

MEJORAMIENTO GENÉTICO EN EL GÉNERO *Mecardonia* (*Plantaginaceae*)

Julián Alejandro Greppi*, Mariana Cecilia Pérez de la Torre, Santiago Ariel Trupkin

Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Instituto de Floricultura. Argentina

*Autor para correspondencia: greppi.julian@inta.gob.ar

RESUMEN

Mecardonia Ruiz & Pavon (*Plantaginaceae*) es un género americano compuesto por alrededor de nueve especies herbáceas, algunas de las cuales se caracterizan por su gran potencial ornamental. Por este motivo, el Instituto de Floricultura del INTA inicia en el año 2004 un programa de mejoramiento genético con el objetivo de desarrollar cultivares de *Mecardonia* para uso ornamental. Desde entonces, se han llevado a cabo distintas actividades, generando información de utilidad para el proceso de mejoramiento. Entre los aspectos abordados, se encuentran los taxonómicos, describiendo dos nuevas especies presentes en Argentina (*M. kamogawae* Greppi & Hagiwara y *M. reneeae* Greppi & Sosa). Conteos cromosómicos en dichas especies mostraron la existencia de mayores niveles de ploidía en *M. reneeae* (tetraploide) y en *M. kamogawae* (hexaploide) en relación al resto de las especies que suelen ser diploides. Se analizaron los contenidos de ADN y se evaluaron las relaciones de compatibilidad reproductiva en las especies y variedades botánicas nativas de Argentina. Los estudios indicaron la existencia de incompatibilidad reproductiva a excepción de unos pocos casos. A partir de los cruzamientos se pudieron crear hasta el momento siete cultivares, cuatro de ellos comercializados en Argentina y tres en el mercado internacional a través de un convenio de vinculación tecnológica con la empresa japonesa Sakata Seed. El proceso de mejoramiento de estos primeros cultivares estuvo basado en metodologías clásicas, llevando a cabo cruzamientos y selección de genotipos. Además, se abordó una estrategia no convencional para avanzar en el proceso de mejoramiento e incorporar nuevas características. La metodología utilizada se basó en la transformación genética con *Agrobacterium rhizogenes* salvaje para obtener plantas con un porte más compacto en cultivares estériles que no pueden ser cruzados o retrocruzados.

Palabras clave: mejoramiento, variedades, transformación.

ABSTRACT

Mecardonia Ruiz & Pavon (*Plantaginaceae*) is an American genus that is composed by about nine herbaceous species, some of which display a great ornamental potential. For this reason, in 2004 the Institute of Floriculture at INTA began a genetic program to develop *Mecardonia* cultivars for ornamental use. Since then, different activities have been carried out, generating useful information for the improvement process. Among the aspects addressed are the

taxonomic ones, describing two new species present in Argentina (*M. kamogawae* Greppi & Hagiwara and *M. reneae* Greppi & Sosa). The numbers of chromosomes in these species showed the existence of higher levels of ploidy in *M. reneae* (tetraploid) and in *M. kamogawae* (hexaploid) in relation to the rest of the species that are usually diploid. The DNA contents were analyzed and compatibility relationships were evaluated in the native species and varieties of Argentina. The studies indicated the existence of reproductive incompatibility except for a few cases, from which seven cultivars were developed, four of them commercialized in Argentina and three in the international market through a technological linkage agreement with the Japanese company Sakata Seed. The improvement process of these initial cultivars was based on classical methodologies, carrying out crosses and selection of genotypes for their commercialization, which are multiplied agamically. In addition, an unconventional strategy was used to advance with genetic improvement and incorporate new features. It was based on the genetic transformation of sterile cultivars, that cannot be crossed or backcrossed, with a wild type strain of *Agrobacterium rhizogenes* to obtain plants with a more compact growth habit.

Keywords: breeding, varieties, transformation.

Importancia del germoplasma nativo para el desarrollo de nuevos cultivos ornamentales

El enorme potencial ornamental que tiene la flora de Argentina aún no se ha aprovechado en toda su magnitud, ni por las grandes empresas florícolas internacionales ni por el sector productivo local que cuenta con los recursos fitogenéticos a su alcance.

Varios de los géneros ornamentales que actualmente se cultivan en el mundo son originarios de Sudamérica y varias de las especies que fueron utilizadas para su desarrollo crecen en Argentina. Sin embargo, a todos ellos se les ha realizado mejoramiento genético fuera del territorio argentino, ingresando a la horticultura ornamental comercial en forma de nuevos cultivos o nuevas variedades con gran valor agregado. De esta manera el país de origen y sus productores pierden la posibilidad de participar en el lucrativo negocio de estas creaciones fitogenéticas. La mejora genética vegetal es esencialmente una elección hecha por el hombre de las mejores plantas escogidas dentro de una población en la cual exista variabilidad (Sánchez-Monge, 1993). A partir de esta definición se pueden establecer las tres premisas más importantes para el planteamiento de cualquier programa de mejoramiento genético vegetal (Smith, 1986): 1- La existencia de variabilidad o bien la capacidad para crearla. 2- La capacidad de detectar dicha variabilidad, o la habilidad del mejorador para observar las diferencias que puedan tener valor económico. 3- La capacidad para manipular dicha variación para producir un nuevo cultivar estable. Finalmente, tan importante como el proceso de selección de un nuevo cultivar, es su transferencia al sector productivo, siendo este el principal objetivo de todo proceso de mejora.

El Instituto de Floricultura del INTA como pieza clave en el mejoramiento de plantas ornamentales a través del uso de germoplasma nativo

Como resultado de un convenio con la Agencia de Cooperación Internacional del Japón (JICA), el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) creó en el año 2004 al Instituto de Floricultura (IF), ubicado en el Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CNIA) en la localidad de Hurlingham, provincia de Buenos Aires. A partir de entonces, en el IF se han comenzado a implementar programas de mejoramiento utilizando recursos fitogenéticos nativos para potenciar su valor económico como plantas ornamentales a través de la creación de cultivares.

El INTA, a través del proyecto antes mencionado, ha dado un primer paso hacia el desarrollo en la Argentina de la industria del mejoramiento de plantas ornamentales aprovechando los recursos fitogenéticos nativos. Actualmente cuenta con cultivares propios que fueron obtenidos utilizando herramientas clásicas de mejoramiento genético como cruzamientos interespecíficos y la selección de genotipos “elite” que luego son propagados en forma agámica mediante el enraizamiento de esquejes (Soto *et al.*, 2011). Debido a que la industria de las plantas ornamentales se encuentra permanentemente en la búsqueda de novedades, estos nuevos cultivos resultan de gran utilidad para aquellos productores que buscan diversificar sus cultivos y así incrementar su participación en el mercado.

