

Caracterización cariotípica y molecular de plantas fuera de tipo en algunos genotipos inestables de trigo pan (*Triticum aestivum* L.)



Alumna: Lorena Laura Musotto

Directora: Dra. Mónica Poverene

2007

Agradecimientos

Este trabajo forma parte de una investigación en curso por convenio entre la UNS, el Criadero de Cereales de la Asociación de Cooperativas Argentinas y la Universidad De Lleida Lleida- IRTA (Institut de la Recerca Tecnologica i Agroalimentaria), España. Quiero expresar mi gratitud a los que hicieron posible la realización del mismo:

A la Dra. Mónica Poverene, por sus valiosas enseñanzas y su dedicación; y al Ing. Miguel Cantamutto, por darme la oportunidad para desarrollar este trabajo.

A mis compañeros del laboratorio, Soledad, Agustina y Alejandro, quienes me acompañaron y ayudaron incondicionalmente.

A mi familia, en especial a mis padres y a mi hermano Sebastián, por alentarme a estudiar durante todos estos años.

A mis amigos, que siempre están conmigo y me brindan su cariño.

Indice

Agradecimientos	1
Resumen	3
Introducción	4
Materiales y métodos	
La especie en estudio	7
Análisis cariotípico	8
Análisis molecular	9
Resultados	11
Discusión	16
Bibliografía	20

RESUMEN

Algunas líneas de trigo pan de alto potencial de rendimiento presentan dificultades de registro y conservación varietal por la aparición de plantas fuera de tipo (PFT) en forma recurrente. Se estudiaron tres generaciones de una línea inestable, sus parentales y dos variedades con inestabilidad fenotípica en dos ambientes de rendimiento medio contrastante (Cabildo, Argentina $\sim 1 \text{ t ha}^{-1}$ y Gimeneles, España $\sim 6 \text{ t ha}^{-1}$). A partir de floración (estadio Z6.5, escala de Zadoks) las PFT se identificaron por su mayor altura. Se caracterizaron los alelos de los loci Rht-B1 y Rht-D1 de los cromosomas 4B y 4D y Rht8 del cromosoma 2D, relacionados con altura de planta, a partir de DNA de tejido foliar. Se cultivaron en invernáculo cinco descendientes de cada PFT y de sus respectivos controles normales para diagnosticar aneuploidía en células madres del polen, mediante fijación en mezcla Farmer y tinción con orceína lactopropiónica. Todos los genotipos presentaban el gen de enanismo Rht-D1b(4D) pero la altura de planta osciló entre 38 y 108 cm, debido presuntamente a su fondo genético y al ambiente. Las plantas aneuploides fueron más altas, presentando una mayor altura al último nudo, un pedúnculo más largo en todos los ambientes y acumularon más biomasa que las normales, especialmente en el peor ambiente. Las PFT de origen desconocido que presentaron un comportamiento intermedio en los rasgos estudiados, podrían deberse a una variabilidad encubierta, polinización cruzada, mutaciones o pérdida de información genética.

INTRODUCCIÓN

El trigo pan (*Triticum aestivum* L.) es una especie anual, originaria de Medio Oriente, alopoliploide ($2n = 6X = 42$) con un número básico $x = 7$. Las variedades cultivadas exhiben una meiosis estable formando sólo bivalentes en meiosis, lo que se traduce en una completa fertilidad. Esta normalidad en el comportamiento meiótico es esperable a nivel del alopoliploide porque está controlada genéticamente por la acción del gen *Ph* (situado en el brazo largo del cromosoma 5 de la serie B) que evita el apareamiento homeólogo. Sin embargo, ocurren fallas en el apareamiento cromosómico durante la profase meiótica conducentes a irregularidades diversas (Maich y Manero de Zumelzú 2007).

La aneuploidía representa una categoría de mutación donde el número cromosómico es anormal. El estado aneuploide $2n - 1$ se denomina monosómico porque sólo está presente una copia de un cromosoma concreto. Debido a su naturaleza poliploide el trigo es relativamente tolerante a las aneuploidías.

Se asume que las gametas femeninas desprovistas de un cromosoma son transmitidas en el 75% de la descendencia, es decir que no hay una selección en contra de los óvulos monosómicos. Contrario a esto, la transmisión de gametas masculinas deficientes es del 4%, por lo cual el polen con $n=21$ cromosomas está fuertemente favorecido respecto al de $n=20$. En base a esta información, en la progenie de la autofecundación de los monosómicos se espera que se produzcan los siguientes números cromosómicos:

Femenino	Masculino	
	$n = 96\%$	$n - 1 = 4\%$
$n = 25\%$	$2n = 24\%$	$2n - 1 = 1\%$
$n - 1 = 75\%$	$2n - 1 = 72\%$	$2n - 2 = 3\%$

Teóricamente, la transmisión del carácter monosómico a la progenie ocurre con una frecuencia de alrededor del 73% (Gupta 1991).

