

Avances en mejoramiento genético de leguminosas nativas de interés forrajero

Castillo, A; López-Carro, B; Dalla Rizza, M; Reyno, R.

Jornadas de Biotecnología
Salto, 4 de mayo de 2016



U R U G U A Y



I I B C E

Contenido de la presentación

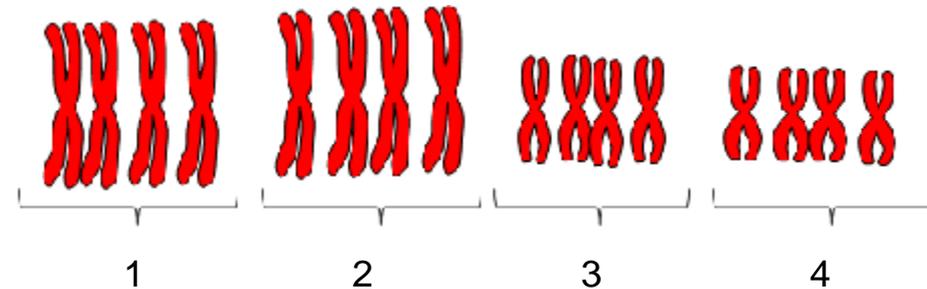
- Definición de poliploide
- Importancia de las pasturas en Uruguay
- *Trifolium polymorphum*
- Inducción de poliploides en *T. polymorphum*
 - Metodología
- Resultados
- Consideraciones finales

Definición:

Un poliploide es un organismo que contiene más de dos juegos completos de cromosomas.

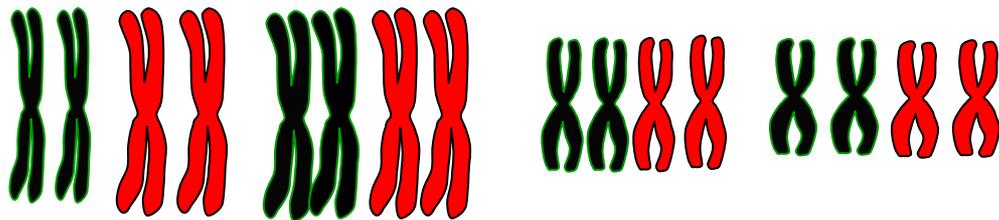
Diploide $2n=2x=8$ Número básico=4

Autopoliploide



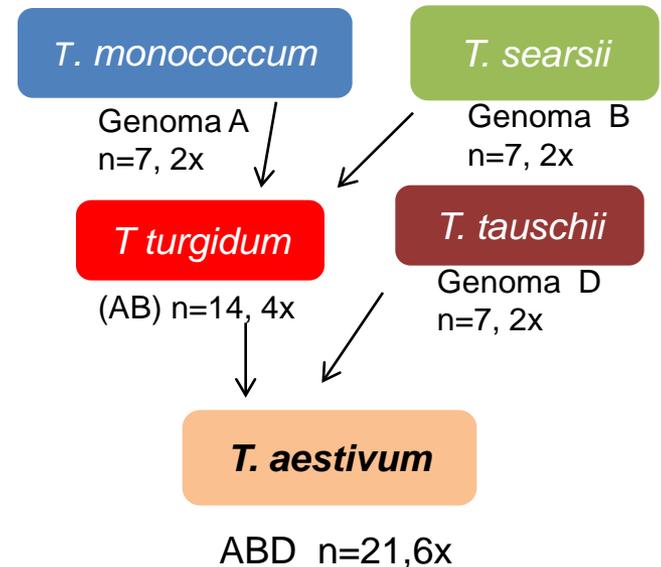
Ej: papa, café, maní, alfalfa, ciruelo y boniato.

Alopoliploide



Ej: algodón, tabaco, avena, trigo, caña de azúcar.

Origen del trigo



La poliploidía es un fenómeno común en las plantas que ocurre en forma natural y espontánea, y ha proporcionado una importante vía para la evolución y generación de especies vegetales.

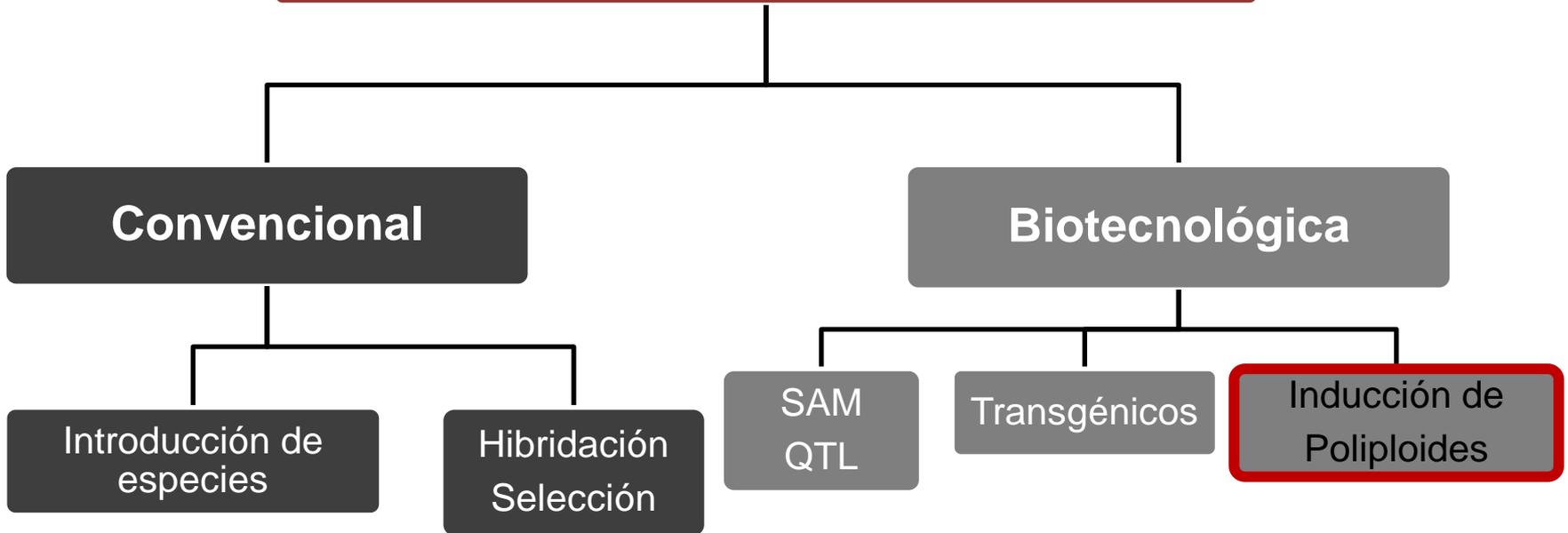
La abundancia de poliploidía indica que la posesión de varios genomas confiere una ventaja evolutiva

Los organismos poliploides difieren en la citología, bioquímica, genética y fisiología, su desarrollo puede adaptarse a las condiciones ambientales más allá de los límites de los progenitores diploides

Las consecuencias a nivel del fenotipo, hacen de la poliploidía una herramienta de gran interés en el mejoramiento genético



Estrategia de mejoramiento



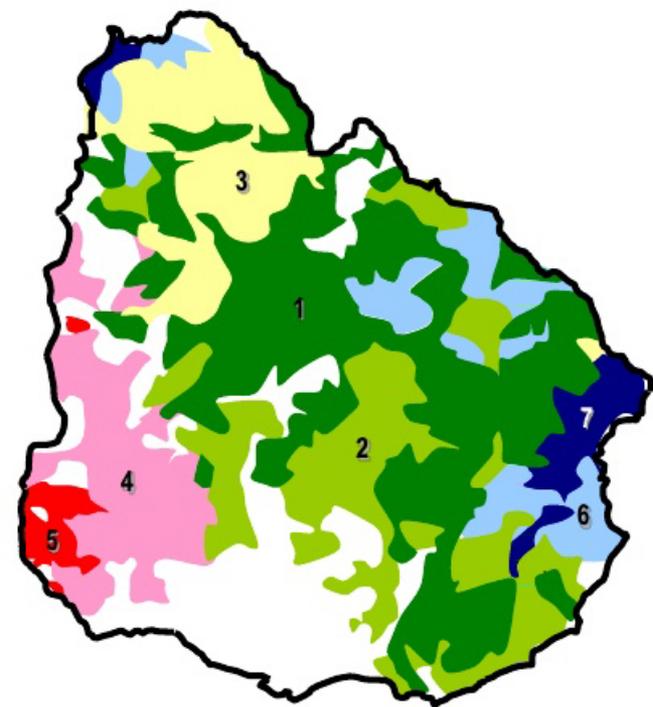
EVALUACIÓN

El aumento en el número de cromosomas puede modificar la expresión de diversas características.

