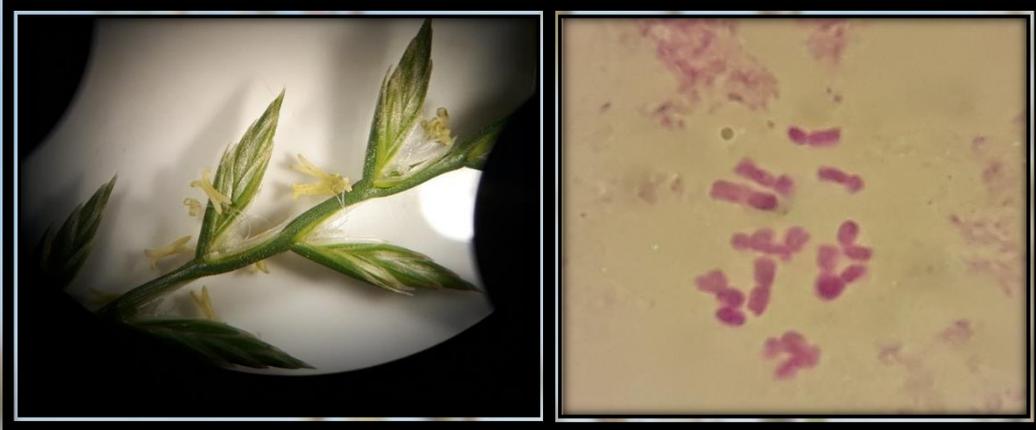


Trabajo de intensificación

Técnicas para la obtención y evaluación de tetraploides en *Lolium perenne*



Luciana Umbriago

Docente tutor

Dra. María Soledad Ureta

Docentes consejeros

Dr. Claudio E. Pandolfo

Mag. Francisco Torres Carbonell



Departamento de Agronomía
Universidad Nacional del Sur

Mayo, 2021

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer principalmente a mi madre, por su apoyo incondicional en cada etapa de mi vida, por empujarme a seguir en cada obstáculo que se me presentaba, por siempre creer en mí, y enseñarme valores como honestidad, respeto, responsabilidad, compañerismo y perseverancia que me hicieron ser la persona que soy. A mi padre que me guía desde el cielo. A mi hermano y hermanas, sobrinos y sobrinas así como el resto de mi familia que siempre están presentes en cada momento de mi vida y especialmente durante estos años de carrera.

A mi tutora de tesis, Dra. Soledad Ureta, por su predisposición desde el primer momento, por orientarme, acompañarme y proporcionarme su apoyo durante toda esta tesina y en situaciones de la vida en general.

Al Ing. agrónomo Juan Sebastián Schneider, por brindarme su ayuda y enseñanzas dentro del laboratorio de genética.

A mis consejeros Dr. Claudio E. Pandolfo, Mg. Francisco Torres Carbonell, por revisar y evaluar este trabajo.

A mis amigas, tanto de la infancia como las que se fueron cruzando en mi camino dentro de esta hermosa carrera, por su acompañamiento en estos años y todos los momentos compartidos.

Al Departamento de Agronomía de la Universidad Nacional del Sur por darme la posibilidad de estudiar, y las herramientas para formarme como profesional, así también a todos los docentes que estuvieron en mi paso por la universidad.

A la empresa EL CENCERRO de Coronel Suárez, por brindarme un espacio dentro de sus instalaciones, elementos y materiales necesarios para continuar con este trabajo. Particularmente a Lic. Cecilia Ducos, Ing. Agr. Ignacio Ducos y Ing. Agr. Aldana Alonso por su buena predisposición ayuda y consejos desde un principio.

A todos ustedes, muchas gracias.

RESUMEN

El raigrás perenne (*Lolium perenne*) es una gramínea forrajera ampliamente distribuida y utilizada en sistemas de producción animal de climas templado-húmedos del mundo. Es una especie diploide ($2n=2x=14$). Las variedades tetraploides poseen cuatro dotaciones cromosómicas ($4n=2x=28$), y han sido obtenidas por manipulación genética. La producción de plantas poliploides ha sido uno de los objetivos de los programas de mejoramiento con el propósito de obtención de genotipos diferenciados con el fin de maximizar rasgos de interés agronómico. La duplicación de cromosomas afecta directamente el rendimiento de la planta a través del aumento del tamaño de las células. La sustancia química más común para la producción de poliploides es la colchicina. El objetivo de esta tesina fue lograr un protocolo eficiente para la obtención de *Lolium perenne* tetraploide y determinar metodologías que permitieran inferir la ploidía de esta especie en distintos momentos fisiológicos. Se llevaron a cabo diferentes tipos de tratamientos tanto en plántula como en estado de macollaje, con diferentes tiempos de exposición y concentraciones de colchicina en cuatro variedades de *Lolium perenne*. Las metodologías utilizadas para determinar la ploidía fueron medición de tamaño de estomas, análisis de contenido de ADN utilizando citometría de flujo, conteo cromosómico en células pertenecientes a ápices vegetativos en macollos, análisis de tamaño y forma de granos de polen y conteo cromosómico de células en división de las espiguillas. Si bien hasta el momento no se pudo observar la duplicación de los cromosomas a través de los tratamientos realizados, si se lograron poner a punto los métodos de determinación indirecta de la ploidía y determinar cuáles son más aptos para esta especie en particular. La metodología de medición de tamaño y forma de los estomas, ampliamente utilizada en otras especies, resultó de alta complejidad para las gramíneas debido a que el conteo de los cloroplastos no pudo llevarse a cabo por su diminuto tamaño. El análisis de citometría de flujo determinó que todas las plantas analizadas eran diploides. Por su parte el análisis de los ápices vegetativos, permitió contabilizar adecuadamente los cromosomas. El análisis del tamaño de grano de polen también se logró con nitidez. Asimismo se pudo lograr un correcto análisis de las espiguillas, donde se contabilizaron adecuadamente los cromosomas presentes en las células.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS	2
RESUMEN	3
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES	5
ÍNDICE DE TABLAS	6
INTRODUCCIÓN	7
Descripción morfológica	7
Crecimiento y desarrollo de <i>Lolium perenne</i>	8
Poliploidía en el género <i>Lolium</i>	9
División mitótica	10
División meiótica.....	11
Poliploidía	11
Consecuencias de la poliploidía	12
Colchicina y su función en la división celular.....	13
HIPÓTESIS	15
OBJETIVO	15
MATERIALES Y MÉTODOS	15
Confirmación inicial de ploidía en las variedades de <i>Lolium perenne</i>	15
Protocolos para la obtención de tetraploides.....	16
Primer tratamiento: duplicación cromosómica en plántula: colchicina 0,1 % durante 3 h.	16
Segundo tratamiento: duplicación cromosómica en plántula: colchicina 0,2 % durante 3 h de exposición y 0,1 % durante 24 h.....	18
Tercer tratamiento: método de inyección de macollos con colchicina al 0,2 %..	20
Métodos para inferir poliploidía	23
Medición de estomas	23
Análisis de citometría de flujo	24
Análisis de ápices vegetativos en macollos.....	24
Análisis de los granos de polen.....	26
Análisis de las espigas.....	26
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
CONCLUSIONES	41
PROYECCIÓN	42
BIBLIOGRAFÍA	45

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

FIGURA 1. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y SEMILLAS DE LOLIUM PERENNE.....	8
FIGURA 2. SEMILLAS GERMINADAS EN PLACAS DE PETRI, DE LAS CUATRO VARIEDADES DE LOLIUM PERENNE.	15
FIGURA 3. PLÁNTULAS TRASPLANTADAS EN BANDEJAS DE ALMÁCIGOS, COLOCADAS EN EL INVERNÁCULO DEL DPTO. DE AGRONOMÍA.	17
FIGURA 4. A. PLANTAS TRASPLANTADAS A MACETAS. B. PLANTAS DESARROLLADAS EN MACETAS.	17
FIGURA 5. PLÁNTULAS GERMINADAS EN CÁMARA DE GERMINACIÓN A TEMPERATURA CONTROLADA.	18
FIGURA 6. PLÁNTULAS SUMERGIDAS EN COLCHICINA.	18
FIGURA 7. PLÁNTULAS COLOCADAS EN LAS PLACAS ALVEOLADAS CON SUSTRATO.....	19
FIGURA 8. LAS CUATRO VARIEDADES DE LOLIUM TRASPLANTADAS A MACETAS, SEPARADAS POR HILOS, LUEGO DE SU TRATAMIENTO CON COLCHICINA.	19
FIGURA 9. SE OBSERVAN LAS PLANTAS ELEGIDAS PARA SOMETER AL TRATAMIENTO DE INYECCIÓN EN MACOLLOS (EN ORDEN DE LAS VARIEDADES 7-5-2-6). LAS PLANTAS PERTENECEN AL SEGUNDO AÑO DEL ENSAYO (SEMBRADAS EN 2018).	20
FIGURA 10. CORTE REALIZADO POR ENCIMA DEL ÁPICE MERISTEMÁTICO PARA PODER TRATARLO.	21
FIGURA 11. INYECCIÓN DE COLCHICINA AL 0,2 % A LOS TRATAMIENTOS Y AGUA A LOS CONTROLES.	21
FIGURA 12. CRECIMIENTO LUEGO DE LA PRIMERA INYECCIÓN DE MACOLLOS.	21
FIGURA 13. ESTADO DE LAS PLANTAS 30 DÍAS DESPUÉS DE APLICADO EL PRIMER TRATAMIENTO DE INYECCIÓN DE MACOLLOS.	22
FIGURA 14. OBSERVACIÓN DE PLANTAS CON EL SEGUNDO TRATAMIENTO DE INYECCIÓN DE MACOLLOS.	22
FIGURA 15. EXTRACCIÓN DE EPIDERMIS PARA LA OBSERVACIÓN DE ESTOMAS.	23
FIGURA 16. FOTO TOMADA DE LA LUPA, DONDE LA FLECHA SEÑALA EL ÁPICE VEGETATIVO, EL CUAL FUE EXTRAÍDO PARA REALIZAR EL CONTEO DE LOS CROMOSOMAS.	24
FIGURA 17. LUEGO DE LAS 48 H DE LLEVADA A CABO LA PREFIJACIÓN, LOS ÁPICES FUERON RETIRADOS DEL AGUA DESTILADA A BAJA TEMPERATURA Y COLOCADOS EN OTROS TUBOS EPPENDORF QUE CONTENÍAN LA SOLUCIÓN DE FARMER PARA REALIZAR LA FIJACIÓN.	25
FIGURA 18. OBSERVACIÓN EN LUPA DE LAS ESPIGUILLAS CON ANTERAS VISIBLES.	26
FIGURA 19. EXTRACCIÓN DE ESPIGUILLAS PARA LA VISUALIZACIÓN DE CROMOSOMAS.	27
FIGURA 20. CONTEO DE CROMOSOMAS EN EL MICROSCOPIO ÓPTICO LUEGO DE LA TINCIÓN CON REACTIVO DE FEULGEN.	28
FIGURA 21. DESARROLLO DE LAS PLANTAS MIXOPLOIDES QUE FUERON COLOCADAS EN MACETAS INDIVIDUALES.	29
FIGURA 22. OBSERVACIÓN DE ESTOMAS AL MICROSCOPIO. A. CONTROL B. TRATAMIENTO	29
FIGURA 23. PLANTAS CRECIENDO EN UNA PLACA ALVEOLADA AL INICIO DEL TRATAMIENTO (JUNIO-JULIO 2019). NÓTESE EL ENGROSAMIENTO EN LA BASE DE LA PLANTA DEL CENTRO DE LA IMAGEN, PRODUCTO DE LA INTENSIDAD DEL TRATAMIENTO.	30
FIGURA 24. NUMERO CROMOSÓMICO DE CONTROL Y TRATAMIENTO 2.....	32
FIGURA 25. PLANTAS DONDE SE REALIZÓ LA INYECCIÓN DE MACOLLOS, NO SE OBSERVAN DIFERENCIAS ENTRE LOS CONTROLES (IZQUIERDA DE HILO) Y LOS TRATAMIENTOS (DERECHA DEL HILO). SE ENCUENTRAN UBICADAS UNA PLANTA DE CADA VARIEDAD DIVIDIDAS POR UN HILO EL CONTROL Y TRATAMIENTO EN EL ORDEN 7-5-2-6.....	32
FIGURA 26. VARIEDAD 7, CONTROL (IZQUIERDA DEL HILO), TRATAMIENTO (DERECHA DEL HILO).....	33