Los genes de enanismo (*Rht*) se han asociado con grandes incrementos en la producción ya que evitan el “vuelco” de la planta, siendo más resistente al daño causado por el viento y la lluvia, e incrementan el índice de cosecha (peso de la espiga/peso total de la planta). Los

alelos Rht B1b y Rht D1b fueron incorporados por la “Revolución Verde” mediante cruzamientos con la variedad japonesa Norin 10, se localizan en los cromosomas 4B y 4D respectivamente (Gale y Marshall 1976). Ambas mutaciones Rht-B1b y Rht-D1b reducen la habilidad de la planta para responder al ácido giberélico (GA). Al conferir insensibilidad al GA, estos genes tienen efectos pleiotrópicos en el crecimiento de la planta reduciendo la longitud del coleoptile y el área foliar de la plántula. Otros genes de enanismo que no confieren insensibilidad a las giberelinas serían más convenientes al reducir la altura final de la planta sin comprometer su crecimiento temprano. Entre los genes de enanismo que responden al GA están los genes Rht9 y Rht8, este último ubicado en el cromosoma 2D e introducido en Europa mediante otra variedad japonesa, Akakomugi (Borojevic y Borojevic, 2005). Estos genes de enanismo no afectan la longitud del coleoptile ni el vigor de la plántula. En síntesis, los alelos Rht B1b y Rht D1b y el gen Rht8 se utilizan para regular la altura en trigos modernos.

Un objetivo de los programas de reproducción y purificación de semillas del trigo pan es el desarrollo de cultivares uniformes. Algunas líneas de alto potencial de rendimiento presentan dificultades de registro y conservación varietal por la aparición de plantas fuera de tipo (PTF) en forma recurrente. La carencia de uniformidad podría ocurrir debido a la fecundación cruzada, mezclas mecánicas o aneuploidía (Storlie et al. 1996). La condición monosómica para los cromosomas 4B o 4D explicaría la presencia de plantas anormalmente altas por pérdida de los alelos Rht1 de semi-enanismo. A su vez, la expresión del carácter fuera de tipo más alto estaría condicionada por la calidad del ambiente. La última suposición planteada es que las plantas altas fuera de tipo euploides tendrían un patrón de expresión diferente de los genes de enanismo que las plantas de altura normal.

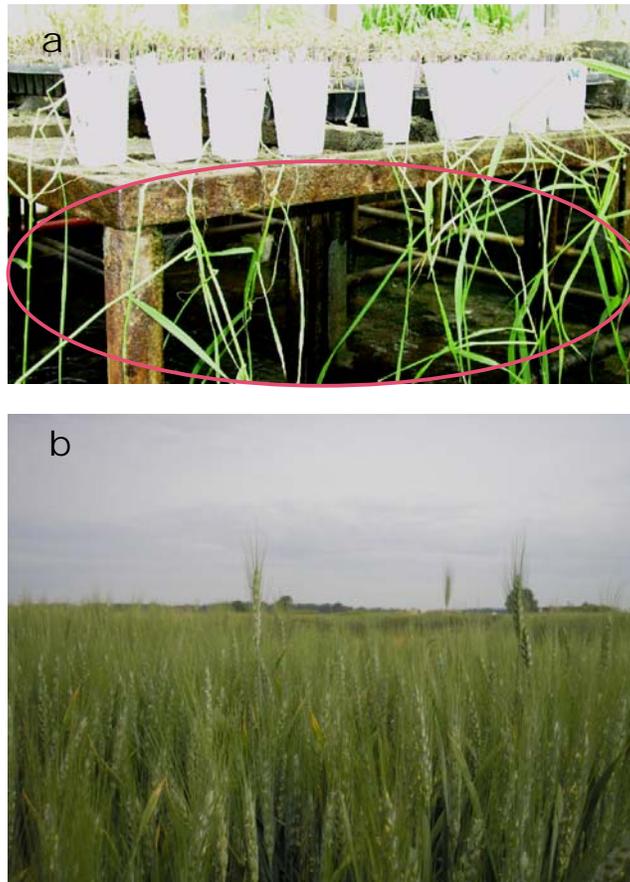
Basándose en estas hipótesis, el objetivo general del trabajo es establecer las relaciones entre diferentes caracteres fenotípicos agronómicos, el cariotipo y características del genotipo de las plantas consideradas.

Objetivos específicos

- Estudiar la frecuencia y manifestación fenotípica de plantas fuera de tipo bajo condiciones ambientales contrastantes.
- Efectuar recuentos cromosómicos en progenies de plantas normales y fuera de tipo, lo que permitirá diagnosticar la monosomía en la planta parental.

- Comparar la variación alélica de plantas normales y fuera de tipo en los genes de enanismo que principalmente determinan el carácter en las variedades de trigo pan.

Figura 1. a) Plantas de morfología acodada. b) Vista de plantas altas fuera de tipo en el campo experimental de Gimeneles riego.



Como ya se mencionó, a los fines de caracterizar las plantas en cuestión es necesario analizar los alelos de los loci Rht-B1 y Rht-D1 de los cromosomas 4B y 4D y el gen Rht8 del cromosoma 2D relacionados con la altura de la planta, como así también examinar distintos caracteres fenotípicos de interés. Por ello en este trabajo se contempla el análisis de caracteres morfológicos y moleculares. Para este último se utilizaron marcadores moleculares que permiten diferenciar los alelos salvaje y mutante para los genes de semi-enanismo Rht-B1 y Rht-D1. Estos marcadores se localizan en regiones homeólogas de los cromosomas 4B y 4D (Ellis et al. 2002). Para el estudio del gen Rht8 se utilizaron microsatélites. Ambas técnicas involucran la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La reacción de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) consiste en el acoplamiento y extensión enzimática de un par de oligonucleótidos (pequeñas moléculas de ADN de cadena simple) utilizados como iniciadores (“primers”) que delimitan la secuencia de ADN blanco de la amplificación. Dado que la multiplicación de estas secuencias a lo largo de diversos ciclos de desnaturalización, acoplamiento y extensión es de progresión geométrica, se pueden obtener así millones de copias de un segmento específico a partir de una pequeña cantidad de ADN molde. Esto permite que los fragmentos de ADN sean fácilmente detectados a simple vista en el gel de electroforesis a través de colorantes específicos como el bromuro de etidio, lo cual hace que las técnicas basadas en PCR sean efectivamente poco costosas y requieran poco tiempo de desarrollo (Ferreira y Grattapaglia, 1996).