En el IF se han realizado con éxito cruzamientos interespecíficos en los géneros *Tecoma* (Kobayashi *et al.*, 2004), *Tabebuia* (Facciuto *et al.*, 2007; Facciuto *et al.*, 2008), *Passiflora* (Bugallo *et al.*, 2011), *Nierembergia* (Soto, 2007; Soto *et al.*, 2007), *Calibrachoa* (Facciuto *et al.*, 2004), *Alstroemeria* (Pakoca *et al.*, 2021), *Glandularia* (Bologna, 2018) y *Mecardonia* (Greppi, 2012).

Aportes al mejoramiento genético del género *Mecardonia* con fines ornamentales

Taxonomía

Mecardonia Ruiz & Pavon (1794) es un género americano perteneciente a la tribu *Gratiolaeae* (*Plantaginaceae*). El género está integrado por hierbas anuales o perennes con hábito reptante o decumbente, rara vez erecto, ramas y hojas glabras, pedicelos bibracteolados, flores normalmente amarillas, a veces blanquecinas o rosadas (en algunas poblaciones de *M. procumbens* var. *flagellaris*), y anteras con dos tecas separadas (D'Arcy, 1979). En el pasado, varias especies de *Mecardonia* fueron incluidas en géneros como *Bacopa*, *Herpestis*, *Pagesia* y *Gratiola* hasta que finalmente Rossow (1987) en su revisión del género lo delimita a 10 especies (Tabla 1), cinco de ellas nativas de Argentina, estableciendo la distribución del género desde la costa este de Estados Unidos hasta la Patagonia Argentina y Chile central. Este número de especies fue modificado por Souza (1997) y Souza & Giulietti (2009) quienes

sugieren que el género está conformado sólo por 7 especies (Tabla 1). Esta diferencia de tres especies respecto al número que había sido reconocido por Rossow (1987), se debe a que de acuerdo con la clasificación de Souza (1997), *M. flagellaris*, *M. tenella* y *M. caespitosa* representan variedades botánicas de *M. procumbens*. Recientemente, dos nuevas especies endémicas de la provincia de Corrientes, Argentina, fueron descritas por investigadores del Instituto de Floricultura del INTA, *M. kamogawae* (Greppi y Hagiwara, 2011) y *M. reneeae* (Greppi *et al.*, 2017). De esta manera, el número total de especies de *Mecardonia* reconocidas en la actualidad asciende a 9, de las cuales 5 crecen en Argentina (Tabla 1).

Tabla 1. Especies y variedades de *Mecardonia* reconocidas actualmente.

Taxón	Nativa de Argentina
<i>M. acuminata</i> (Walt.) Small	No
<i>M. berroi</i> Marchesi	No
<i>M. exilis</i> (Brand.) Pennell	No
<i>M. grandiflora</i> (Benth.) Pennell	Sí
<i>M. kamogawae</i> Greppi & Hagiwara	Sí*
<i>M. procumbens</i> (Mill.) Small var. <i>procumbens</i>	Sí
<i>M. procumbens</i> (Mill.) Small var. <i>caespitosa</i> (Cham.) V.C. Souza	No
<i>M. procumbens</i> (Mill.) Small var. <i>flagellaris</i> (Cham. & Schltl.) V.C. Souza	Sí
<i>M. procumbens</i> (Mill.) Small var. <i>herniarioides</i> (Cham.) V.C. Souza	Sí
<i>M. procumbens</i> (Mill.) Small var. <i>tenella</i> (Cham. & Schltl.) V.C. Souza	Sí
<i>M. pubescens</i> Rossow	No
<i>M. reneeae</i> Greppi & Sosa	Sí*
<i>M. serpylloides</i> (Cham. & Schltl.) Pennell	Sí

*Especie endémica de Argentina.

Estudios citológicos e implicancia taxonómica

Los estudios citológicos proveen información valiosa para llevar a cabo análisis taxonómicos y evolutivos, siendo de suma importancia también para ser usados en procesos de mejoramiento genético convencional o biotecnológico (Poggio *et al.*, 2004). Los números cromosómicos son considerados un carácter importante para delimitar géneros, especies y analizar las relaciones entre éstas (Guerra, 2008).

Debido a la reciente valoración de *Mecardonia* como cultivo ornamental, la información sobre su genoma es de vital importancia para la planificación de un adecuado programa mejoramiento para potenciar sus características ornamentales.

En *Mecardonia*, Lewis *et al.* (1962) reportan el número cromosómico $2n=44$ para la especie norteamericana *M. acuminata* y Kaul (1969) da a conocer el número cromosómico $2n=22$ para *M. procumbens* var. *procumbens*. Más recientemente, Mini *et al.* (2013) y Sosa *et al.* (2016), llevaron a cabo estudios en los cuales realizan el conteo del número cromosómico de algunas especies y variedades de *Mecardonia* que habitan en Argentina. En estos trabajos, se confirma que el número básico de cromosomas en *Mecardonia* es 11 y que *M. procumbens* var. *procumbens*, *M. procumbens* var. *flagellaris*, *M. procumbens* var. *tenella* y *M. grandiflora* son especies diploides con $2n=22$, mientras que *M. kamogawae* es hexaploide con $2n=66$. La última especie identificada, *M. reneae*, es tetraploide con $2n=44$ (Tabla 2) (Greppi *et al.*, 2017).

El contenido de ADN también provee información de gran utilidad para la taxonomía y para los estudios vinculados a los programas de mejoramiento genético (Angulo y Dematteis, 2013). La metodología de determinación del contenido de ADN mediante el uso de equipos de citometría de flujo es ampliamente utilizada con diversos objetivos de investigación básica y aplicada (Doležel y Bartos, 2005; Leitch y Bennett, 2004). Sosa *et al.* (2016) analizaron los contenidos de ADN de algunas especies de *Mecardonia* y observaron diferencias entre ellas, incluso entre las variedades de *M. procumbens*, de las cuales *M. procumbens* var. *tenella* presenta el genoma con el menor contenido de ADN (Tabla 2).

Tabla 2. Números cromosómicos, niveles de ploidía y contenidos de ADN de algunas especies de *Mecardonia* nativas de Argentina.

Taxón	2n	Nivel de ploidia	Contenido de ADN (pg)*
<i>M. procumbens</i> var. <i>procumbens</i>	22	2x	1,91
<i>M. procumbens</i> var. <i>flagellaris</i>	22	2x	2,06
<i>M. procumbens</i> var. <i>tenella</i>	22	2x	1,52
<i>M. grandiflora</i>	22	2x	2,05
<i>M. kamogawae</i>	66	6x	5,29
<i>M. reneae</i>	44	4x	3,7

*pg: Picogramos

Biología floral

El conocimiento de los mecanismos reproductivos de un cultivo, el momento de apertura de las flores o anthesis, la dehiscencia de anteras, la viabilidad del polen y la receptividad del estigma constituyen aspectos básicos para poder proyectar convenientemente un plan de mejora (Smith, 1986).

