



Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria  
U R U G U A Y



# Inducción de poliploides como estrategia de mejoramiento genético

**Ing. Agr. Alicia Castillo (Dra)**  
**Unidad de Biotecnología**

**Seminario Mejoramiento Genético Forestal**  
**8 de agosto de 2018**  
**Tacuarembó**



U R U G U A Y

# Contenido de la presentación

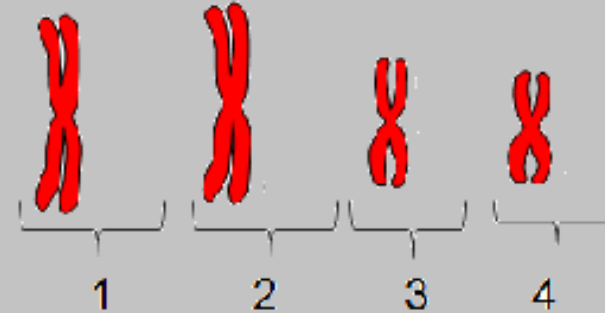
- **Definición de poliploide**
- **Ejemplos de poliploides naturales**
- **Aplicación en mejoramiento genético**
- **Poliploides artificiales**
- **Metodología**
- **Resultados**
- **Consideraciones finales**

# Definición:

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

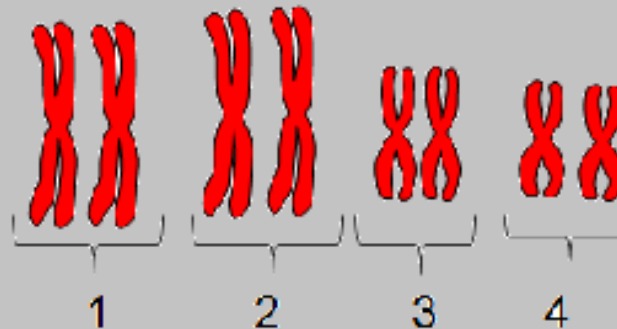
Número básico de la especie  $x=4$

Un juego de cromosomas: A  
Individuo Haploide  $n=x=4$



Dos juegos de cromosomas:

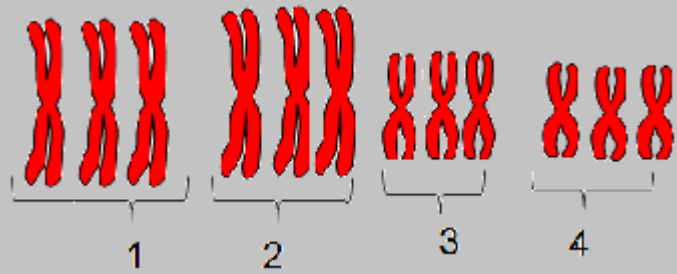
Individuo Diploide: AA  
Células somáticas:  $2x$