En particular, los microsatélites (SSR) son regiones genómicas hipervariables constituidas por repeticiones en tándem de secuencias de 1 a 4 nucleótidos de largo. Están distribuidos en todo el genoma y son muy polimórficos. La base genética del polimorfismo detectado se basa en la variabilidad del número de repeticiones en tándem y consecuentemente del tamaño del microsatélite amplificado en individuos de una especie. Las regiones conteniendo secuencias simples repetidas son amplificadas por PCR utilizándose un par de oligonucleótidos específico (de 20 a 30 pares de bases) complementarios a las secuencias que flanquean al microsatélite. El microsatélite amplificado por PCR es sometido a electroforesis en geles de alta resolución que permiten detectar diferencias de 2, 3 o 4 nucleótidos que corresponden al mínimo polimorfismo de longitud en un microsatélite. Por el alto polimorfismo que presentan por locus (multiallelismo) se los considera ideales para solucionar problemas de bajos niveles de diversidad genética en el germoplasma cultivado. Estos marcadores son codominantes y brindan un alto contenido de información (PIC) pero tienen la desventaja de que requieren una gran cantidad de trabajo previo para desarrollar los marcadores (Picca et al. 2004).

MATERIALES Y MÉTODOS

La especie en estudio

Las plantas de *Triticum aestivum* son anuales, de cerca de 1 m de altura, con hojas planas y espigas densas. Las espiguillas son trifloras, solitarias, dispuestas apretadamente sobre un raquis articulado o continuo. La raquilla está articulada por encima de las glumas. Estas

últimas son rígidas, carenadas, con 3 o más nervaduras, mucronadas, dentadas o aristadas en el ápice. Presenta lemmas anchas, carenadas, multinervadas, puntiagudas o aristadas (Cabrera 1953).

Se realizó un estudio de tres generaciones de una línea inestable de *T. aestivum* (ID2144), sus parentales (cvs. Hans Parulla y Marca) y dos variedades con inestabilidad fenotípica (ACA 223 y cv. Calquín) las que se ensayaron en dos ambientes de rendimiento medio contrastante (Cabildo, Argentina $\sim 1 \text{ t ha}^{-1}$ y Gimeneles, España $\sim 6 \text{ t ha}^{-1}$). En estas plantas se midieron las variables fenotípicas altura total de la planta, altura y largo del pedúnculo, cantidad de granos por espiga, peso del grano, biomasa de la planta e índice de cosecha. También se cultivaron en invernáculo cinco descendientes de cada PFT y de sus respectivos controles normales colectados en floración (Cantamutto, 2006).

Los datos obtenidos para las variables fenotípicas cuantitativas fueron sometidos a análisis de la varianza (ANOVA). Debido a la existencia de diferencias entre los valores medios, éstos se compararon mediante la prueba de Tukey con $P \leq 0.05$.

Análisis cariotípico

El estudio de los cromosomas meióticos se realizó a partir de inflorescencias, las cuales fueron colectadas en el estadio de bota (cuando la espiga se visualizó en la porción hinchada de la vaina foliar) e inmediatamente fijadas en mezcla Farmer (etanol y ácido acético glacial 3:1 v/v) durante 24 horas, a temperatura ambiente y conservadas en etanol 70% a 4° C. Para realizar el estudio citológico, las espigas fueron hidratadas en dos pasos sucesivos: en etanol 40% durante 10 minutos y luego en agua destilada. Se realizaron disecciones de varias espículas de cada espiga hasta encontrar el estado de maduración apropiado para la diagnosis. Este puede ser estimado a través del tamaño de las anteras, aunque puede variar en distintos cultivares. Los preparados se obtuvieron por aplastado de las anteras o “squash” y tinción con orceína lactopropiónica 2% o carmín acético 1%. Finalmente, se observaron al microscopio óptico células madres del polen para determinar su cariotipo.

Análisis molecular

Se caracterizaron los alelos de los loci Rht-B1 y Rht-D1 de los cromosomas 4B y 4D y Rht8 del cromosoma 2D, relacionados con altura de planta, a partir de DNA de tejido foliar. Las hojas jóvenes de las plantas cultivadas en el invernáculo se congelaron a -80°C . La extracción de ADN se realizó a partir de 100 mg del tejido foliar y fue necesario pulverizar la muestra en un mortero de porcelana con nitrógeno líquido. Para la obtención de ADN se siguió un protocolo CTAB (Hoisington *et al.* 1994). El ADN así extraído fue cuantificado mediante espectrofotómetro, midiendo la absorbancia a 260 nm de longitud de onda y obteniendo la concentración de ADN de la muestra mediante la expresión:

$$[C]= A_{260} \times \text{factor de dilución} \times 50 \mu\text{g/ml}$$

donde A_{260} es el valor de la absorbancia a esa long. de onda y la constante 50 $\mu\text{g/ml}$ es la concentración de ADN de doble cadena que genera un valor de absorbancia = 1.

Para evaluar la pureza de las muestras de ADN se calculó la relación A_{260}/A_{280} y se verificó que el ADN no estuviera fragmentado mediante electroforesis en gel de agarosa 1%.