FIGURA 27. VARIEDAD 5, CONTROL (IZQUIERDA) TRATAMIENTO (DERECHA).....	33
FIGURA 28. VARIEDAD 2 CONTROL (IZQUIERDA), TRATAMIENTO (DERECHA)	33
FIGURA 29. VARIEDAD 6, CONTROL (IZQUIERDA), TRATAMIENTO (DERECHA).....	33
FIGURA 30. EPIDERMIS DE LA CARA SUPERIOR DE HOJAS DE LOLIUM. LAS FLECHAS SEÑALAN LAS CÉLULAS GUARDA DE LOS ESTOMAS (DE FORMA ALARGADA, CARACTERÍSTICO DE LAS MONOCOTILEDÓNEAS). LA MEDICIÓN TOMADA FUE EL LARGO DE LAS CÉLULAS GUARDA.	34
FIGURA 31. ESTOMAS DE LOS CONTROLES	34
FIGURA 32. ESTOMAS DEL TRATAMIENTO.....	34
FIGURA 33. LO QUE INDICA EL PICO, ES EL CONTENIDO DE ADN. PLANTA 1: CONTROL. PLANTA 2 Y 9: PERTENECEN A LA VARIEDAD 2. PLANTA 3, 4, 5: VAR 5; PLANTAS 6, 7, 8 VAR 6 Y LA PLANTA 10: VAR 7.	35
FIGURA 34. HISTOGRAMA RESULTADO DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO DE LA PLANTA NÚMERO 6	36
FIGURA 35. HISTOGRAMA DE PLANTA 6, DEMOSTRANDO LA AUSENCIA DEL SEGUNDO PICO YA QUE SE TRATA DE UNA PLANTA DIPLOIDE.	36
FIGURA 36. PLANTA Nº 12 (ADELANTE) Y 9 (ATRÁS) COLOCADAS EN MACETAS INDIVIDUALES.	37
FIGURA 37. PLANTA NÚMERO 12, VARIEDAD 5. EN ESTA FOTO SE APRECIA UNA CÉLULA DIPLOIDE (2X) A LA IZQUIERDA Y A LA DERECHA UNA CÉLULA PRESUNTAMENTE TETRAPLOIDE.	37
FIGURA 38. PLANTA NÚMERO 9, VARIEDAD 2. SE OBSERVAN CÉLULAS CON MÁS DE 14 CROMOSOMAS.....	38
FIGURA 39. OBSERVACIÓN DE CROMOSOMAS DEL SEGUNDO TRATAMIENTO, DONDE SE PUEDEN OBSERVAR CÉLULAS DIPLOIDES.	38
FIGURA 40. OBSERVACIÓN DE LOS GRANOS DE POLEN AL MICROSCOPIO	39
FIGURA 41. OBSERVACIÓN DE LOS CROMOSOMAS DE LAS ESPIGAS DE LOLIUM PERENNE. TODAS LAS CÉLULAS SON DIPLOIDES (2N=14)	40
FIGURA 42. GERMINACIÓN DE LAS CUATRO VARIEDADES DE LOLIUM PERENNE.....	42
FIGURA 43. EXPOSICIÓN DE LAS PLÁNTULAS A LA COLCHICINA, EXCEPTO EL CONTROL QUE SE LO COLOCÓ EN AGUA DESTILADA.	42
FIGURA 44. PLÁNTULAS EN AGUA DESTILADA LUEGO DE HABER REALIZADO LOS 5 LAVADOS.	43
FIGURA 45. PLÁNTULAS COLOCADAS EN LAS BANDEJAS DE ALMÁCIGOS LUEGO DE REALIZADOS LOS TRATAMIENTOS.....	43
FIGURA 46. LA MORTANDAD DE LAS PLÁNTULAS COMENZÓ PRESENTANDO CLOROSIS EN EL ÁPICE DE LOS FOLIÓLOS HASTA TORNARSE CLORÓTICA EN SU TOTALIDAD.	43
FIGURA 47. PLANTAS RECIENTEMENTE TRASPLANTADAS A MACETAS.	44

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. MORTANDAD OBSERVADA EN PLANTAS BAJO EL SEGUNDO TRATAMIENTO DONDE SE APLICARON DOS CONCENTRACIONES Y DOS PERÍODOS DE EXPOSICIÓN: 0.2% DE COLCHICINA DURANTE 3HS Y 0.1% DE COLCHICINA DURANTE 24HS.	31
TABLA 2. MORTANDAD OBSERVADA DE LAS VARIEDADES 2, 5,6 ,7; EN LOS CONTROLES Y LOS TRATAMIENTOS REALIZADOS: 0.2% DE COLCHICINA DURANTE 6HS, 12HS, Y 24HS DE EXPOSICIÓN.	44

INTRODUCCIÓN

Las especies del género *Lolium* son nativas de Europa, áreas templadas de Asia y norte de África, aunque se han dispersado por regiones templadas de todo el mundo (Balfourier *et al.*, 2000).

Lolium multiflorum Lam. y *L. perenne* L. son las especies más utilizadas en las zonas templado-húmedas de Europa y Nueva Zelanda, aprovechadas en ensilajes, como forraje verde, en pastoreo y como césped (López, 2009). En la actualidad, estos forrajes representan un componente importante en la alimentación bovina debido principalmente a su buen crecimiento y desarrollo, su elevada productividad, precocidad y calidad nutritiva (Legarda-López *et al.*, 2015).

Las poblaciones naturalizadas de raigrás se extienden por toda la región pampeana formando parte de las comunidades de malezas o praderas (Cabrera y Zardini, 1978). En el sur de la provincia de Buenos Aires, el raigrás resulta ser una maleza frecuente en cultivos invernales (Catullo *et al.*, 1982; Istilart, 1991; Istilart y Yanniccari, 2012).

Las plantas de raigrás perenne son generalmente diploides ($2n=2x=14$), aunque existen variedades tetraploides ($4n=4x=28$) (Beddows, 1967; Terrell, 1968).

Descripción morfológica

L. perenne (raigrás perenne) es una planta cespitosa de hasta 80 cm de altura, que produce un número variable de macollos durante toda su vida. Sus hojas son glabras y presentan láminas de entre 20 y 30 cm de largo y hasta 6 mm de ancho. La prefoliación, es de tipo conduplicada o plegada. Las vainas son rojizas en la base, la lígula es corta y trunca y las aurículas son pequeñas (Beddows, 1967; Cabrera y Zardini, 1993).

Las inflorescencias son espigas delgadas, erguidas o ligeramente curvas, normalmente sin ramificaciones, de hasta 20 cm de largo. Cada espiga puede portar entre 20 y 30 espiguillas de hasta diez flores cada una; el largo de las espiguillas sobrepasa en un tercio el largo de la gluma (Fig. 1). Durante la etapa reproductiva, la planta sigue produciendo macollos, los cuales rodean a aquellos ya florecidos (Beddows, 1967; Cabrera y Zardini, 1993). La especie presenta una gran plasticidad, por lo que la morfología de las plantas se ve afectada por las condiciones ambientales en las que crezca (Inda Aramendia, 2005).

L. perenne es una especie alógama, frecuentemente auto-incompatible y de polinización principalmente anemófila (Beddows, 1967; Terrell, 1968; Thorogood y Hayward, 1991). El fruto es un cariopse, fuertemente envuelto por la pálea y la lemma; esta última generalmente carece de arista (Beddows, 1967; Cabrera y Zardini, 1993).



Figura 1. Características morfológicas y semillas de *Lolium perenne*

Crecimiento y desarrollo de *Lolium perenne*

L. perenne es una especie hemicriptófito, que pasa por un estadio de semi-roseta anterior a la encañazón. La longevidad presenta variaciones inter e intrapoblacionales, observándose desde formas anuales o bienales, poco macolladoras, hasta formas extremadamente persistentes, con numerosos macollos, algunos de los cuales son postrados y cuyos nudos producen raíces. Aquellas plantas que encañan y florecen durante su primer año de vida tienden a pertenecer a poblaciones menos persistentes (Beddows, 1967).

En el sur de la provincia de Buenos Aires, el raigrás germina y emerge con las primeras lluvias otoñales, pero previamente las semillas requieren haber perdido la dormición condicionada por el tiempo térmico de post maduración (Steadman *et al.*, 2003).

La tasa de crecimiento de las plántulas es inicialmente baja, pero cuando la planta expande su cuarta hoja, se inicia el período de macollaje y la tasa de crecimiento se incrementa (Yanniccari y Acciaresi, 2013). Esta especie presenta requerimientos de vernalización y días largos para el desarrollo de la inflorescencia (MacMillan *et al.*, 2005). Posteriormente comienza la encañazón que, llegada la primavera, termina con la floración entre octubre y noviembre. En tanto, la producción de macollos continúa durante este período demostrando su característica perennidad.

La antesis se inicia en las espiguillas centrales y continúa hacia el extremo basal y apical. A su vez, las flores basales de cada espiguilla son las primeras en llegar a antesis. Su frecuente auto-incompatibilidad hace que la alogamia sea el hábito reproductivo dominante, resultando ser una planta anemófila (Thorogood y Hayward, 1991). Hacia el fin de la primavera, juntamente con el incremento de las temperaturas, los granos maduran y comienza la dispersión de las semillas.

En el verano, las tasas de crecimiento de *L. perenne* descienden y la senescencia avanza en los órganos aéreos, mientras que los órganos subterráneos se mantienen en latencia. Hacia la nueva estación, con las primeras lluvias esas plantas rebrotan vigorosamente y nuevas semillas germinan para continuar el ciclo (Yanniccari y Acciaresi, 2013).

Poliploidía en el género *Lolium*

La duplicación del número de cromosomas de *L. perenne* genera una serie de cambios morfológicos y fisiológicos en las plantas asociado con un aumento en el tamaño de las células, ampliando la relación contenido celular/pared celular. La mayor proporción de contenido celular aumenta la concentración de carbohidratos solubles, proteínas y lípidos y mejora la digestibilidad del forraje (Smith *et al.*, 2001; Nair, 2004). Los cultivares tetraploides tienen semillas más grandes que los diploides (Nair, 2004). Tienen un menor número de macollos de gran tamaño con follaje verde más intenso y hojas más grandes. Requieren más fertilidad del suelo para expresar su potencial de crecimiento y son menos tolerantes al estrés hídrico (Sugiyama, 2006).

La producción de plantas poliploides ha sido uno de los objetivos de los programas de mejoramiento con el propósito de obtención de genotipos diferenciados con el fin de maximizar rasgos de interés agronómico. Entre sus ventajas, la poliploidización permite ampliar la base genética, restaurar la fertilidad de los híbridos interespecíficos, obteniendo líneas de cría en poco tiempo y viabilizar los cruces cuando los genotipos están involucrados con diferencias en la ploidía (Barbosa *et al.*, 2007, Campos *et al.*, 2009, Ishigaki *et al.*, 2009, Souza-Kaneshima *et al.*, 2010).

La poliploidía se refiere a la presencia de más de dos conjuntos de cromosomas por núcleo celular, que ha sido considerado un fenómeno omnipresente en la evolución y diversificación de las plantas (Soltis *et al.*, 2009).

En *Lolium*, se logró por primera vez la duplicación de cromosomas por Meyers en 1939, y el primer cultivar tetraploide se produjo en 1950 (Humphrey *et al.*, 2010).

En plantas forrajeras, así como en otras especies, la colchicina ha sido la sustancia antimitótica más utilizada para inducir poliploidía (Barbosa *et al.*, 2007; Campos *et al.*, 2009; Ishigaki, 2009; Quesenberry *et al.*, 2010; Souza-Kaneshima *et al.*, 2010).

División mitótica

Es el proceso mediante el cual se divide el núcleo de la célula madre, originándose dos núcleos hijos que tendrán el mismo número y clase de cromosomas que el núcleo materno. La finalidad de la mitosis es repartir el material genético (ADN) equitativamente entre los núcleos hijos que se forman (Navarro, 2009).

Previo a cualquier división celular, ocurre la duplicación del ADN en la **interfase**. La división mitótica propiamente dicha, comienza con la **profase**, en esta etapa se observa que cada cromosoma consiste en dos cromátidas hermanas, unidas por los centrómeros, el nucléolo pierde visibilidad, la membrana nuclear desaparece (Orillo y Bonierbale, 2009). La próxima etapa es la **metafase**, donde los cromosomas muestran el máximo acortamiento y condensación, y son desplazados por los microtúbulos hasta que todos los centrómeros quedan en el plano ecuatorial (Márquez y Zabala, 2007). Es una de las más importantes para los estudios citogenéticos porque las características que conforman a los cromosomas son más visibles, es conveniente que las células que se analizan en preparaciones citogenéticas se encuentren en esta fase de división celular (Robertis y Robertis. 1987). Prosigue la **anafase**, donde se separan los centrómeros hijos, y las cromátidas, que ahora se convierten en cromosomas hijos. Cada juego de cromosomas hijos migra hacia un polo de la célula (Márquez y Zabala, 2007). Cuando esto ocurre comienza la **telofase** donde los cromosomas hijos se alargan y pierden condensación. Al final de esta etapa se produce la citocinesis donde el citoplasma se divide en la línea media por un tabique que comienza a formarse en la anafase. Cada célula hija construye entonces su propia pared celular. Una vez completada la división celular, quedan dos células hijas idénticas (Márquez y Zabala, 2007).

División meiótica

La meiosis es un tipo especial de división nuclear que segrega una copia de cada cromosoma homólogo en un nuevo gameto. Durante la formación de los gametos, el número de cromosomas se reduce a la mitad y retornan al número completo cuando los dos gametos se unen durante la fecundación, restableciendo la ploidía original. La mayor parte de las células de la planta se dividen por mitosis, denominándose células de la línea somática (o células vegetativas). A las células que se convierten en gametos se las considera células pertenecientes a la línea germinal (Castrillo *et al*, 1988).

Durante la meiosis los cromosomas homólogos se replican y se compactan, y seguidamente existen dos divisiones: una primera división meiótica, llamada Meiosis I, donde se segregan los cromosomas homólogos (segregación reductora), consta de cuatro etapas distintas, profase I, metafase I, anafase I y telofase I. A su vez, la profase I se subdivide en cinco estadios, leptotena, cigotena, paquitena, diplotena y diacinesis.

En la segunda división o ecuacional (Meiosis II) se segregan las cromátidas hermanas (segregación equilibrada), al igual que en mitosis. Esta etapa comprende Profase II, Metafase II, Anafase II y Telofase II. Por lo tanto, la meiosis es una división reductora, ya que a partir de una célula diploide ($2n$) se da lugar a 4 células haploides (n) o gametos (Kleckner, 1996).

Poliploidía

La poliploidía consiste en el incremento del tamaño del genoma causado por la presencia de tres o más juegos de cromosomas dentro de las células somáticas de un organismo (3, triploides; 4, tetraploide; 5, pentaploide; 6, hexaploide; etc.) (Winchester, 1981; Futuyama, 2005; Ranney, 2006; Hegarty y Hiscock, 2008; Madlung, 2013).