Las especies del género *Mecardonia* poseen flores zigomorfas de alrededor de 1 cm de longitud, solitarias, axilares, sub-sésiles hasta largamente pediceladas con dos bractéolas en la base del pedicelo. El cáliz cubre aproximadamente la mitad inferior de la corola o un poco más y está formado por 5 sépalos imbricados y desiguales, siendo generalmente, el dorsal de mayor tamaño y forma oblonga, mientras que los dos laterales y el interno son más pequeños y lineares. La corola es gamopétala y bilabiada con el labio inferior 3-lobado y con un mechón de pelos claviformes en la cara interna del labio posterior, rara vez también presentan pelos claviformes o no claviformes en el labio inferior. El androceo posee 4 estambres didínamos, dos largos y dos cortos. El gineceo es súpero, glabro; el estilo es recto y el estigma es bilamelado y algo curvado. El fruto es una pequeña cápsula septicida, 2-valvada, dehiscente, de entre 5 y 8 mm de largo con alrededor de 400 semillas endospermadas, muy pequeñas, de aproximadamente 0,5 mm, rugosas y de color castaño oscuro (Rossow, 1987). Si bien no existen estudios que aborden la biología floral de todas las especies de *Mecardonia*, hay bibliografía referida a dos de ellas y, teniendo en cuenta la similitud morfológica entre las flores de las distintas especies, es posible inferir que el síndrome de polinización es idéntico en todas las especies del género. Cappellari (2003), afirma que *M. tenella* es una especie de polinización entomófila, siendo uno de sus visitantes los machos de *Euglossa mandibularis* (*Hymenoptera*). Asimismo, se ha observado que todas las especies evaluadas de *Mecardonia* son muy visitadas por abejas (Figura 1).

Faye *et al.* (2002) incluyen a *M. procumbens* en su relevamiento de la flora apícola para el sureste de la provincia de Córdoba, Argentina. Las flores de *M. tenella* no producen néctar, pero son portadoras de elaióforos (Cappellari, 2003). Estas glándulas productoras de aceites se encuentran en los ápices de los tricomas que poseen todas las especies de *Mecardonia* en la base del labio posterior de la corola. Estos aceites y el polen serían las únicas recompensas florales (Cappellari, 2003). En base al estudio de la disposición de las estructuras florales durante su desarrollo, se concluyó que debido a la posición del estigma en relación al primer par de anteras (superior), sería teóricamente posible la autopolinización (Cappellari, 2003). Sin embargo, este autor descarta la posibilidad de autogamia debido a que la actividad simultánea (i.e. viabilidad del polen y receptividad del estigma) de estos órganos ocurre sólo en una minoría de las flores analizadas y únicamente durante unos pocos días antes de la antesis. Si bien estos datos sugieren que las especies de *Mecardonia* serían autoincompatibles, aún no han sido bien estudiadas y al momento de llevar a cabo cruzamientos dirigidos será necesario tomar precauciones realizando la emasculación de las flores polinizadas. Del mismo modo, al tratarse de especies de polinización entomófila, se deberá estudiar previamente la receptividad del estigma en distintos momentos del desarrollo floral y remover las corolas para evitar la visita de los polinizadores y posibles contaminaciones con polen de otras plantas de *Mecardonia* distintas a la utilizada en el cruzamiento dirigido.



Figura 1. Abeja actuando como agente polinizador sobre flores de *Mecardonia*.

Estudios de compatibilidad reproductiva entre las especies de *Mecardonia* que crecen en Argentina

Estudios de autocompatibilidad en especies y variedades argentinas de *Mecardonia* (*M. procumbens* var. *procumbens*, *M. procumbens* var. *flagellaris*, *M. procumbens* var. *tenella*, *M. grandiflora*, *M. kamogawae* y *M. reneeae*) confirman que las mismas son autoincompatibles (Greppi, 2017; Greppi *et al.*, 2017). Gracias a esta característica, no es necesario emasculiar las flores para llevar a cabo los cruzamientos dirigidos. Sin embargo, a los fines de evitar la atracción de insectos polinizadores, antes de realizar los cruzamientos es necesario remover la corola de la flor. Al realizar esta tarea, indirectamente se produce la emasculación de las flores debido a que el androceo se encuentra soldado a la corola. Asimismo, las flores a polinizar deben ser seleccionadas en su estadio de pimpollo, previo a la antesis floral y estando maduro y receptivo el estigma. De esta manera, es posible tener certeza de que las flores no fueron polinizadas previamente por insectos.

Las cantidades de frutos y semillas y la obtención de híbridos fértiles al llevar a cabo cruzamientos recíprocos entre las variedades *M. procumbens* var. *procumbens* y *M. procumbens* var. *flagellaris*, demuestran que no existen barreras a la hibridación entre ellas en ningún sentido, confirmando su afinidad genética (Tabla 3) (Greppi, 2017). Este resultado concuerda con el estudio morfológico realizado por Souza (1997), justificando el tratamiento taxonómico de estas dos entidades a nivel varietal y no a nivel específico como lo sugiere Rossow (1987).

Tabla 3: Tabla de cruzamientos entre las variedades de *Mecardonia*.

Combinación	Obtención de híbridos	Híbrido fértil	Valor ornamental
MPP x MPF	Sí	Sí	Sí (b)
MPP x MPT	Sí (a)	No	No
MPP x MG	No	-	-
MPP x MK	No	-	-
MPP x MR	No	-	-
MPF x MPP	Sí	Sí	Sí (b)
MPF x MPT	Sí (a)	No	No
MPF x MG	No	-	-
MPF x MK	No	-	-
MPF x MR	No	-	-
MPT x MPP	No	-	-
MPT x MPF	No	-	-
MPT x MG	No	-	-
MPT x MK	No	-	-
MPT x MR	No	-	-
MG x MPP	No	-	-
MG x MPF	No	-	-
MG x MPT	No	-	-
MG x MK	No	-	-
MG x MR	No	-	-
MK x MPP	No	-	-
MK x MPF	No	-	-
MK x MPT	No	-	-
MK x MG	No	-	-
MK x MR	No	-	-
MR x MPP	No	-	-
MR x MPF	No	-	-
MR x MPT	Sí (a)	No	Sí
MR x MG	No	-	-
MR x MK	No	-	-

(a) escasas semillas por fruto y germinación pobre. (b) Si bien el valor ornamental es bajo, utilizando genotipos de *M. procumbens* var. *flagellaris* con color de flor diferente al amarillo (existen poblaciones con flores rosadas o blanquecinas), el híbrido hereda dicha característica. Siglas representativas de los taxa utilizados en los cruzamientos: MPP = *M. procumbens* var. *procumbens*. MPF = *M. procumbens* var. *flagellaris*. MPT = *M. procumbens* var. *tenella*. MG = *M. grandiflora*. MK = *M. kamogawae*. MR = *M. reneeae*.