Se analizaron marcadores moleculares basados en PCR para detectar los genes de enanismo Rht-B1b y Rht-D1b (Figura 2). Las amplificaciones se llevaron a cabo en un volumen total de 20 μl , conteniendo 100 ng de ADN molde, 10 pmoles de cada primer (F y R, 30 ng) y 20 pmol de la combinación de iniciadores DF2-WR2, 1 unidad de *Taq* polimerasa (Biotools, 5 un./ μl), 2 μl 1 Buffer 10X (Biotools) y 4 nmol dNTP. Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador PTC-100 de MJ Research, Inc utilizando iniciadores diseñados especialmente (Tabla 1) y un programa modificado del perfil de reacción descrito por Ellis *et al.* (2002). Este consiste en 5 min de desnaturalización inicial a 94°C , 7 ciclos “touchdown” de 30 seg a 94°C , 30 seg a 65°C y 1 min 20 seg a 72°C con 1°C de disminución en la temperatura de “annealing” en cada ciclo; 30 ciclos de 15 seg a 94°C , 15 seg a 58°C y 50 seg a 72°C .

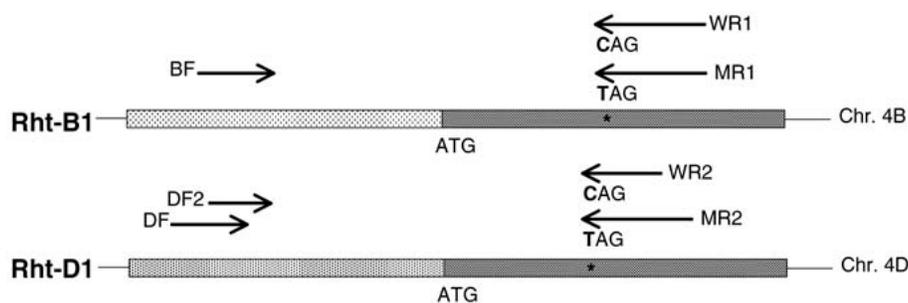


Figura 2: Base genética de los marcadores utilizados (tomado de Ellis et al. 2002).

Para los primers DF2-WR2 la amplificación se realizó utilizando el siguiente programa descrito por Ellis *et al.* (2002): 5 min a 95 °C, 42 ciclos de 20 seg a 94 °C, 30 seg a 58 °C, 10 seg a 72 °C y un paso final de 72 °C durante 2 min. Los productos de amplificación se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa 1.5% p/v preparado con buffer TAE 1X, con el agregado de 0.175 µg de bromuro de etidio por ml de gel. Se sembraron 12 µl de producto de reacción y 4 µl de buffer de siembra. Como marcador de peso molecular se utilizó un ladder de 100 bp DNA (PBL Productos Bio-Lógicos. Universidad de Quilmes). La electroforesis se desarrolló a voltaje constante de 80 V por 150 minutos. Las bandas de los marcadores moleculares así logradas se visualizaron con luz UV y se registraron con cámara digital.

Tabla 1. Nombre y secuencia de bases de los iniciadores utilizados.

Iniciador	Secuencia
BF	5'-GGTAGGGAGGCGAGAGGCCGAG-3'
DF	5'-CGCGCAATTATTGGCCAGAGATAG-3'
DF2	5'-GGCAAGCAAAGCTTCGCG-3'
MR1	5'-CATCCCCATGGCCATCTCGAGCTA-3'
WR1	5'-CATCCCCATGGCCATCTCGAGCTG-3'
MR2	5'-CCCCATGGCCATCTCGAGCTGCTA-3'
WR2	5'-GGCCATCTCGAGCTGCAC-3'

La caracterización del gen Rth8 ubicado en el cromosoma 2D fue realizada a través del análisis de marcadores microsatélites (Korzun et al. 1998):

WMS261 CTCCTGTACGCCTAAGGC /CTCGCGCTACTAGCCATTG

WMS296 AATTCAACCTACCAATCTCTG /GCCTAATAAACTGAAAACGAG

En 20 μ l finales de mezcla de reacción PCR se colocaron 100 ng de DNA molde, 20 pmol de cada primer (F y R) 1 unidad de polimerasa Taq (Biotools, 5 un./ μ l), 2 ul Buffer 10X (Biotools) y 4 nmol dNTP. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 45 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 55°C (o variando según la temperatura de “annealing”), 2 min a 72°C y un paso de extensión final de 10 min a 72°C. Los productos se separaron en geles de agarosa 1,5% y visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio.

RESULTADOS

En el análisis citogenético, las plantas normales exhibieron una meiosis estable formando sólo bivalentes (Figuras 3-a y 3-b) mientras que las aneuploides monosómicas presentaron irregularidades en la misma. Algunas de las anomalías observadas fueron: univalentes en metafase I, cromosomas rezagados en anafase I y micronúcleos en cuartetos (Figuras 3 c - h).

Una PTF fue calificada de aneuploide (A) si entre sus descendientes se halló al menos una planta aneuploide; caso contrario se consideró como de genotipo desconocido.