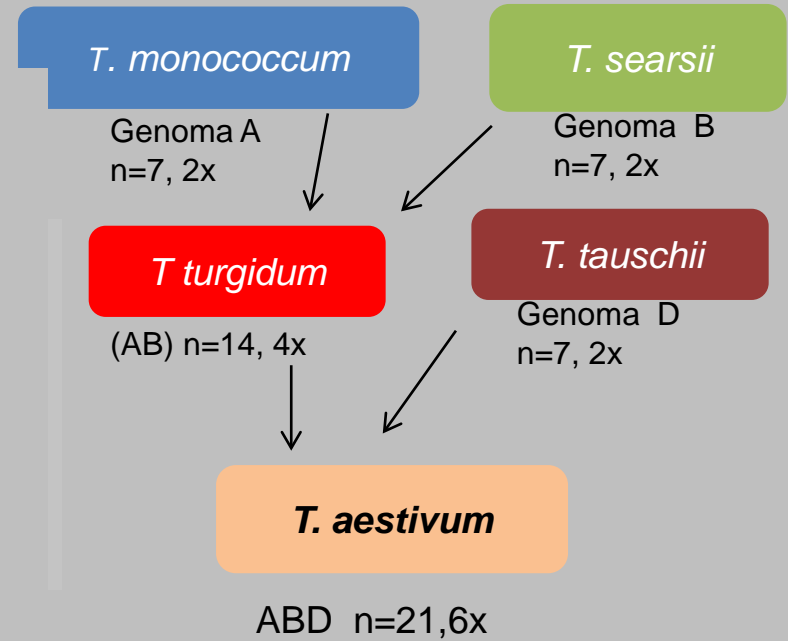
Dos juegos de cromosomas:  $2x=2n=8$

Número básico=4

3x: triploide= 12 AAA



## 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



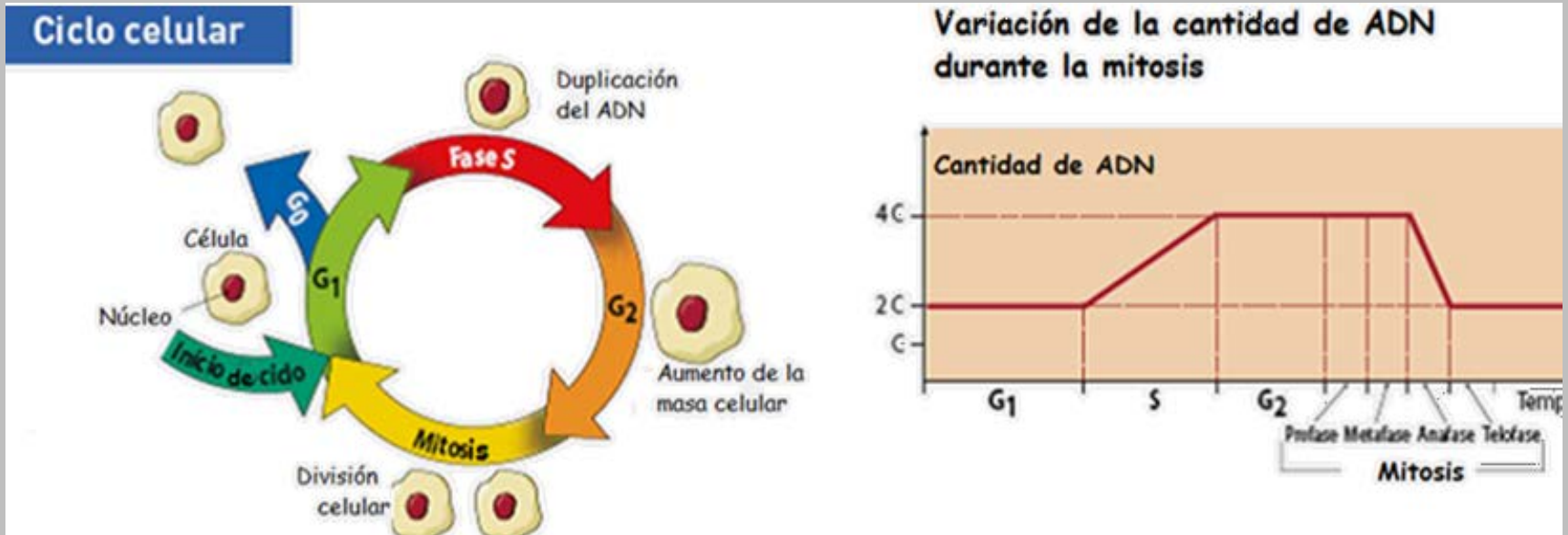
# ¿Cómo se originan los poliploides en la naturaleza?

- Fusión de gametos sin reducción cromosómica (falla en meiosis) gametas  $2n$ .

$2n \times 2n =$  tetraploide

$2n \times n =$  triploide

- Duplicación somática (falla en la mitosis).



# Consecuencias de la poliploidía:

**Aumenta el tamaño de la célula**

**Los ciclos de crecimiento son más largos**

**Aumenta el tamaño de los órganos de las plantas**

**Altera la fertilidad**

**Varía el contenido de materia seca**

Observaciones: hojas más gruesas y de color verde más oscuro, y en algunos casos las plantas presentan mayor vigor.



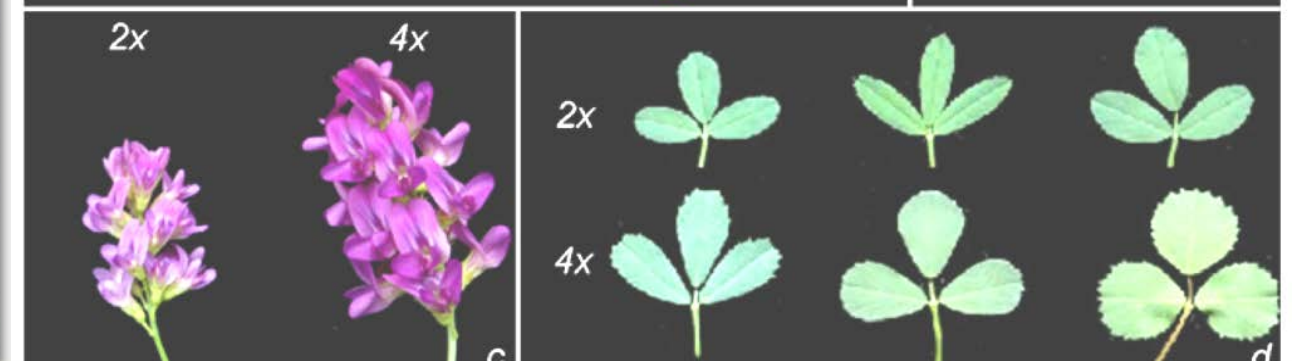
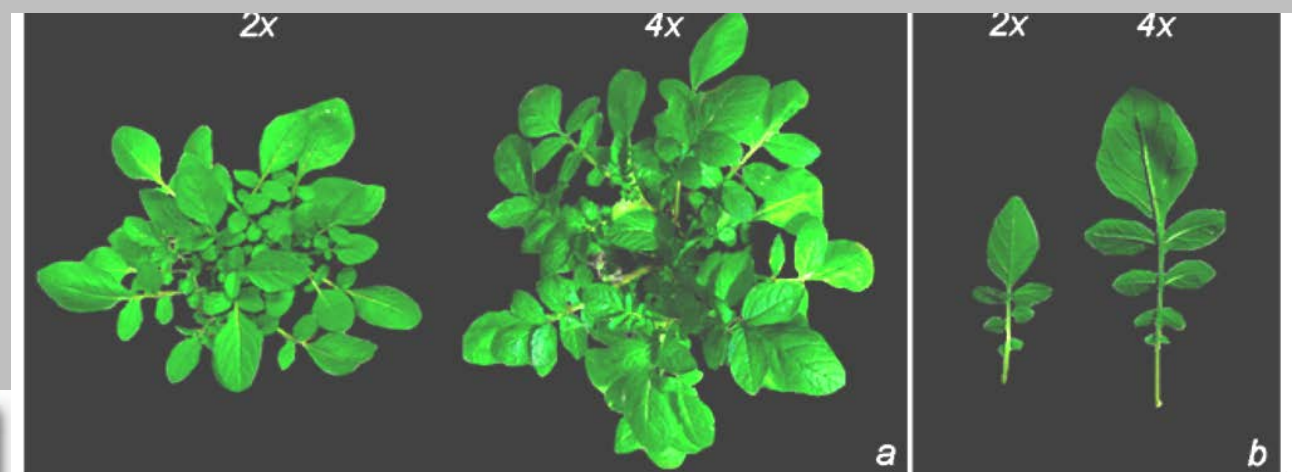
# Utilización de poliploides en mejoramiento genético

## Ventajas: Plantas de mayor tamaño

- ✓ Mayor capacidad de adaptación del poliploide.
- ✓ Células más grandes conducen a la disminución de la actividad metabólica, por lo tanto, el desarrollo más lento y conlleva a menor transpiración (resistencia a la sequía).
- ✓ Disminución de la incompatibilidad polen estilo (se pueden obtener líneas puras)

Desventajas: Irregularidad de su meiosis reducción de la fertilidad, lento crecimiento inicial en varias especies.