Las plantas poliploides pueden producirse de forma natural, como resultado de algunos mecanismos citológicos, como la formación de gametos no reducidos a través de una falla en la división reduccional de la meiosis, durante la primera división (probablemente asociado con los procesos que se llevan a cabo en la profase I, como el entrecruzamiento entre cromátidas) (Alcántar, 2014). También pueden obtenerse sintéticamente mediante la inducción de la duplicación cromosómica de las células somáticas. Este procedimiento es posible mediante la interferencia en el ciclo celular, utilizando sustancias antimitóticas o choques térmicos, esto afecta la organización/polimerización, o causa la ruptura de los microtúbulos, lo que inhibe la separación de los cromosomas y da como resultado la formación de células con un complemento cromosómico duplicado (Dhooghe *et al.*, 2011).

La poliploidía también puede surgir a través de la hibridación interespecífica (entre especies) (Otto y Whitton, 2000; Futuyma, 2005; Ryan, 2006). Es bien conocido que la poliploidía es especialmente frecuente en grupos híbridos, lo anterior se debe a que los híbridos diploides tienen altas tasas de formación de gametos no reducidos (Otto, 2007). Los nuevos poliploides pueden originarse por reproducción sexual, si están involucradas gametas $2n$, o mediante duplicación somática de cromosomas. En la duplicación somática, las regiones meristemáticas de la planta, en las cuales se lleva a cabo el crecimiento (se encuentran cerca de las puntas de los tallos y de las raíces), pueden entrar en la profase con el número de cromosomas duplicados, pero no llegan a tener una anafase normal. Por lo cual, las células resultantes son tetraploides. Con el tiempo este grupo de células puede llegar a constituir la porción dominante en el crecimiento de una rama (Winchester, 1981).

Uno de los problemas que se encuentran comúnmente en el proceso de poliploidización es la regeneración de plantas mixoploides, es decir, plantas que tienen células con variaciones en el número de cromosomas o ploidía en el mismo tejido o entre órganos de la misma planta. La mixoploidía se produce porque el tratamiento con el antimitótico actúa sobre las células del ápice de crecimiento que se encuentran en diferentes etapas del ciclo celular, dando como resultado la falta de uniformidad del tejido. Esta variación en el número de cromosomas compromete la fertilidad y estabilidad de las plantas en el campo, siendo indeseable desde el punto de vista comercial y/o con fines de mejora genética. El éxito en la inducción de la duplicación cromosómica también depende de la eficacia y toxicidad de los antimitóticos, que varía entre las especies y dentro de ellas. (Pereira *et al.*, 2012)

La poliploidización es habitual en el reino vegetal y es el mejor instrumento conocido que resulta en la evolución de los genomas. Se estima que en angiospermas la proporción de especies poliploides es de aproximadamente el 70 % (Masterson, 1994). Sin embargo, investigaciones recientes han revelado que muchas especies de plantas diploides poseen orígenes poliploides (Gaut y Doebley 1997, Blanc y Wolfe 2004, Paterson *et al.*, 2004, Yu *et al.*, 2005, Cui *et al.*, 2006), demostrando la frecuencia de la poliploidía a lo largo de la historia de las plantas.

Consecuencias de la poliploidía

Diversos autores han documentado la determinación de la ploidía por métodos indirectos como el aumento del tamaño celular. Las plantas poliploides son más grandes y vigorosas que sus ancestros diploides, tal incremento frecuentemente puede ser observado en las células epidérmicas, estomas, y granos de polen, así como en sus diversos

órganos. El incremento en el volumen celular es una de las consecuencias más comunes y universales de la poliploidización. Cambios en el volumen celular resultan en cambios en el radio superficie-volumen, los cuales alteran la tasa de procesos fisiológicos y metabólicos que dependen de sistemas regulatorios cuidadosamente balanceados (Alcántar, 2014). El ciclo celular es más lento, disminuye la velocidad de crecimiento, como consecuencia de un aumento en la duración del ciclo celular (Gantait *et al.*, 2011). Presentan semillas más grandes, que germinan más despacio y con un índice de germinación menor. En general florecen más tarde, pero se extiende el periodo, alargando el ciclo que en muchas circunstancias, se manifiesta cambiando de anual a perenne. El defecto más común de los autopoloides inducidos es su crecimiento lento por lo que su periodo vegetativo se alarga, son de maduración tardía (Elliot, 1967).

La duplicación genómica causa un incremento en la altura de plantas y en la longitud, ancho, espesor y volumen foliar con respecto a plantas diploides (Molero y Matos, 2008). Por lo tanto, si se modifica el juego de cromosomas, éstos pueden modificar las características como son el largo, ancho, así como también la densidad estomática (Simmonds, 1948; Orillo y Bonierbale, 2009) y la cantidad de cloroplastos que presentan las células guarda en los estomas (Orillo y Bonierbale, 2009).

La densidad de los estomas se reduce así como la transpiración, por lo tanto los poliploides toleran mejor los ambientes más secos que los diploides (Ramírez *et al.*, 2013). Los procedimientos indirectos para la detección de poliploidía suelen ser rápidos y sencillos. No obstante, a menudo son inexactos y suele ser necesaria la confirmación mediante métodos directos, como el recuento de cromosomas y la medición del tamaño del genoma nuclear mediante citometría de flujo (Sattler *et al.*, 2016). El recuento de cromosomas se ha considerado el método más preciso para detectar variantes poliploides. Sin embargo, las técnicas citogenéticas suelen ser laboriosas y requieren protocolos muy específicos para cada especie (Dolez *et al.*, 2007).

Alternativamente, la citometría de flujo es un método rápido, confiable y simple para medir el nivel de ploidía y confirmar el éxito de inducción de poliploidía, lo que permite el análisis de una gran número de plantas objetivo en un corto período de tiempo (Roy *et al.*, 2001). Se basa en la determinación de la cantidad de ADN, cuantificando la luz emitida por el ADN fluorescente. Una computadora presenta gráficas de intensidad lumínica las cuales sirven para interpretar la cantidad de ADN presente por muestra (Garnette *et al.*, 1999)

Colchicina y su función en la división celular

La colchicina es un metabolito secundario extraído de las semillas y bulbos de *Colchicum autumnale* L. perteneciente a la familia *Liliaceae*. Es probablemente el producto

químico más ampliamente utilizado para la inducción de poliploidía y actualmente es sintetizado artificialmente. Otros agentes utilizados con el mismo fin son: la dinitroanilina, la orizalina y la trifluralina (Grzebelus y Adamus, 2004).

La colchicina es una sustancia muy tóxica y cancerígena. Se solubiliza en agua caliente y se almacena en recipiente ámbar debido a fotosensibilidad; la exposición prolongada a la acción de la luz puede alterar su estructura química, con la consecuente pérdida de sus propiedades (Lewis, 2009).

El tratamiento con colchicina da como resultado individuos poliploides puros o impuros (células aneuploides, mixoploides), según la concentración de colchicina, el tiempo de exposición, los tejidos vegetales, su etapa de desarrollo y el método para duplicar el conjunto de cromosomas (Rauf *et al.*, 2021) por lo que es importante el desarrollo de protocolos eficientes para cada especie en particular.

Blakeslee y Avery (1937) descubrieron que la colchicina inhibe la formación de las fibras del huso debido a su unión a los microtúbulos de manera inestable, por ese motivo, el cambio de medio puede revertir el proceso, permitiendo la continuación del cultivo. En esta fase (anafase) los cromosomas se han multiplicado, pero la división celular aún no ha tenido lugar. La restricción de la formación de la pared celular en esta etapa da como resultado células poliploides. Este incremento en el volumen de la célula, con mayor frecuencia desarrolla tejidos más gruesos, lo que resulta en grandes órganos de la planta. Un modelo común para explicar los cambios originados de la inducción tetraploide, se basa en el supuesto de que existe una proporción más baja de la membrana nuclear en relación a la cromatina (el volumen de las células tetraploides suele ser aproximadamente el doble, y su superficie es solamente 1,5 veces más grande), lo que provoca que más cromatina entre en contacto con la membrana nuclear, reforzando así la actividad de los genes, la mejora en las relaciones de agua, el estado hormonal y la tasa de fotosíntesis (Levin, 2002 y Lavania, 2005).

El grupo de investigación donde desarrollé mi trabajo final de carrera posee un convenio con la empresa El Cencerro S.A., mediante el cual vienen trabajando hace algunos años para aumentar la ploidía de diversas especies forrajeras. En el año 2018 recibimos cuatro variedades de *L. perenne* diploide, con el fin de duplicar su número cromosómico y así lograr una mayor producción de la pastura como se mencionó anteriormente. Si bien se han obtenido buenos resultados en la duplicación cromosómica de *Trifolium pratense* L. (Schneider *et al.*, 2018), poco se conoce sobre los métodos de duplicación cromosómica en la especie *L. perenne* y sus modos de detección.

HIPÓTESIS

Es posible duplicar cromosomas de *Lolium perenne* a través de la manipulación del ciclo celular con colchicina.

OBJETIVO

- Lograr un protocolo eficiente para la obtención de *L. perenne* tetraploide.
- Determinar metodologías que permitan inferir la ploidía de esta especie en distintos momentos fisiológicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los ensayos de poliploidización fueron realizados durante 3 años consecutivos (2018-2020) en el laboratorio de genética y el invernáculo del Departamento de Agronomía de la Universidad Nacional del Sur.

Para este estudio se utilizaron cuatro variedades diploides (2, 5, 6 y 7) de *L. perenne* de la empresa El Cencerro S.A. de Coronel Suárez.

Confirmación inicial de ploidía en las variedades de *Lolium perenne*

En un inicio se evaluó la ploidía de las variedades enviadas por la compañía. Para esto se colocaron 50 semillas de las cuatro variedades de *L. perenne* en cajas de Petri con papel absorbente durante un periodo de 15-20 días y suficiente humedad para lograr su germinación (Fig. 2).



Figura 2. Semillas germinadas en placas de Petri, de las cuatro variedades de *Lolium perenne*.

Se colectaron los meristemas radiculares de 10 individuos por población. Las colectas de tejidos se realizaron a media mañana ya que las células se encuentran en activa

división y el objetivo era encontrar las células de este tejido en metafase, fase en la que se observan mejor los cromosomas (Delgado *et al.*, 2010).

Para realizar la prefijación las raíces se sumergieron en tubos eppendorf con agua destilada, los mismos se colocaron dentro de un recipiente de poliestireno expandido con agua y hielo durante 24 h y se llevó bajo refrigeración a 4 °C, esto permitió detener la división celular en el estadio de metafase. Luego se fijaron en una solución de etanol: ácido acético glacial en un volumen de 3:1 durante 5 días. Esta solución se preparó al momento de usarse, el etanol se encontraba a baja temperatura y la fijación se realizó a temperatura ambiente. Posteriormente se llevó a cabo la hidrólisis, donde se agregaron las raíces a la solución de HCl 1N previamente calentada a 60 °C, se probaron distintos tiempos de hidrólisis ácida (entre 5 y 10 minutos) para determinar el periodo óptimo de exposición. Luego, fueron retiradas del HCl con una pinza y se lavaron con agua destilada, inmediatamente se llevó a tinción con reactivo de feulgen durante 20 minutos en oscuridad, para visualizar los cromosomas. Finalmente, se colocó una raíz en un portaobjeto, se cortó 1-2 mm del extremo y se añadió una gota de ácido acético al 45 % y luego el cubreobjeto. Se realizó el squash donde se golpeó suavemente con el extremo posterior de una lapicera y se le aplicó presión con el dedo pulgar y papel absorbente sin mover el cubreobjeto. Los cromosomas se visualizaron mediante el microscopio óptico, y se contabilizaron en al menos 8 preparados.

Protocolos para la obtención de tetraploides

Para la obtención de tetraploides se realizaron tres tratamientos, en plántulas y en macollos utilizando los protocolos consultados en la bibliografía que se detallan a continuación:

Primer tratamiento: duplicación cromosómica en plántula: colchicina 0,1% durante 3 h.

Dilución de colchicina: Se preparó colchicina al 0,2 % (0,5 g en 250 mL) de dicha solución se tomaron 50 mL y se llevaron a 100 mL para tener una solución al 0,1 %. La colchicina fue conservada en la heladera hasta su utilización.

Se colocaron 100 semillas de cada una de las 4 variedades de *L. perenne* a germinar siguiendo las normas ISTA, en placas de Petri con papel absorbente. Luego de 10 días se les aplicó colchicina al 0,1 % durante 3 h en oscuridad, donde las placas de Petri fueron cubiertas con papel y colocadas dentro de una caja. Posteriormente se realizaron 5 lavados con agua destilada y permanecieron durante toda la noche en una fina capa de agua (Ramakrishnan, 2004, Pereira *et al.*, 2014). Asimismo, se pusieron 12 semillas

a germinar en idénticas condiciones a las anteriores (en placas de Petri con papel absorbente y humedad), que no fueron tratadas con colchicina, a modo de control. Todas las semillas germinadas fueron trasplantadas a bandejas para almácigos con sustrato y riego constante, en el invernáculo del Dpto. de Agronomía de la UNS (Fig. 3). Una vez que las plantas se desarrollaron, fueron trasplantadas a macetas para su posterior crecimiento y evaluación (Fig. 4).



Figura 3. Plántulas trasplantadas en bandejas de almácigos, colocadas en el invernáculo del Dpto. de Agronomía.

