

El uso de mutágenos en el mejoramiento de germoplasma ornamental nativo.

Alderete, Marisol¹; Bologna, Paula¹; Facciuto, Gabriela¹; Hagiwara, Juan Carlos¹; Kato, Adriana¹; Escandón, Alejandro Salvio¹.

¹Instituto de Floricultura. INTA-Castelar, de los reseros y Nicolás Reppetto s/n. Pcia. de Buenos Aires, Argentina, email: asescandon@cni.inta.gov.ar

La mejora se basa en la existencia de variabilidad genética entre los seres vivos, esta variación, a su vez, se basa en la aparición continua de mutaciones. Una mutación puede definirse, sintéticamente, como un cambio heredable en el ADN. La mutación espontánea es la base de la selección natural y en consecuencia de la evolución y de la selección para el proceso de mejoramiento. La mutación inducida es un complemento de la natural a fin de incrementar la variación existente, ya sea por acotamiento de aquella o cuando no se dispone del rasgo deseado (Cubero, 2003).

Estas mutaciones artificiales provocan cambios genéticos de carácter aleatorio, generando variación o variaciones genéticas en el corto plazo. Estos cambios pueden llevar a la incorporación de características totalmente nuevas y poco probables desde el punto de vista del "pool" de genes de la especie, provocando que los programas de mejoramiento se vean considerablemente acelerados, dado que generalmente la selección de mutantes inducidos se efectúa a través del fenotipo y muchas de las plantas que se propagan vegetativamente permiten la detección, selección y conservación de las mutantes dentro de la primer generación M1.

Las plantas ornamentales representan un área de la agricultura cuyo mercado se caracteriza por ser muy exigente y ávido de novedades que responden a modas y gustos del momento, razón por la cual la generación de nuevos productos es una demanda constante. Es así que uno de los objetivos en el mejoramiento de plantas ornamentales es la generación de variación genética a partir de la cual se efectúe una selección en base a características o rasgos morfoagronómicos deseables, como tamaño floral, pigmentación foliar y/o floral, hábito de crecimiento, etc. (Schum & Preil, 1998).

Clásicamente las mutaciones se clasificaron según el nivel de cambios que provocaban en el genoma:

-genómicas: cambios que afectan a todo el genoma (poliploidías).

-cromosómicas: afectan a cromosomas (aneuploidías, inversiones, traslocaciones, deleciones etc.).

-de punto: cuando afectan a un gen propiamente dicho.

Hoy en día éste último es el sentido principal y prácticamente el único que se le da a la palabra mutación.

MUTANTES POR RADIACIÓN

Calibrachoa, La LLave y Lexarza (Solanaceae), es un género originario de Sudamérica (Stehmann & Semir, 1997) de apreciado valor ornamental y del cual es posible hallar una gran cantidad de variedades comerciales en el mercado mundial.

En el Instituto de Floricultura (INTA-Castelar) se ha comenzado un plan de mejoramiento genético en *Calibrachoa* (híbr.) con el objetivo de obtener plantas compactas que se adapten a las condiciones ambientales de Buenos Aires. Dentro de este marco se está llevando a cabo el ajuste de metodologías para la inducción de variación genética mediante mutagénesis por radiación-X. Para ello se han realizado trabajos relativos a la caracterización del germoplasma nativo (Facciuto et al., 2006), poliploidización *in vitro* (Hagiwara et al., 2002) y micropropagación del género (Coviella & Facciuto, 2005). Teniendo en cuenta el uso de rayos X como herramienta de mutagénesis para el mejoramiento, se han llevado a cabo trabajos de selección de clones de acuerdo a

características tales como tiempo de floración, compacidad, color de flor y capacidad de enraizamiento, entre otras.

Comenzando con el plan de mejoramiento por medio de la técnica de inducción de mutantes para material *in vivo*, se seleccionó un clon con potencial ornamental.

Para la determinación de la LD50 (dosis letal media), estacas enraizadas de aproximadamente 4 semanas fueron tratadas a distintas dosis de radiación, evaluándose de esta forma, la dosis letal 50 (LD50). Se obtuvo una curva de daño fisiológico medida en base al crecimiento de los brotes axilares de las estacas irradiadas, viéndose que la supervivencia de los brotes disminuyó a medida que aumentó la dosis de radiación.