El cariotipo de las plantas estudiadas estuvo estrechamente correlacionado a algunos caracteres fenotípicos (tabla 2). En particular, hay una asociación entre la condición aneuploide y la aparición de plantas fuera de tipo. El análisis estadístico de los datos mediante ANOVA y la comparación de medias demostró diferencias altamente significativas en muchas de las variables estudiadas ($p < F$ del ANOVA y $p < 0,05$ respectivamente) entre las plantas normales, fuera de tipo y de cariotipo desconocido. Las plantas aneuploides fueron más altas, presentando una mayor altura al último nudo, un pedúnculo más largo en todos los ambientes y acumularon más biomasa que las normales, especialmente en el peor ambiente (Figura 1). Las espigas fueron más largas y presentaron mayor número de granos en las plantas de cariotipo anormal. Las PFT de origen desconocido presentaron un comportamiento intermedio en los rasgos estudiados.

Figura 3. Meiosis en trigo. a) Metafase y anafase normales, b) Cuartetos normales, c) Univalente en metafase I, d) Univalente fuera de la placa metafísica, e) Cromosomas rezagados, f) Cromosoma rezagado en anafase I, g) Micróspora con micronúcleo, h) Granos de polen con micronúcleos.

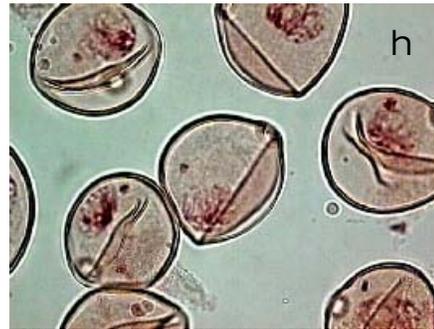
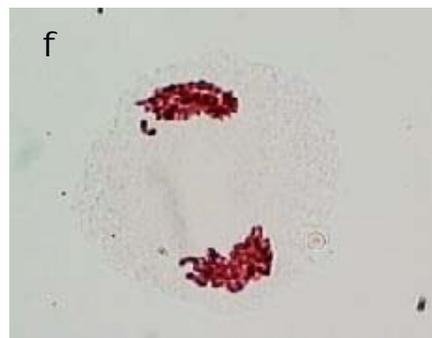
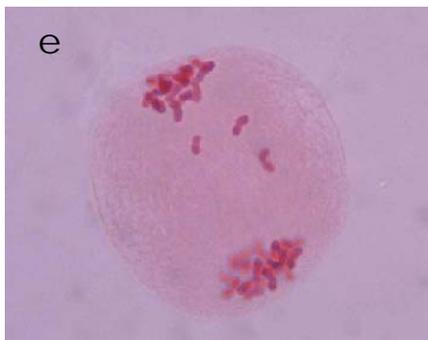
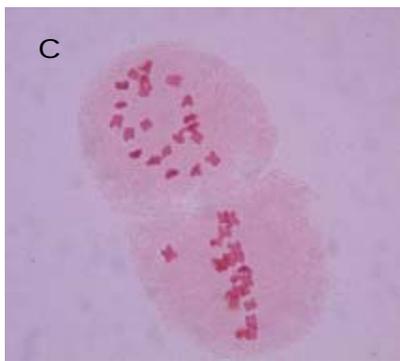
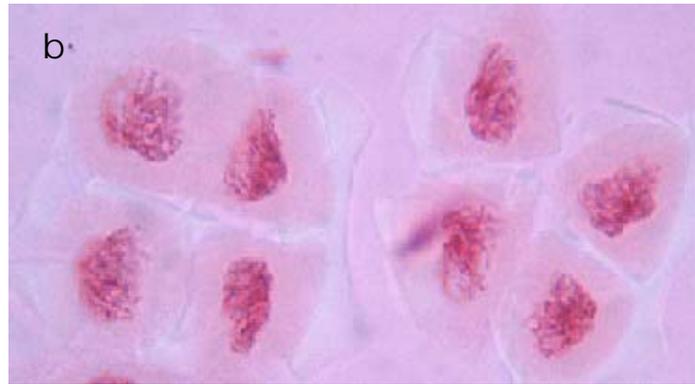


Tabla 2. Caracterización en cosecha de plantas normales (N), fuera de tipo (ft) aneuploides (A) y ft de cariotipo desconocido (D) en tres genotipos de trigo en dos ambientes contrapuestos. Dentro de cada grupo se indica la p<F del ANOVA, medias con igual letra no difieren para p<0,05 (de Poverene et al. 2007).

		ALTTOT	ALPED	LARPED	LARESP	GRESP	BIOMGR	BIOMPL	IC
		cm			n	mg	g	%	
Cabildo									
ACA 223	N	38 b	21 b	9 b	7 b	4 c	25 b	1,16 c	5 b
	D	46 b	20 b	18 a	8 ab	13 b	28 b	2,05 b	28 a
	A	59 a	28 a	20 a	12 a	41 a	37 a	3,83 a	36 a
		**	**	**	*	**	**	**	**
CALQUIN	N	43 b	22 b	13	8 b	15	23 b	1,86 b	21
	D	58 a	31 a	16	11 a	21	33 a	3,45 a	18
	A								
		**	**	ns	**	ns	**	**	ns
ID-2144	N	35 b	17 b	10 b	8 b	13 b	27 c	1,88 c	19 b
	D	52 a	26 a	16 a	9 a	32 a	30 b	3,12 a	30 a
	A	53 a	28 a	16 a	10 a	28 a	34 a	2,84 b	36 a
		**	**	**	**	**	**	**	**
Gimenells riego									
ACA 223	N	89 b	40 b	38 b	10	38	30 b	2,56 b	40
	D	107 a	54 a	43 a	10	38	37 a	3,16 ab	41
	A	108 a	58 a	41 ab	10	44	33 ab	3,28 a	41
		**	**	**	ns	ns	**	**	ns
CALQUIN	N	79 b	36 b	35	8 b	34 b	31 b	2,05 b	45
	D	94 a	49 a	36	9 a	46 a	43 a	3,86 a	48
	A	98 a	53 a	37	9 a	41 ab	35 b	2,99 c	44
		**	**	ns	*	**	**	**	ns
ID-2144	N	74 b	35 b	32 b	8	39 b	32 b	2,27 b	48 b
	D	87 a	44 a	35 a	8	45 a	37 a	3,08 a	50 a
	A	89 a	45 a	35 a	9	48 a	36 a	3,33 a	49 ab
		**	**	**	ns	**	**	**	**