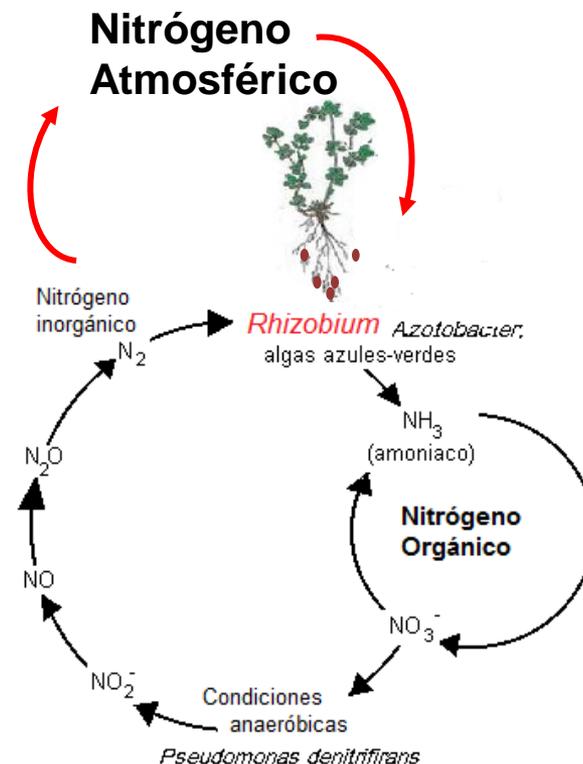
Importancia de las leguminosas en la producción animal

La presencia de leguminosas en un sistema forrajero mejora la calidad de las pasturas, por su aporte de proteínas digestibles.

Incremento del N total en el sistema suelo-planta a través de la fijación de N atmosférico.



- 1. Ganadera <10% Mejoramientos
- 2. Ganadera >10% Mejoramientos
- 3. Ovejera
- 4. Agrícola-ganadera
- 5. Agrícola
- 6. Arrocería-ganadera
- 7. Arrocería



Trifolium polymorphum Poir. (2n=2x=16)

Leguminosa nativa con alta palatabilidad, perenne, niveles de proteína

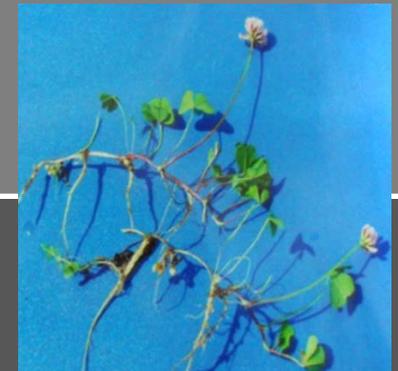
Raíz tuberosa reservante, napiforme.

Es una especie anficárpica; anficarpia: anfi (del griego) dos, carpia frutos

En el género *Trifolium* L. se encuentran más de 255 especies, es uno de los más importantes en la familia Fabaceae. En este género sólo 2 especies presentan anficarpia. En la naturaleza se conocen alrededor de 30 o 40 especies anficárpicas.

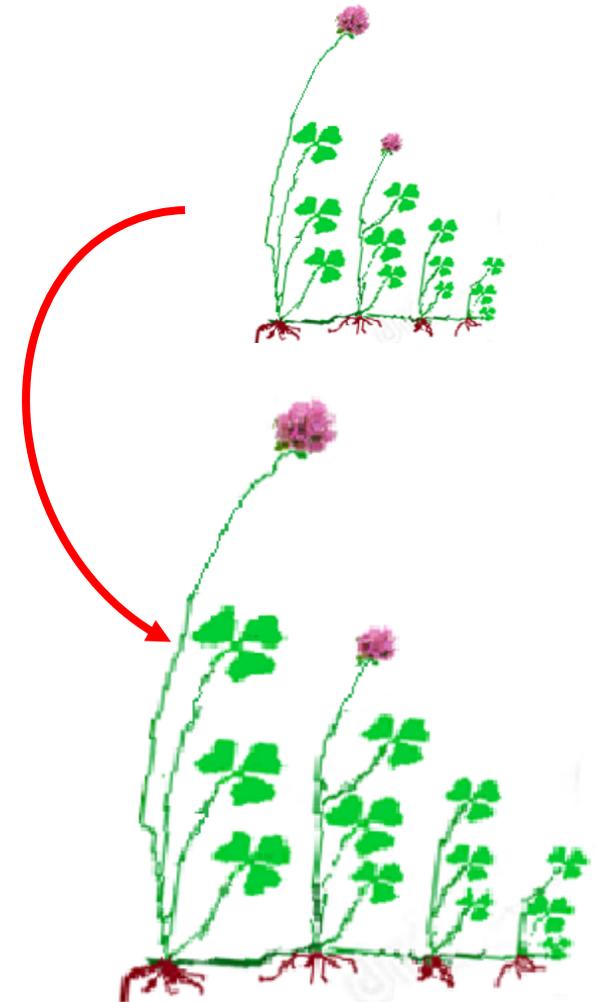
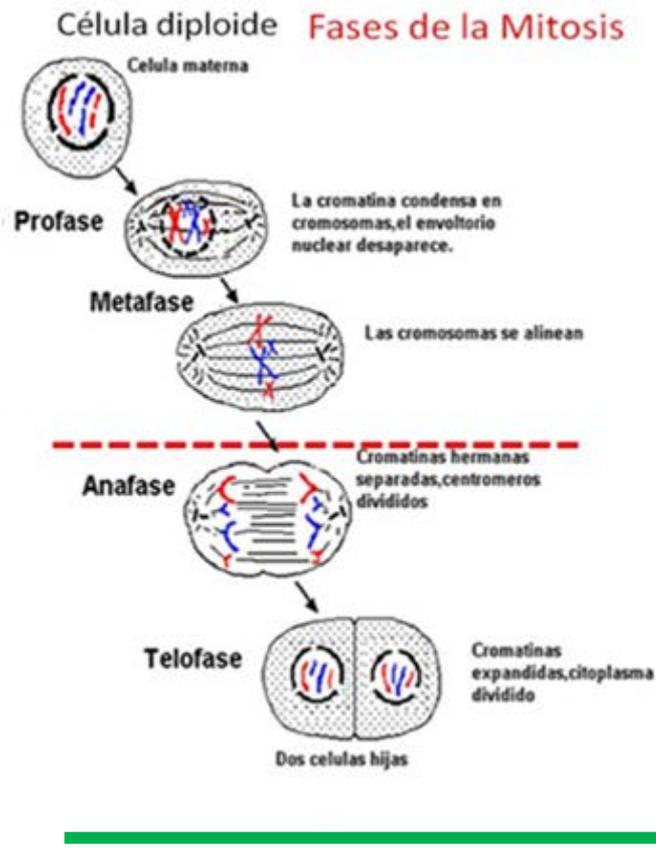
Desventajas.....:

Escasa producción de biomasa y bajo vigor en implantación



Objetivo

El objetivo de esta investigación fue poner a punto protocolos para la obtención de individuos tetraploides en *t. polymorphum* con el fin de aumentar la producción de biomasa en esta especie.