Posteriormente se irradió el genotipo selecto a la dosis de LD50 (24 Gy) -material que se encuentra en este momento en evaluación-. Se observó que el material *in vivo* irradiado con el objeto de obtener la LD50, ciertas plantas presentaban diferencias morfológicas con respecto al clon original en cuanto a color de flor, tamaño y forma; así como también el grado de compacidad. En vistas a evaluar estas diferencias, se realizaron estacas con el objetivo de propagar vegetativamente el material y ver la estabilidad de dichos cambios. Durante su seguimiento, se observaron que ciertos cambios revertieron, lo cual se puede inducir a efectos epigenéticos; mientras que hubo otras plantas que mantuvieron el fenotipo.

Dentro de este plan de mejoramiento para el género *Calibrachoa*, se comenzaron también trabajos de mutagénesis con material *in vitro* con el objetivo de evaluar ambos sistemas de cultivo para la inducción de mutantes del mismo clon selecto. Previo a esto, trabajos de investigación en micropropagación documentan para el género *Calibrachoa* el desarrollo de yemas adventicias a partir de trozos de hojas maduras cultivadas *in vitro* (Coviella & Facciuto, 2005) mediante el uso de 6-bencil amino purina (BAP).

Los materiales irradiados para la obtención de la LD50 se encuentran en este momento en estudio; pero ensayos preliminares indican que la dosis de radiación de LD50 para dicho material y en esa condición de cultivo sería de una dosis menor, que la obtenida para el material tratado *in vivo*; debido posiblemente a que los explantos de hoja son significativamente muy diferentes en cuanto a fisiología de tejido, ontogenia y edad del mismo, que las estacas utilizadas para el ensayo *in vivo*.

POLIPLOIDES

El término "ploidía" se refiere al número de juegos de cromosomas de un individuo y se lo denomina como "x". Un individuo con dos juegos de cromosomas (2x) se refiere como un diploide, con 3x, triploide y sucesivamente.

Por definición un individuo poliploide tiene un número de cromosomas diferente del número básico "n" correspondiente a las gametas de la especie. Los organismos superiores que están formados por dos series de genomas se consideran diploides.

El fenómeno de poliploidía es muy raro en animales. Por el contrario en plantas es relativamente frecuente y juega un papel muy importante en la evolución. En oposición con la evolución como un proceso gradual en el cual las nuevas especies surgen a partir del aislamiento de poblaciones y una importante acumulación de mutaciones, el fenómeno de poliploidización puede originar nuevas especies en forma abrupta, el mecanismo consiste en que una vez originada la población tetraploide sólo puede originar descendencia fértil cruzándose entre sí, por lo que queda aislada desde el punto de vista reproductivo; la poliploidización genera, en consecuencia, un barrera reproductiva entre los poliploides y la población parental, dado que la cruce entre individuos diploides y tetraploides generará una descendencia estéril.

Desde hace tiempo se ha sugerido que un importante porcentaje de las plantas fanerógamas tienen como origen evolutivo el proceso de la poliploidización, un ejemplo es la familia de las Rosáceas, la subfamilia maloideae (entre otros géneros: *Malus*, *Pyrus*; *Photinia* y *Chaenomeles*), se postula que todos tienen origen en un allopoliploide con $n=17$, mientras que en otras subfamilias de rosáceas el ancestro habría tenido un número $n=8$ ó 9 (Rowley, 1993).

En otros géneros, como *Chrysanthemum* (*Dendranthema*), las diferentes especies que lo componen muestran diferentes niveles de ploidía, representando series de ploidías crecientes en base $n=9$, esto es: $2n= 18; 36; 54; 72; 90$ y 198 (Ranney, 2000).

Un poliploide natural se puede generar a partir del cruzamiento de gametas no reducidas, si pertenecen a la misma especie se denominará autopoliploide o autoploide, en cambio si se trata del cruzamiento entre gametas de diferentes especies se lo considerará alopoliploide o aloploide (Cubero, 2003).

La poliploidía confiere una serie de ventajas adaptativas, por lo que los poliploides son seleccionados positivamente en el curso de la evolución (Ranney, 2000). Las ventajas en cuestión se refieren a:

- Una mayor dosis génica, lo que implica una mayor cantidad de proteína, aunque puede generar problemas en cuanto a reducción de fertilidad, en el caso de os autoploides con los mismos cromosomas homólogos.
- Una mayor heterosis, eventualmente el individuo podría disponer de 4 alelos diferentes en el mismo *locus*.
- A partir de esta redundancia genética, las mutaciones que se produzcan en estas copias extras de genes pueden originar nuevas características sin poner en riesgo las funciones esenciales.
- En los poliploides aumenta la frecuencia de autofecundación y el fenómeno de apomixis.
- La heterocigocidad de los alopoliploides disminuye los efectos deletéreos de la endocria.
- Mayor tolerancia al estrés, dada la multiplicidad de enzimas que les confiere una gran flexibilidad y aumenta su capacidad adaptativa.