Cuando *M. procumbens* var. *tenella* fue utilizada como parental femenino, esta variedad resultó incompatible con todas las demás especies y variedades nativas. No obstante, esta incompatibilidad fue unilateral, debido a que fue posible obtener híbridos cuando esta variedad

fue utilizada como parental masculino en cruzamientos con *M. procumbens* var. *procumbens*, *M. procumbens* var. *flagellaris* y *M. reneae* (Tabla 3). Sin embargo, existe cierto grado de incompatibilidad reproductiva en estas combinaciones debido a que las probabilidades de éxito en los cruzamientos y la cantidad de semillas por fruto resultaron notablemente inferiores respecto de los cruzamientos intraespecíficos y los híbridos obtenidos fueron estériles en todos los casos. Esto sugiere que *M. procumbens* var. *tenella* se encuentra genéticamente aislada del resto de las especies de *Mecardonia* evaluadas e incluso de las otras dos variedades de su misma especie. Un análisis de marcadores ISSR en individuos de *M. procumbens* var. *tenella* y *M. procumbens* var. *flagellaris* mostró que los individuos se separaron en clados bien diferenciados (Pérez de la Torre *et al.*, 2010), al igual que los resultados del estudio morfológico de Rossow (1987) en el cual *M. procumbens* var. *tenella* es considerada como una especie diferente, bajo el binomio *M. tenella* (Cham. & Schldl.) Pennell. Los resultados obtenidos en los cruzamientos dirigidos (Tabla 3) refuerzan el tratamiento de *M. tenella* como una especie válida, separada del complejo varietal de *M. procumbens*.

Las especies *M. grandiflora* y *M. kamogawae*, fueron totalmente incompatibles con el resto de las especies evaluadas, lo cual dificultó su utilización en los programas de mejoramiento genético basados en cruzamientos interespecíficos (Tabla 3).

Mecardonia reneae es una especie tetraploide y se encuentra suficientemente aislada genéticamente del resto de las especies evaluadas, presentando cierto grado de compatibilidad reproductiva sólo con *M. procumbens* var. *tenella* (Tabla 3) (Greppi *et al.*, 2017).

Los híbridos producidos por las combinaciones: *M. procumbens* var. *procumbens* x *M. procumbens* var. *flagellaris*, *M. procumbens* var. *flagellaris* x *M. procumbens* var. *procumbens* y *M. procumbens* var. *flagellaris* x *M. procumbens* var. *tenella* y *M. procumbens* var. *procumbens* x *M. procumbens* var. *tenella* carecen de valor ornamental debido a sus largos tallos rastreros, radicantes y con entrenudos largos. Sin embargo, la variabilidad de color de flor y la fertilidad de los híbridos producidos entre las variedades *M. procumbens* var. *procumbens* y *M. procumbens* var. *flagellaris*, cuando de esta última especie se utilizan genotipos de las poblaciones con color de flor rosado o blanquecino, podría ser utilizada para la creación de nuevos cultivares con nuevos colores de flor, siendo ésta una característica necesaria para el crecimiento comercial de este cultivo.

Las evaluaciones llevadas a cabo sobre la descendencia sugieren que los híbridos con mayor potencial ornamental corresponden a la combinación *M. reneae* x *M. procumbens* var. *tenella* debido a su porte compacto, llamativa y abundante floración y a su período de floración temprano y prolongado, muy apropiado acorde al ciclo de producción del cultivo. Asimismo, la esterilidad de estos híbridos resulta muy apropiada a los fines comerciales (Figuras 2-3).

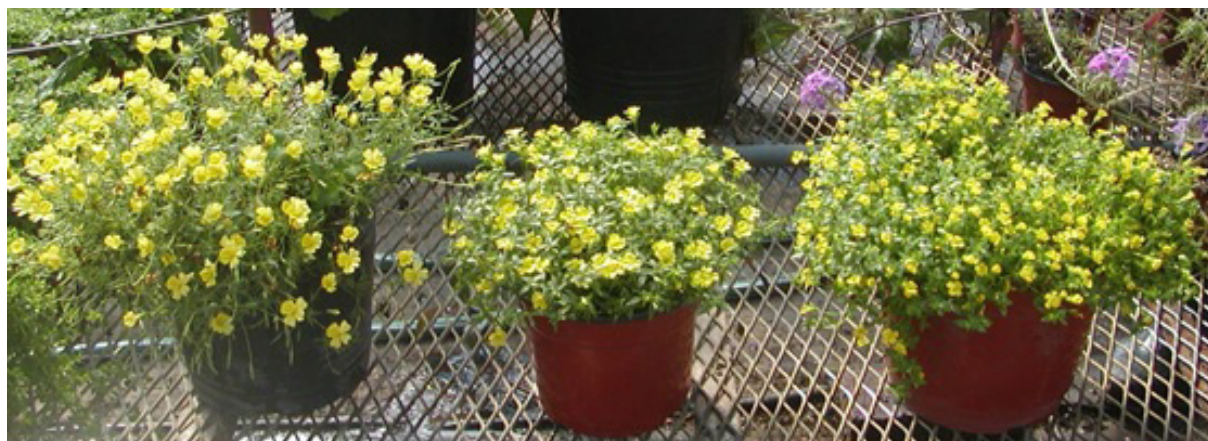


Figura 2. *Mecardonia reneae* (izquierda), *M. procumbens* var. *tenella* (derecha) y el híbrido obtenido de la combinación de dichas especies (centro).

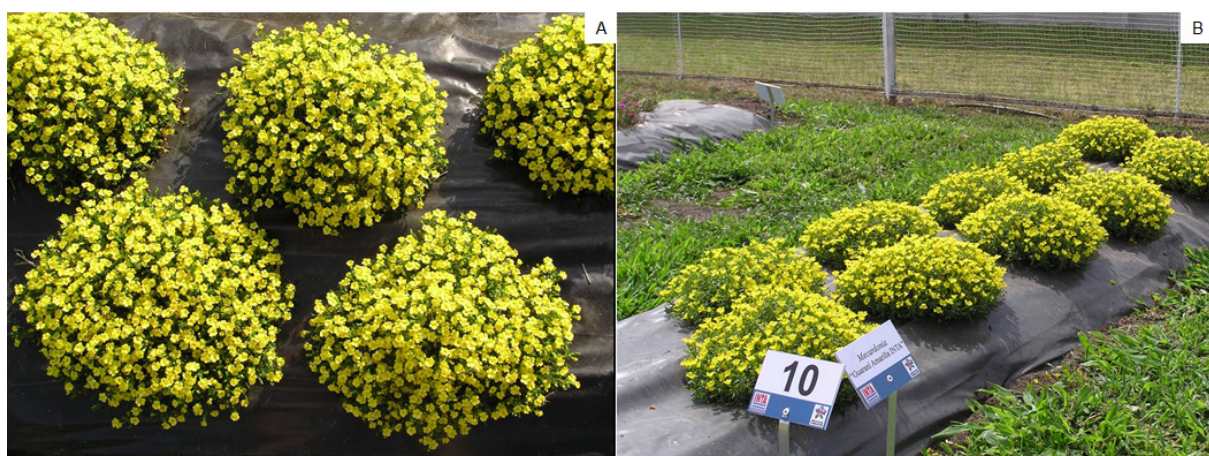


Figura 3. Híbrido obtenido de la combinación *Mecardonia reneae* x *M. procumbens* var. *tenella* en parcela de evaluación.