Inducción de poliploides en tejidos somáticos

Aplicación de agentes inhibidores de la mitosis

Colchicina

Trifluralin

Orizalin

N₂O

Cultivo de Tejidos

Fusión de protoplastos

Producción de callo

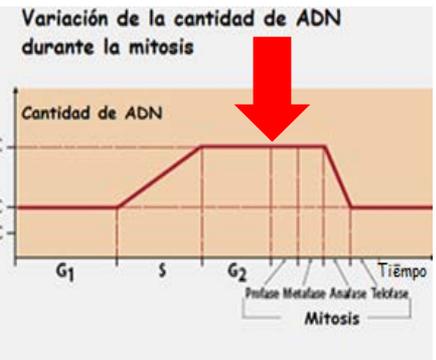
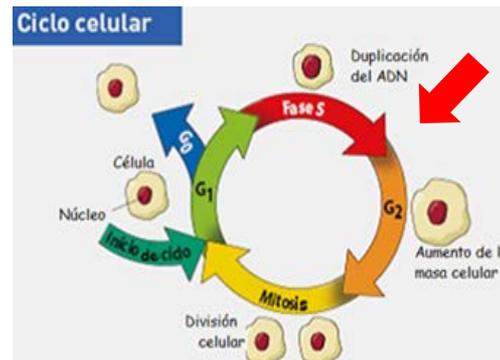
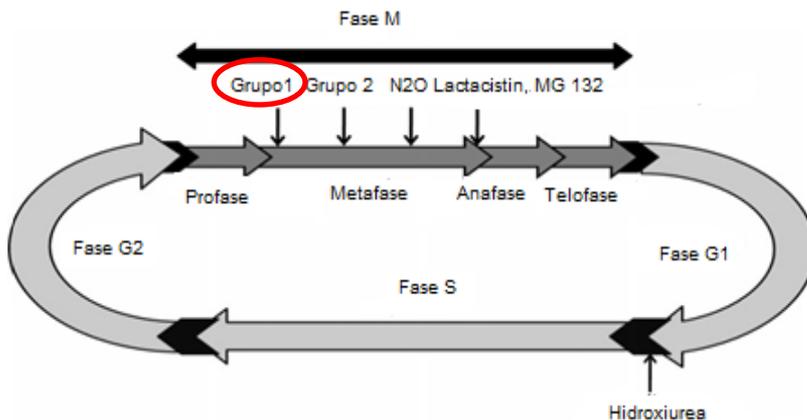
Semilla

Meristemas vegetativos (in vivo)

Explante in vitro

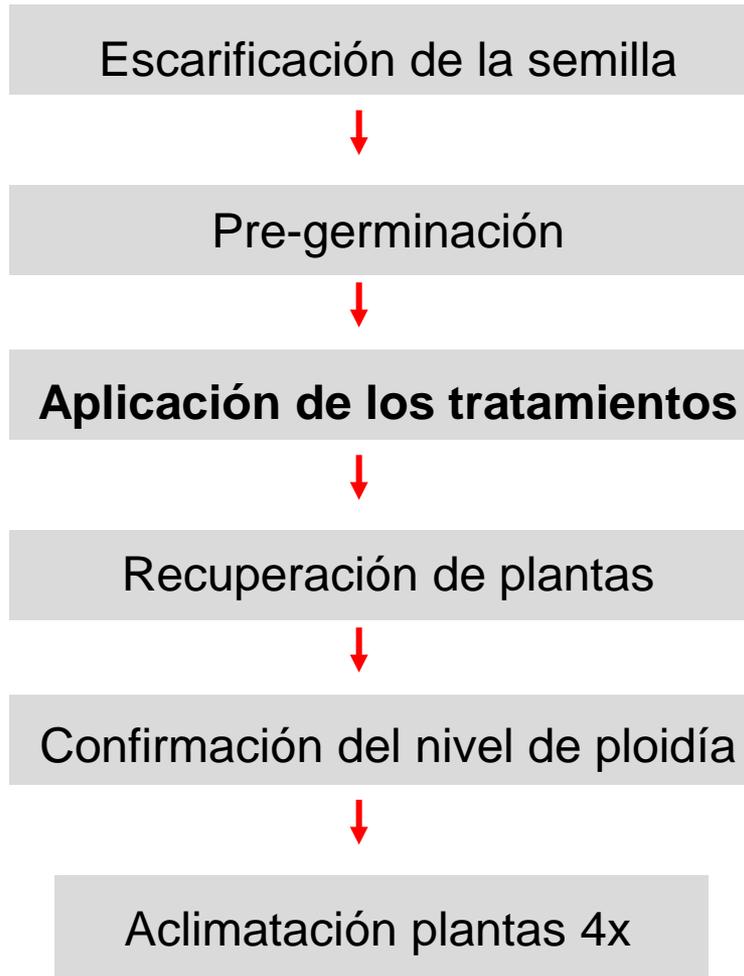
Definición de los tratamientos
(Selección del agente, concentración, tiempo)

Tejidos/individuos poliploides

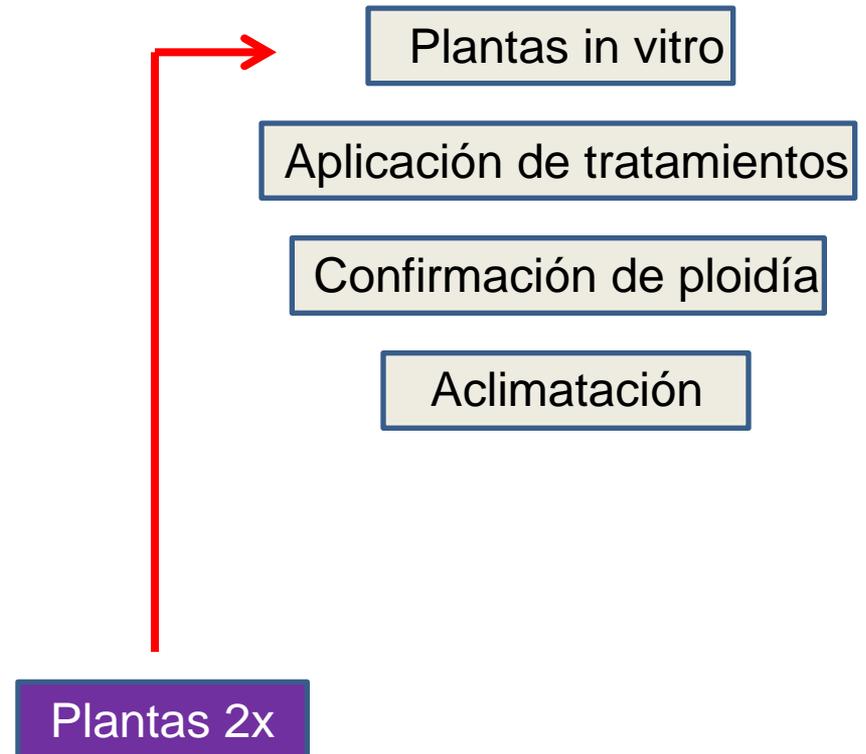


Metodología

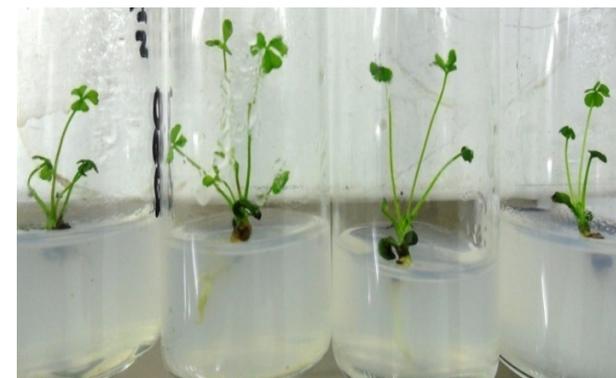
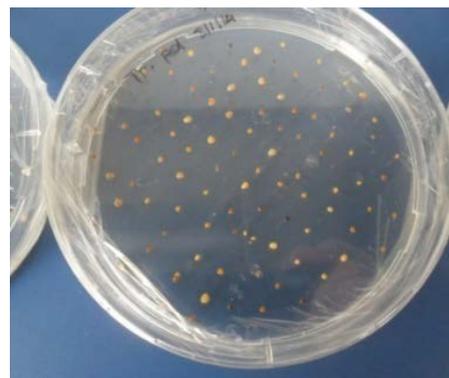
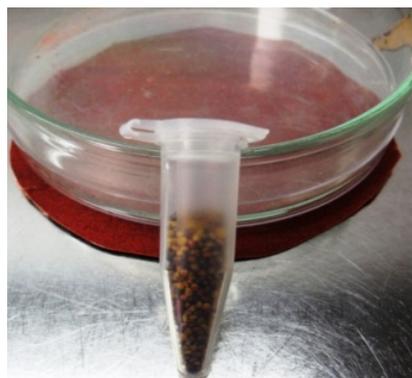
Tratamiento a las semillas