ALTTOT: altura total de la planta, ALPED: altura del pedúnculo, LARPED: largo del pedúnculo, LARESP: largo de la espiga, GRESP: granos por espiga, BIOMGR: peso del grano, BIOMPL: peso de la planta e IC: índice de cosecha.

Al comparar las variedades en los distintos ambientes, ACA 223 en el menos favorable presentó diferencias altamente significativas en las variables altura total de la planta, altura y largo del pedúnculo, cantidad de granos por espiga, biomasa de los granos y de la planta e índice de cosecha entre plantas normales y aneuploides, mientras que se encontraron diferencias significativas en el carácter longitud de la espiga. En Gimennells riego, ACA 223 se comportó diferente ya que no se hallaron diferencias en el largo de la espiga, cantidad de granos por espiga e índice de cosecha, mientras que en el resto de los rasgos las diferencias fueron altamente significativas. En Cabildo, Calquín mostró diferencias altamente significativas en los caracteres altura total de la planta y del pedúnculo y biomasa de los granos y de la planta, y no se diferenciaron en varias de las variables: longitud del pedúnculo y de la espiga, cantidad de granos por espiga e índice de cosecha. En Gimennells, en cambio, esta variedad se diferenció significativamente en la longitud de la espiga y muy significativamente en la cantidad de granos por espiga. En Cabildo, en ID-2144 se encontraron diferencias altamente significativas en cada una de las variables fenotípicas analizadas, mientras que en Gimennells se hallaron estas mismas diferencias a excepción de la longitud de la espiga.

Análisis molecular

Se analizaron los patrones obtenidos para los genes Rht-1B y Rht-1D con siete iniciadores. Todos los individuos produjeron patrones constantes. Tanto las plantas normales como fuera de tipo presentaban en su genotipo el alelo normal Rht-1Ba en el cromosoma 4B y todas amplificaron el alelo Rht-1Db que codifica el gen de enanismo del cromosoma 4D (Figuras 4 y 5).

En el análisis del microsatélite WMS261 del cromosoma 2D los materiales dieron fuerte señal para el gen de enanismo Rht8, con una banda principal y tres bandas secundarias (Figura 6).

El microsatélite WMS296 dio una señal fuerte correspondiente al cromosoma 2D en todos los materiales. Algunos materiales mostraron una segunda señal correspondiente al cromosoma 2A (Figura 7).

Todos los genotipos presentaron el gen de enanismo Rht-D1b(4D) pero la altura de planta osciló entre 38 y 108 cm, debido presuntamente a su fondo genético y al ambiente.

Figura 4. Análisis del gen Rht-1B en una planta normal y una fuera de tipo de los genotipos Marca (1-2; 10-11), Hahn's Parulla (3-4; 12-13), Calquín (5-6; 13-14) y ID2144 Pos (7-8; 15-16). De 1 a 8 se amplificó el alelo Rht-1Bb que codifica el gen de enanismo (No hubo señal). De 9 a 16 se amplificó el alelo normal Rht-1Ba (Todos los genotipos dieron señal).



Figura 5. Análisis del gen Rht-1D en una planta normal y una fuera de tipo de los genotipos Marca (1-2), Hahn's Parulla (3-4), Calquín (5-6) y ID2144 Pos (7-8).

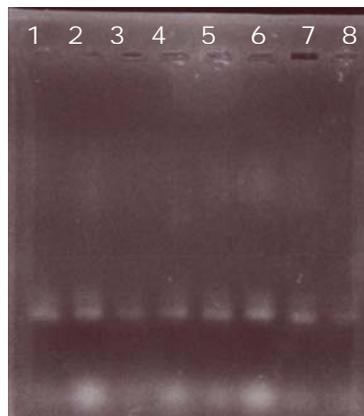


Figura 6. Análisis del microsatélite WMS261 del cromosoma 2D en una planta normal y una fuera de tipo de los genotipos Marca (1-2), Hahn's Parulla (3-4), Calquín (5-6) y ID2144 Pos (7-8).

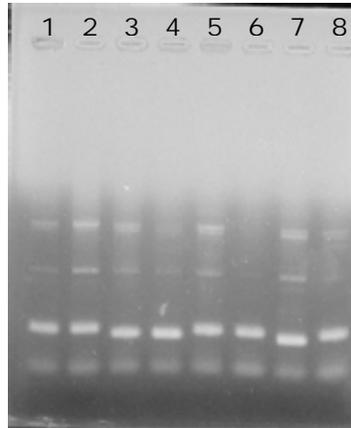
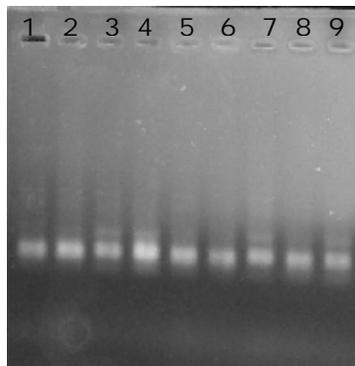


Figura 7. Análisis del microsatélite WMS296 en una planta normal y una fuera de tipo de los genotipos Marca (1-2), Hahn's Parulla (3-4), ACA223 (5-6) y ID2144 Pos (7-8-9, esta última es otra planta normal).