A pesar de la relevancia de la poliploidía en la evolución de los vegetales, la aplicación de esta estrategia de mejoramiento no ha tenido gran impacto en los programas de mejoramiento de los grandes cultivos. En efecto, la duplicación somática de la dotación cromosómica aunque produce copias adicionales de los genes pre existentes, no introduce nueva información genética a los materiales. A esto se suma que esta cantidad extra de ADN debe ser duplicada en cada división, incrementando la duración del ciclo mitótico, la duplicación de estructuras implica un incremento del tamaño celular que trae aparejado desbalances anatómicos. Otros inconvenientes detectados son la fragilidad de la madera, frutos con exceso de agua (desabridos), etc. (Ranney, 2000).

Sin embargo, desde el descubrimiento de los inhibidores de la mitosis en la década del 30, el desarrollo de poliploides somáticos se ha convertido en una estrategia de rutina en ornamentales. En este contexto, el incremento del tamaño los órganos, especialmente de hojas y flores, la intensificación de los colores, además del restablecimiento de androfertilidad y la posibilidad de generar triploides estériles, hacen de la poliploidía una herramienta de gran utilidad en los programas de mejoramiento en ornamentales. Prueba de ello es el importante número de especies que, independientemente de que se trate de flor de corte o plantas en macetas se ha utilizado la poliploidización en su correspondiente programa de mejoramiento.

Los inhibidores de la mitosis son sustancias de naturaleza alcaloide que provocan la desorganización del uso acromático y en consecuencia, se impide la migración de las cromátides hermanas. Entre los más utilizados se encuentran, entre otros: la orizalina, la vincristina, la vinblastina y la colchicina, siendo esta última la de aplicación más generalizada. Estos alcaloides se utilizan en soluciones cuyas concentraciones oscilan entre el 0,05% y 0,9% (P/V), bajo condiciones *in vivo* se aplican: embebiendo semillas en proceso

de germinación, sumergiendo raíces o aplicándola sobre meristemas por medio de algodones embebidos en la solución del alcaloide (Callaway & Callaway, 2000). Asimismo, es posible su aplicación bajo condiciones *in vitro*, esta alternativa tiene algunas ventajas respecto de la aplicación *in vivo*. En efecto, es más reproducible en cuanto a las condiciones experimentales y además permite aprovechar la posibilidad del cultivo *in vitro* de tejidos de generar condiciones de multibrotación a partir del explanto utilizado, lo que podría redundar en un significativo incremento en la producción de poliploides (Escandón *et al.*, 2007).

En el Instituto de Floricultura de INTA se han obtenido individuos poliploides aplicando tanto técnicas *in vivo* como *in vitro*. Con relación a la primera alternativa, Mata *et al.* (2003) reportaron la obtención de individuos poliploides de *Jacaranda mimosifolia*, *Tabebuia heptaphyla* y *Tecoma stans*, exponiendo por imbibición semillas de estas especies a diferentes dosis de colchicina. Posteriormente se evaluaron las diferencias entre los individuos tetraploides y los diploides originales, encontrándose diferencias entre los grupos de las 3 especies. El individuo tetraploide de *T. heptaphyla* mostró flores más grandes, hojas más gruesas y de un color verde más intenso, los granos de polen fueron de mayor tamaño y con un 100% de viabilidad.

En *J. mimosifolia*, las plantas tetraploides mostraron entrenudos más cortos, flores más grandes y de un color azul más intenso así como en el verde de las hojas, pero en este caso el tamaño de las mismas fue menor, aunque presentaron estomas de mayor tamaño así como los granos de polen.

Las plantas tetraploides de *T. stans* mostraron entrenudos más cortos y una mayor intensidad en los colores de flores y hojas. Asimismo, estos órganos mostraron de ser mayor tamaño y con menos número de estomas por unidad de área. En este caso también el polen tetraploide fue de mayor diámetro que el de los controles diploides.

En el IF se comenzó a trabajar en la puesta a punto de la poliploidización bajo condiciones *in vitro* en *Calibrachoa pygmaea* y *C. linearis* con los trabajos de Hagiwara *et al.* (2002) y Hagiwara *et al.* (2006), a partir de los cuales se obtuvieron nuevos cultivares en ambas especies.

Con el objetivo de consolidar en el IF el uso de esta estrategia, nuestro grupo de trabajo optó por tres géneros de la familia Schrophulariaceae: *Scoparia*, *Bacopa* y *Mecardonia*, para utilizarlos en ensayos de aplicación de biotécnicas en la exploración de germoplasma nativo con potencial ornamental. Estos géneros se caracterizan por tener flores de colores llamativos, pero de pequeño tamaño, lo mismo ocurre con el tamaño de las hojas, por lo que la obtención de poliploides representa una alternativa válida para intentar incrementar el tamaño de estos órganos y mejorar la calidad ornamental de algunas especies de estos géneros.