Tratamiento a las plantas in vitro

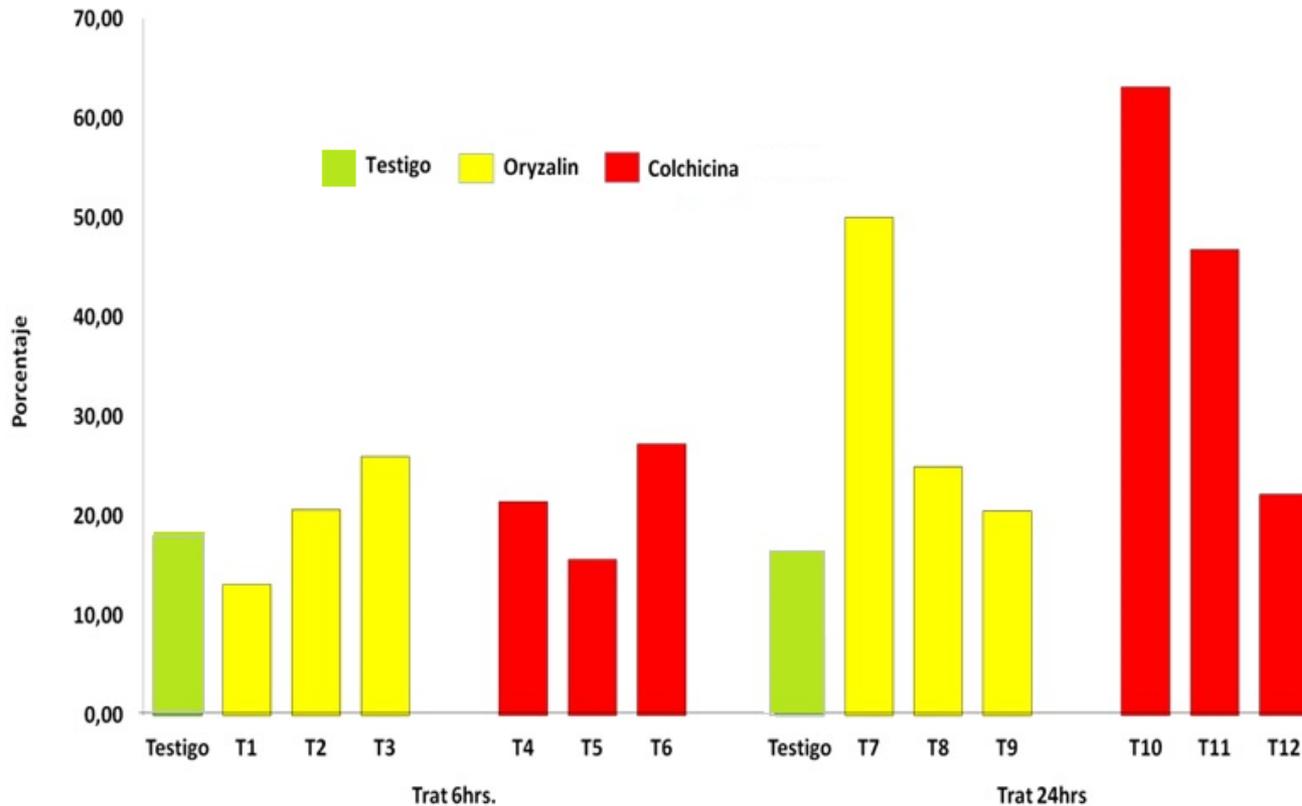


Tratamientos en semilla y en plantas in vitro



PRODUCTO	CONCENTRACIÓN	TIEMPO	ID
ORYZALIN	2,88 μ M	6 horas	T1
ORYZALIN	28,8 μ M	6 horas	T2
ORYZALIN	57,6 μ M	6 horas	T3
COLCHICINA	250 μ M	6 horas	T4
COLCHICINA	500 μ M	6 horas	T5
COLCHICINA	751 μ M	6 horas	T6
ORYZALIN	2,88 μ M	24 horas	T7
ORYZALIN	28,8 μ M	24 horas	T8
ORYZALIN	57,6 μ M	24 horas	T9
COLCHICINA	250 μ M	24 horas	T10
COLCHICINA	500 μ M	24 horas	T11
COLCHICINA	751 μ M	24 horas	T12

Sobrevivencia de las plantas a los 30 días



- a) Panta tratada
- b) Control
- c) Efecto tóxico de la colchicina
- d) y e) Plantas tratadas con oryzalin

Resultados

T12: 0,3% colchicina produjo 11% de duplicación en semilla pre-germinada.

T12: 0,3% fue altamente fitotóxico cuando se usó como explante plantas in vitro.

T11 :0,2% colchicina, indujo 16% de duplicación en plantas in vitro.

Oryzalin: Indujo plantas con mezcla de ploidías, (mixoploides) y además indujo un 5% de plantas albinas.

Estimación del nivel de ploidía

Métodos directos: Conteo de cromosomas

Citometría de flujo

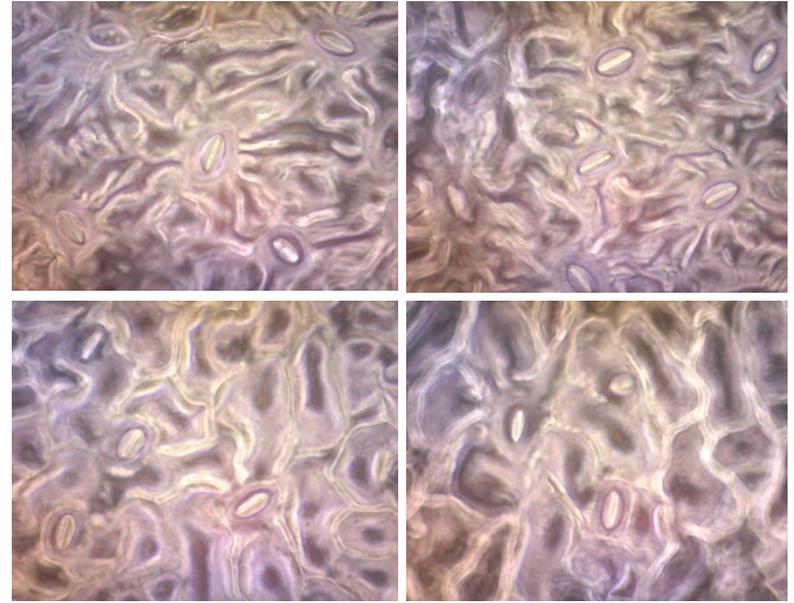
Métodos indirectos: Vinculación con características morfológicas

Tamaño de los estomas

Densidad de los estomas

Contenido de clorofila

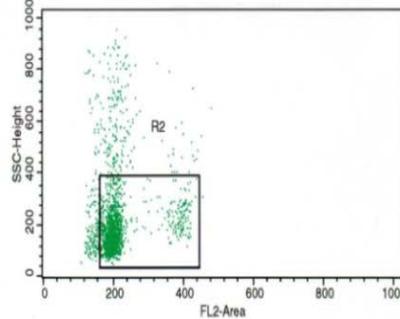
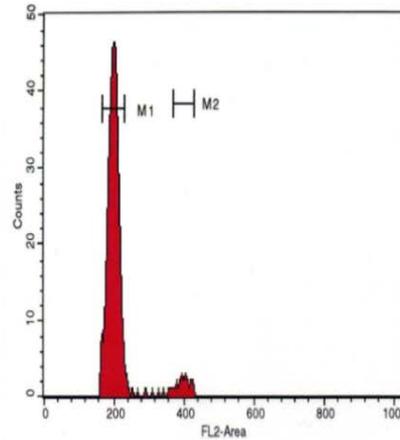
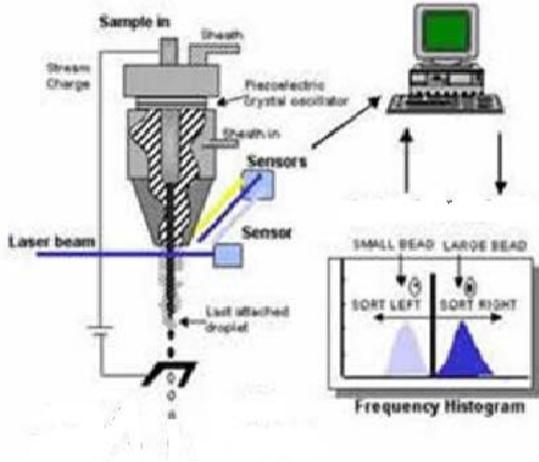
Estimación del nivel de ploidía



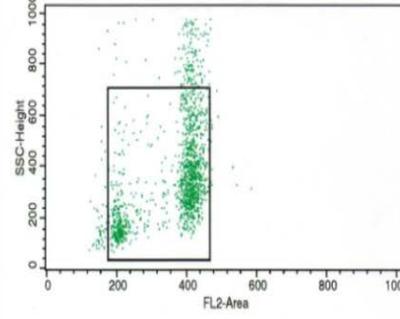
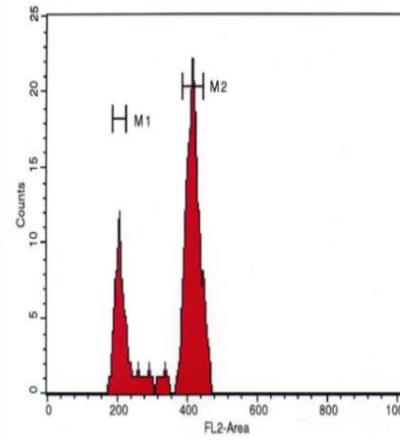
Observación de **estomas** al microscopio: diferencia en tamaño y densidad.