DISCUSIÓN

La pureza de las semillas ha sido un requisito controlado oficialmente para el comercio en la mayoría de los países productores de trigo. A causa de esto, sólo una frecuencia muy baja de PFT se tolera en la multiplicación de semillas. Tradicionalmente, dichas plantas se han atribuido a la mezcla de variedades, a cruza naturales o a plantas voluntarias (plantas nacidas espontáneamente de las semillas caídas durante la cosecha). Sin embargo, recientemente se ha informado que muchas variedades presentan altos porcentajes de plantas fuera de tipo

aparentemente debido a aneuploidía. Las plantas altas han sido el fenotipo anormal más común observado en variedades semi-enanas (Suárez 1986).

La variación de los caracteres fenotípicos en los cultivares considerados puede ser explicada debido a los niveles de aneuploidía observados. El estudio citológico es una herramienta útil en la diagnosis del cariotipo de las plantas de interés. Del análisis de distintos caracteres agronómicos se desprende que las plantas aneuploides fueron más altas en todos los casos y que acumularon más biomasa que las normales, especialmente en el peor ambiente. El comportamiento intermedio en los rasgos estudiados que presentaron las PFT de origen desconocido, podría deberse a una variabilidad encubierta, polinización cruzada, mutaciones o pérdida de información genética.

En el trigo, el apareamiento de los cromosomas homólogos consta de tres estadios. El primer evento que puede ser detectado en estudios de pintado de cromosomas (painting) es el reconocimiento y asociación de dominios de cromosomas homólogos que sucede durante la interfase anterior al leptoteno. El segundo paso en el proceso de apareamiento es la organización de los cromosomas en “filamentos”, como se reconocen en preparaciones teñidas convencionalmente, y el alineamiento de secuencias homólogas durante el leptoteno y el temprano zigoteno. En el tercer estadio de apareamiento, los cromosomas homólogos establecen sinapsis y se forma un complejo sinaptonémico tripartito durante el zigoteno. En muchos casos, la sinapsis comienza en la región telomérica (Schwarzacher 1997).

En la meiosis de plantas monosómicas el univalente no puede alinearse en la placa metafásica debido a la ausencia de co-orientación proporcionada por el cromosoma homólogo. Por este motivo, el cromosoma queda rezagado en anafase I, dando lugar a la formación de un micronúcleo en las cuartetos de las micrósporas hijas (Gupta 1991). En algunos casos, los micronúcleos no pueden ser detectados debido a la presencia de DNAsas citoplasmáticas que digieren el DNA.

Una de las hipótesis que se plantearon fue que las plantas altas fuera de tipo eran monosómicas para alguno de los cromosomas portadores de genes de enanismo, 4B, 4D o 2D. En los análisis moleculares efectuados se pudo determinar que tanto las plantas normales como fuera de tipo presentaban en su genotipo el alelo normal Rht-1Ba en el cromosoma 4B y el alelo Rht-1Db que codifica el gen de enanismo del cromosoma 4D y, a pesar de ello, la

altura de las plantas osciló entre 38 y 108 cm. Esta falta de concordancia puede deberse al fondo genético de las mismas y al ambiente. Los resultados sugieren que la condición monosómica del cromosoma 4D que contiene el alelo mutante Rht-1Db conduciría a plantas anormalmente altas. En este caso, la expresión molecular tanto de plantas de fenotipo normal como monosómicas no difiere ya que ambas originan una banda electroforética, en las primeras producto de dos fragmentos del mismo tamaño molecular. En las plantas nulisómicas no aparecerían bandas debido a que carecen de las dos copias del alelo Rht-1Db (Tabla 3). Sin embargo, estas plantas se presentan en proporciones muy bajas (aproximadamente 3%). Es por esta razón que se deberían evaluar molecularmente un número de muestras muy elevado para identificar plantas nulisómicas. Además, las plantas altas fuera de tipo euploides pueden poseer un patrón de expresión de los genes de enanismo diferente de las plantas de altura normal, por ejemplo a causa de mutaciones.

Tabla 3. Resultados moleculares esperados en base al cariotipo de los ejemplares en estudio.

Fenotipo	Número cromosómico	Expresión molecular
Normal	2n = 42 disómico	1 banda (homocigota).
Fuera de tipo	2n = 41 monosómico	1 banda (hemicigota).
Fuera de tipo	2n = 40 nulisómico	No se observan bandas.

En base a las observaciones realizadas de las células madres de las micrósporas se encontraron menos monosómicos que las proporciones esperadas (73%). De 178 descendientes analizados, se hallaron 71 normales y 73 aneuploides. A pesar de que se recolectaron botones de varios tamaños a partir de cada planta, en varios casos no se encontró ninguno en un estadio adecuado: o bien la microsporogénesis aún no había comenzado, o bien el polen de pared muy resistente ya se había formado. Por ello, en 34 plantas no se pudo evaluar la meiosis.

La aptitud biológica de la mayoría de los monosómicos es aproximadamente la misma que las plantas euploides o aún mayor. Las plantas altas fuera de tipo persisten en cada generación a pesar de los esfuerzos de eliminarlas ya que la condición aneuploide ocurre al azar y algunos monosómicos surgen "de novo". El uso preferencial de líneas Rht2Rht2 minimizaría la frecuencia de aneuploides que inducen PFT (Storlie 1996).

