

LOS DESAFÍOS DE LA EXPLORACIÓN DE LOS RECURSOS GENÉTICOS EN PLANTAS APOMÍCTICAS: LECCIONES DEL CASO DE *Paspalum dilatatum*

Speranza, P.¹

RESUMEN

La apomixis combina la reproducción asexual con la producción de semillas. La dispersión de genotipos individuales a través de semillas probablemente sea un factor muy relevante en la estructuración geográfica del germoplasma en estas especies. Si bien se conoce que las poblaciones de plantas de reproducción asexual son frecuentemente multiclonales, frecuentemente no se distingue entre la variación mutacional dentro de un genotipo determinado de aquella producida por recombinación sexual. Esta distinción es fundamental ya que los recombinantes probablemente contengan el rango más amplio de variabilidad genotípica. *Paspalum dilatatum* ha sido una de las primeras gramíneas estivales que se han utilizado como forrajeras pero a pesar de haberse realizado extensas evaluaciones de germoplasma, subsisten diversas limitantes para su uso. Un análisis de variabilidad genética realizado con 11 loci de microsatélites en una colección de 95 accesiones mostró que el biotipo pentaploide *P. dilatatum* está constituido por un clon dominante y unos pocos genotipos recombinantes, mayormente originados por hibridaciones del clon dominante con especies relacionadas sexualmente compatibles. Todos los genotipos recombinantes se encontraron geográficamente relacionados con las contrapartes sexuales involucradas y en accesiones que también contenían individuos del clon dominante. La variación mutacional dentro del clon dominante no estaba estructurada genéticamente. Es posible que la estructura de la variabilidad genética en *P. dilatatum* constituya un modelo extremo. Sin embargo, patrones evolutivos similares probablemente podrían encontrarse en muchos complejos apomícticos. La utilización de marcadores moleculares, la identificación y localización de las fuentes de sexualidad compatibles y la discriminación entre la variabilidad generada por mutación y recombinación seguramente aumentarían la eficiencia de la evaluación y conservación del germoplasma. Para ello, las colecciones deben reestructurarse como clones individualizados. Finalmente, el análisis filogenético de la información proporcionada por los mismos marcadores permite una exploración mucho más racional de la variabilidad mutacional dentro de cada clon.

PALABRAS CLAVE: apomixis, estructura de poblaciones, *Paspalum dilatatum*, recursos genéticos.

SUMMARY

THE CHALLENGES OF THE EXPLORATION OF GENETIC RESOURCES IN APOMICTIC PLANTS: LESSONS FROM *Paspalum dilatatum*

Apomixis combines asexual reproduction with seed production. The dispersion of individual genotypes by seed is probably a very relevant factor in determining the geographical structure of germplasm in apomictic species. Although it is accepted that asexual plant populations are often multiclonal, mutational variation is frequently not distinguished from that caused by sexual recombination. This distinction is crucial since recombinants may represent the widest range of genotypic variation. *Paspalum dilatatum* is one of the first warm-season grasses to have been used for forage but in spite of extensive germplasm evaluations, limitations for its use have not been overcome. An analysis of genetic variability performed with 11 microsatellite loci on a collection of 95 accessions showed that *P. dilatatum* comprises a dominant clone and a few recombinant genotypes, mostly originated by hybridization of the dominant clone and related sexually compatible species. All the recombinant genotypes were geographically related to the sexual counterparts involved and they were found in accessions that also contained individuals belonging to the dominant clone. The structure of the genetic

¹Departamento de Biología Vegetal. Facultad de Agronomía, Universidad de la República. Av. E. Garzón 780, 12900. Montevideo, Uruguay.
E-mail: pasp@fagro.edu.uy

variability in *P. dilatatum* may represent an extreme case; however, similar evolutionary patterns may be found in other apomictic complexes. The use of molecular markers, the identification and localization of the compatible sexual counterparts, and the discrimination between mutational and recombinational variation, would clearly increase the efficiency in the use and evaluation of germplasm. Finally, a phylogenetic analysis of the information provided by the same markers would allow a more rational exploration of mutational variability within each clone.

KEY WORDS: apomixis, genetic resources, *Paspalum dilatatum*, population structure.