Parámetros asociados a la poliploidía son: un **mayor tamaño del grano de polen**, mayor **número de cloroplastos** en las célula guardia de los estomas, mayor **contenido de clorofila**.

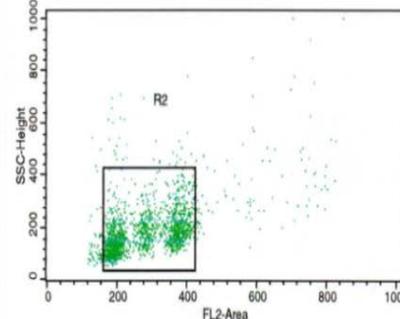
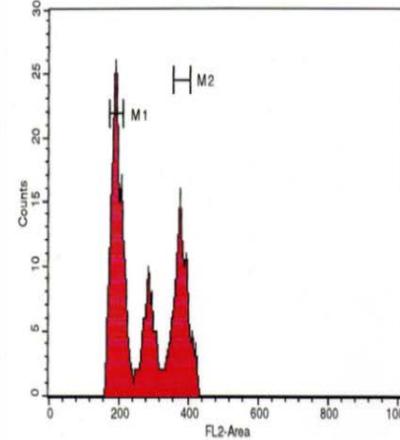
Confirmación del nivel de ploidía: citometría de flujo



Planta diploide



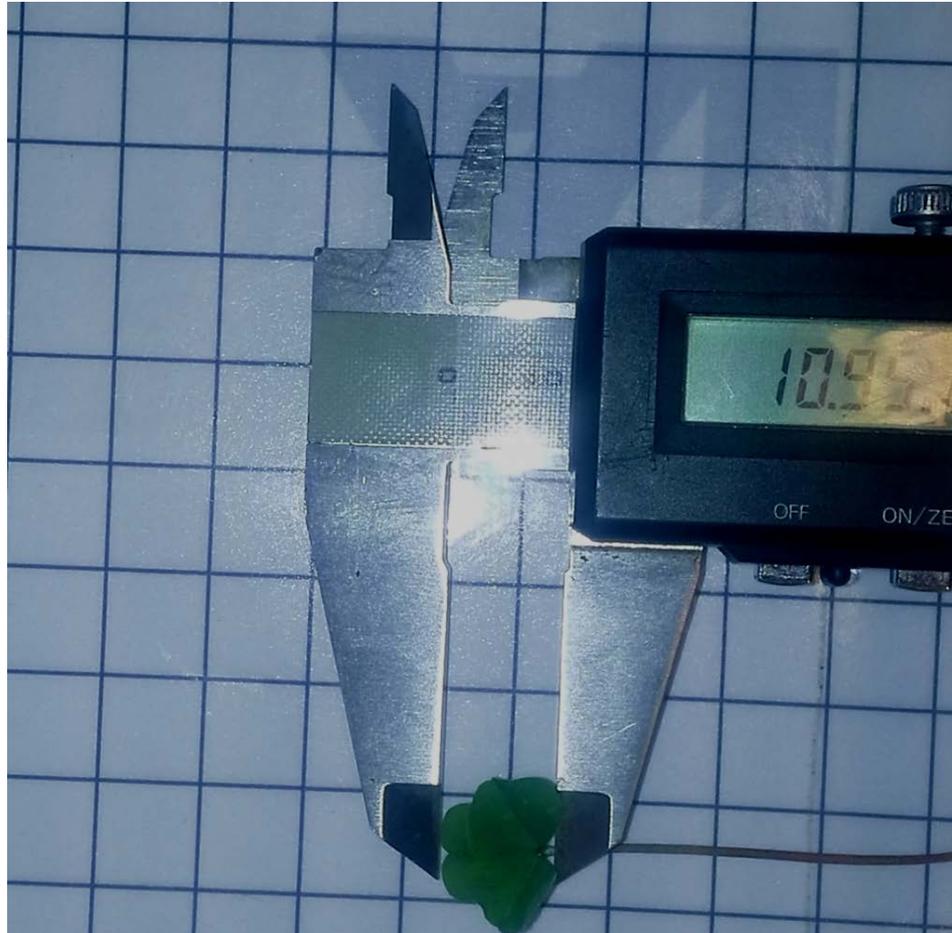
Planta tetraploide



Planta mixoploide

La **citometría de flujo** presenta **ventajas**, es una **técnica objetiva**, **segura**, con **elevada sensibilidad** y alta **velocidad** de análisis.