La esterilidad de todos los híbridos obtenidos en los cruzamientos realizados pone de manifiesto que, utilizando la metodología clásica de mejoramiento mediante cruzamientos sexuales, no sería posible avanzar más allá de una primera generación (F1). En caso de existir interés en la realización de retrocruzas o cruzamientos entre plantas F1 para la obtención de una segunda generación (F2), será necesario primero revertir la esterilidad de los híbridos seleccionados como parentales. Esta tarea puede lograrse mediante metodologías que duplican el número cromosómico mediante el uso de sustancias como colchicina, orizalina o amiprofos-metil (Ramulu *et al.*, 1991).

Los estudios de las características genéticas de las especies de *Mecardonia* utilizadas y sus relaciones de compatibilidad reproductiva, han permitido diagramar correctamente un programa de mejoramiento basado en cruzamientos interespecíficos.

Obtención y comercialización de cultivares ornamentales de *Mecardonia*

Los híbridos del género *Mecardonia* obtenidos por cruzamientos dirigidos han tenido impacto a nivel mundial por tratarse de una novedad como cultivo ornamental. A través de convenios de vinculación tecnológica con la empresa japonesa Sakata, tres de las primeras siete variedades de *Mecardonia* obtenidas; “Yellow Crossite”, “Magic Carpet Yellow” y “Yellow Jewel” se cultivan y comercializan en EE.UU., Canadá, Unión Europea y Japón (Figura 4 A, B, C). Otras cuatro variedades: “Poty Amarilla INTA”, “Guaraní Amarilla INTA”, “Tatarendy Melocotón INTA” y “Kambá Clara INTA” fueron registradas en el Registro Nacional de Cultivares del INASE por el INTA para iniciar su transferencia al sector florícola argentino y actualmente, su cultivo empieza a captar el interés de los productores (Figura 5 A, B, C, D). Actualmente, estos cultivares y otros pocos de empresas extranjeras del sector hortícola-ornamental como Suntory y Proven Winners, presentan variabilidad principalmente en el porte y en el tamaño de las flores, las cuales son amarillas. Por lo tanto, la incorporación de nuevas características, como la gama de colores de flor, es de fundamental importancia para el crecimiento de *Mecardonia* como cultivo ornamental.



Figura 4. A) Imagen de catálogo del cultivar ‘Yellow Crossite’ INTA-Sakata comercializado en Japón. B) Imagen de catálogo del cultivar “Yellow Jewel” INTA-Sakata comercializado en Japón.



Figura 5. A) Cultivar “Poty Amarilla INTA”. B) Cultivar “Guaraní Amarilla INTA”. C) Cultivar “Tatarendy Melocotón INTA”. D) Cultivar “Kambá Clara INTA”.

Mejoramiento de *Mecardonia* a través del uso de una herramienta no convencional

Transformación con *Agrobacterium rhizogenes* salvaje

En la industria de plantas ornamentales el aspecto compacto de las plantas es una característica de calidad relevante. Plantas más compactas y homogéneas son preferidas por los consumidores, al mismo tiempo que simplifican el transporte y minimizan los daños. Los productores suelen podar las plantas de acuerdo al cultivo y en muchos países se utilizan reguladores del crecimiento vegetal como, por ejemplo, inhibidores de las respuestas a las giberelinas (Milošević *et al.*, 2015). Sin embargo, la poda es laboriosa, insume mucha mano de obra costosa y el uso de químicos puede producir efectos negativos a las plantas, a las personas que aplican estos productos y al medioambiente (Lütken *et al.*, 2012; Milošević *et al.*, 2015). Muchas de las especies de *Mecardonia* que crecen en Argentina tienen entrenudos muy largos que, a pesar de haberse reducido a través de cruzamientos interespecíficos en algunos de los híbridos generados, en otras ocasiones esto no ha sido posible. Una de las barreras más importantes, como se mencionó previamente, es

la incompatibilidad reproductiva, la cual dificulta o imposibilita totalmente la obtención de híbridos (De Nettancourt, 2005). También han sido frecuentes los problemas de esterilidad en los híbridos obtenidos.

Una estrategia alternativa consiste en producir plantas más compactas y estables a través de la introducción de genes *rol* presentes en cepas salvajes de *Agrobacterium rhizogenes*, los cuales son incorporados e integrados al genoma vegetal a través de un proceso natural de transformación genética. Este proceso involucra la infección de órganos de la planta, como por ejemplo tallos u hojas con dichas bacterias y la transferencia e integración estable de un T-DNA (*transfer DNA*) en un cromosoma al azar. Para ello, las cepas de *A. rhizogenes* cuentan con un plásmido Ri (Root-inducing) que presenta los genes que permiten la transferencia del T-DNA al núcleo de células vegetales. En dicho T-DNA se encuentran presentes los genes *rolA-D*, entre otros, capaces de mostrar expresión en la planta. Luego de la transformación, en los sitios de infección suelen desarrollarse raíces pilosas (*hairy roots*) que son capaces de crecer en medios de cultivo en ausencia de hormonas vegetales. Las cepas de *A. rhizogenes* patógenas están asociadas a la enfermedad de raíz pilosa (*hairy root syndrome* o *hairy root disease*) (Cardarelli *et al.*, 1987; Christensen y Müller, 2009; Milošević *et al.*, 2015; Slightom *et al.*, 1986). Bajo condiciones controladas, es posible regenerar vástagos a partir de las raíces pilosas, muchas veces utilizando hormonas vegetales incorporadas exógenamente a los medios de cultivo. Tanto las raíces pilosas como las plantas regeneradas a partir de dichas raíces presentan normalmente alteraciones en el crecimiento celular y el desarrollo, asociados a la expresión en la planta de los genes bacterianos (Alpizar *et al.*, 2008; Casanova *et al.*, 2005; Christensen y Müller, 2009; Milošević *et al.*, 2015; Prinsen *et al.*, 1994; Schmülling *et al.*, 1993). Las plantas obtenidas suelen ser más compactas, debido a la reducción de la longitud de los entrenudos, entre otras modificaciones morfológicas y fisiológicas como la reducción de la dominancia apical y tamaño de las hojas, mayor formación de raíces adventicias y secundarias, cambios en la morfología de las hojas y flores, tiempo a floración, entre otras características. Las modificaciones generadas dependen fuertemente de la interacción entre los genes bacterianos que son transferidos y la genética de la planta que es transformada (Christensen *et al.*, 2008; Giovannini *et al.*, 1997; Godo *et al.*, 1997; Holefors *et al.*, 1998; Lütken *et al.*, 2012; Milošević *et al.*, 2015; Mishiba *et al.*, 2006; Schmülling *et al.*, 1988; Tepfer, 1984, 1990; Welander *et al.*, 2004).