INTRODUCCIÓN

La reproducción apomíctica combina la reproducción asexual con la producción de órganos especializados en la dispersión como las semillas. El alto poder de dispersión de los genotipos individuales probablemente constituya el aspecto más relevante en la estructuración geográfica del germoplasma, sobre todo cuando se combina con proporciones muy bajas de reproducción sexual. Las dos fuentes principales de variabilidad genética en especies apomícticas son la recombinación sexual y las mutaciones. Es generalmente aceptado que las poblaciones de especies de reproducción asexual son frecuentemente multiclonales (Ellstrand & Roose, 1987; Asker & Jerling, 1992; Widén *et al.*, 1994). Sin embargo, sorprendentemente esta aseveración se ve condicionada por las diferentes acepciones del concepto de clon utilizadas en la literatura. En la acepción corrientemente utilizada en mejoramiento y acuñada por Webber (1903), la palabra “clon” designa la progenie producida vegetativamente a partir de una planta original. Este concepto es fácilmente generalizable a la progenie producida por sucesivos ciclos de reproducción apomíctica. Sin embargo, la palabra es frecuentemente utilizada para designar genotipos estrictamente idénticos. Así en estudios de variabilidad genética en poblaciones de plantas clonales, el número de clones resulta altamente dependiente de la sensibilidad de la técnica utilizada para detectarlos (Ellstrand & Roose, 1987). Con la utilización de marcadores moleculares cada vez más sensibles, la probabilidad de detectar “verdaderos clones” según esta acepción es cada vez menor (Loxdale & Lushai, 2003). Desde el punto de vista de la exploración de la variabilidad genética utilizable en una especie, la discriminación entre variantes mutacionales y recombinantes producidos por hibridación, resulta de crucial importancia. Esta distinción, frecuentemente no se hace.

En sistemas experimentales como *Taraxacum*, se ha hecho especial énfasis en discriminar la variabilidad derivada de mutaciones (dentro de clones) de aquella derivada de la reproducción sexual (Van der Hulst *et al.*, 2000) utilizando metodologías que específicamente intentan identificar los genotipos recombinantes en base a marcadores

moleculares (Mes 1998; Mes *et al.*, 2002). La variabilidad generada por mutación, debería generar una estructura jerárquica de genotipos. El análisis de compatibilidad de caracteres utilizado por Mes (1998) se basa en la compatibilidad de las combinaciones de caracteres en una matriz de presencia/ausencia con una posible estructura jerárquica pero provee sólo una aproximación a la identificación de recombinantes.

Dado que la recombinación sexual en especies apomícticas frecuentemente representa eventos de hibridación relativamente amplia, la no individualización de los clones recombinantes resulta necesariamente en una significativa subvaloración del rango de variabilidad natural utilizable en una especie. Estos recombinantes sexuales pueden ser poco frecuentes y la detección de los mismos resulta improbable si no se hace deliberadamente. La recombinación sexual sólo puede ocurrir en aquellos lugares donde existan contrapartes sexuales compatibles, ya se trate de individuos sexuales de la misma especie o especies relacionadas. En esas áreas, se concentra la mayor variabilidad de la especie o citotipo apomíctico (por ejemplo: de Wet, 1968; Daurelio *et al.*, 2004). La existencia y localización de estas áreas como se verá más adelante, no siempre es evidente y los componentes sexuales pueden ya no estar presentes.

EL CASO DE *Paspalum dilatatum*

Paspalum dilatatum Poir. es una gramínea nativa de las praderas templadas de Sudamérica. Si bien ha sido una de las primeras gramíneas de ciclo estival que se han utilizado como forrajeras (Skerman & Riveros, 1992), subsisten diversas limitantes para su uso, principalmente, su baja producción de semilla y susceptibilidad al hongo *Claviceps paspali*. *Paspalum dilatatum* se incluye en el grupo Dilatata junto con varias entidades sexuales y apomícticas. Debido a la complejidad de las relaciones entre estas entidades los rangos taxonómicos formalmente reconocidos de las mismas son arbitrarios. En esta presentación me referiré a todos ellos como “biotipos”. El grupo Dilatata incluye cinco biotipos sexuales de fórmula genómica IIIJ (*P. urvillei* Steud., *P. dasypleurum* Kunze ex Desv., *P.*

dilatatum ssp. *flavescens* Roseng. Arr. et Izag. y los biotipos Virasoro y Vacaria de *P. dilatatum*). Estos biotipos sexuales se encuentran geográfica, genética y morfológicamente bien diferenciados y probablemente todos ellos merezcan rango específico. El grupo también incluye un biotipo pentaploide apomíctico, *P. dilatatum* ssp. *dilatatum* de fórmula genómica IIIJX, y varios otros biotipos apomícticos monoclonales de diferentes niveles de ploidía, la mayor parte de los cuales son probablemente derivados del pentaploide (Speranza, 2005). Recientemente se desarrollaron microsatélites para las especies del grupo Dilatata (Speranza, 2005). Este tipo de marcadores tienen un alto poder de resolución debido a su alta variabilidad y a su naturaleza codominante. Se caracterizaron 95 accesiones pentaploides de *P. dilatatum* de las colecciones del Banco de Germoplasma de la Facultad de Agronomía y el Departamento de Agricultura de los EE. UU. representando el área de origen y áreas en que la especie ha sido introducida. Para caracterizar esta colección se utilizaron 11 loci de microsatélites. Para la mayoría de la colección se analizó un individuo de cada accesión y para 10 de éstas, se analizaron ocho individuos. Las variantes clonales y los recombinantes se discriminaron por comparación directa de los genotipos, tomando en cuenta la conservación de combinaciones heterocigotas y la presencia de alelos compartidos con los biotipos sexuales de la especie.