Evaluación de parámetros vegetativos





**Plantas en invernáculo
en la segunda estación de
crecimiento**

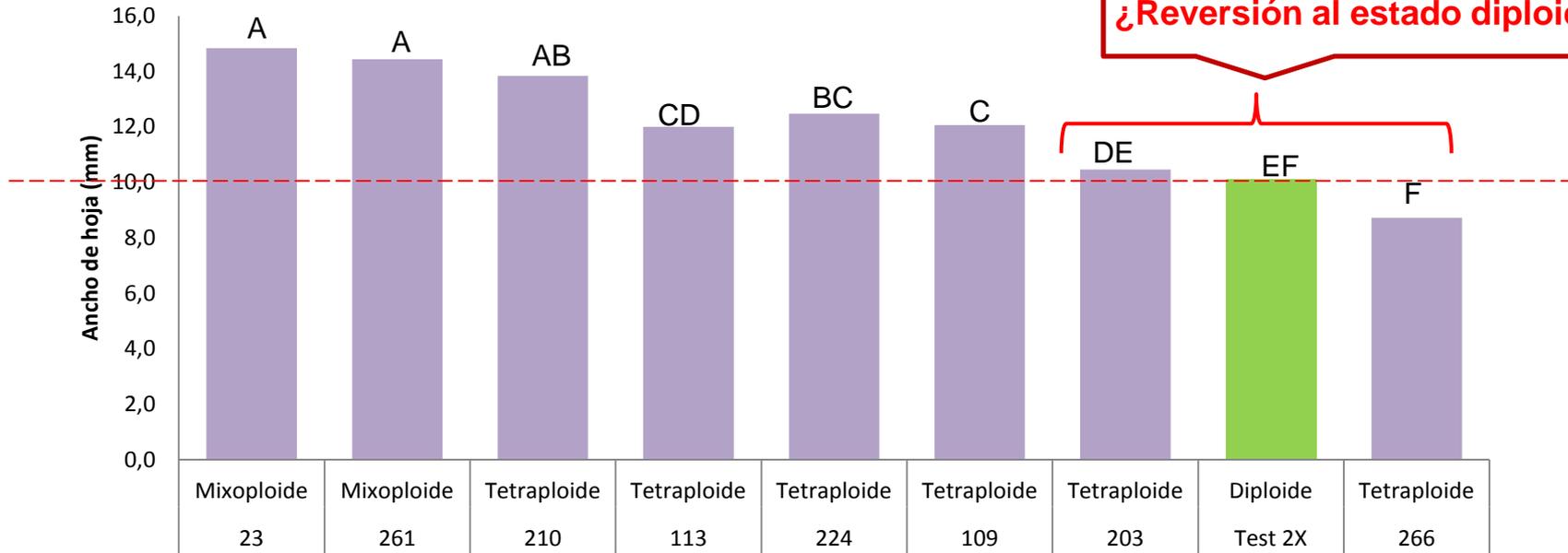
Plantas 2x



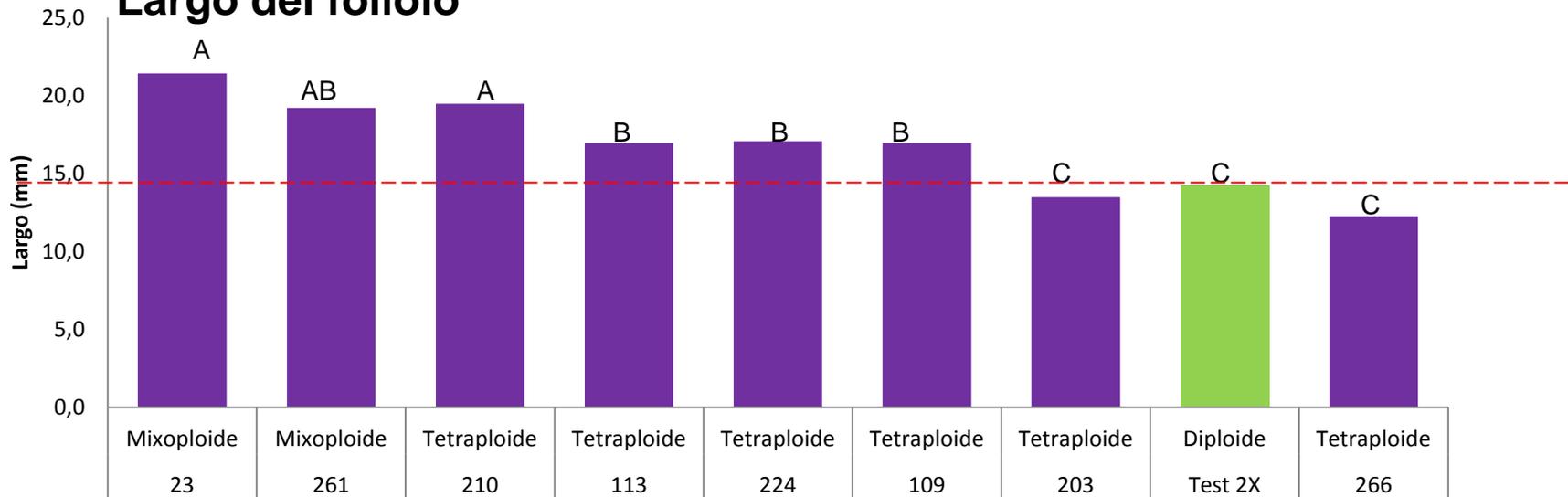
Plantas tetraploides

Ancho del folíolo

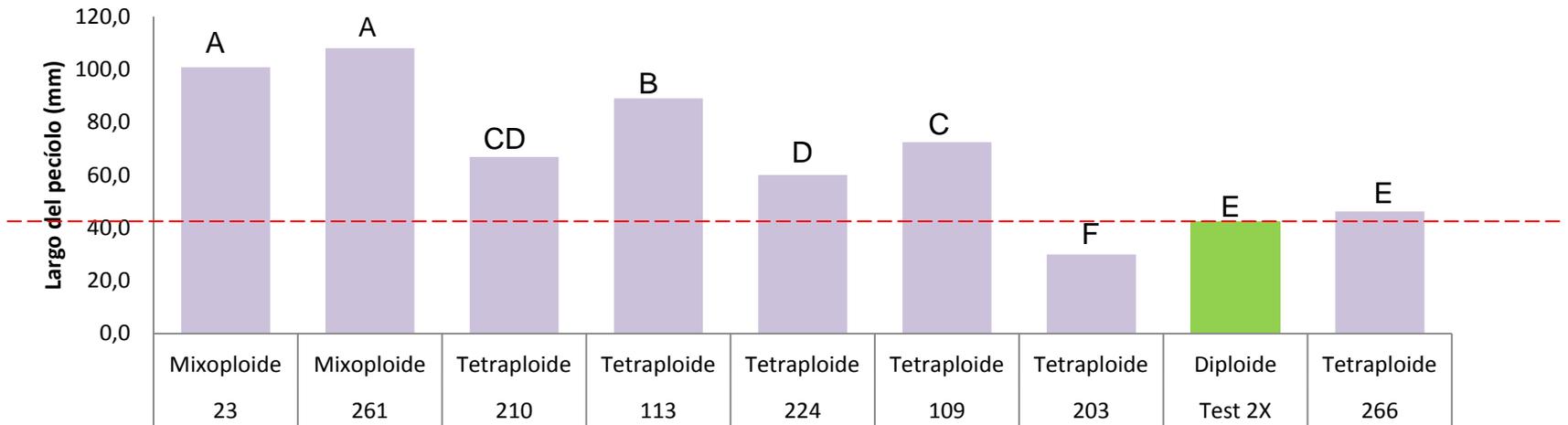
¿Variabilidad en la semilla?
 ¿Depresión por homocigosis?
 ¿Reversión al estado diploide?