# No es posible conocer de antemano la utilidad práctica inmediata de un poliploide, siempre es necesario un proceso de evaluación



# Estrategia de mejoramiento

```
graph TD; A[Estrategia de mejoramiento] --> B[Convencional]; A --> C[Biotecnológica];
```

**Convencional**

**Biotecnológica**

# Inducción de poliploides en tejidos somáticos

Aplicación de agentes inhibidores de la mitosis

Colchicina

Trifluralin

Orizalin

N<sub>2</sub>O

Cultivo de Tejidos

Fusión de protoplastos  
Rescate de embriones

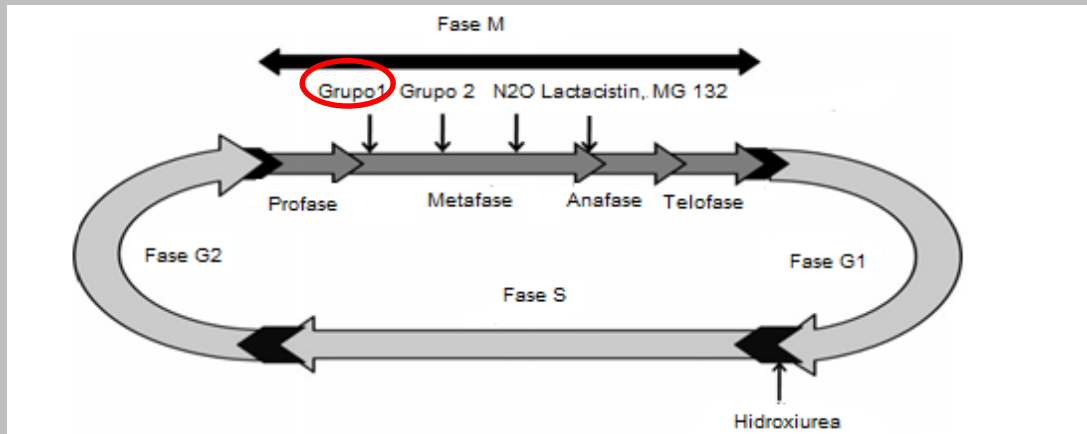
Semilla

Meristemas vegetativos (in vivo)