Los principales resultados de este estudio fueron:

- 1) El citotipo pentaploide de *P. dilatatum* está constituido por un único clon dominante y varios clones recombinantes derivados en su mayor parte de éste.
- 2) El clon dominante es heterocigoto para todos los loci analizados y se encuentra distribuido en toda el área nativa de la especie.
- 3) Todos los individuos provenientes de otras regiones del mundo pertenecieron a este clon.
- 4) La variación mutacional dentro del clon dominante no presenta estructura geográfica definida y las poblaciones pueden ser muy heterogéneas para estos genotipos.
- 5) Los recombinantes, fijados por apomixis, son en su mayoría derivados del clon dominante y constituyen híbridos F1 de éste con los biotipos tetraploides locales.
- 6) En todas las accesiones en que se encontraron genotipos recombinantes también se encuentran individuos del clon dominante.

Los recombinantes constituyeron sólo un 10% de una colección confeccionada específicamente con clones fuera de tipo, mientras que el restante 90% de la colección estuvo constituida por variantes de un único clon dominante. Un 40% de las accesiones del clon dominante pro-

venientes de los cinco continentes y un alto número de localidades de la región de origen fueron indistinguibles para 11 loci heterocigotos de microsatélites. A su vez, en sólo ocho individuos provenientes de una determinada población se detectaron cinco variantes mutacionales del clon típico y un genotipo recombinante.

La variabilidad genética en la especie no se encuentra distribuida entre accesiones sino principalmente dentro de éstas. Dado que los genotipos recombinantes constituyen hibridaciones inter-biotípicas, es esperable que la mayor parte de la diversidad en el citotipo esté representada por éstos.

La conservación y evaluación de recursos genéticos, a falta de otras fuentes de información, debe hacerse bajo el supuesto implícito de que la variabilidad se encuentra estructurada geográficamente. En el caso de *P. dilatatum*, la inclusión de germoplasma proveniente de fuera del área de origen de la especie, implicaría un gran aumento en la utilización de recursos con muy poco beneficio desde el punto de vista de la variabilidad evaluada. Inclusive la caracterización ecológica o edafológica de los sitios de colecta aún dentro del área de origen, no podría haber mejorado la eficiencia del muestreo debido a la amplia distribución y mezcla de las variantes clonales. Debido a que todos los clones recombinantes se encontraron en accesiones que también contenían variantes del clon típico, la no individualización temprana de los mismos impide su evaluación independiente. Mientras que una gran proporción de recombinantes no hubieran podido ser identificados fácilmente por su morfología, existe información preliminar de que contienen una considerable variabilidad fisiológica.

En el caso de *P. dilatatum* se identificaron tres grupos de recombinantes según la fuente de sexualidad involucrada. La distribución geográfica de dos de estos grupos se relaciona con el área de distribución del biotipo sexual cuya participación es sugerida por los alelos de microsatélites que contienen: Virasoro y ssp. *flavescens*. Sin embargo, un tercer grupo de recombinantes, se distribuye en un área en la cual no se han identificado biotipos tetraploides del grupo Dilatata y contienen alelos que delatan la participación de una fuente de sexualidad desconocida. Esta fuente de sexualidad puede estar actualmente extinta o existir en forma relictual aún no detectada. La participación de Virasoro en hibridaciones con biotipos apomícticos fue sugerida recientemente por Machado *et al.* (2005) en base a un carácter de fácil observación como el número de nervaduras en las glumas. En cambio, la participación de ssp. *flavescens* sólo había sido sugerida por resultados experimentales de nuestro grupo pero no se contaba con evidencia morfológica definitiva. Aún con

marcadores moleculares como AFLP (datos no publicados) estos últimos híbridos no pudieron identificarse debido a la falta de marcadores específicos de ssp. *flavescens* no presentes en el clon típico de *P. dilatatum*. Como consecuencia, si bien el muestreo deliberado en áreas de superposición con contrapartes sexuales compatibles parece ser una aproximación aceptable a la exploración de germoplasma en entidades apomíticas, la extinción o no identificación de las mismas puede determinar el no aprovechamiento de una gran parte de la variabilidad.