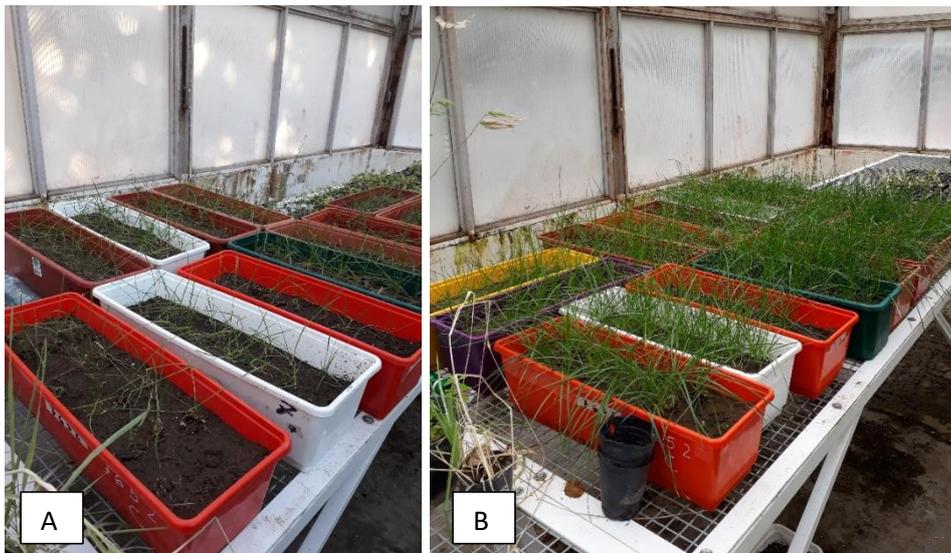


Figura 4. A. Plantas trasplantadas a macetas. B. Plantas desarrolladas en macetas.

Segundo tratamiento: duplicación cromosómica en plántula: colchicina 0,2 % durante 3 h de exposición y 0,1 % durante 24 h.

Se colocaron semillas de las 4 variedades en placas de Petri y fueron llevadas a una cámara de germinación a 15 °C de temperatura durante 15-20 días (Fig. 5). Una vez que germinaron, se trataron 100 plántulas de cada variedad, en dos tratamientos. El primer grupo, compuesto por 50 plántulas de cada variedad, recibió una dosis de 0,2 % de colchicina durante 3 h, y el segundo grupo de 50 plántulas de cada variedad, fue expuesto a una dosis de colchicina al 0,1 % por 24 h (Fig. 6) (Rosalaine *et al.*, 2014).



Figura 5. Plántulas germinadas en cámara de germinación a temperatura controlada.



Figura 6. Plántulas sumergidas en colchicina.

Después del período de exposición, llevado a cabo a media mañana y a la oscuridad, las plántulas fueron sumergidas en agua destilada 5 veces para realizar su lavado. Luego se las cubrió parcialmente con agua destilada y se las dejó reposar durante toda la noche. Posteriormente fueron retiradas del agua destilada y colocadas en las placas alveoladas con sustratos y llevadas al invernáculo (Fig. 7).



Figura 7. Plántulas colocadas en las placas alveoladas con sustrato.

Luego de 60 días se contabilizó la mortandad y fueron trasplantadas a macetas. Cada maceta contenía la misma variedad y los distintos tratamientos experimentales se separaron mediante un hilo atado a la misma (Fig. 8)



Figura 8. Las cuatro variedades de Lolium trasplantadas a macetas, separadas por hilos, luego de su tratamiento con colchicina.

Tercer tratamiento: método de inyección de macollos con colchicina al 0,2 %.

Basándonos en Frascaroli (1990), que trabajó con plantas en desarrollo de cuatro o cinco hojas, usando una jeringa con una aguja hipodérmica e introduciendo en la base de la planta, inmediatamente sobre el ápice de crecimiento, se inyectó la solución de colchicina hasta que se observó que el líquido comenzó a salir por la parte central de la hoja más nueva emitida por la planta. Este tratamiento se repitió a medida que la planta desarrolló nuevos macollos para aumentar la frecuencia de poliploidía.

En este ensayo, fue seleccionada la planta más vigorosa de cada variedad y con un estado de desarrollo más avanzado ya que presentaban dos años de desarrollo. Estas plantas fueron trasplantadas en una maceta (Fig. 9) y divididas a la mitad con un hilo. Se realizaron cortes próximos al ápice meristemático en toda la planta (Fig. 10) para exponerla a un mismo disturbio y así eliminar posibles diferencias de crecimiento que no estén relacionadas con el tratamiento. Las plantas de la izquierda del hilo fueron utilizadas como control, inyectándose agua y en las de la derecha se inyectó colchicina al 0,2 %, hasta que se observó que el líquido comenzó a salir (Fig.11).

Luego se las dejó en el laboratorio cubiertas con una caja brindándole condiciones de oscuridad durante 3 h.



Figura 9. Se observan las plantas elegidas para someter al tratamiento de inyección en macollos (en orden de las variedades 7-5-2-6). Las plantas pertenecen al segundo año del ensayo (sembradas en 2018).



Figura 10. Corte realizado por encima del ápice meristemático para poder tratarlo.



Figura 11. Inyección de colchicina al 0,2 % a los tratamientos y agua a los controles.

Luego de la primera inyección de macollos, las macetas fueron llevadas al invernadero para que las plantas continúen con su crecimiento (Fig. 12).

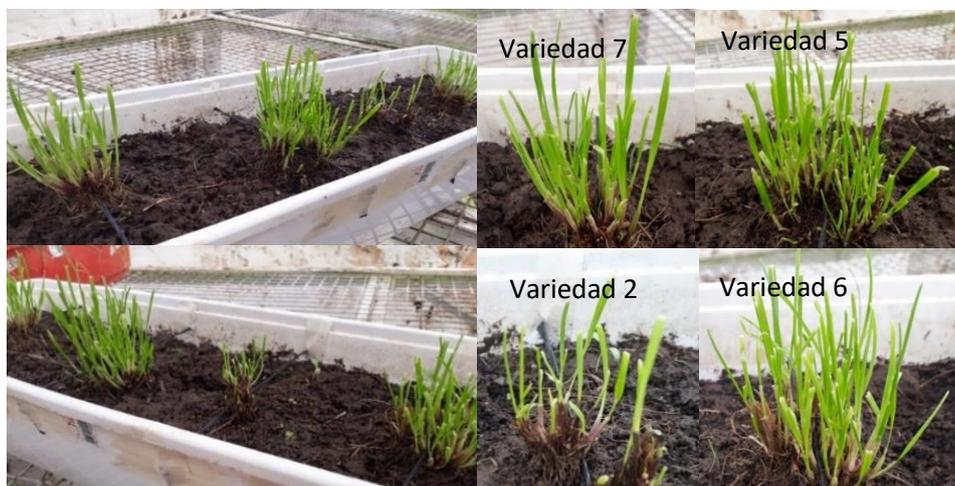


Figura 12. Crecimiento luego de la primera inyección de macollos.

Pasados los 30 días de realizada la primera inyección de macollos, se procedió a la repetición del tratamiento debido a que no se encontraron diferencias morfológicas a simple vista (Fig. 13).



Figura 13. Estado de las plantas 30 días después de aplicado el primer tratamiento de inyección de macollos.



Figura 14. Observación de plantas con el segundo tratamiento de inyección de macollos.

Métodos para inferir poliploidía

Medición de estomas

Se realizaron distintos métodos para determinar la poliploidía, uno de los cuales fue la medición del tamaño de los estomas, ya que las modificaciones en los niveles de ploidía presentan una relación proporcional con el tamaño de los estomas. Se estudiaron 150 plantas con la finalidad de detectar alguna diferencia en los estomas, que permitiera asumir la existencia de alguna planta tetraploide dentro del grupo analizado. Se evaluó el tamaño y el número de cloroplastos de los estomas en la cara adaxial de la hoja de las plantas. Con la ayuda de una pinza se extrajo el tejido epidérmico de cara adaxial, se colocó una gota de verde de metilo sobre un porta objetos, por encima se colocó el tejido y luego el cubre objetos (Fig. 15). Posteriormente se examinó bajo microscopio óptico.

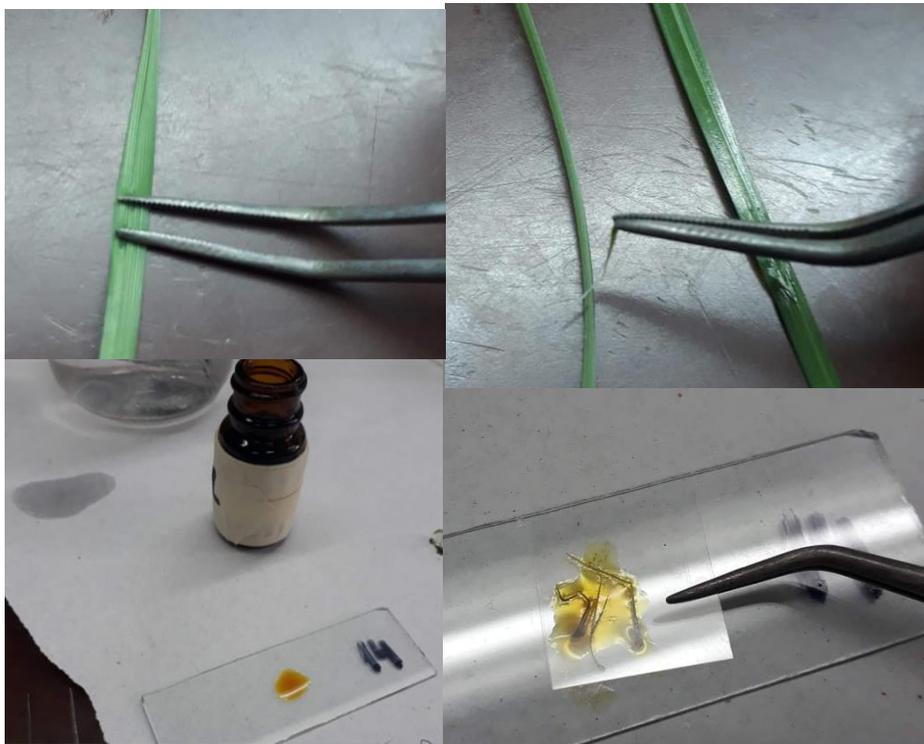


Figura 15. Extracción de epidermis para la observación de estomas.

Para la comparación del tamaño de los estomas del tratamiento con los controles se utilizó el software ImageJ/Fiji 1.46 (Ferreira y Rasband, 2012), que indica las medidas en micrones.

Análisis de citometría de flujo

De las 150 plantas del primer tratamiento (colchicina 0,1% durante 3 h), y luego de analizar el tamaño de los estomas, se seleccionaron un control y 9 plantas candidatas a ser tetraploides, ya que presentaron un tamaño superior al promedio calculado en las plantas control, y fueron enviadas para su análisis por medio de citometría de flujo en el instituto IBONNE de la ciudad de Corrientes.

Análisis de ápices vegetativos en macollos

Una vez que las plantas entraron en estado de macollaje, se procedió a analizarlos, teniendo en cuenta el defecto que tiene la colchicina de crear plantas mixoploides (con macollos diploides, tetraploides y mixoploides). El momento temprano en el que se realizó el análisis podría asegurar, al menos en parte, que si un macollo presenta una conformación (2X, 4X o 2X+4X) toda la planta restante resulte similar a él.

Se analizaron ápices vegetativos de los macollos de las distintas variedades (Fig. 16). Al tomar un macollo éste muere y se pierde dicho material, pero, considerando la salvedad anteriormente mencionada, esto no debe ser un problema.

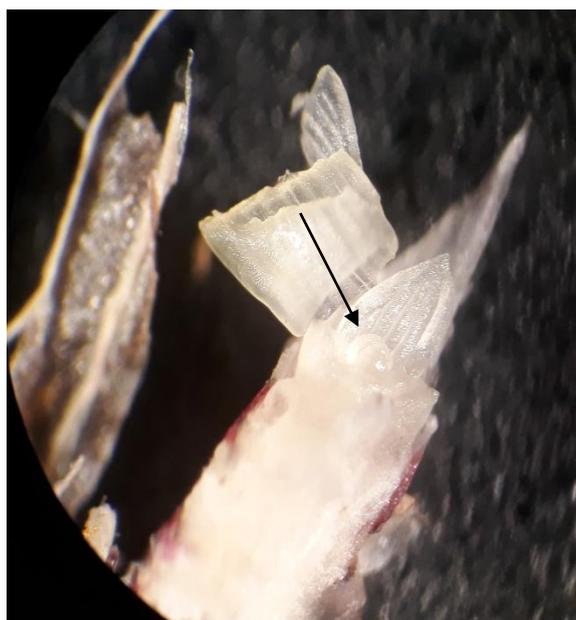


Figura 16. Foto tomada de la lupa, donde la flecha señala el ápice vegetativo, el cual fue extraído para realizar el conteo de los cromosomas.

Se cortaron los tallos de un macollo de cada planta en aproximadamente 1 cm alrededor de la zona donde se encuentra el ápice vegetativo. Para llevar a cabo la etapa de prefijación, estas porciones de tallos se colocaron en tubos eppendorf sumergidos en agua destilada, y fueron llevados a un recipiente de poliestireno expandido con agua y hielo dentro de la heladera, para mantener así una temperatura de 4 °C durante 48 h. En esta etapa se acumula el mayor número de células metafásicas en el meristema.

Para la fijación de los cromosomas, donde se interrumpen rápidamente los procesos vitales, los pequeños tallos fueron retirados con una pinza del agua destilada y colocados en otros tubos eppendorf con solución de Farmer (etanol absoluto y ácido acético glacial en proporción 3:1). Éstos fueron llevados nuevamente dentro del recipiente de poliestireno expandido con agua y hielo a la heladera, almacenados allí durante 24 h (Fig. 17). Luego, con el propósito de destruir la pared celular y poder observarlas bajo el microscopio, se realizó una hidrólisis ácida de 10 minutos con HCl a 60 °C.