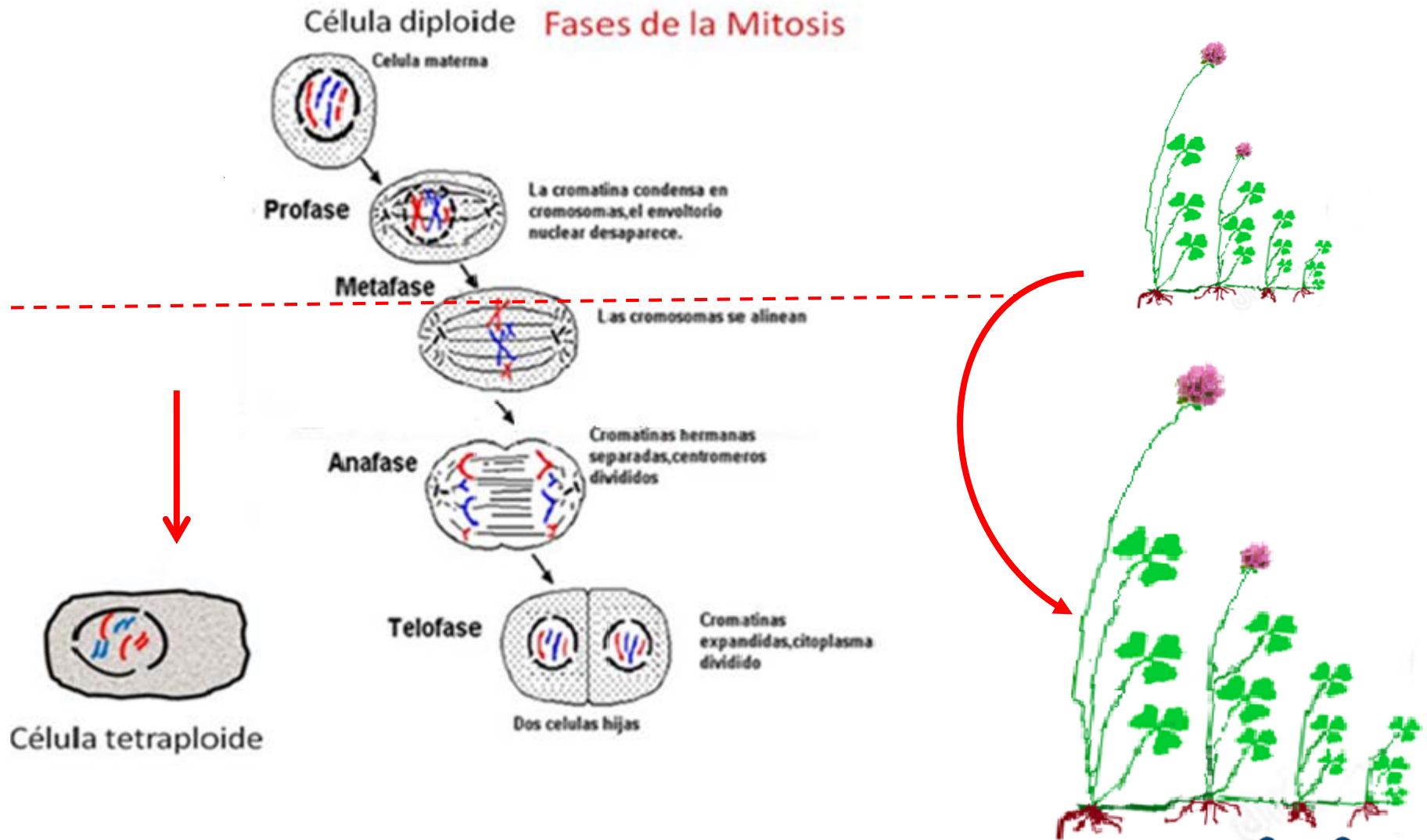
Explante in vitro

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

Tejidos/individuos poliploides



# Duplicación somática: interrupción de la mitosis en leguminosas nativas



# Metodología utilizada aplicando agentes antimitóticos

## Tratamiento a las semillas

Escarificación de la semilla



Pre-germinación



**Aplicación de los tratamientos**



Recuperación de plantas



Confirmación del nivel de ploidía



Aclimatación plantas 4x

## Tratamiento a las plantas in vitro

Plantas in vitro

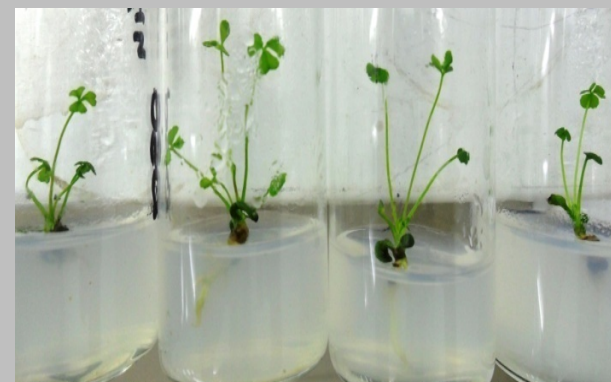
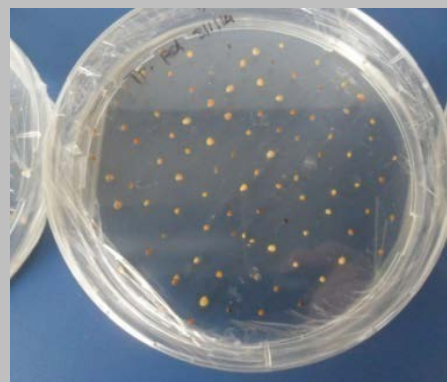
Aplicación de tratamientos

Confirmación de ploidía

Aclimatación

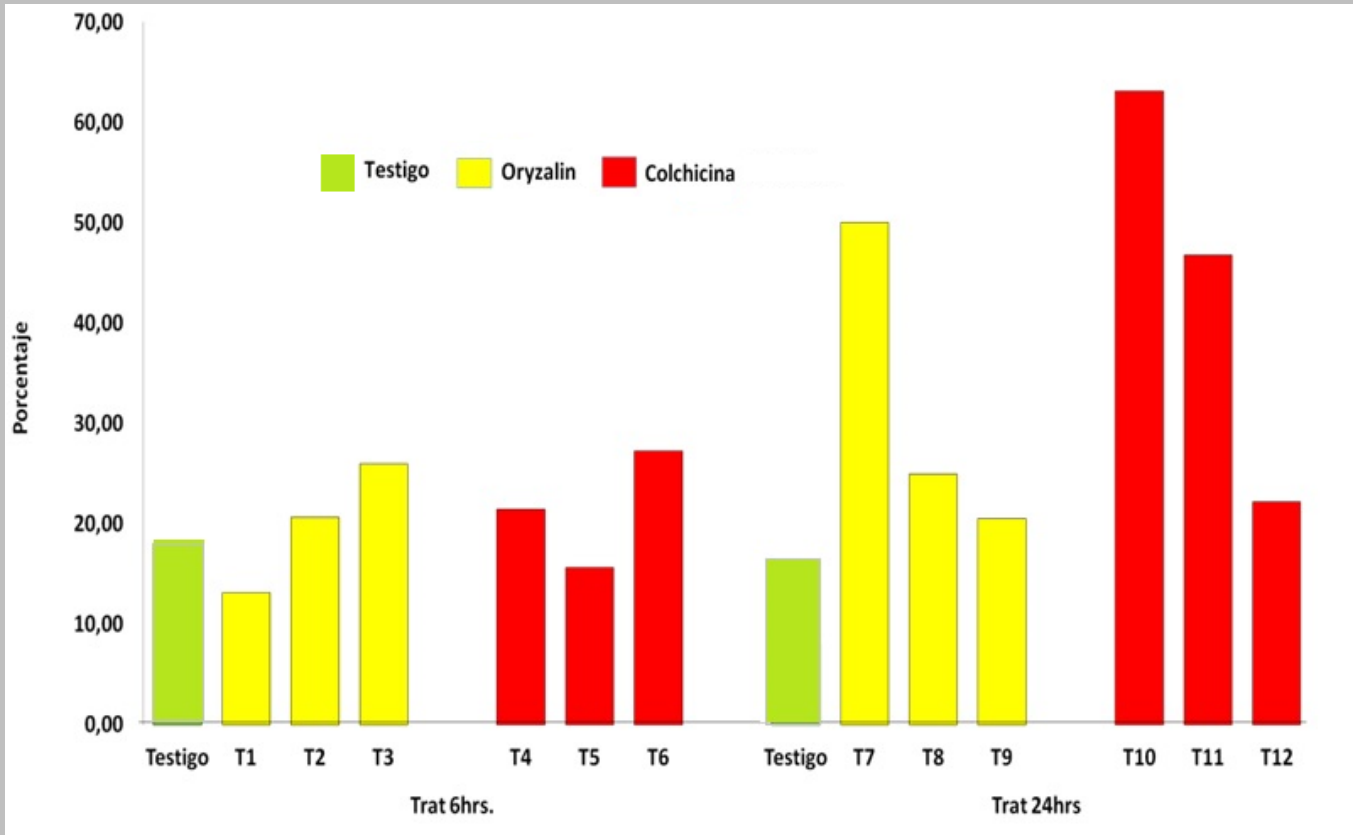
Plantas 2x

# Tratamientos en semilla y en plantas in vitro

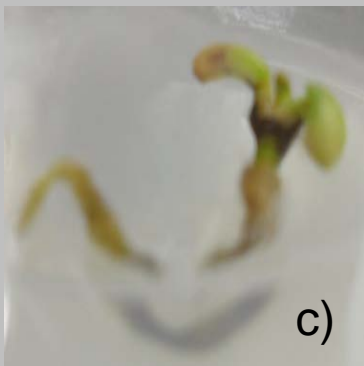


PRODUCTO	CONCENTRACIÓN	TIEMPO	ID
ORYZALIN	2,88 $\mu$ M	6 horas	T1
ORYZALIN	28,8 $\mu$ M	6 horas	T2
ORYZALIN	57,6 $\mu$ M	6 horas	T3
COLCHICINA	250 $\mu$ M	6 horas	T4
COLCHICINA	500 $\mu$ M	6 horas	T5
COLCHICINA	751 $\mu$ M	6 horas	T6
ORYZALIN	2,88 $\mu$ M	24 horas	T7
ORYZALIN	28,8 $\mu$ M	24 horas	T8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