Paspalum dilatatum presentó varias características que permitieron una identificación clara de los patrones de generación de variabilidad involucrados:

1. Los diferentes biotipos sexuales del complejo fueron fácilmente identificables por sus alelos característicos y se encuentran genéticamente aislados.
2. Los componentes sexuales tienen distribuciones geográficas restringidas.
3. Existe un único genotipo pentaploide altamente dominante que está directamente involucrado en la generación de los híbridos.
4. El genotipo dominante es completamente heterocigoto para estos marcadores y permitió detectar fácilmente la recombinación sexual.
5. La herencia de los marcadores utilizados es disómica.

CONCLUSIONES

El desarrollo de marcadores moleculares de alto poder discriminante resulta cada vez más accesible económica y tecnológicamente. Es actualmente posible realizar, aún en nuestras condiciones, análisis de la variabilidad genética que permitan realizar una exploración racional del germoplasma de especies apomíticas. Es posible que *P. dilatatum* constituya un modelo extremo desde el punto de vista de la estructura de su variabilidad genética; sin embargo los efectos de patrones evolutivos similares probablemente puedan encontrarse en muchos complejos apomíticos que se encuentran actualmente en estudio. La utilización de marcadores moleculares, la identificación y localización de las fuentes de sexualidad compatibles y la discriminación entre la variabilidad generada por mutación y recombinación seguramente aumentarán en gran medida la eficiencia de la evaluación y conservación del germoplasma en especies apomíticas. Para ello las colecciones deben reestructurarse como clones individualizados. Finalmente, el análisis filogenético de la información proporcionada por los mismos marcadores puede permitir una exploración mucho más racional de la variabilidad mutacional dentro de cada clon.

BIBLIOGRAFÍA

- ASKER, S.E. & JERLING, L. 1992. Apomixis in plants. CRC Press, Boca Raton.
- DAURELIO, L.D.; ESPINOZA, F.; QUARÍN, C.L. & PESSINO, S.C. 2004. Genetic diversity in sexual diploid and apomictic tetraploid populations of *Paspalum notatum* situated in sympatry or allopatry. *Pl. Syst. Evol.* 244:189-199.
- DE WET, J.M.J. 1968. Diploid-tetraploid-haploid cycles and the origin of variability in *Dichantium* agamospecies. *Evolution* 22:394-397.
- ELLSTRAND, N.C. & ROOSE, M.L. 1987. Patterns of genotypic diversity in clonal plant species. *Am. J. Bot.* 74:123-131.
- LOXDALE, H.D. & LUSHAI, G. 2003. Rapid changes in clonal lines: the death of a "sacred cow". *Biol. J. Linnean. Soc.* 79:3-16.
- MACHADO, A.C.C.; VALLS, J.F.M.; PEÑALOZA, A.P.S. & DOS SANTOS, S. 2005. Novos biótipos pentaploides do grupo Dilatata de *Paspalum* L. (Gramineae) no Sul do Brasil. *Ciência. Rural* 35:56-61
- MES, T.H. 1998. Character compatibility of molecular markers to distinguish asexual and sexual reproduction. *Mol. Ecol* 7:1719-1727.
- MES, T.H.; KUPERUS, P.; KIRSCHNER, J.; STEPÁNEK, J.; STORCHOVÁ, H. OOSTERVELD, P. & DEN NIJS, C.M. 2002. Detection of genetically divergent clone mates in apomictic dandelions. *Mol. Ecol* 11:253-265.
- SKERMAN P.J. & RIVEROS, F. 1992. Gramíneas Tropicales. Colección FAO: Producción y protección vegetal. No. 23. FAO, Roma.
- SPERANZA, P. 2005. Evolutionary patterns in the Dilatata group (*Paspalum*, Poaceae): a polyploid/agamic complex. PhD Thesis, University of Florida, Gainesville, Florida, USA.
- VAN DER HULST, R.G.M.; MES, T.H.M.; DEN NIJS, J.C.M. & BACHMANN, K. 2000. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers reveal that population structure of triploid dandelions (*Taraxacum officinale*) exhibits both clonality and recombination. *Mol. Ecol* 9:1-8.
- WEBBER, H.J. 1903. New horticultural and agricultural terms. *Science* 18:501-503.
- WIDÉN, B.; CRONBERG, N. & WIDÉN, M. 1994. Genotypic diversity, molecular markers and spatial distribution of genets in clonal plants, a literature survey. *Folia. Geobot. Phytotax.* 29:245-263.