Posteriormente se realizó una tinción con fucsina, durante 10-20 min, bajo condiciones de oscuridad, donde los tallos fueron colocados en tubos eppendorf dentro de un cajón. Luego de realizar la tinción, se llevó el tallo a un portaobjetos, se extrajo el ápice con una aguja de disección, se le agregó una gota de ácido acético al 45 %, el cubre objetos y se procedió a realizar el squash sin mover este último.

Finalmente se llevó a cabo el conteo de los cromosomas en el microscopio óptico.



Figura 17. Luego de las 48 h de llevada a cabo la prefijación, los ápices fueron retirados del agua destilada a baja temperatura y colocados en otros tubos eppendorf que contenían la solución de Farmer para realizar la fijación.

Análisis de los granos de polen

Finalizando el ciclo, las plantas que recibieron el primer tratamiento, florecieron y se realizó el análisis de los granos de polen.

Se colectaron las flores próximas a antesis, se colocó una o dos gotas de colorante aceto carmín glicerol en el centro del porta-objeto y sobre ella fue colocado una pequeña cantidad de polen, que fue obtenido bajo lupa (Fig. 18) dando golpes a la antera con una aguja de disección para hacer caer el polen sobre la lámina del porta-objetos.

Se movió ligeramente con una aguja de disección para asegurar una distribución uniforme y luego se cubrió con un cubre-objetos.

Una vez que se lograron los preparados, se realizaron las observaciones en el microscopio óptico.



Figura 18. Observación en lupa de las espiguillas con anteras visibles.

Análisis de las espigas

Las espigas fueron recolectadas alrededor de las 10 de la mañana en estado de espiga embuchada (Fig. 19) y colocadas en una solución fijadora (solución de Farmer: etanol absoluto y ácido acético glacial en proporción 3:1) para analizar posteriormente sus cromosomas en el laboratorio de genética. Luego, se llevó a cabo una hidrolisis ácida de 5 minutos con HCL a 60 °C. Posteriormente, se llevó a tinción con fucsina durante 10-20 min, dentro de tubos eppendorf y guardados en un cajón para obtener oscuridad. Se extrajo el ápice de las espiguillas y luego de un squash, con 2 muestras por portaobjeto en presencia de ácido acético al 45 %, se visualizaron los cromosomas mediante el microscopio óptico.

Las células observadas fueron aquellas que se encontraban en mitosis, en el ápice de las espiguillas, y no las que originarían los granos de polen por meiosis (por una cuestión práctica).



Figura 19. Extracción de espiguillas para la visualización de cromosomas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El primer ensayo para corroborar la ploidía de las variedades entregadas y poner a punto la visualización correcta de los cromosomas de la especie se logró con claridad. Los preparados utilizando la tinción de feulgen fueron de excelente nitidez. Se confirmó que las semillas entregadas eran diploides pudiendo contabilizar de forma sencilla el número cromosómico ($2n = 14$). (Fig. 20)

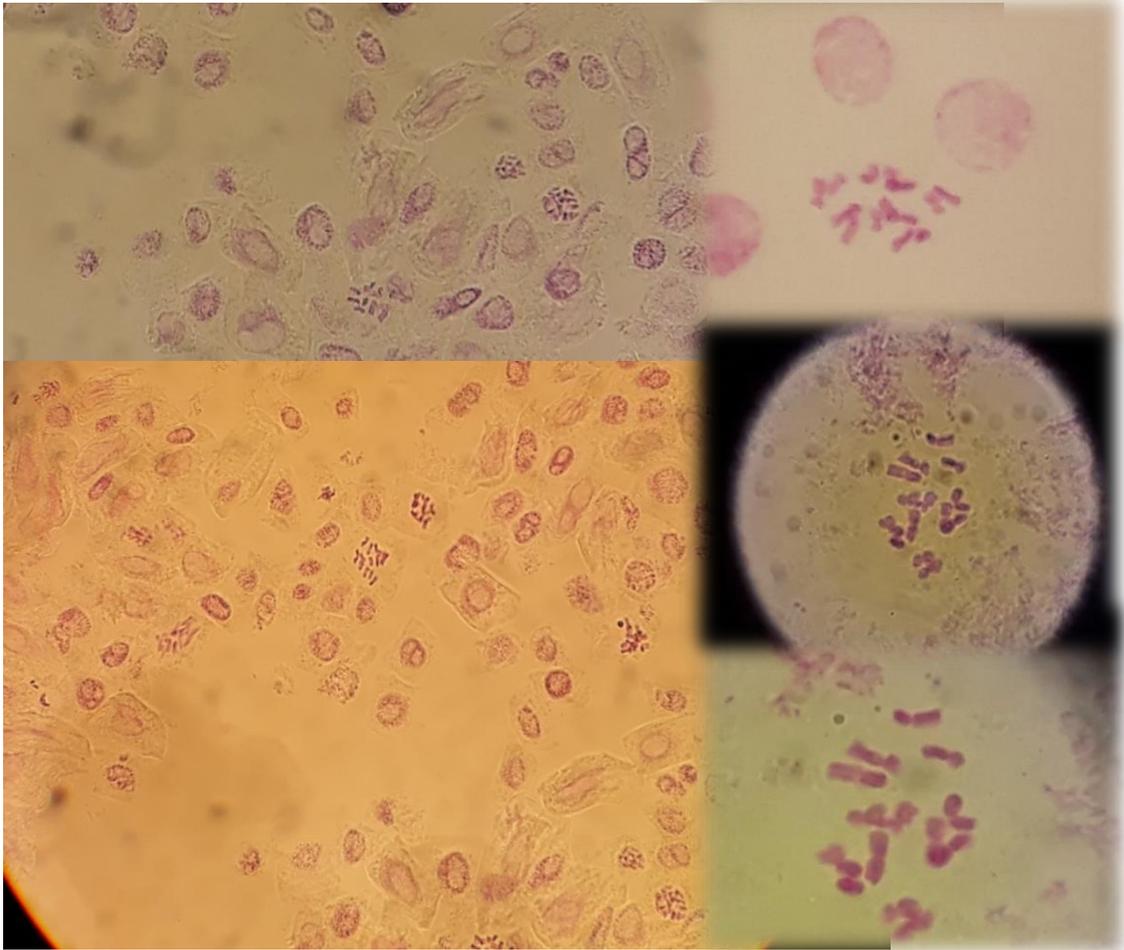


Figura 20. Conteo de cromosomas en el microscopio óptico luego de la tinción con reactivo de feulgen.

La contabilización de cromosomas fue más eficiente cuando la recolección de los meristemas se realizó en los horarios de 9-12 h, con un correcto proceso de prefijación y fijación.

De todos los tiempos de hidrolisis probados (5-10 min), los mejores resultados se obtuvieron con un lapso de 8 min de exposición al HCL.

Tratamientos:

En el **primer tratamiento** se registró un 10 % de mortandad de las plantas que se presentaban en las bandejas. Dicho porcentaje se contabilizó a los 60 días, cuando las plantas tenían el desarrollo suficiente para ser trasplantarlas a las macetas. Si bien no se obtuvieron tetraploides, se encontraron mediante el análisis de ápice vegetativo dos plantas potencialmente mixoploides, que fueron individualizadas en macetas aparte (Fig. 21). Además, se pudieron lograr varios preparados para el conteo de cromosomas donde se contó fácilmente el número cromosómico utilizando como material de partida los ápices vegetativos y/o las espiguillas.



Figura 21. Desarrollo de las plantas mixoploides que fueron colocadas en macetas individuales.

El análisis del tamaño de estomas en las plantas del primer tratamiento, no evidenció diferencias significativas entre los controles y el tratamiento (Fig. 22) y demostró que el programa ImageJ/Fiji 1.46 es adecuado para este tipo de mediciones y de muy fácil aplicación.

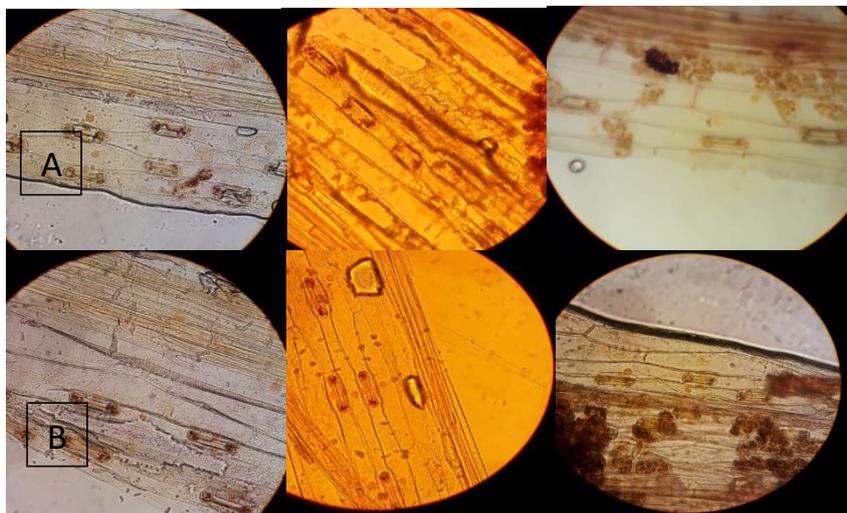


Figura 22. Observación de estomas al microscopio. A. Control B. Tratamiento

Respecto a la utilización de los granos de polen para inferir ploidía, el protocolo llevado a cabo permitió observar fácilmente el tamaño y forma de los granos de polen, pero al no haber cambio en la ploidía, mantuvieron un tamaño uniforme.

En la bibliografía consultada, los tratamientos con colchicina al 0,1 % fueron los que mejor resultado obtuvieron, presentando una supervivencia del 41,8 % y generando 39,7 % de tetraploides (Ramakrishnan, 2004), a diferencia de las plántulas tratadas en nuestro trabajo que 0,1% de colchicina resultó ser una dosis muy baja, ya que no se obtuvieron tetraploides.

Las plántulas del **segundo tratamiento** presentaron malformaciones producto de la severidad del tratamiento (Fig. 23). Aunque se observó un mayor porcentaje de mortalidad en comparación con el primer tratamiento (Tabla 1), debido a una mayor concentración y exposición de colchicina, de todas las plantas analizadas ninguna fue tetraploide.



Figura 23. Plantas creciendo en una placa alveolada al inicio del tratamiento (junio-julio 2019). Nótese el engrosamiento en la base de la planta del centro de la imagen, producto de la intensidad del tratamiento.

Tabla 1. Mortandad observada en Plantas bajo el segundo tratamiento donde se aplicaron dos concentraciones y dos periodos de exposición: 0,2 % de colchicina durante 3 h y 0,1 % de colchicina durante 24 h.

Variedad	Horas de tratamiento	Cantidad de muertes/ 50 plántulas	Porcentaje de mortalidad
2	24	11	22 %
2	3	2	4 %
5	24	13	26 %
5	3	6	12 %
6	24	18	36 %
6	3	6	12 %
7	24	15	30 %
7	3	5	10 %

En algunas plantas de este tratamiento se observaron los cromosomas en los ápices vegetativos, pero no se pudieron observar los granos de polen y conteo de cromosomas en espiguillas, debido a que el año en que se realizó el tratamiento (2019) no florecieron producto de su perennidad, por lo que deberían haberlo hecho a fines del segundo año (2020). Debido a la pandemia COVID19 y la imposibilidad de ingresar a la Universidad Nacional del Sur en ese periodo, estos caracteres no pudieron ser analizados en estas plantas.

El tratamiento realizado por Rosaline *et al.*, 2014 donde se trataron plantas anuales de *Lolium* con colchicina al 0,25%; 0,5 % + 1 % Dimetilsulfoxido (DMSO); 0,25% + 1 % Dimetilsulfoxido y 0,1 % + 1 % Dimetilsulfoxido, arrojó como resultado un porcentaje de plantas poliploides supervivientes de 10 %, 27 %, 24 % y 18 %, respectivamente. Sus resultados mostraron que la adición de DMSO a la colchicina favorece la duplicación de cromosomas en las plantas anuales de raigrás. Se observó la eficacia del procedimiento de duplicación para cuatro tratamientos. De estos, el tratamiento que proporcionó los mejores resultados utilizó colchicina 0,5 % + 1 % de DMSO durante 24 h, y permitió una regeneración del 27 % de plantas con un número de cromosomas duplicado.

En este tratamiento, si bien fue más agresivo, ya que aumentamos la concentración de colchicina, sin el agregado de DMSO, no pudimos observar plantas de *Lolium* poliploides, por lo tanto, el número cromosómico de los individuos tratados no difirió con los controles (Fig. 24).



Figura 24. Numero cromosómico de control y tratamiento 2.

En el **tercer tratamiento**, que correspondió a la inyección de macollos, no se observaron diferencias significativas entre el control y los tratamientos hasta el momento. A pesar de que no se llegó a analizar cromosomas, ni polen, debido al contexto de pandemia, las diferencias que se esperan en los cultivares tetraploides no fueron registradas en éstas plantas (Fig. 25, 26, 27, 28, 29).



Figura 25. Plantas donde se realizó la inyección de macollos, no se observan diferencias entre los controles (izquierda de hilo) y los tratamientos (derecha del hilo). Se encuentran ubicadas una planta de cada variedad divididas por un hilo el control y tratamiento en el orden 7-5-2-6



Figura 26. Variedad 7, control (izquierda del hilo), tratamiento (derecha del hilo)



Figura 27. Variedad 5, control (izquierda) tratamiento (derecha)



Figura 28. Variedad 2 control (izquierda), tratamiento (Derecha)



Figura 29. Variedad 6, control (izquierda), tratamiento (derecha)

Metodologías para inferir ploidía

❖ Medición de estomas:

Si bien se pudieron lograr buenos preparados de tejidos pertenecientes a la cara adaxial de la planta, el tamaño de los estomas observados fue uniforme. El programa ImageJ/Fiji 1.46 permitió medir los estomas con exactitud. Por otro lado, el número de cloroplastos no pudo ser contabilizado por su pequeño tamaño (Fig. 30). Se logró a través de este programa la medición en micrones y la comparación de los tratamientos y los controles de las distintas variedades (Fig. 31, 32).