# Estimación del nivel de ploidía

## Métodos indirectos:

Vinculación con características morfológicas

Tamaño de los estomas

Densidad de los estomas

Contenido de clorofila

## Métodos directos:

Conteo de cromosomas

Citometría de flujo



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**.

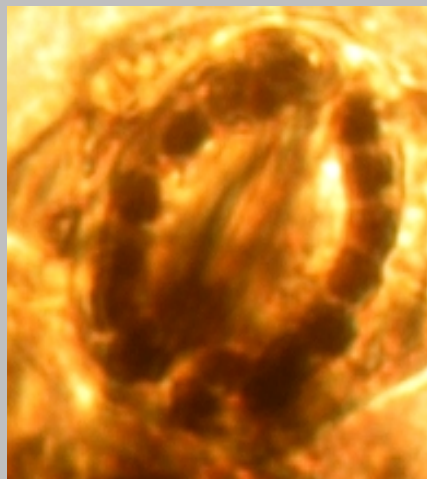
# Observación de cloroplastos en el microscopio

Conteo de cloroplastos, antes de enviar las muestras al citómetro de flujo

Tinción con FDA



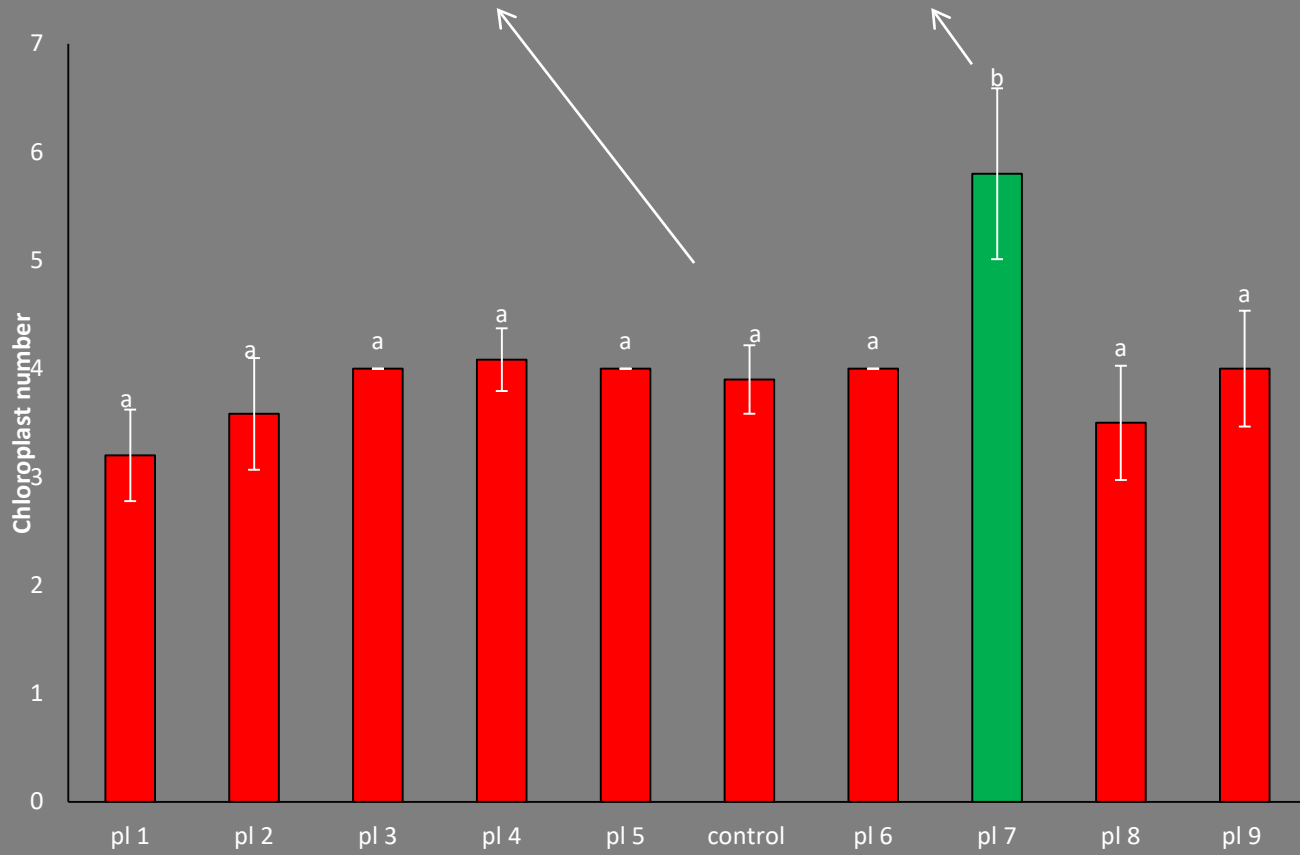
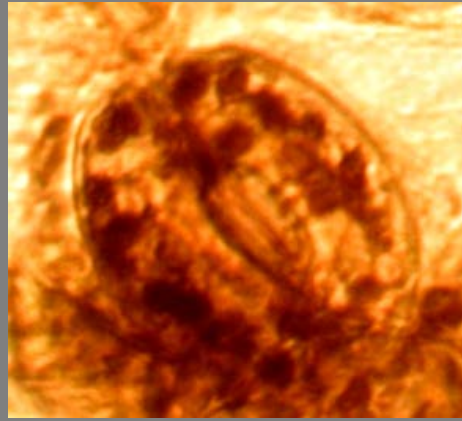
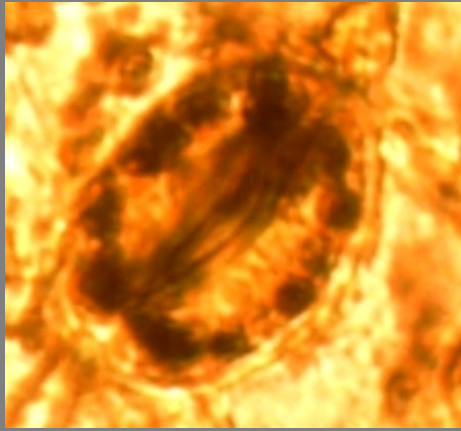
Tinción con Yodo