El uso de cepas salvajes de *A. rhizogenes* presenta la ventaja de que las putativas líneas transformadas pueden ser seleccionadas por el fenotipo característico de las raíces pilosas que se producen en los sitios de infección, constituyendo una selección libre de antibióticos o herbicidas, como es característico en las transformaciones clásicas que involucran el uso de ingeniería genética (Christey, 2001; Lütken *et al.*, 2012; Roychowdhury *et al.*, 2013). De esta manera, otra de las ventajas radica en que las plantas obtenidas por este método no son consideradas organismos vegetales genéticamente modificados (OVGM, del inglés: *GMOs*) en EE.UU. (USDA APHIS, 7 CFR part 340), Japón (Mishiba *et al.*, 2006)

y Argentina (SAGYP N°701/11), porque son producidas por un proceso de transformación que no involucra técnicas de ADN recombinante in vitro, debido a que se utilizan cepas salvajes. De hecho, las cepas silvestres pueden transformar plantas en el ambiente, como ha sido observado en cultivares de batata, en donde la transformación ha ocurrido durante el proceso de domesticación de dicho cultivo (Kyndt *et al.*, 2015). En la Unión Europea, según la legislación actual, las plantas generadas por este método no son consideradas OVGM (European Union, 2001; Lütken *et al.*, 2012a; Lütken *et al.*, 2012b).

En el IF, se evaluó la capacidad de una cepa salvaje de *A. rhizogenes* (ATCC15834) de producir crecimiento más compacto en *Mecardonia*, a través de la transformación del cultivar 'Guaraní Amarilla INTA'. En dicho trabajo, se estudió la capacidad de transformación, regeneración y las alteraciones morfológicas producidas en las plantas (Pérez de la Torre *et al.*, 2018). Raíces adventicias fueron generadas desde los sitios de infección producidos en los entrenudos de plantas cultivadas in vitro. Veinte líneas independientes de raíces pilosas fueron obtenidas, las cuales regeneraron espontáneamente vástagos en medio de cultivo ausente de hormonas vegetales. Fueron seleccionadas cuatro líneas en base a su grado de compacidad diferencial, para estudiar in vitro y en invernadero sus aptitudes ornamentales en comparación con plantas control (Pérez de la Torre *et al.*, 2018). Bajo condiciones de invernadero, las líneas modificadas presentaron reducción en la longitud de entrenudos y tallos, en la biomasa aérea y radicular, en la cobertura aérea, en el área foliar, en el tamaño de las flores y en el número de flores por planta. A su vez, se incrementaron el número de nudos, las ramificaciones laterales, la densidad de flores por unidad de superficie y el tamaño de las flores en relación a la superficie cubierta, sin modificar en general el tiempo a floración (Figura 6). A través de esta estrategia de mejoramiento, un crecimiento más compacto y estéticamente más ordenado pudo ser obtenido, incrementándose el valor ornamental. Actualmente, se están preparando los registros para su comercialización en Argentina de dos cultivares de *Mecardonia* modificados a través de este método.

CONCLUSIONES

Los estudios taxonómicos, citológicos y las relaciones de compatibilidad reproductiva entre las especies y variedades de *Mecardonia* nativas de Argentina, permitieron avanzar en los programas de mejoramiento del género, logrando una serie de cultivares que se comercializan en Argentina y en el exterior. Debido a que todos los híbridos interespecíficos son estériles, la transformación genética con *A. rhizogenes* se presenta como una herramienta de gran potencial para obtener cultivares más compactos, resultando esta característica sumamente necesaria principalmente para aquellos híbridos que presenten colores de flor diferentes al amarillo pero que debido a su porte poco compacto poseen escaso valor ornamental. Por este motivo, la transformación genética permitiría, indirectamente, ampliar la gama de colores de flor en el cultivo.

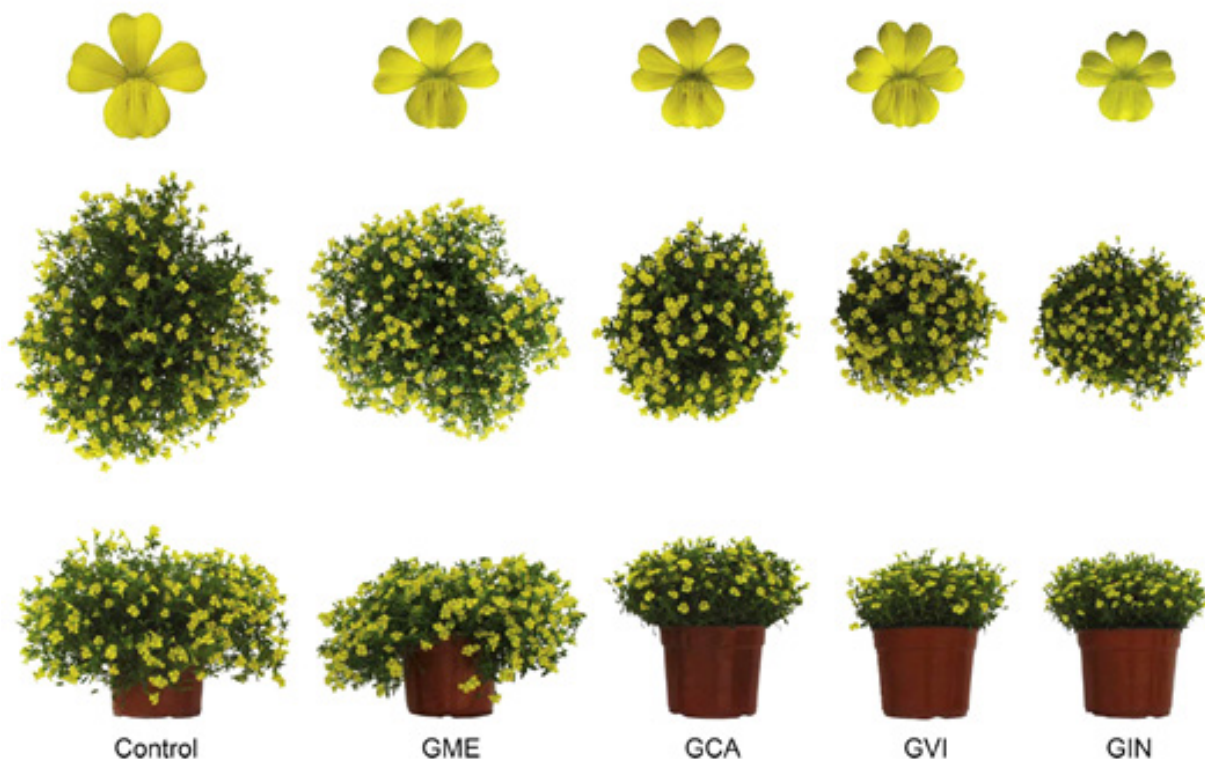


Figura 6. Vista aérea y lateral de plantas de 4 meses de edad en macetas de 14 cm de diámetro. Imágenes representativas de las flores y de plantas del cultivar 'Guaraní Amarilla INTA' (control) y de cuatro líneas modificadas (GME, GCA, GVI y GIN). Figura adaptada de Pérez de la Torre *et al.* (2018).