Figura 32. Epidermis de la cara superior de hojas de Lolium. Las flechas señalan las células guarda de los estomas (de forma alargada, característico de las monocotiledóneas). La medición tomada fue el largo de las células guarda.

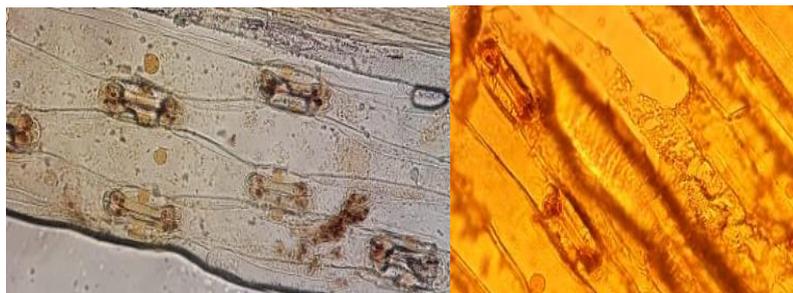


Figura 30. Estomas de los controles

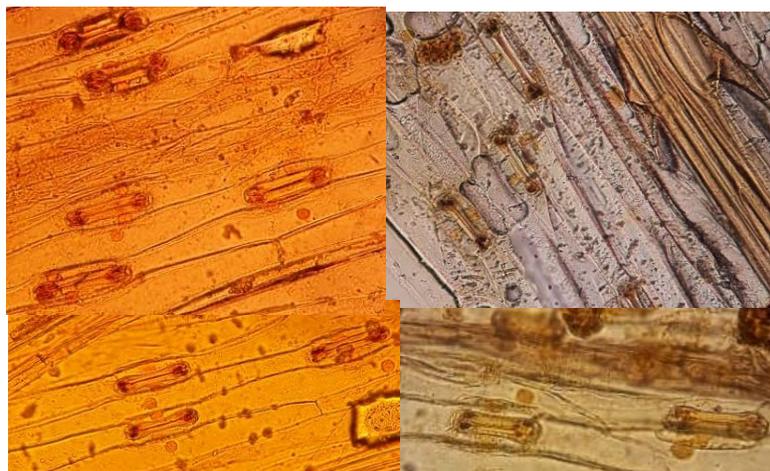


Figura 31. Estomas del tratamiento

❖ Análisis de citometría de flujo:

De todas las plantas pertenecientes al primer tratamiento (0,1 % colchicina durante 3 h. de exposición), fueron seleccionadas 9 candidatas a ser tetraploides, cuyo tamaño de estomas fue analizado, presentando un tamaño mayor al de los controles. También fue seleccionado un control, enviando así 10 plantas para el análisis de citometría de flujo.

La citometría de flujo arrojó 10 histogramas correspondientes a las plantas analizadas, la planta 1 es el control ($2n=2x$). DAPI fue el fluorocromo utilizado para el análisis. En el eje Y se observa el número de eventos analizados por el citocromo para cada concentración de DAPI. (Fig. 33)

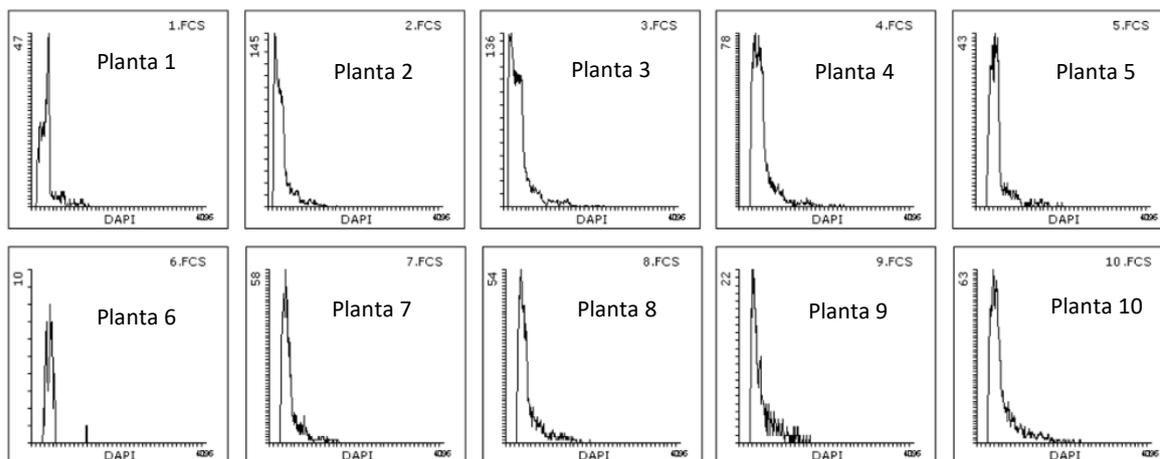


Figura 33. Lo que indica el pico, es el contenido de ADN. Planta 1: control. Planta 2 y 9: pertenecen a la variedad 2. Planta 3, 4, 5: Var 5; Plantas 6, 7, 8 Var 6 y la planta 10: Var 7.

De todos los resultados enviados, la planta número 6, perteneciente a la variedad 6 podría ser presuntamente poliploide ya que como se puede observar en el gráfico, contiene 2 picos (Fig. 34). Una planta tetraploide contiene el doble de cantidad de ADN que una planta diploide, en el histograma se observaría como un pico al doble de distancia del eje Y (lo que corresponde al doble de concentración del fluorocromo).

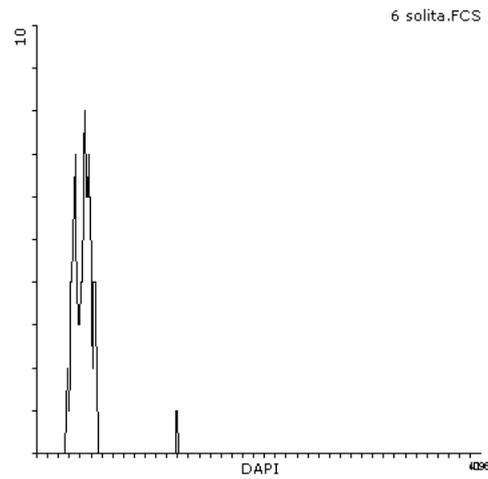


Figura 34. Histograma resultado de la citometría de flujo de la planta número 6

Luego, se realizó nuevamente el análisis de citometría de flujo en esta planta, donde muestra la ausencia de ese segundo pico, confirmando que efectivamente se trata de una planta diploide (Fig. 35). Donde ese segundo pico en el grafico anterior pudo ser producto de un tejido joven en activo crecimiento.

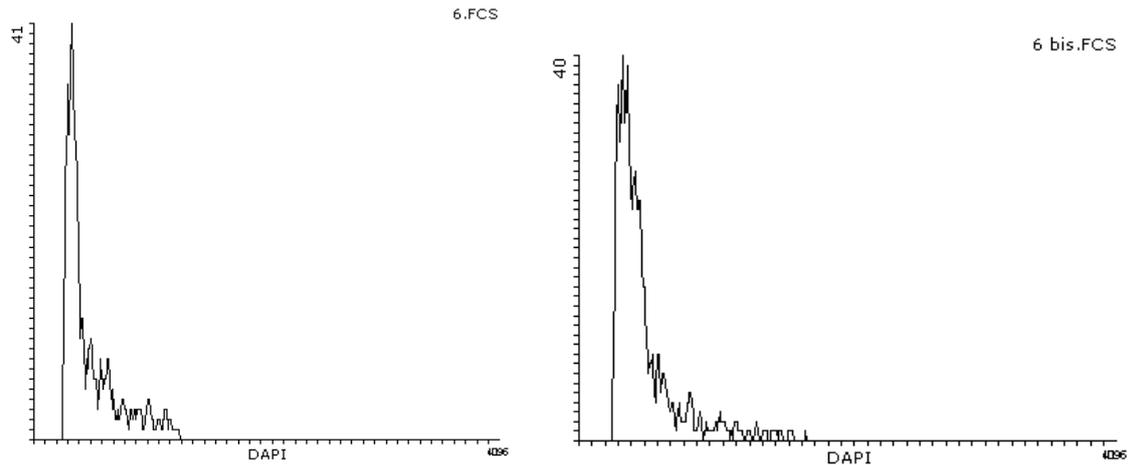


Figura 35. Histograma de planta 6, demostrando la ausencia del segundo pico ya que se trata de una planta diploide.

❖ Análisis de ápices vegetativos en macollos

Todas las plantas analizadas del **primer tratamiento** resultaron diploides, excepto dos que resultaron mixoploides (con células diploides y células tetraploides) cuyas plantas fueron individualizadas en macetas separadas y llevadas al invernadero (Fig. 36).



Figura 36. Planta N° 12 (adelante) y 9 (atrás) colocadas en macetas individuales.

El conteo cromosómico de los ápices vegetativos permitió evidenciar cambios en el número cromosómico. Si bien la calidad de la imagen no permite un conteo de los cromosomas de esta célula, se puede asumir con gran seguridad que no es diploide. El tamaño de los cromosomas difiere entre las dos células debido al diferente grado de condensación y es totalmente natural esta observación (Fig. 37 y 38)

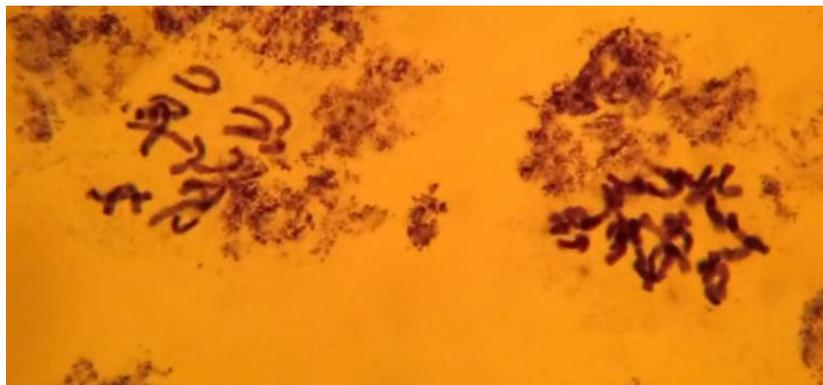


Figura 37. Planta número 12, variedad 5. En esta foto se aprecia una célula diploide (2X) a la izquierda y a la derecha una célula presuntamente tetraploide.

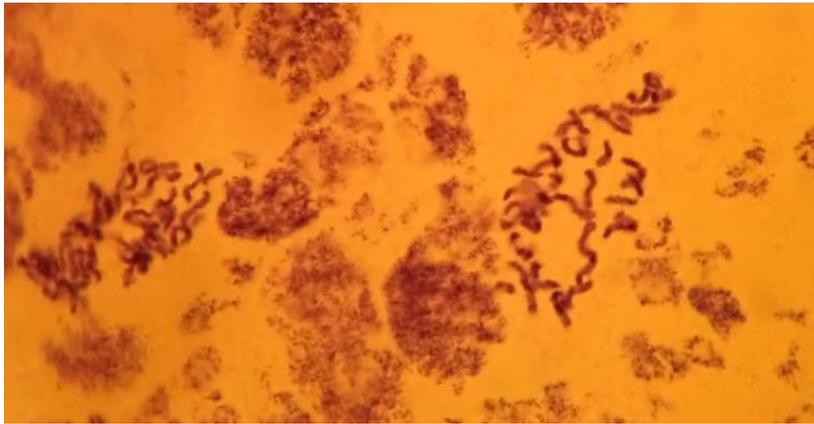


Figura 38. Planta número 9, variedad 2. Se observan células con más de 14 cromosomas.

El conteo de cromosomas de los ápices vegetativos de los macollos **del segundo tratamiento** se pudo llevar a cabo fácilmente con el protocolo desarrollado (Fig. 39). No fueron halladas plantas poliploides.

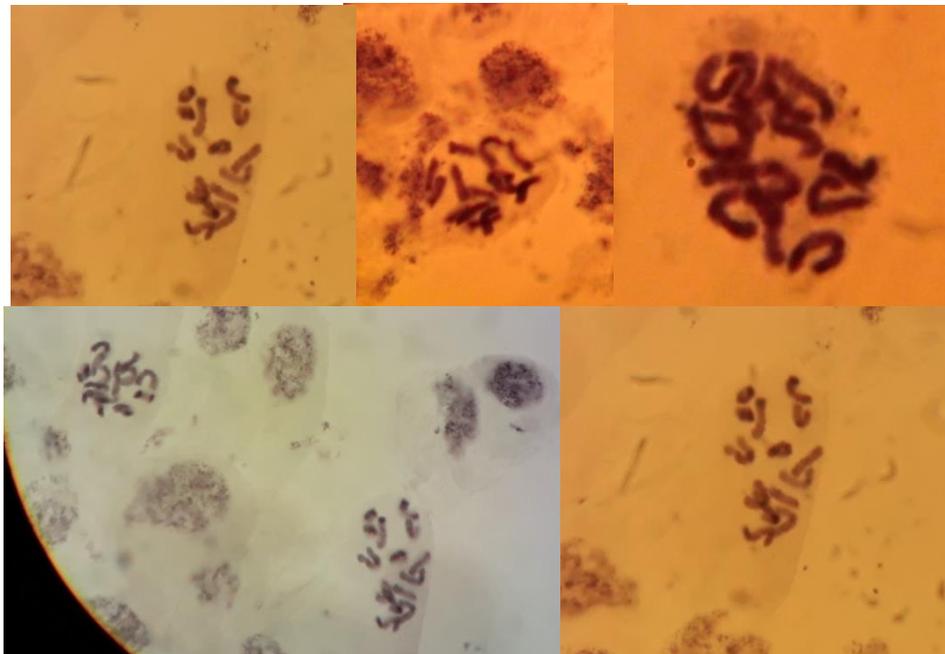


Figura 39. Observación de cromosomas del segundo tratamiento, donde se pueden observar células diploides.