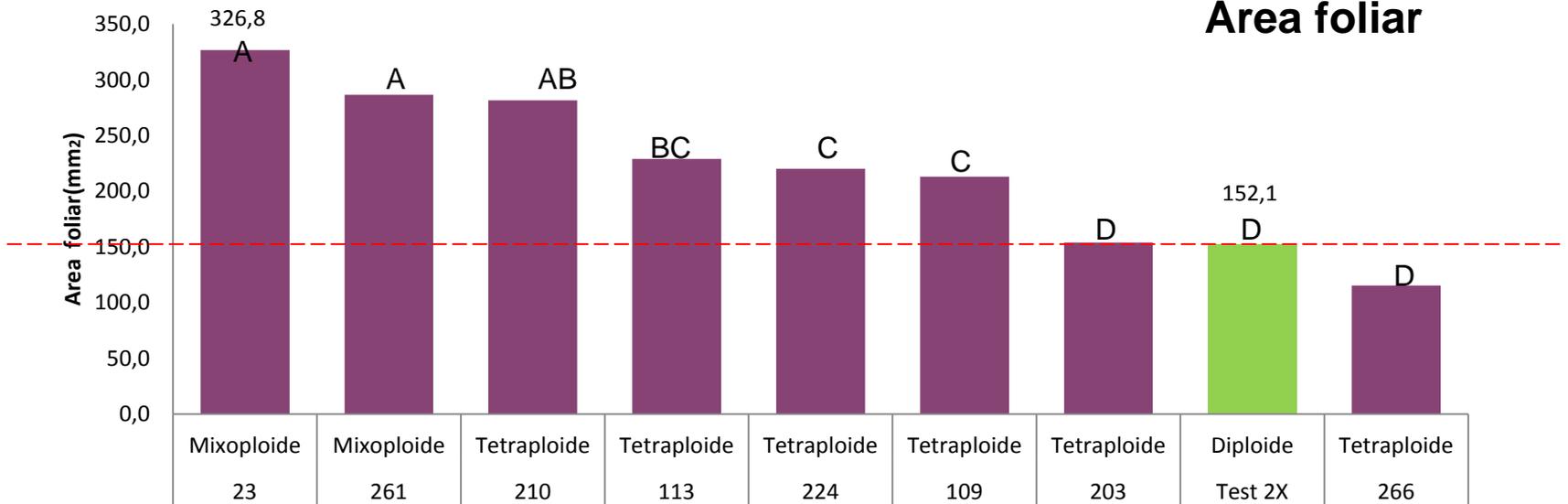
Largo del folíolo



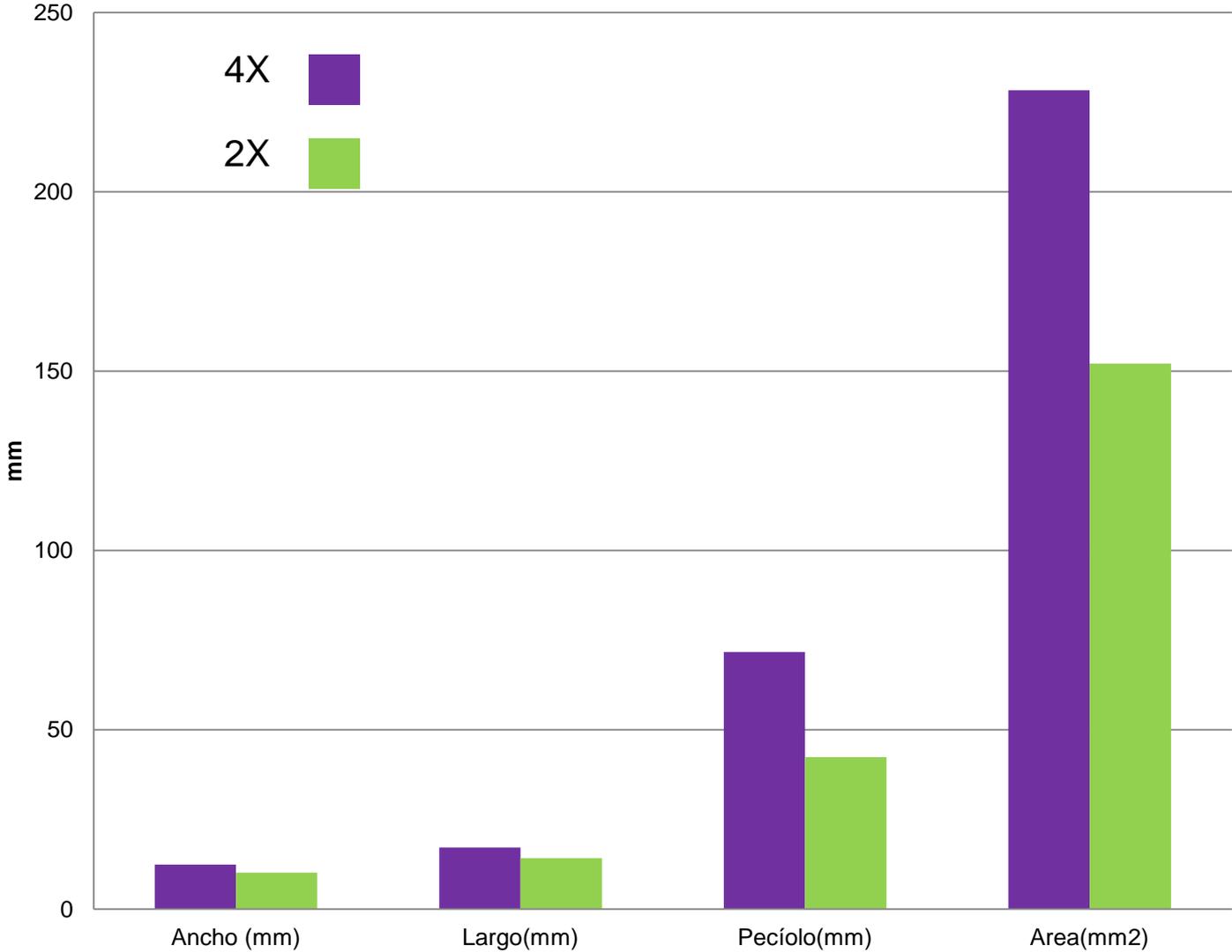
Largo del pecíolo



Área foliar



Promedio de los parámetros vegetativos



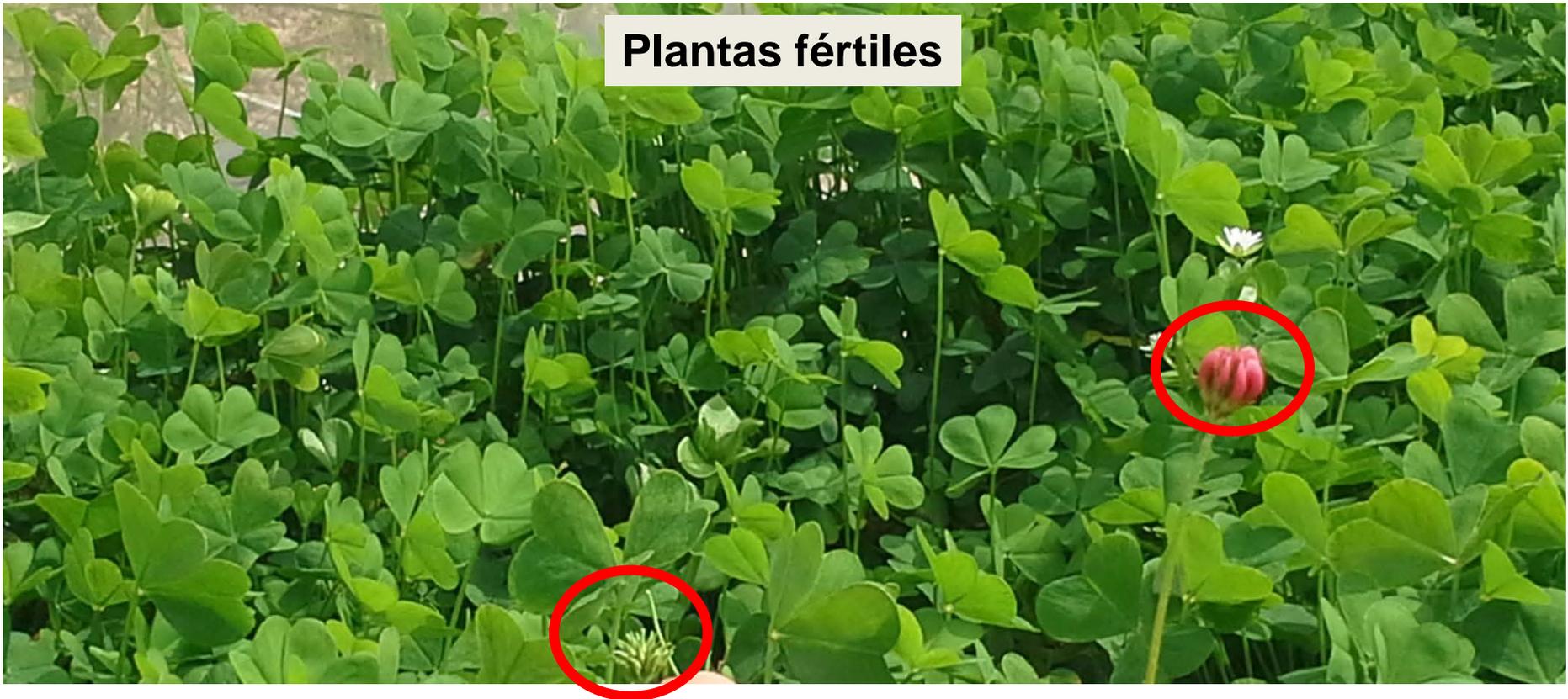
Aclimatación de plantas







Plantas fértiles



Testigo 2x



Plantas tetraploides



Mejoramiento en el nivel 4x



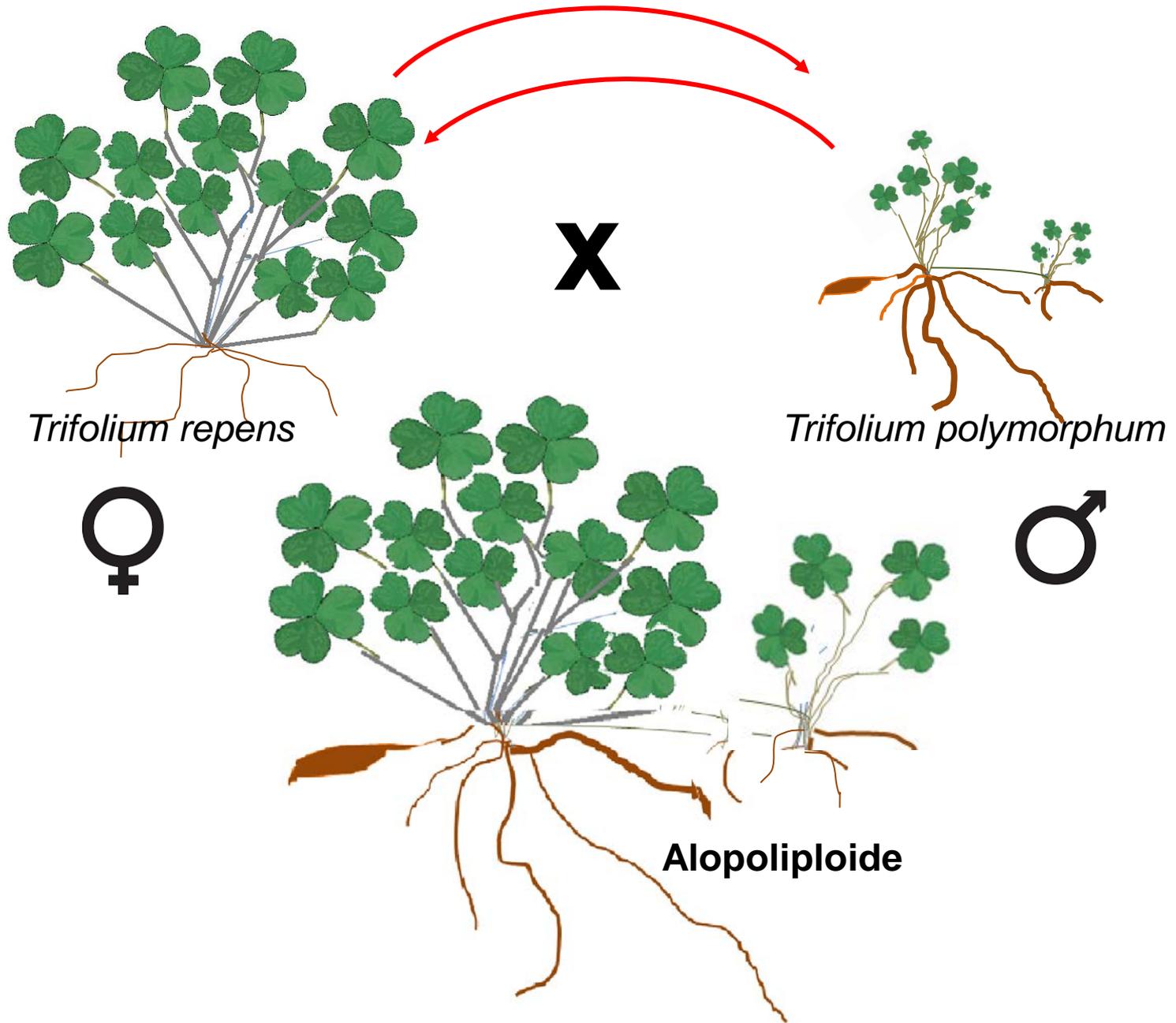
**Cruzamientos
intra-específico**



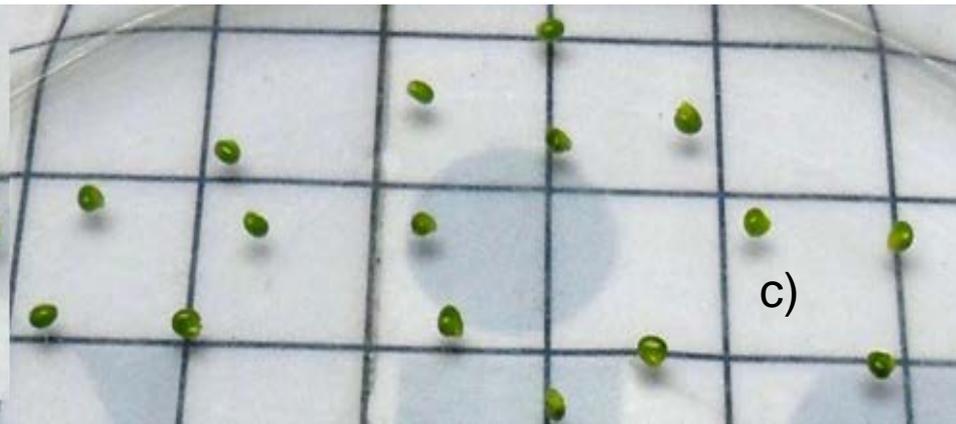
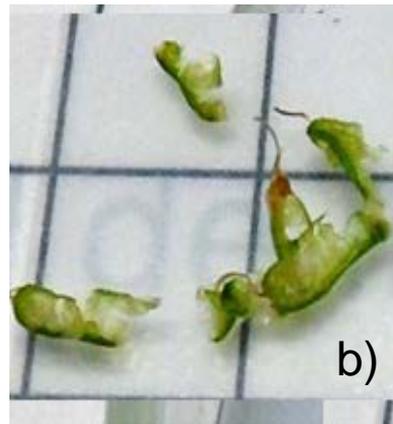
**Cruzamiento
inter-específico**



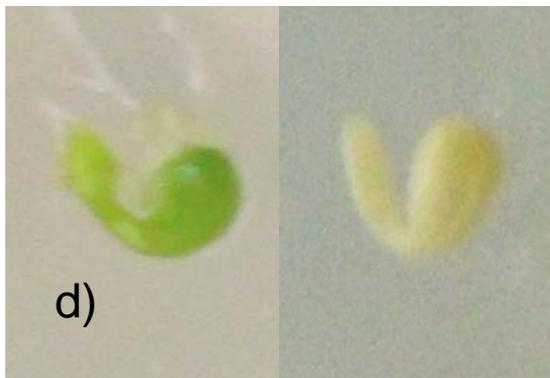
Recombinación de características



Rescate de embriones en cruzamientos interespecífico con trébol blanco



a), b), y c) Vainas a los 14 días de la polinización



d) Embrión a los 16 días de la polinización

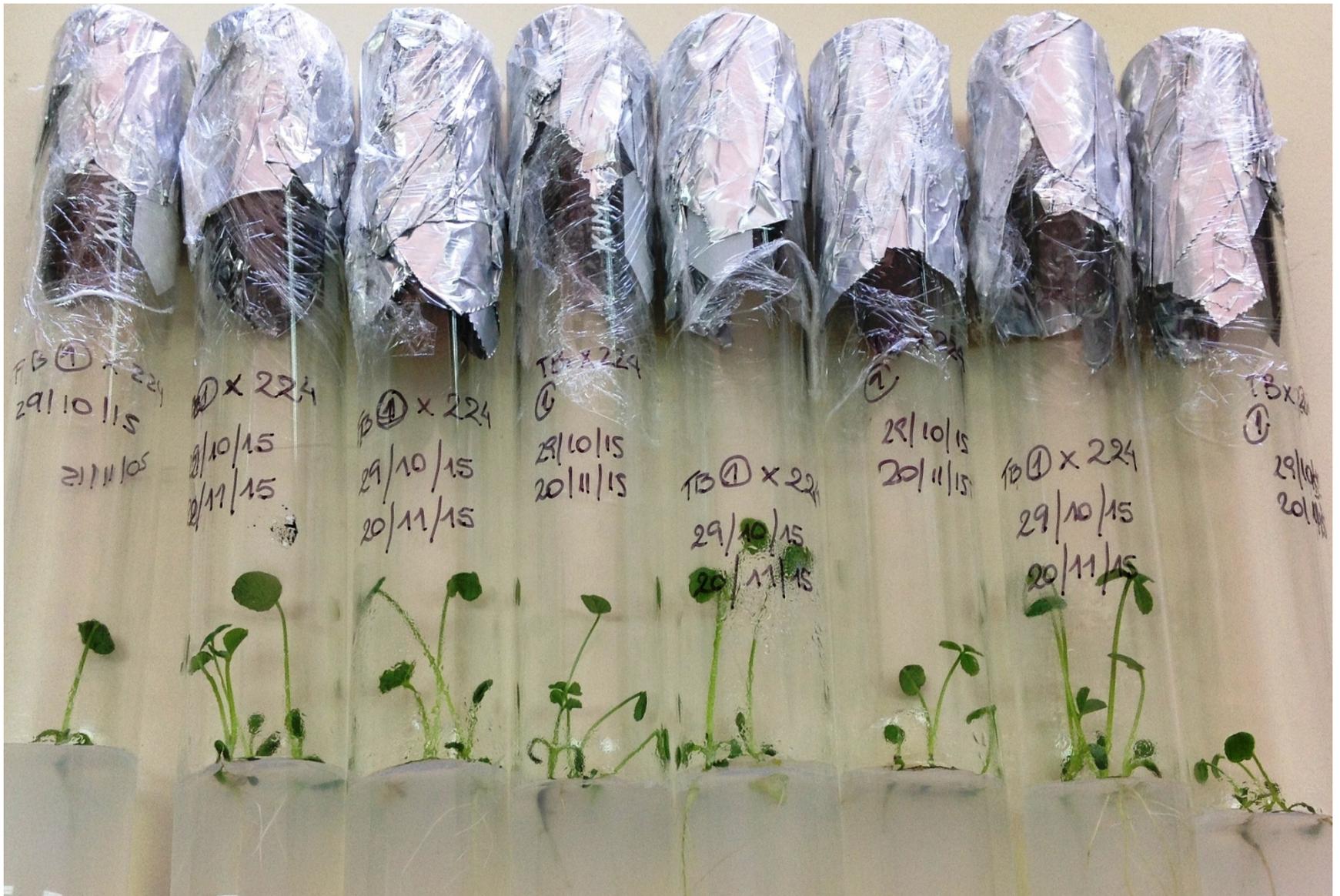


e) Vainas a los 29 días de la polinización



f) Embrión rescatado a los 30 días

Embriones rescatados de cruzamiento *T.repens* x *T.polymorphum*.



Consideraciones finales

Los individuos tetraploides mostraron abundante floración. Estas plantas se cruzaron entre sí para generar variabilidad genética.

En promedio, todos los parámetros vegetativos evaluados mostraron la superioridad de los individuos tetraploides comparado con los diploides. Está pendiente el análisis de las características radiculares de las plantas 4x.

La duplicación cromosómica resultó una estrategia útil para aumentar la producción de biomasa, generándose genotipos de interés que se utilizarán en el programa de mejoramiento con distintas finalidades.

Se están ajustando las condiciones para la duplicación cromosómica de otras especies nativas como *adesmia*.

Se está evaluando el producto de los cruzamientos con *T. repens*, una de las forrajeras más adaptadas y productivas del país tanto en volumen de materia seca como en su valor proteico.

Es necesario evaluar la estabilidad de los individuos, debido a que puede darse la reversión a la condición diploide.

Muchas gracias por su atención

acastillo@inia.org.uy