REFERENCIAS

ALPIZAR, E. ; DECHAMP, E. ; LAPEYRE-MONTES, F. ; GUILHAUMON, C. ; BERTRAND, B. ; JOURDAN, C.; LASHERMES, P.; ETIENNE, H. 2008. *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of coffee (*Coffea arabica*): conditions for long-term proliferation, and morphological and molecular characterization. *Ann. Bot.* 101, 929-940.

ANGULO, M.B.; DEMATTEIS, M. 2013. Nuclear DNA content in some species of *Lessingianthus* (*Vernonieae*, *Asteraceae*) by flow cytometry. *Journal of Plant Research* 126, 461-468.

BOLOGNA, P. 2018. Nuevos cultivares de *Glandularia* obtenidos en Argentina. *RIA. Revista de Investigaciones Agropecuarias.* 44 (2): 136-139.

BUGALLO, V.; PANNUNZIO, M. J.; CARDONE, S.; FACCIUTO, G. 2011. Breeding Advances in *Passiflora* Native to Argentina. *Floriculture and Ornamental Biotechnology*, Global Science Books, UK. 5 (1): 23-34. ISSN: 1749-0294.

- CAPPELLARI, S.C. 2003. Blüten von *Mecardonia tenella* (*Scrophulariaceae*) als alternative Duftstoff-Trachtquelle für Männchen von *Euglossa mandibularis* (Apidae: Euglossini). <http://www.pro-araucaria-online.com/assets/applets/Cappellari-2003.pdf>, verificado: 18/03/2021.
- CARDARELLI, M.; MARIOTTI, D.; POMTPONI, M.; SPANÒ, L.; CAPONE, I.; COSTANTINO, P. 1987. *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA genes capable of inducing hairy root phenotype. *Mol. Gen. Genet.* 209, 475-480.
- CASANOVA, E.; TRILLASA, M.I.; MOYSSETA, L.; VAINSTEIN, A. 2005. Influence of *rol* genes in floriculture. *Biotechnol. Adv.* 23, 3-39.
- CHRISTENSEN, B.; MÜLLER, R. 2009. The use of *Agrobacterium rhizogenes* and its *rol*-genes for quality improvement in ornamentals. *Eur. J. Hort. Sci.* 74 (6), 275-287.
- CHRISTENSEN, B.; SRISKANDARAJAH, S.; SEREK, M.; MÜLLER, R. 2008. Transformation of *Kalanchoe blossfeldiana* with *rol*-genes is useful in molecular breeding towards compact growth. *Plant Cell. Rep.* 27, 1485-1495.
- CHRISTEY, M.C. 2001. Use of Ri-mediated transformation for production of transgenic plants. *In Vitro. Cell. Dev. Biol. Plant.* 37, 687-700.
- D' ARCY, WG. 1979. *Scrophulariaceae* in Flora of Panama. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 66 (2), 173-272.
- DOLEŽEL, J.; BARTOS, J. 2005. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Annals of Botany* 95, 99-110.
- FACCIUTO, G.; COVIELLA, A.; BOLOGNA, P.; PANNUNZIO, S.; SOTO, S. 2007. Hybridization between pink and yellow *Tabebuia* species native to Argentina (*Bignoniaceae*). *Acta Horticulturae* 813, 127-132.
- FACCIUTO, G.; HAGIWARA, J.C.; SOTO, M.S.; MATA, D.; BUALO, R.; MORISIGUE, D.; ESCANDON, A.; KAMOGAWA, T.; BULLRICH, L. 2004. Evaluación de plantas nativas herbáceas para uso en cantero. II Congreso Argentino de Floricultura y Plantas Ornamentales. Buenos Aires. Libro de resúmenes: pp 457-461.
- FACCIUTO, G.; SOTO, S.; MALDONADO, S. 2008. Domestication and breeding of ornamental plant native to Argentina. The cases of *Tabebuia* and *Nierembergia* genera. *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology. Advances and Topical Issues.* Vol. 5, 164-170.
- FAYE, P.F.; PLANCHUELO, A. M. y MOLINELLI, M. L. 2002. Relevamiento de la flora apícola e identificación de cargas de polen en el sureste de la provincia de Córdoba, Argentina. *Agriscientia* Vol. XIX, 19-30.

- GIOVANNINI, A.; PECCHIONI, N.; RABAGLIO, M.; ALLAVENA, A. 1997. Characterization of ornamental *Datura* plants transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant 33, 101-106.
- GODO, T.; TSUJII, O.; ISHIKAWA, K.; MII, M. 1997. Fertile transgenic plants of *Nierembergia scoparia* Sendtner obtained by a mikimopine type strain of *Agrobacterium rhizogenes*. Sci. Hortic. 68, 101-111.
- GREPPI, J., SOSA, M., de las, M., DEMATTEIS, M. 2017. A new polyploid species of *Mecardonia* (Gratioleae, *Plantaginaceae*) from South America. Phytotaxa 303 (3), 264-270.
- GREPPI, J.A. 2012. Manual de cultivo de *Mecardonia*. Variedades comerciales: 'Poty Amarilla INTA' y 'Guaraní Amarilla INTA'. Instituto de Floricultura, 9 pp.
- GREPPI, J.A.; HAGIWARA, J.C. 2011. Una nueva especie de *Mecardonia* (*Plantaginaceae*). Darwiniana 49 (1).
- GUERRA, M. 2008. Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implications. Cytogenetic Genome Research 120, 339–350.
- HOLEFORS, A.; XUE, Z.T.; WELANDER, M. 1998. Transformation of the apple rootstock M26 with the *rolA* gene and its influence on growth. Plant Sci. 136, 69-78.
- KAUL, M.L.H. 1969. Cytogenetical studies on ecological races of *Mecardonia dianthera* (SW) Pennell I. Cytology, floral-biology and pollination mechanism. Cytologia 34, 169-177.
- KOBAYASHI, N.; HAGIWARA, J. C.; MIYAJIMA I.; FACCIUTO, G.; SOTO, S.; MATA, D.; ESCANDON, A. 2004. A New Pot Plant Variety Bred by Interspecific Crossing between *Tecoma stans* (L.) H. B. K. and *T. garrocha* Hieron. J. Japan Soc. Hort. Sci. 73 (1), 69-71.
- KYNDT, T.; QUISPE, D.; ZHAI, H.; JARRET, R.; GHISLAIN, M.; LIU, Q.; GHEYSEN, G. 2015. The genome of cultivated sweet potato contains *Agrobacterium* T-DNAs with expressed genes: an example of a naturally transgenic food crop. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 112 (18), 5844-5849.
- LEITCH, I.J., BENNETT, M.D. 2004. Genome downsizing in polyploid plants. Biological Journal of Linn. Soc. 82, 651-663.
- LÜTKEN, H.; CLARKE, J.L.; MÜLLER, R. 2012a. Genetic engineering and sustainable production of ornamentals: current status and future directions. Plant Cell Rep. 31 (7), 1141-1157.
- LÜTKEN, H., WALLSTRÖM, S.V., JENSEN, E.B. et al. 2012b Inheritance of *rol*-genes from *Agrobacterium rhizogenes* through two generations in *Kalanchoë*. *Euphytica* 188, 397–407. <https://doi.org/10.1007/s10681-012-0701-5>, verificado: 18/03/2021.