❖ Análisis de polen:

No se encontraron diferencias entre las plantas control y las plantas tratadas. Según Castro y Loureiro (2014), los granos de polen conteniendo gametos no reducidos pueden ser reconocidos por medio de caracterizaciones morfológicas o por citometría de flujo. Dada la fuerte correlación existente entre el tamaño de la célula y el contenido del ADN nuclear (Price *et al.*, 1973), en la mayoría de las especies estudiadas el diámetro del grano de polen diploide ($2n$) tiene un incremento de 30-40 % respecto a granos de polen haploide (n) (Ramsey y Schemske, 1998). Sin embargo, estas diferencias deben evaluarse con cuidado, ya que es posible que no existan en determinados grupos, por ejemplo, gramíneas (Bretagnolle y Thompson, 1995). En los granos de polen analizados en el presente trabajo no se observaron diferencias de tamaño, pudiéndose inferir un mismo grado de ploidía (Fig. 40).

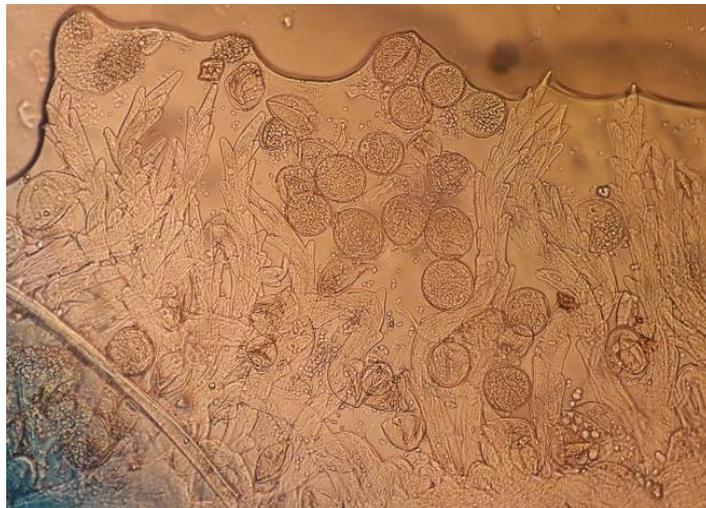


Figura 40. Observación de los granos de polen al microscopio

❖ Análisis de las espigas:

Si bien el análisis de espiguillas en división no evidencio ninguna célula tetraploide, se pudo establecer un protocolo eficiente para la observación y conteo de los cromosomas en los ápices de las espigas. (Fig. 41).



Figura 41. Observación de los cromosomas de las espigas de *Lolium perenne*. Todas las células son diploides ($2n=14$)

En las plantas mixoploides no fue posible realizar los análisis de polen y espiguillas ya que no llegaron a florecer, debido a que para un mayor cuidado permanecieron dentro del invernadero y no fueron llevadas al exterior como las demás plantas del primer tratamiento, resultando esta decisión desfavorable. Por lo tanto, no pudo confirmarse su ploidía.

CONCLUSIONES

Obtención de poliploides

- ✓ De los 3 tratamientos utilizados en este ensayo, el tratamiento 1 generó plantas mixoploides.

Exploración de métodos para inferir ploidía

- ✓ Utilizando los protocolos aquí mencionados se pudieron lograr preparados de alta calidad que permitieron visualizar y medir *el tamaño de los estomas* de *Lolium* mediante el programa con el software ImageJ/Fiji 1.46.
- ✓ El *conteo de cloroplastos* no fue una herramienta recomendable para inferir ploidía en esta especie debido a su diminuto tamaño.
- ✓ Se logró poner a punto la técnica de conteo de cromosomas a través del análisis de los *ápices vegetativos* en esta especie y contabilizar adecuadamente los cromosomas que presentaban las muestras.
- ✓ A través de la técnica de conteo cromosómico en células de *ápices vegetativos* se determinaron dos plantas mixoploides.
- ✓ La técnica de *citometría de flujo* fue altamente confiable para corroborar los resultados de ploidía.
- ✓ El análisis tamaño de *granos de polen* se pudo realizar con sencillez y los mismos se visualizaron de forma muy nítida.
- ✓ Se lograron excelentes preparados con células de *ápices vegetativos*, sin embargo, no se pudieron detectar células poliploides.

Conclusión general

Si bien hasta el momento no se lograron obtener plantas de *L. perenne* tetraploides, este trabajo permitió poner a punto las técnicas que permiten inferir ploidía de forma indirecta y determinar cuál de los tratamientos utilizados para lograr poliploides podría brindarnos mejores resultados.

PROYECCIÓN

En este momento se está llevando adelante nuevos ensayos para poder obtener plantas de *L. perenne* tetraploides.

Para su germinación, siguiendo las normas ISTA, se colocaron 400 semillas de cada variedad (2, 5, 6, 7) en placa de Petri sobre papel absorbente y adecuadas condiciones de humedad a temperatura ambiente durante 10 días (Fig. 42).

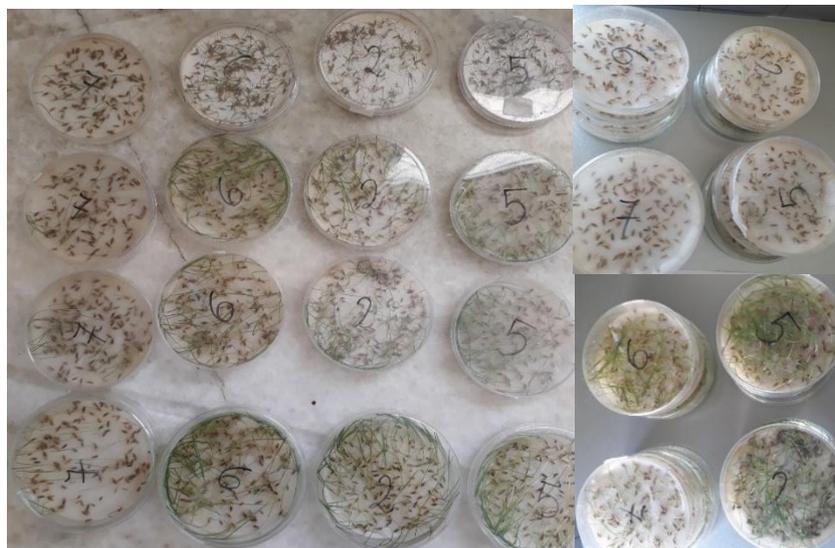


Figura 42. Germinación de las cuatro variedades de *Lolium perenne*

Luego de la germinación se comenzó con los tratamientos, que consistieron colocar las plántulas dentro de cajas de Petri y exponerlas a una concentración de colchicina de 0,2 % durante distintos tiempos de exposición los cuales fueron 6 h, 12 h y 24 h, cubriendo las placas con papel de diario y una caja para brindarle condiciones de oscuridad. También se contó con un control de cada variedad que luego de su germinación fue sumergido en agua destilada (Fig. 43).

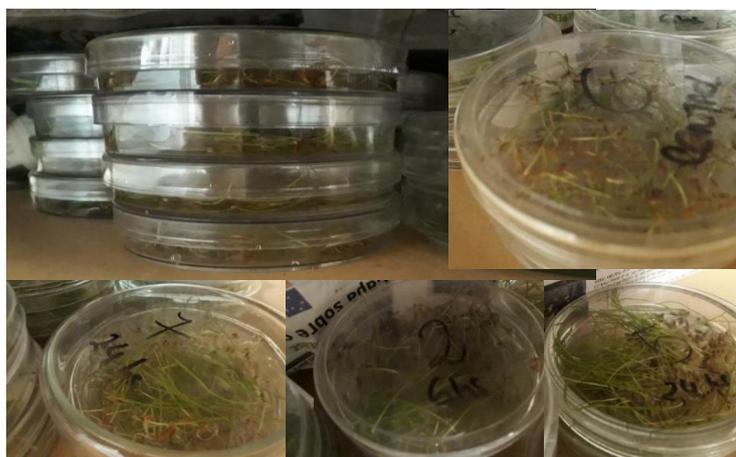


Figura 43. Exposición de las plántulas a la colchicina, excepto el control que se lo colocó en agua destilada.

Una vez cumplido el tiempo, se realizaron 5 lavados con agua destilada y permanecieron dentro de la placa de Petri, sumergidas en una fina capa de agua durante toda la noche (Fig. 44).



Figura 44. Plántulas en agua destilada luego de haber realizado los 5 lavados.

Fueron trasplantadas en bandejas de almácigos con sustrato correctamente señalizadas. Las bandejas contenían 66 alveolos, donde se colocaron 60 plántulas de cada tratamiento (excepto en la variedad 7 con 6 h de exposición que se colocaron 48 plantas debido a su bajo PG) y 6 controles en cada bandeja (Fig. 45).



Figura 45. Plántulas colocadas en las bandejas de almácigos luego de realizados los tratamientos

Las plántulas siguieron su crecimiento en los almácigos, aunque algunas a los pocos días presentaron clorosis total, causando su muerte (Fig. 46).



Figura 46. La mortandad de las plántulas comenzó presentando clorosis en el ápice de los folíolos hasta tornarse clorótica en su totalidad.

Luego de 60 días fueron trasplantadas a macetas y contabilizada su mortandad (Fig. 47 y tabla 2).



Figura 47. Plantas recientemente trasplantadas a macetas.

Tabla 2. Mortandad observada de las variedades 2, 5, 6, 7; en los controles y los tratamientos realizados: 0.2% de colchicina durante 6 h, 12 h, y 24 h de exposición.

Variedad	Plántulas al inicio	Trasplantadas a la maceta	% Mortandad
Controles			
2*	18	5	27,77 %
5	18	15	83,33 %
6	18	10	55,55 %
7	18	10	55,55 %
6 h de exposición			
2	60	52	86,66 %
5	60	30	50,00 %
6*	60	5	8,33 %
7**	48	21	43,75 %
12 h de exposición			
2	60	28	46,00 %
5	60	11	18,33 %
6	60	8	13,00 %
7	60	8	13,00 %
24 h de exposición			
2	60	20	33,33 %
5	60	5	8,33 %
6	60	11	18,33 %
7	60	7	11,66 %

*Las variedades 2 control y 6 con 6 h de exposición, presentan una elevada mortandad producto de una alta exposición al sol directo que recibieron en el momento de la germinación.

** La variedad número 7 comenzó con 48 plántulas al inicio debido a que presentó bajo poder germinativo sin poder completar la bandeja de 60 alveolos.

Actualmente, las plantas se encuentran en estado de 4 hojas prontas a macollar y algunas comenzando a mostrar su primer macollo. Una vez que esto ocurra y los macollos tengan el desarrollo suficiente, se tomaran muestras de los ápices vegetativos de los macollos y se analizará el número cromosómico siguiendo el protocolo mencionado en el trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- ALCÁNTAR V. J. P. 2014. La poliploidía y su importancia evolutiva. *Temas de Ciencia y Tecnología*. 18(54): 17-29.
- BALFOURIER, F.; IMBERT, C.; CHARMET, G. 2000. Evidence for phylogeographic structure in *Lolium* species related to the spread of agriculture in Europe: a cpDNA study. *Theoretical and Applied Genetics* 101: 131–138.
- BARBOSA S, DAVIDE LC, PEREIRA AV AND ABREU JC. 2007. Duplicação cromossômica de híbridos triploides de capim elefante e milheto. *Bragantia* 66: 365-372.
- BEDDOWS, A.R. 1967. Biological flora of the British Isles. *Lolium perenne* L. *Journal of Ecology* 55: 567-587.
- BLANC G & WOLFE KH. (2004) Widespread paleopolyploidy in model plant species inferred from age distributions of duplicate genes. *Plant Cell* 16: 1667–78
- BRETAGNOLLE, F., THOMPSON, J.D. 1995. Gametes with the somatic chromosome number: mechanisms of their formation and role in the evolution of autopolyploid plants. *New Phytologist* 129:1–22.
- CABRERA, A; ZARDINI, E. 1978. Manual de la flora de los alrededores de Buenos Aires. Buenos Aires. ACME. 715pp.
- CABRERA, AL Y ZARDINI, EM. 1993. *Manual de la flora de los alrededores de Buenos Aires*. Segunda edición. Editorial ACME, Buenos Aires. 755 pp.
- CAMPOS JMS, DAVIDE LC, SALGADO CC, SANTOS FC, COSTA P N, SILVA PS, ALVES CCS, VICCINI LF AND PEREIRA AV. 2009. *In vitro* induction of hexaploid plants from triploid hybrids of *Pennisetum purpureum* and *Pennisetum glaucum*. *Plant Breeding* 128: 101-104.
- CASTRILLO, J.,BODNER, M., THEILL, E., DEERINCK, T., ELLISMAN, M., KARIN, M. 1988. Factores específicos de la transcripción. Biblioteca nacional de medicina de los EE. UU. Instituto Nacional de Salud. *Engl. J Med. Nov* 4; 55(3): 505-18.PubMedPMID: 2902927.28. Strasburger, E. Tratado de botánica. 8va. Ed. castellana. Ediciones Omega S.A.1994.
- CASTRO, S., LOUREIRO, J. 2014. El papel de la reproducción en el origen y evolución de las plantas poliploides. ISSN 1697-2473 CFE – Centro de Ecología Funcional, Departamento de Ciências de la Vida, Universidade de Coimbra, Calçada Martim de Freitas, 3000-456 Coimbra, Portugal.
- CATULLO, J.; VALLETI, O.; RODRIGUEZ, E. 1982. Relevamiento de malezas en cultivos comerciales de trigo y girasol en el centro sur bonaerense. IX Reunión Argentina de Malezas y su Control ASAM. Santa Fe. *Malezas* 11: 204-235.
- CUI LY, WALL PK, LEEBENS-MACK JH, LINDSAY BG & SOLTIS DE. 2006. Widespread genome duplications throughout the history of flowering plants. *Genome Res.* 16:738–49
- DELGADO ML., URIBE LASTRA M., QUÍMICO, M. MARULANDA ANGEL ML, Estandarización de la técnica citogenética “squash” para conteo de cromosomas mitóticos EN *Rubus glaucus* Benth, *Scientia et Technica* Año XVII, No 46, Diciembre de 2010 Universidad Tecnológica de Pereira