Control

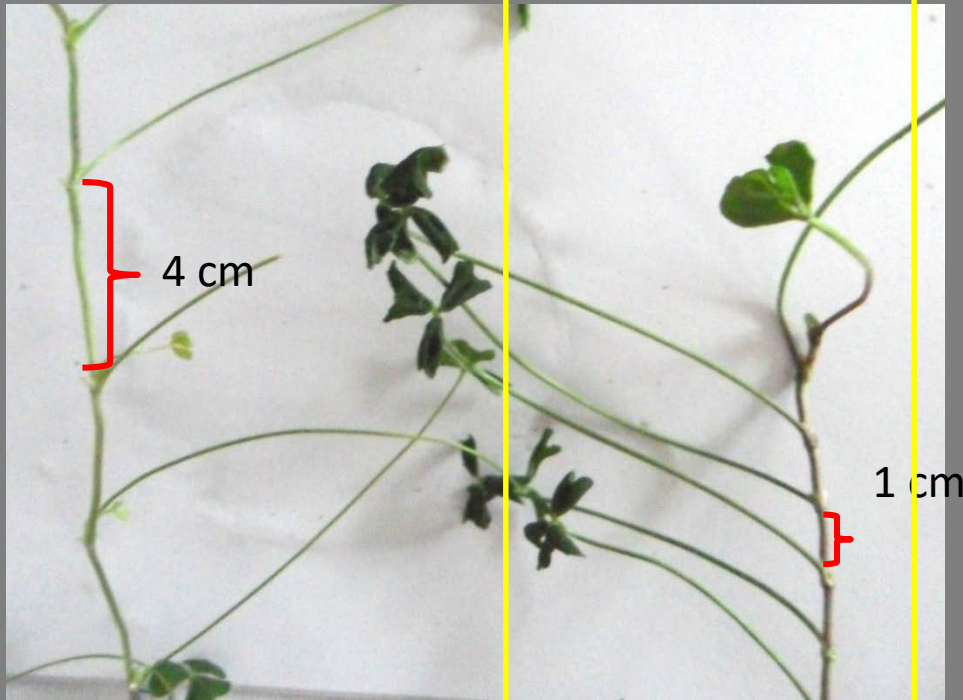


Planta candidata



# Características morfológicas modificadas en plantas poliploides

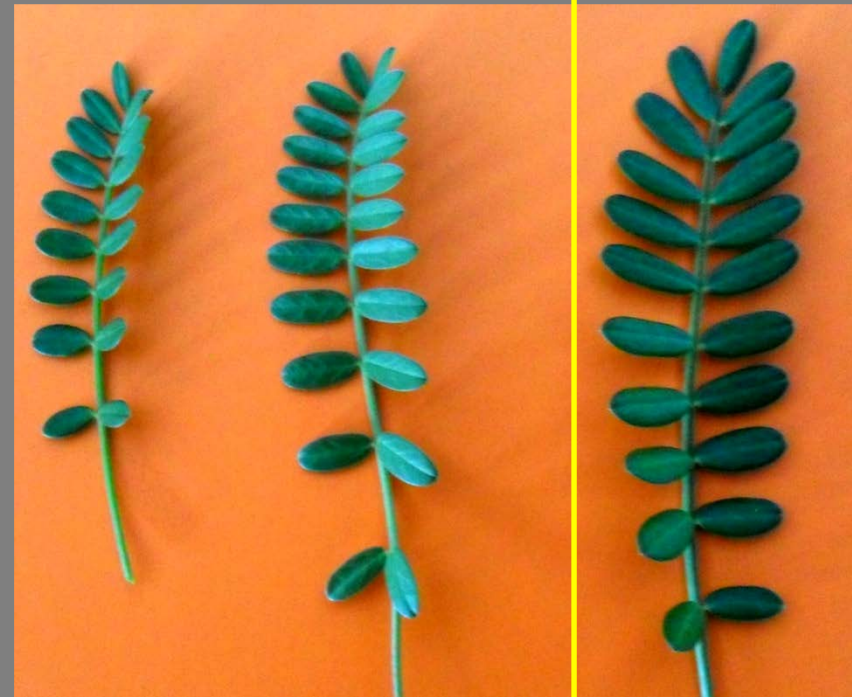
## Distancia de entrenudos



*T. polymorphum* (2x)

*T. polymorphum* (4x)

## Tamaño del folíolo



*A. bicolor* (2x)

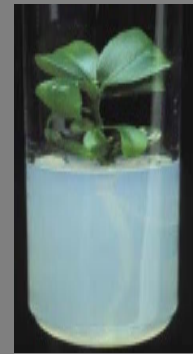
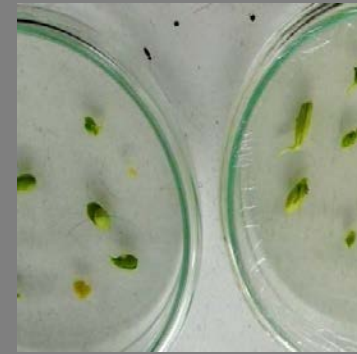
*A. bicolor* (4x)