- MILOŠEVIĆ, S.; CINGEL, A.; SUBOTIĆ, A. 2015. *Agrobacterium*-mediated transformation of ornamental species: a review. *Genetika* 47 (3), 1149-1164.
- MISHIBA, K.; NISHIHARA, M.; ABE, Y.; NAKATSUKA, T.; KAWAMURA, H.; KODAMA, K.; TAKESAWA, T.; ABE, J.; YAMAMURA, S. 2006. Production of dwarf potted gentian using wild-type *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Biotechnol.* 23, 33-38.
- De NETTANCOURT, D. 2005. Incompatibility and Incongruity. En: *Wild and Cultivated Plants*. Berlin. Springer.
- PAKOCA, C.; BUGALLO, V.; FACCIUTO, G. 2021. Mejoramiento genético de *Alstroemeria* en Argentina: Obtención de híbridos a través de rescate de embriones. *Revista FAVE. Ciencias Agrarias* 20 (1), 133-145.
- PÉREZ DE LATORRE, M.C.; FERNANDEZ, P.; GREPPI, J.A.; COVIELLA, M.A.; FERNÁNDEZ, M.N.; ASTIGUETA, F.; MATA, D.A.; TRUPKIN, S.A. 2018. Transformation of *Mecardonia* (*Plantaginaceae*) with wild-type *Agrobacterium rhizogenes* efficiently improves compact growth, branching and flower related ornamental traits. *Sci. Hortic.* 234, 300-311.
- PÉREZ DE LA TORRE, M.C.; ZIRILLI, P.; ULRICH, N.; SETTEN, L.; ESCANDÓN, A. 2010. Caracterización molecular en el género *Mecardonia* Ruiz & Pav. (*Plantaginaceae*) utilizando marcadores ISSR. *Rev. La Fac. Agron. La Plata* 109, 23–30.
- PRINSEN, E.; CHRQUI, D. ; VILAINE, F.; TEPFER, M. ; VAN ONCKELEN, H. 1994. Endogenous phytohormones in tobacco plants transformed with *Agrobacterium rhizogenes* pRi TLDNA genes. *J. Plant Physiol.* 144, 80-85.
- RAMULU, K.S.; VERHOEVEN, H.A. & DIJKHUIS, P. 1991. Mitotic blocking, micronucleation, and chromosome doubling by oryzalin, amiprofos-methyl, and colchicine in potato. *Protoplasma* 160, 65-73.
- ROSSOW, R.A. 1987. Revisión del género *Mecardonia* (*Scrophulariaceae*). *Candollea* 42 (2), 431-474.
- ROYCHOWDHURY, D.; MAJUMDER, A.; JHA, S.; *et al.* 2013. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation in medicinal plants: prospects and challenges. En: Chandra, S. (Ed.), *Biotechnology for Medicinal Plants: Micropropagation and Improvement*. Springer- Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 29-68.
- SÁNCHEZ-MONGE, E. 1993. Introduction, pp 3-5. En: *Plant Breeding. Principles and prospects*. M.D. Hayward, N.O. Bosemark, I. Romagosa (Eds.), 550 pp. Chapman & Hall. London.

- SCHMÜLLING, T.; FLADUNG, M.; GROSSMANN, K.; SCHEL, J. 1993. Hormonal content and sensitivity of transgenic tobacco and potato plants expressing single *rol* genes of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA. *Plant J.* 3, 371-382.
- SCHMÜLLING, T.; SCHELL, J.; SPENA, A. 1988. Single genes from *Agrobacterium rhizogenes* influence plant development. *EMBO J.* 7 (9), 2621-2629.
- SLIGHTOM, J.L.; DURAND-TARDIF, M.; JOUANIN, L.; TEPFER, D. 1986. Nucleotide sequence analysis of TL-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* agropine type plasmid. *J. Biol. Chem.* 261, 108-121.
- SOSA, M.M.; ANGULO, M.B.; GREPPI, J.A.; BUGALLO, V. 2016. Chromosome numbers and ADN content in some species of *Mecardonia* (*Gratiolae*, *Plantaginaceae*). *Cytogenetics* 10 (4), 769-780.
- SOTO, M.S. 2007. Estudios de las relaciones interespecíficas en el género *Nierembergia*, como herramientas del mejoramiento. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 205 pp.
- SOTO, M.S.; BULLRICH, L.; PANNUNZIO, M.; BOLOGNA, P.; FACCIUTO, G. 2007. Interspecific hybridization in *Nierembergia*: a source of variation. *Acta Horticulturae* 813, 407-412.
- SOTO, M.S.; GREPPI, J.A.; FACCIUTO, G. 2011. Exploration and Collection of Ornamental Germplasm Native to Argentina. *Floriculture and Ornamental Biotechnology* 5(1), 10-22.
- SOUZA, V.; GIULIETTI, A.M. 2009. Levantamento das espécies de *Scrophulariaceae* sensu lato nativas do Brasil. *Pesquisas Botânica* 60, 7-288.
- SOUZA, V.C. 1997. Consideraciones sobre la delimitación de *Mecardonia procumbens* (Mill.) Small (*Scrophulariaceae*). *Acta Botanica Brasilica* 11, 181-189.
- TEPFER, D. 1984. Transformation of several species of higher plants by *Agrobacterium rhizogenes*: sexual transmission of the transformed genotype and phenotype. *Cell* 37, 959-967.
- TEPFER, D. 1990. Genetic transformation using *Agrobacterium rhizogenes*. *Physiol. Plant.* 79, 140-146.
- WELANDER, M.; ZHU, L.H.; LI, X.Y. 2004. Transformation of dwarfing apple and pear rootstocks with the *rolB* gene and its influence on rooting and growth. *Acta Hort.* 663, 437-442.