En una primera etapa se efectuaron ensayos de introducción *in vitro* y poliploidización con diferentes especies del género *Scoparia*. Para ello se establecieron las condiciones de desinfección y establecimiento *in vitro* para segmentos nodales de *S. montevidiensis*, para lo cual sobre un medio MS (Murashige & Skoog, 1962) se probaron con diferentes tratamientos de reguladores del crecimiento (mg/L): 0,0; 0,25; 0,50 y 1,00; de ácido naftalen acético (ANA) y BAP, todas combinadas entre sí y cultivadas bajo un fotoperíodo 16:8, con 3.000 lux de irradiancia. El tratamiento conteniendo 0,25 mg/L de BAP, con una tasa de multiplicación de 9 brotes por explanto, resultó el más adecuado entre todas las combinaciones de reguladores probados. Los brotes regenerados *in vitro* fueron aclimatados y transferidos a condiciones de invernáculo sin mayores inconvenientes.

Tomando como referencia los datos obtenidos con *S. montevidiensis*, se aplicaron esas condiciones de cultivo para otras accesiones del género *Scoparia*: *S. montevidiensis* var. *montevidiensis* y var. *glandulifera*; *S. nudicaulis*, *S. hasleriana* y *S. dulcis*, con el objetivo de estudiar la respuesta *in vitro* de este germoplasma. Se observó que con la excepción de *S. hasleriana*, el resto tuvo un comportamiento *in vitro* similar al de *S. montevidiensis*. Ajustado de esta forma el protocolo de cultivo de tejidos, se comenzaron los ensayos de poliploidización *in vitro* con *S. montevidiensis* var. *montevidiensis*. Segmentos nodales de plántulas cultivadas *in vitro* fueron tratados con las siguientes concentraciones de colchicina (v/v %): 0,0; 0,1; 0,05; 0,01 y 0,001 en 1% v/v dimetill-sulfóxido (DMSO) (24 y 48 h); se

llevaron a cabo 3 tratamientos control: explantos sin tratar, tratados con agua y con solución 1% de DMSO.

De los brotes tratados con colchicina se midieron con el citómetro de flujo un total de 379 plantas de *S. montevidiensis* entre las cuales se pudieron detectar 4 tetraploides sólidas y 15 quimeras. Las plantas fueron analizadas desde el punto de vista fenotípico y se hallaron diferencias significativas con relación al tamaño de hojas y flores, a la intensidad del color verde del follaje, entre controles y tetraploides y entre estos entre sí (Escandón et al., 2005).

Tomando como base el protocolo ajustado para *S. montevidiensis* se llevaron a cabo ensayos de establecimiento y ajuste de condiciones de cultivo *in vitro* de tejidos para *Bacopa monnieri* y *Mecardonia tenella*. Ambas especies coincidieron que el medio MS suplementado con 0,25 mg/L de BAP era el tratamiento más adecuado para su multiplicación *in vitro*, se obtuvo una tasa de multiplicación de yemas de 18 para *B. monnieri* y de 32 yemas/explanto para *M. tenella*. Con respecto a la poliploidización con colchicina, aplicando el protocolo ajustado para *Scoparia*, sobre 150 individuos medidos por el citómetro de flujo, se detectaron 2 individuos de *B. monnieri* tetraploides sólidos y 2 quimeras (Escandón et al., 2006). Por su parte, con *M. tenella*, sobre 126 individuos medidos, 68 fueron tetraploides y el resto, quimeras (Escandón et al., 2007).

En lo que se refiere al fenotipo, en ambas especies, se encontraron diferencias significativas entre controles y tratados, con relación al tamaño de hojas y flores y a la intensidad de los colores, aunque no se detectaron diferencias entre los tetraploides sólidos recuperados en ambas especies.

Excepto una, el resto de las schrophulariaceas ensayadas mostraron requerimientos culturales similares bajo condiciones *in vitro*. Además con las 3 especies ensayadas fue posible la obtención de nuevos cultivares tetraploides, aunque, en este contexto, es importante recalcar las diferencias observadas entre ellas en lo que hace a la cantidad de individuos afectados por la colchicina en el caso de *S. montevidiensis* y *B. monnieri*, por un lado y *M. tenella*, por el otro. Esta diferencia podría estar relacionada con una diferencia en la sensibilidad de las especies frente al alcaloide utilizado, así como también a la diferente tasa de multiplicación observada en las condiciones de cultivo establecidas, esto la capacidad de multibrotación sería directamente proporcional a la cantidad de individuos tetraploides recuperados.