Tanto en Gimennells riego como en Cabildo, en las tres variedades analizadas se encontraron diferencias altamente significativas entre plantas normales y aneuploides en los rasgos altura total de la planta, altura del pedúnculo y biomasa de los granos y de la planta. Por lo tanto, estas variables fueron más indicativas de la condición aneuploide. El cromosoma ausente probablemente contiene los genes de enanismo que afectan los caracteres fenotípicos mencionados anteriormente.

En general, los caracteres fenotípicos resultaron significativamente asociados al número cromosómico en el ambiente más pobre mientras que en el ambiente más rico esta asociación fue menos estrecha. Esto indicaría que el ambiente puede determinar una expresión diferencial de la aneuploidía en el fenotipo. Cabe señalar que en el cultivar Calquín solamente se pudieron observar plantas aneuploides en el ambiente bajo condiciones de riego lo cual coincide con lo informado en la bibliografía. La expresión del carácter fuera de tipo más alto está condicionada por la calidad del ambiente. Así, las irregularidades meióticas resultarían altamente influenciadas (Maich y Manero de Zumelzú 2007).

La proporción de plantas fuera de tipo fue más elevada en el mejor ambiente, posiblemente porque existieron menos limitantes para la expresión del potencial de crecimiento del cultivo y los rasgos distintivos fueron más marcados (Cantamutto 2006). En este sentido, las plantas anormales fueron identificadas más claramente en el ambiente de mayor rendimiento.

Las PTF aparecen en forma recurrente en ciertas variedades de trigo. Los mejoradores deberían considerar la utilización de genes de enanismo alternativos o educar a los productores y agencias de certificación de semillas de que las plantas fuera de tipo serían una característica inherente e inevitable de ciertas variedades de trigo semienano (Storlie 1993).

BIBLIOGRAFÍA

- Borojevic K. and K. Borojevic. 2005. Historic role of the wheat variety Akakomugi in Southern and Central European Wheat Breeding Programs. *Breeding Science* 55:253-256.
- Cabrera, A.L.. 1953. Manual de la flora de los alrededores de Buenos Aires. Editorial Acme S. A. Buenos Aires.
- Cantamutto M.A. 2006 Caracterización fenotípica de plantas anormales (“fuera de tipo”) en algunos genotipos inestables de trigo panadero (*Triticum aestivum* L.) Universitat de Lleida. Centro UdL-IRTA, Lleida, España,
- Ellis M.H., Spielmeier W., Gale K.R., Rebetzke G.J., Richards R.A. 2002 “Perfect” markers for the Rht-B1b and Rht-D1b dwarfing genes in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 105: 1038-1042.
- Ferreira, M. E. y D. Grattapaglia. 1996. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 2º Ed. EMBRAPA-CENARGEN, Brasília, 220 p.
- Gale, M.D. and G.A. Marshall. 1976. The chromosomal location of *Gai* and *Rht1*, genes for gibberellin insensitivity and semidwarfism, in a derivative of Norim 10 wheat. *Heredity* 37:283-289.
- Gupta P.K. 1991 Cytogenetics of wheat and its close wild relatives - *Triticum* and *Aegilops*. In: *Chromosome Engineering in Plants: Genetics, Breeding, Evolution, Part A* (P.K. Gupta and T. Tsuchiya, Eds.) Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, pp. 243-262.
- Hoisington, D., M. Khairallah, D. González de León. 1994. Laboratory protocols: CIMMYT applied molecular genetics laboratory. 2º Ed. CIMMYT, México, D. F., 72 p.
- Korzun, V., M. S. Röder, M. W. Ganal, A. J. Worland and C. N. Law. 1998. Genetic analysis of the dwarfing gene (Rht8) in wheat. Part I. Molecular mapping of Rht8 on the short arm of chromosome 2D of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet.* 96: 1104-1109.

- Maich R. y D. Manero de Zumelzú. 2007. Índice meiótico en *Triticale* hexaploide. Análisis y corrección. *Journal of Basic & Applied Genetics* 18 (1): 23-27.
- Picca A., M. Helguera, N. Salomón, A. Carrera. 2004. Marcadores moleculares. En: *Biotecnología y mejoramiento vegetal*. Ediciones INTA, 446 p.
- Poverene M., Musotto L., Sagarzazu I., Martín Sanchez J. y Cantamutto M. 2007. Caracterización fenotípica, cariotípica y molecular de plantas fuera de tipo en algunos genotipos inestables de trigo pan. *J. Basic & Applied Genetics* 18 (Supplement II) p. 164.
- Schwarzacher, T. 1997. Three stages of meiotic homologous chromosome pairing in wheat: cognition, alignment and synapsis. *Sex Plant Reprod* 10:324–331.
- Storlie E. W. and L. E. Talbert. 1993. Cause of Tall Off-Types in a Semiwarf Spring Wheat. *Crop Science* 33: 1131-1135.
- Storlie E. W., H. Xie and L. E. Talbert. 1996. Tall Off-Types in Semidwarf Spring Wheat with Height-Reducing Genes *Rht1* and *Rht2*. *Crop Science* 36: 1521-1522.
- Suárez, E. Y. and E. A. Favret. 1986. Aneuploidy as an explanation of high values of phenotypic variability in commercial wheat varieties. *Cereal Research Communications*. Vol. 14 No. 3.