



Duplicación cromosómica en raigrás anual (*Lolium multiflorum* Lamarck) mediante tratamiento con colchicina

Maciel M. A.^{1,2}, M. L. Roldán³, C. Delucchi³, A. E. Re³, M. L. Acuña³, A. H. Díaz Paleo³.

¹Centro de Investigaciones y Transferencia del Noroeste de la provincia de Buenos Aires (UNNOBA- UNSaA- CONICET), Buenos Aires, Argentina; ²Instituto de Biología Subtropical- Nodo Posadas (UNaM- CONICET), Misiones, Argentina; ³Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Argentina. E-mail: roldan.lorena@inta.gov.ar

INTRODUCCIÓN

Programas de mejoramiento genético
Germoplasma poliploide
Ampliar base genética y maximizar caracteres de interés agronómico

Raigrás anual o raigrás italiano (*Lolium multiflorum* Lamarck).
Diploide (2n=2x=14)

Mitosis Normal

Profase → Metafase → Anafase → Dos células hijas

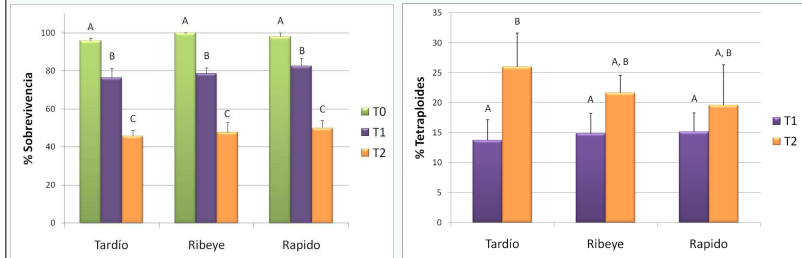
COLCHICINA

Célula tetraploide

Figura N°1. Mitosis. En la parte superior, etapas de la mitosis normal, con línea punteada roja se detalla el efecto de la colchicina. La misma inhibe la formación del huso mitótico. Los cromosomas en anafase no se separan dando origen a células con cantidad de cromosomas duplicados (Dhooghe et al, 2011).

RESULTADOS

La sobrevivencia de las plántulas de raigrás sometidas a la acción del agente antimitótico colchicina fue de $76 \pm 5\%$; $78 \pm 3\%$ y $83 \pm 4\%$ en T1 y $46 \pm 3\%$, $48 \pm 5\%$ y $50 \pm 4\%$ en T2 para Tardío, Ribeye y Rápido, respectivamente. En T0 no se afectó la viabilidad (Figura N° 2A). De acuerdo a los datos analizados, el efecto del tratamiento T1 fue similar independientemente del cultivar. Si bien la tasa de sobrevivencia fue menor en T2, se obtuvo mayor porcentaje de plántulas tetraploides: $26,1 \pm 5,7\%$; $21,7 \pm 2,9\%$ y $19,6 \pm 6,7\%$ para Tardío, Ribeye y Rápido, respectivamente (Figura N° 2B). Se observó un efecto del tratamiento dependiente de la concentración de colchicina ($p=0,0028$) no así del cultivar ($p=0,6283$).



Mediante el uso de este protocolo sólo el 14,5% del total de las plantas tratadas con colchicina – DMSO 1% resultó en quimeras. El conteo cromosómico de las células meristemáticas de raíz permitió evidenciar duplicación en el número cromosómico en el 99% de los casos mediante la tinción con solución de fucsina 0,4% (Figura N°3), lo cual permitió verificar la estabilidad de la progenie con respecto al número de cromosomas.

Mediante el uso de este protocolo sólo el 14,5% del total de las plantas tratadas con colchicina – DMSO 1% resultó en quimeras.

El conteo cromosómico de las células meristemáticas de raíz permitió evidenciar duplicación en el número cromosómico en el 99% de los casos mediante la tinción con solución de fucsina 0,4% (Figura N°3), lo cual permitió verificar la estabilidad de la progenie con respecto al número de cromosomas.