# Obtención de plantas triploides, por rescate de embriones generados en forma espontánea y en cruzamientos dirigidos



Plantas regeneradas:  
4x  
2x  
3x

Confirmación por citometría de flujo



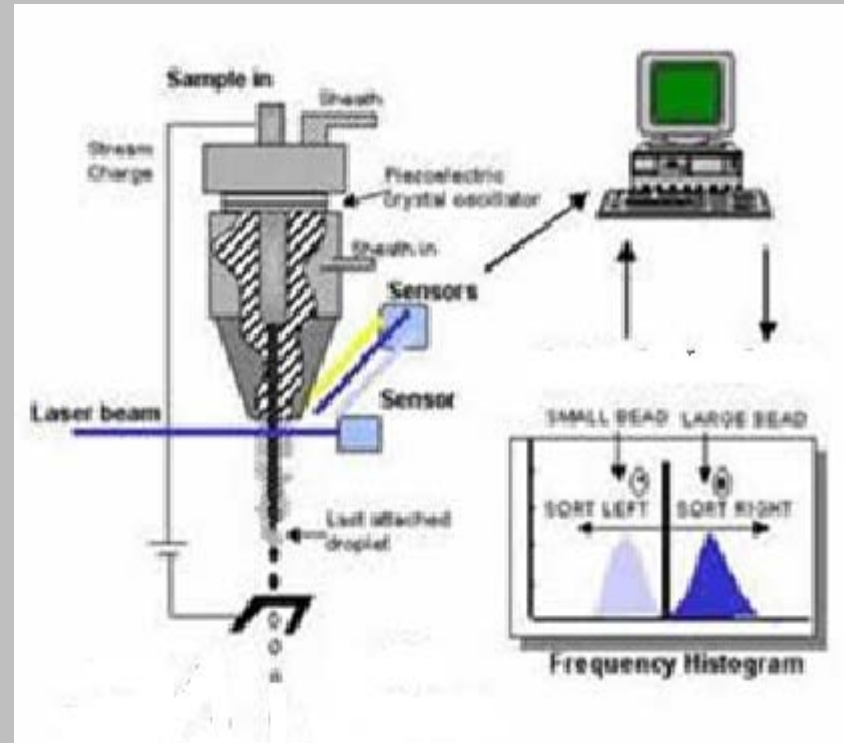
1. Selección de semillas subdesarrolladas; la ausencia de endosperma indica posible fecundación con un gameto no reducido.
2. Desinfección de semillas y rescate de embriones.
3. Embrión sin endosperma en semilla subdesarrollada.
4. Siembra de embriones en placa con medio de cultivo.
5. Plantas regeneradas.

# Confirmación del nivel de ploidía: citometría de flujo

Muestra



- 1) Preparación de la muestra
- 2) Procesamiento con buffer, liberación del núcleo
- 3) Tinción con fluorocromos



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

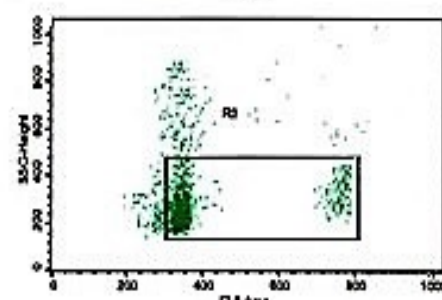
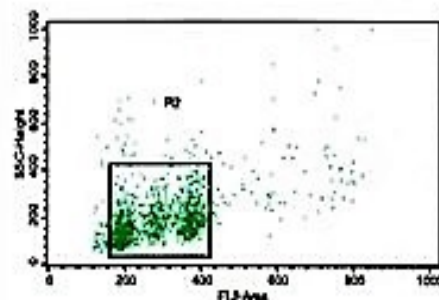
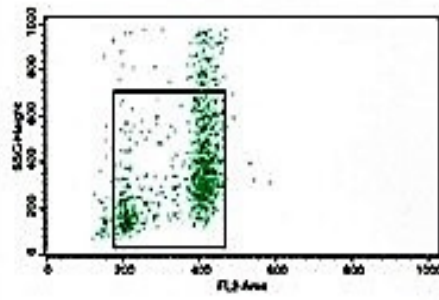
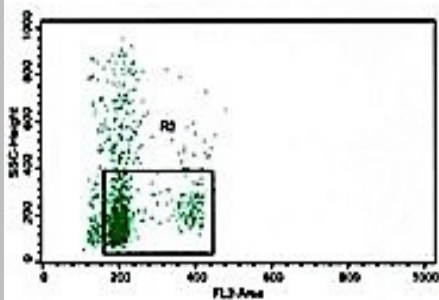
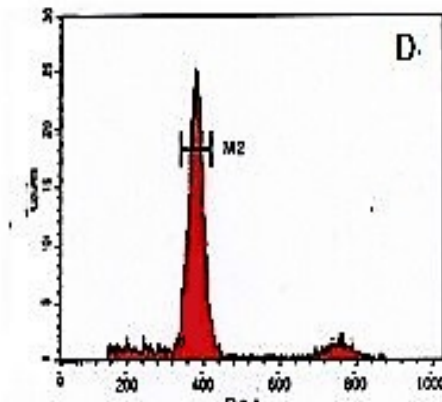
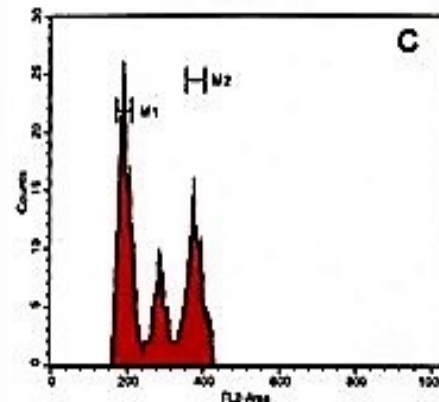
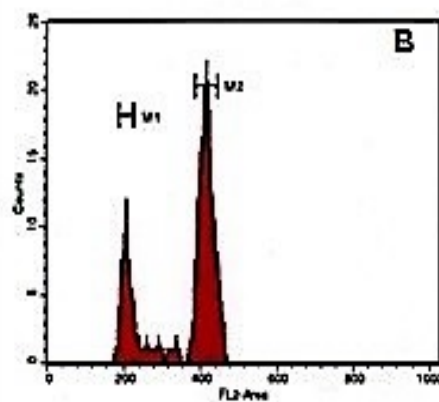
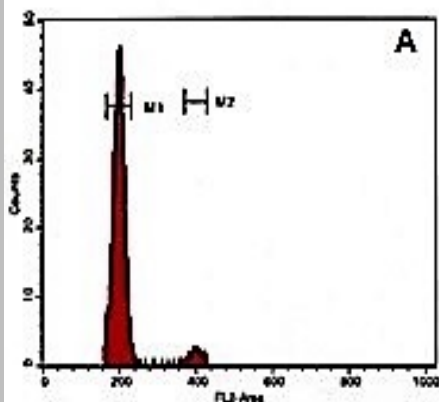
# Resultados obtenidos en el citómetro de flujo

