros, desarrollándose los embriones somáticos desde células individuales de la nucela. Aunque en la apomixis no se produce meiosis en la megáspora, sí existe en la micróspora, es decir, los granos de polen producidos por las plantas apomícticas son haploides. Este polen es necesario en la gran mayoría de las plantas apomícticas, ya que, aunque el embrión se desarrolla sin fertilización, la formación del endosperma requiere, en la mayoría de los casos, la unión de los núcleos polares con uno de los núcleos espermáticos aportado por el grano de polen. Este mecanismo se denomina pseudogamia.

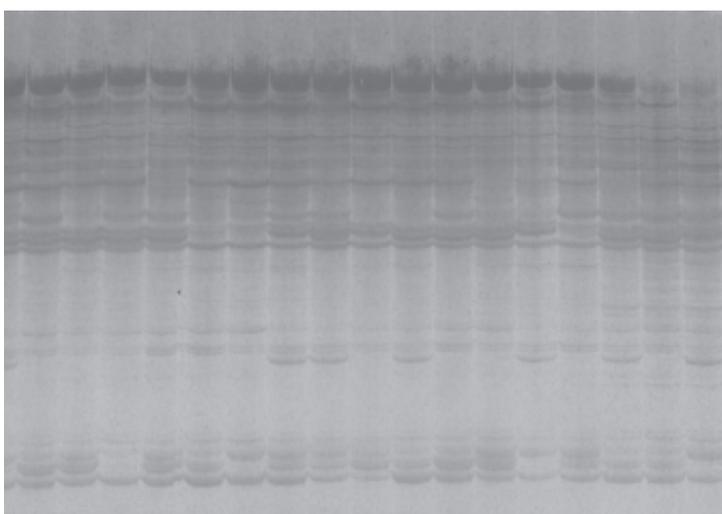


Figura 4. Corrida electroforética donde se parecía un patrón de amplificación sexual en una progenie de 17 individuos.

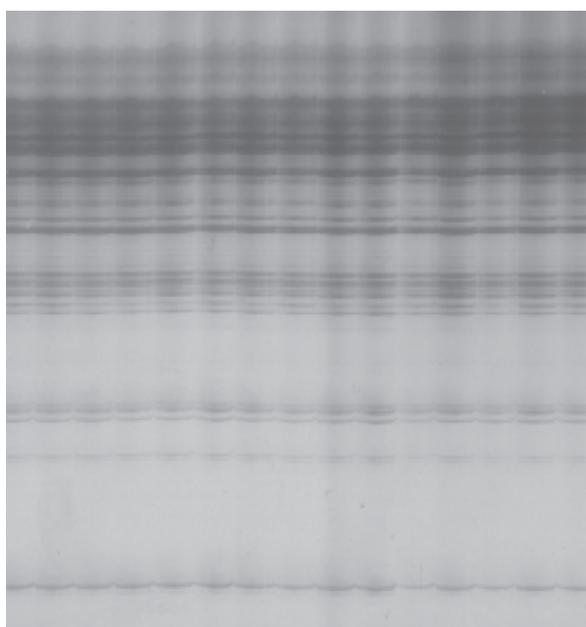


Figura 5. Corrida electroforética donde se parecía un patrón de amplificación apomíctica en una progenie de 15 individuos.

Bibliografía

Bicknell, R. y A. Koltunow. 2004. Understanding apomixis: recent advances and remaining conundrums. *Plant Cell* 16:228-45.

Cardone, S., P. Polci, J. P. Selva, M. Mecchia, S. Pessino, P. Hermann, V. Cambi, P. Voigt, G. Spangenberg y V. Echenique. 2006. Novel genotypes of the subtropical grass *Eragrostis curvula* the study of apomixis. *Euphytica* 151:263-72.

Cervigni, G., N. Paniego, M. Díaz, J. P. Selva, D. Zappacosta, D. Sanáis, I. Landerreche, L. Martelotto, S. Felitti, S. Pessino, G. Spangenberg y V. Echenique. 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.

Koltunow, A. 1993. Apomixis: embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. *Plant Cell* 5:1425-37.

Leblanc, O. y A. Mazzucato. 2001. "Screening procedures to identify and quantify apomixis". En: Savidan Y., J. Carman y T. Dresselhaus (Eds.), *The flowering apomixis: from mechanisms to genetic engineering*, CIMMYT, IRD, European Commission DG VI (FAIR), Mexico D.F., 243 p., Cap. 9, pp. 121-36.

Ozias-Akins, P. 2006. Apomixis: Developmental characteristics and genetics. *Critical Reviews in Plant Sciences* 25:199-214.

Voigt, P. y E. Bashaw. 1976. Facultative apomixis in *Eragrostis curvula*. *Crop Science* 16:803-5.