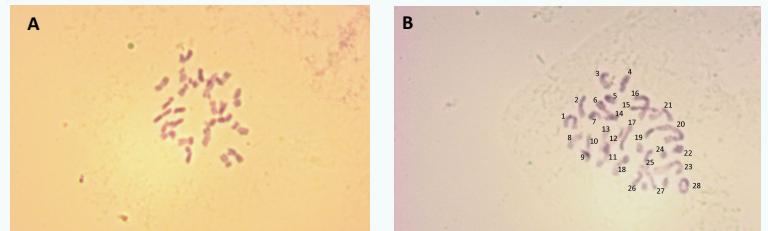


Figura N°3. Imagen bajo microscopio de una célula tetraploide (4x) del meristema apical de la raíz de raigrás anual genotipo Rápido.

CONCLUSIONES

Se evidenció que el tratamiento con colchicina durante 24 horas es adecuado para la duplicación de cromosomas en los tres genotipos evaluados de *L. multiflorum*. Asimismo, se observó que hay un incremento en el porcentaje de tetraploides obtenidos en relación con la concentración de colchicina, tal como lo describió Pereira et al, 2017. El proceso de duplicación sucedió en todos los tratamientos, lográndose un porcentaje de eficiencia mayor cuando se utilizó 0,25% colchicina y 1% de DMSO.

FINANCIAMIENTO

Mejoramiento genético de leguminosas y gramíneas forrajeras para incrementar la productividad y la variabilidad 2019-PE-E6-1142-001. INTA

OBJETIVOS

Obtener plantas tetraploides de *L. multiflorum* a partir de tres genotipos diploides adaptados a la región pampeana (Tardío, Ribeye y Rápido) del programa de mejoramiento de INTA para lograr una forrajera de mayor rendimiento y generar variabilidad genética.

MATERIALES Y MÉTODOS

Germinación de 170 semillas diploides (2x) de cada genotipo a 16 °C y fotoperiodo 12/12. Riego con agua destilada estéril. Tres repeticiones de n: 55.

Lavado de raíces con agua. Inmersión de las plántulas en colchicina (T0: 0%; T1: 0,1%; T2: 0,25 %) más DMSO 1% en un DCA.

10 plántulas/tubo de 50 mL
24 h en oscuridad a 16 °C

Transferecia de plántulas a bandejas con arena estéril a 16 °C y fotoperiodo 10/14. Pasaje a los 42 d a maceta con sustrato (3 tierra: 1 arena) bajo las mismas condiciones de luz y temperatura.

15 días
Determinación del nivel de ploidez de las plantas antes del trasplante mediante citometría de flujo, servicio realizado por el Instituto de Floricultura, INTA Castelar.

Protocolo adaptado de Pereira et al.2014

Germinación de 10 semillas provenientes de 15 plantas 4x del genotipo Rápido, determinadas por citometría de flujo, sobre papel de filtro en placas de Petri. Raíces de 1-2 cm de largo se fijaron y las células meristemáticas se tiñeron con solución de Feulgen. Para verificar el nivel de ploidez se realizó el recuento cromosómico bajo microscopio (100X).

Análisis de los datos: Se compararon los porcentajes de tetraploidización de cada genotipo mediante ANOVA. Se utilizó el software InfoStat (Di Rienzo et al, 2020).

BIBLIOGRAFÍA

- Amigone, MA; Kloster, AM. (2003) Verdeos de invierno. Invernada Bovina en Zonas Mixtas. Agro 12. INTA Centro Regional Córdoba. Pp 56-79.
- Dhooghe, E; Van Laere, EK; Eeckhaut, T; Leus, I; Van Huylenbroeck, J (2011) Mitotic chromosome doubling of plant tissues in vitro. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 104:359-373.
- Pereira, RC; Mendes Ferreira MT; Davide LC; Pasqual M; Mittelman A; Techio VH (2014) Chromosome duplication in *Lolium multiflorum* Lam. Crop Breeding and Applied Biotechnology, v. 14, n. 4, pp. 251-255. DOI: 10.1590/1984-70332014v14n4n39.
- Pereira RC; de Souza S N; Oliveira Bustamante F; Mittelman A; Techio VH (2017) Stability in chromosome number and DNA content in synthetic tetraploids of *Lolium multiflorum* after two generations of selection. Ciencia Rural, v.47, n.2, e20150767.
- Piñero, J; Díaz, N; Pérez, M. (2001) Raigrás italiano. Revista Española Agropecuaria. 828:437-443.
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M., Robledo, C. W. (2020). InfoStat versión 2020. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.