BIBLIOGRAFÍA

CALLAWAY, M.B.; CALLAWAY, D.J. Genetics and its applications. En: **Breeding ornamental plants**. Cap. 1. Editores: CALLAWAY, M.B. y CALLAWAY, D.J. Timber Press Portland, Oregon. EEUU, 2000. p. 19-48.

COVIELLA, M. A.; FACCIUTO, G. **Regeneración de plantas a partir de hojas maduras y segmentos nodales de cuatro especies de *Calibrachoa***. (BIOTEC 2005).

CUBERO, J.I. Los poliploides en la mejora vegetal. En: **Introducción a la mejora genética vegetal**. Cap. 15. Ediciones Mundi-prensa. Madrid. España, 2003. p. 325-351.

ESCANDÓN, A.S.; ALDERETE, M. L.; HAGIWARA, J. C. **A new variety of *Mecardonia tenella*, a native plant from South America with ornamental potential, obtained by *in vitro* polyploidization**. Scientia Horticulturae, 2007. en prensa.

ESCANDÓN, A.S., HAGIWARA, J.C.; ALDERETE, M.L. A new variety of *Bacopa monnieri* obtained by *in vitro* polyploidization. In: Proceeding of VI Symposium REDBIO-Argentina 2005. "A Biotechnology vision from South America". (Eds.) ESCANDÓN, A.; SHARRY, S.; IZQUIERDO, J. **Electronical Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 3, p. 157-162, 2006. [on line]. <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol9/issue3/full/8/>

ESCANDÓN, A.S.; MIYAJIMA, I.; ALDERETE, M.; HAGIWARA, J.C.; FACCIUTO, G.; MATA, D.; SOTO, S.M. Wild ornamental germplasm exploration and domestication based on biotechnological approaches. *In vitro* colchicine treatment to obtain a new cultivar of *Scoparia montevidensis*. **Electronical Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 2, p. 204-211, 2005. [online]. <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol8/issue2/full/2/>

FACCIUTO, G; PANNUNZIO, M. J.; COVIELLA, M.A.; SOTO, S.; HAGIWARA, J.C.; BORJA, M. Characterization of the ornamental value of *Calibrachoa spp* native to Argentina. **Acta Horticulturae**, n.714, p.37-42, 2006.

HAGIWARA, J.C.; KATO, A.; MORI, M.; MIYAJIMA, I. Obtención de poliploides en *Calibrachoa pygmaea* mediante el uso de colchicina *in vitro*. 1er. Congreso Argentino de Floricultura y Plantas Ornamentales. Buenos Aires, Noviembre, 2002. p. 90.

HAGIWARA, J.C.; KATO, A.; GARCÍA LAGER, E.; MORI, M.; GREPPI, J. 3er. Congreso Argentino de Floricultura. La Plata, Noviembre 2006, p. 353.

HORN, W. Breeding methods and breeding research. En: **Breeding for ornamentals: classical and molecular approaches**. Editor: VAINSTEIN, A. Kluwer Acad. Pub. Impreso en Holanda, 2002. p. 47-83.

MATA, D.; FACCIUTO, G.; HAGIWARA, J.C.; SOTO, S.; MIYAJIMA, I.; KOBAYASHI, N. Morphological characterization of induced tetraploids from native Bignoniaceae in Argentina. V International Symposium on New Floriculture Crops. Iguazu Falls. Brasil, 2003. p. 63.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 437-497, 1962.

RANNEY, T.G. Polyploidy: From evolution to landscape plant improvement. Proceedings of the 11th Conf. Metropolitan Tree Improvement Alliance (METRIA). En: www.ces.ncsu.edu/fletcher/programs/nursery/metria/metria11/ranney/polyploidy.htm. 2000.

ROWLEY, G.D. Rosaceae: The rose family. En HEYWOOD, V.H. (Ed.), **Flowering plants of the world**. Batsford Pub. Londres, 1993. p. 141-144.

SCHUM, A.; PREIL, W. Induced mutation in ornamental plants. In: JAIN, S.M.; BRAR, D.S.; AHLHOOVALIA, B.S. (Eds.). **Somaclonal variation and Induced Mutations in Crop Improvement**, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1998. p. 367-378.

STEHMANN, J.R.; SEMIR, J. A New Species and New Combinations in *Calibrachoa* (Solanaceae). **Novon**, v. 7, p. 417-419, 1997.

PALAVRAS CHAVES:
Mutágenos, mejoramiento, germoplasma.