- DHOOGHE E, VAN LAERE EK, EECKHAUT T, LEUS L AND VAN HUYLENBROECK J. 2011. Mitotic chromosome doubling of plant tissues *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 104: 359-373.
- DOLEZ EL J, GREILHUBER J, SUDA J (2007) Flow cytometry with plant cells: analysis of genes, chromosomes and genomes. WileyVCH, Weinheim
- ELLIOT, F. 1967. Citogenética y mejoramiento de plantas. Continental. México. 474.
- FERREIRA T. Y RASBAND W, 2012. ImageJ/Fiji 1.46. <http://imagej.nih.gov/ij/download.html>.
- FRASCAROLI CJ., ROLANDO RO., BADIALI OJ., CORAGLIO JC., LOVEY RJ., AKMANDOZ MC. 1990. Descripción y evaluación de un método de tratamiento con colchicina en híbridos de trigo (*Triticum aestivum* L.) por centeno (*Secale cereale* L.). *Rev. Cs Agropec VII*: 41-44. Cordoba.
- FUTUYMA D. J. 2005. Evolution. Tercera Edición. Sinauer Ass., Sunderland, Massachusetts. 603 pp.
- GAMIETTE F., F. BAKRY y G. Ano. 1999. Ploidy determination of some yam species (*Dioscorea* spp.) by flow cytometry and conventional chromosomes counting. *Genetic Res. Crop. Evol.* 46: 19-27.
- GANTAIT S, MANDAL N, BHATTACHARYYA S, DAS PK. 2011. Induction and identification of tetraploids using *in vitro* colchicine treatment of *Gerbera jamesonii* Bolus cv. Sciella. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 106 (3):485-493.
- GAUT BS & DOEBLEY JF. 1997. DNA sequence evidence for the segmental allotetraploid origin of maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:6809–14
- GRZEBELUS E. AND A. ADAMUS 2004. Effect of anti-mitotic agents on development and genome doubling of gynogenic onion (*Allium cepa* L.) embryos. *Plant Science* 167 (3): 569-574.
- HEGARTY, M.J., HISCOCK, S.J. 2008. Genomic clues to the evolutionary success of review polyploid plants. *Current Biology*. Vol. 18. 435-444.
- HUMPHREYS, M. O. 1991: The value of polyploidy in breeding hybrid grasses. Proceedings of the XVII meeting of the fodder crops section of Eucarpia, Alghero (Italy) 14-18 October. Pp. 37-44.
- HUMPHREYS M, FEUERSTEIN U, VANDEWALLE M AND BAERT J. 2010. Ryegrasses. In Boller B, Posselt UK, Veronesi F (eds.) *Handbook of plant breeding: fodder crops and amenity grasses*. Springer, New York, p. 211-260.
- INDA ARAMENDIA, LA. 2005. El género *Lolium*. Claves dicotómicas. *Revista de la Real Academia de Ciencias. Zaragoza* 60: 143-155.
- ISHIGAKI G, GONDO T, SUENAGA K AND AKASHI R. 2009. Induction of tetraploid ruzigrass (*Brachiaria ruziziensis*) plants by colchicine treatment of *in vitro* multiple-shoot clumps and seedlings. *Grassland Science* 55: 164-170.
- ISTILART, C. 1991. Relevamiento de malezas en cultivos de trigo en los partidos de Tres Arroyos, G. Chaves y Necochea. XII Reunión ASAM 2: 87-96.

- ISTILART, C.; YANNICCARI, M. 2012. Análisis de la evolución de malezas en cereales de invierno durante 27 años en la zona sur de la pampa húmeda argentina. *Revista Técnica Especial: Malezas problema (Aapresid)*: 47-50.
- KLECKNER, N. 1996. Meiosis: how could it work? *Proceedings of the National Acad Sciences*, Vol. 93, pp. 8167-8174.
- LAVANIA, U.C. 2005. Genomic and ploidy manipulation for enhanced production of phytopharmaceuticals. *Plant Genetic Resources* 3: 170- 177.
- LEGARDA-LÓPEZ, D., G. Benavides-Cuesta, y H. Ruiz-Erazo. 2015. Respuesta del pasto raigrás Aubade (*Lolium* sp.) a dosis de silicio en interacción con diferentes dosis de NPK. *Biotechnol. Sector Agropecu. Agroind.* 13(1):99-109.
- LEVIN, D.A. 2002. *The role of chromosomal change in plant evolution*. New York: Oxford University Press
- LEWIS, R.J. 2009. *Hawey Diccionario de Química y Productos Químicos*. Ediciones Omega, 1512 págs.
- LÓPEZ, J. 2009. Estudio de los recursos fitogenéticos del complejo *Festuca - Lolium*. Tesis Ph.D., Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, ESP.
- MACMILLAN, C., C. BLUNDELL & R. KING. 2005. Flowering of the grass *Lolium perenne*. Effects of vernalization and long days on gibberellin biosynthesis and signaling. *Plant Physiology* 138: 1794-1806.
- MADLUNG, A. 2013. Polyploidy and its effect on evolutionary success: old questions revisited with new tools. *Heredity*. Vol. 99-104.
- MÁRQUEZ-S.S. & D. I. E. ZABALA. 2007. División Celular <http://genomasur.com/lecturas/Guia12b.htm> (ultimo acceso 17 de noviembre de 2015).
- MASTERSON J. 1994. Stomatal size in fossil plants: evidence of polyploidy in majority of angiosperms. *Science* 264:421-23
- MOLERO, P., T. & MATOS A. 2008. Efectos de la inducción artificial de la poliploidía en plantas de Aloe vera (L.). *Revi Cy HLUZ. Boletín Centro de Investigaciones Biológicas Venezuela* 42(1):111-133.
- NAIR, R. 2004. Developing tetraploid perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) populations. *N.Z. J. Agric. Res.* 47:45-49.
- NAVARRO L. C. 2009. TEMA 28: La División Celular: mitosis y citocinesis. <http://mural.uv.es/monavi/disco/primer/biologia/Tema26.pdf> (ultimo acceso 16 de Noviembre del 2015)
- ORILLO M., BONIERBALE. 2009. M., Manual Técnico. Biología reproductiva y citogenética de la papa. Centro Internacional de la Papa (CIP) Cap2: pág. 10-11.
- OTTO, S.P. 2007. The evolutionary consequences of polyploidy. *Cell*. Vol. 131(3). 452-462.
- OTTO, S.P., WHITTON J. 2000. Polyploid incidence and evolution. *Annual Review of Genetics*. Vol. 34. 401-437.

PATERSON AH, BOWERS JE & CHAPMAN BA. 2004. Ancient polyploidization predating divergence of the cereals, and its consequences for comparative genomics. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 101:9903–08

PEREIRA R, FERREIRA M, DAVIDE L, PASQUAL M, MITTELMANN A, TECHIO V. 2014. Chromosome duplication in *Lolium multiflorum* Lam. *Crop Breed ApplBiotechnol* 14:251–255

PEREIRA RC., CHAMMA DAVIDE L., TECHIO VH., OLIVEIRA TIMBÓ AL. 2012. Duplicação cromossômica de gramíneas forrageiras: uma alternativa para programas de melhoramento genético *Ciência Rural*, vol. 42, núm. 7, julio, pp. 1278-1285 Universidade Federal de Santa Maria Santa Maria, Brasil (2012).

PRICE, H.J., SPARROW, A.H., NAUMAN, A.F. 1973. Correlations between nuclear volume, cell volume and DNA content in meristematic cells of herbaceous angiosperms. *Experientia* 29:1028-1029.

QUESENBERRY KH, DAMPIER JM, LEE YY, SMITH RL AND AEUÑA CA (2010) Doubling the chromosome number of bahiagrass via tissue culture. *Euphytica* 175: 43-50.

RAMAKRISHNAN M. NAIR. 2004. Developing tetraploid perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) populations, *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 47:1, 45-49, DOI:10.1080/00288233.2004.9513569

RAMÍREZ G. F., V. ROBLEDO T., R. FOROUGHBAKHCH P., A. BENAVIDES M. & M. A. ALVARADO V. 2013. Viabilidad de Polen, Densidad y Tamaño de Estomas en Autotetraploides y Diploides de *Physalis ixocarpa*. *Botanical Sciences* 91 (1): 11-18.

RAMSEY, J., SCHEMSKE, D.W. 1998. Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 29:467-501.

RANNEY, T.G. 2006. Polyploidy: From evolution to new plant development. *Combined Proceedings International Plant Propagators' Society*. Vol. 56. 137-142.

RAUF S, ORTIZ R, MALINOWSKI DP, CLARINDO WR, KAINAT W, SHEHZAD M, WAHEED U, HASSAN SW. Poliploidía inducida: una herramienta para el mejoramiento de especies forrajeras. *Agricultura*. 2021; 11 (3): 210. <https://doi.org/10.3390/agriculture11030210>.

ROBERTIS D. Y ROBERTIS M. 1987 *Cell and molecular biology*. Lea & Febiger. p. 734.

ROSALINE CP., MENDES FERREIRA MT., DAVIDE CL., PASCUAL M., MITTELMANN A., TECHIO VH. 2014. Chromosome duplication in *Lolium multiflorum* Lam. *Cop Breeding and Applied Biotechnology* 14: 251-255.

ROY AT, LEGGETT G, KOUTOULIS A (2001) In vitro tetraploid induction and generation of tetraploids from mixoploids in hop (*Humulus lupulus* L.). *Plant Cell Rep* 20:489–495. doi:10.1007/s002990100364

RYAN, F.P. 2006. Genomic creativity and natural selection: a modern synthesis. *Biological Journal of the Linnean Society*. Vol. 88. 655-672.

SATTLER MC, CARVALHO CR, CLARINDO WR. The polyploidy and its key role in plant breeding. *Planta*. 2016 Feb; 243(2):281-96. doi: 10.1007/s00425-015-2450-x. Epub 2015 Dec 29. PMID: 26715561.

SCHNEIDER J., URETA MS. Ensayo de poliploidización en trébol rojo (*Trifolium pratense*) mediante la utilización de colchicina. III Jornadas Regionales de Genética del Litoral 28 Y 29 de junio 2018.

SIMMONDS N. 1948. Genetical and cytological studies of Musa x. estomatal size and plant vigour in relation to polyploidy. *J. Genet.* 49:57-68.

SMITH, K., R. SIMPSON, R. CULVENOR, M. HUMPHREYS, M. PRUD'HOMME, AND R. ORAM. 2001. The effects of ploidy and a phenotype conferring a high water soluble carbohydrate concentration on carbohydrate accumulation, nutritive value and morphology of perennial ryegrass (*Lolium perenne*). *J. Agric. Sci. (Cambridge)* 136:65-74.

SOLTIS DE, ALBERT VA, LEEBENS-MACK J. 2009. Polyploidy and angiosperm diversification. *Am J Bot* 96:336–348. doi:[10.3732/ajb.0800079](https://doi.org/10.3732/ajb.0800079)

SOUZA-KANESHIMA AM, RISSO-PASCOTTO C, PAGLIARINI MS AND VALLE CB. 2010. Meiotic behaviour in the first interspecific hybrids between *Brachiaria brizantha* and *Brachiaria decumbens*. *Plant Breeding* 129: 186-191.

STEADMAN, K., A. CRAWFORD, & R. GALLAGHER. 2003. Dormancy release in *Lolium rigidum* seeds is a function of thermal after-ripening time and seed water content. *Functional Plant Biology* 30: 345-352.

STUPAR RM, BHASKAR OB, YANDELL BS, RENSINK WA, HART AL, OUYANG S, VEILLEUX RE, BUSSE JS, ERHARDT RJ, BUELL CR & JIANG J. 2007. Phenotypic and transcriptomic changes associated with potato autopolyploidization. *Genetics* 176: 2055–67

SUGIYAMA, S. 2006. Responses of shoot growth and survival to water stress gradient in diploid and tetraploid populations of *Lolium multiflorum* and *L. perenne*. *Grassland Sci.* 52:155-160.

TERRELL, E. 1968. A taxonomic revision of the genus *Lolium*. Technical Bulletin No 1392. Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture. *U.S. Government Printing Office*, Washington DC. 73 pp.

THOROGOOD, D Y HAYWARD, MD. 1991. The genetic control of self-compatibility in an imbred line of *Lolium perenne* L. *Heredity* 67: 175-181.

Winchester, A. M. 1981. Genética. Compañía Editorial Continental. Tercera Edición. México. 576 p

YANNICCARI, M. & A. ACCIARESI. 2013. Perennial weeds in Argentinean crop systems: biological and ecological characteristics and basis for a rational weed management. En: Gorawala, P. & S. Mandhatri (editores): *Agricultural Research Updates Vol. 5*. Nova Science Publishers. Nueva York. 176pp.

YU J, WANG J, LIN W, LI SG & LI H. 2005. The genomes of *Oryza sativa*: a history of duplications. *PLoS Biol.* 3:e38