Planta diploide

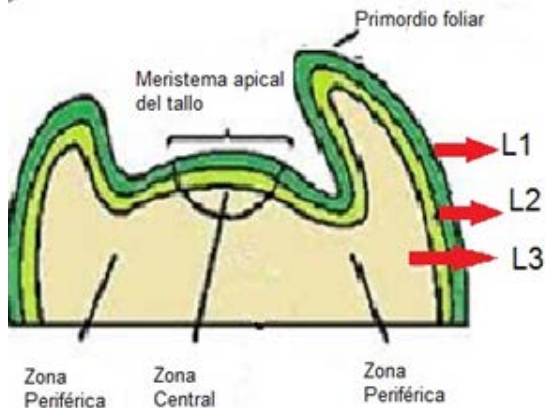
Planta mixoploide

Planta mixoploide

Planta tetraploide



# Resultados de la aplicación de agentes antimitóticos



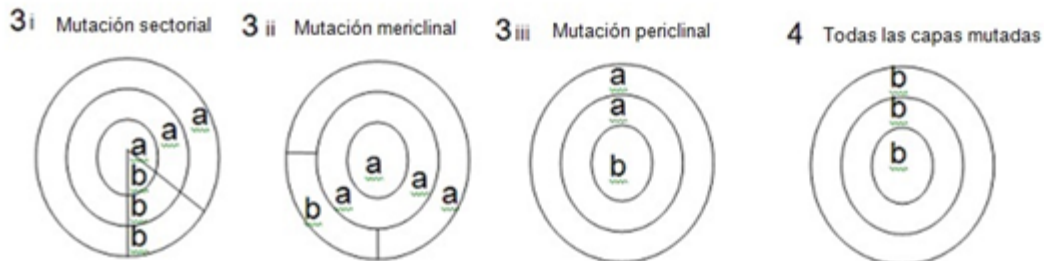
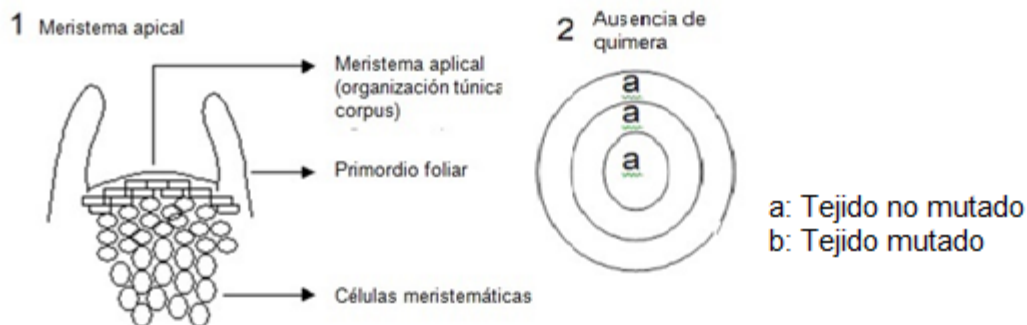
Los agentes antimitóticos pueden actuar en tres niveles

L1 : epidermis, células guarda de los estomas

L2 : tejidos subepidérmicos, granos de polen

L3 : floema, xilema, médula, meristema radicular

Representación esquemática del meristema apical y de los distintos tipos de mutaciones



(Adaptado de Burge et al., 2002)



# Algunos ejemplos en el área forestal

Álamos ... gran uso de 3x clones en China, EE. UU., Canadá y Europa (propiedades de crecimiento y características de la madera)

Especie	Nivel de ploidía	N de semillas/vaina		Número de semillas completas /vaina	
<i>A. mangium</i>	<b>2X</b>	<b>9.7</b>	<b>a</b>	<b>8.7</b>	<b>a</b>
		(±1.1)		(±1.3)	
<i>A. mangium</i>	<b>4X</b>	<b>4.3</b>	<b>c</b>	<b>2.8</b>	<b>c</b>
		(±1.3)		(±1.0)	

Eucalipto. I + D en Brasil y Sudáfrica propiedades de la madera y adaptación

En acacia se produjeron clones 3x con características de interés.

Las propiedades modificadas de la madera (fibras más grandes) podrían brindar oportunidades para industrias de procesamiento. Los clones tetraploides produjeron pulpa con fibras significativamente más largas (**883 µm**) y más anchas (**20,0 µm**), en comparación con los clones diploides (**683 µm** y **15,6 µm**).

# Resumen de características observadas en poliploides

- ❖ Reducción de la tasa de crecimiento temprano en individuos 4x.
- ❖ Gran potencial de crecimiento en individuos 3x.
- ❖ Propiedades mejoradas de la fibra.
- ❖ Mayor resistencia de la madera.
- ❖ Mayor productividad de la cosecha.
- ❖ Potencial resistencia a estrés biótico y abiótico por características morfológicas, de hoja y corteza modificadas respecto al diploide.

Muchas gracias por su atención

acastillo@inia.org.uy

