

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA**

**Proyecto de Trabajo Final presentado para optar al Grado de
Ingeniero Agrónomo**

**ANÁLISIS CITOGÉNÉTICO DE GENOTIPOS DE TRITICALES
Y TRICEPIROS.**

**Braian Emmanuel Galván
35.894.021**

Director: Dr. Ernesto Castillo

Co-Director: Ing. Agr. Hernán di Santo

**Río Cuarto – Córdoba
Diciembre/2016**

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA

CERTIFICADO DE APROBACIÓN

Título del Trabajo Final: Análisis citogenético de genotipos de triticales y tricepiros .

Autor: Braian Emmanuel Galván

DNI: 35.894.021

Director: Ernesto Castillo

Co-Director: Hernán di Santo.

Aprobado y corregido de acuerdo con las sugerencias de la Comisión Evaluadora:

Fecha de presentación: ____/____/____.

Aprobado por Secretaría Académica: ____/____/____.

Secretario Académico

DEDICATORIA

A vos, Abuela...

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, que sin ellos no sería quien soy hoy...

Al amor de mi vida, Marisel, por apoyarme en cada momento...

A Tito, por bancarme y por su paciencia en cada una de mis ocurrencias...

Al “Jefesote” Ezequiel, Tito y Hernán por permitirme formar parte de la Cátedra...

A mis amigos, por acompañarme en este camino tan hermoso que es la Universidad...

Sencillamente, a todas aquellas personas que me ayudaron a forjar lo que hoy soy...

GRACIAS!!

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
ÍNDICE	
General	V
Cuadros	VI
Figuras	VII
RESUMEN	VIII
SUMMARY	IX
INTRODUCCIÓN	1
HIPÓTESIS	4
CAPITULO I: CITOGENÉTICA CLÁSICA EN LÍNEAS AVANZADAS DE TRICEPIRO Y TRITICALE	5
OBJETIVOS	5
MATERIALES Y METODOS	5
RESULTADOS Y DISCUSION	6
CONCLUSIONES	10
CAPITULO II: ESTUDIO CITOGENÉTICO DE GENOTIPOS SEGREGANTES DE TRICEPIROS	11
OBJETIVOS	11
MATERIALES Y METODOS	11
RESULTADOS Y DISCUSION	11
CONCLUSIONES	19
CONCLUSIONES GENERALES	20
BIBLIOGRAFÍA	21

ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1: Valor medio, coeficiente de variación, valor mínimo y valor máximo del número cromosómico en líneas avanzadas de triticales y tricepiro. Río Cuarto, Córdoba. 2016.	6
Cuadro 2: Comparación entre tricepiro y triticales del número de bivalentes por células madre de polen. Río Cuarto, Córdoba. 2016	6
Cuadro 3: Comparación del número de bivalentes por células madres de polen, para cada tricepiro primario en función del efecto de los trigopiros. Río Cuarto, Córdoba. 2016.	12
Cuadro 4: Comparación del número de bivalentes por células madres de polen, para cada tricepiro primario en función del efecto de los triticales. Río Cuarto, Córdoba. 2016.	13
Cuadro 5: Comparación de trigopiros, respecto a un mismo triticales, en función del Índice Meiótico. Río Cuarto, Córdoba. 2016.	14
Cuadro 6: Comparación de triticales, respecto a un mismo trigopiro, en función del índice meiótico. Río Cuarto, Córdoba. 2016.	14
Cuadro 7: Promedio, desvío estándar, máximos y mínimos de micronúcleos por tétrada, para cada tricepiro. Río Cuarto, Córdoba. 2016.	15
Cuadro 8: Comparación de progenitor masculino respecto a un mismo progenitor femenino en función de la cantidad de micronúcleos/tétrada. Río Cuarto, Córdoba. 2016.	16
Cuadro 9: Comparación de triticales, respecto a un mismo trigopiro, en función de la cantidad de micronúcleos/tétrada. Río Cuarto, Córdoba. 2016.	17

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1: Valor medio y desvío estándar de bivalentes por célula madre de polen para tricepiro y triticales. Río Cuarto, Córdoba. 2016.	7
Figura 2: Genotipo 65 x Horv./4 en anafase I.	7
Figura 3: a) Genotipo 53 x Horv/6: conteo de figuras bivalentes. b) Genotipo 65 x Horv/4: conteo de figuras bivalentes.	8
Figura 4: Genotipo 65 x Horv./4 en diacinesis.	8
Figura 5: Genotipo 65 x Horv./4: formación anormal de una tétrada, formación en “Tríada”.	8
Figura 6: Genotipo 53 x Horv./6 en anafase I.	9
Figura 7: a) Genotipo Genu HA: conteo de figuras bivalentes sin anormalidades. b) C94/528: conteo de figuras bivalentes sin anormalidades.	9
Figura 8: a) Genotipo 94/528 x Don Noé: célula en diacinesis con 21 bivalentes; b) Cumé x SH 16: célula en anafase I tardía, con cromosomas retrasados en el plano ecuatorial.	12
Figura 9: Genotipo C94/528 x Don Noé: célula en anafase I tardía, con cromosomas retrasados en el plano ecuatorial.	13
Figura 10: Tétradas con micronúcleos. a) Eronga x SH16; b) 94/528 x Don Noé; c) Cumé x SH16; d) Eronga x Don Noé.	15
Figura 11: a) Genotipo 94/528 x SH 16: Tétrada sin micronúcleos. b) Genotipo Eronga x SH 16: Tétrada con hasta seis micronúcleos fácilmente identificables.	17

RESUMEN

La hibridación interespecífica se emplea para incorporar caracteres deseables en el germoplasma cultivado. En la UN de Río Cuarto se desarrolló germoplasma de triticale (trigo x centeno) y tricepiro (triticale x trigopiro). Este trabajo se organizó en dos capítulos. En el primero, se analizó el nivel de ploidía y el comportamiento meiótico de dos tricepiros y un triticale obtenidos en la UN de Río Cuarto, y de una línea de triticale introducida. En el segundo se estudió el nivel de ploidía y se realizó el recuento de micronúcleos/tétrada (MxT) de seis líneas segregantes de tricepiro obtenidas a partir de tres triticales como progenitores femeninos y dos trigopiros como progenitores masculinos. En primer lugar, se determinó el número de bivalentes en la meiosis de células madres de granos de polen y posteriormente se compararon mediante pruebas t. El análisis de líneas avanzadas mostró que los genotipos de tricepiro demostraron un mayor rango de variación de los bivalentes en la meiosis de células madres de granos de polen, registrando diferencias significativas al compararlos con los de triticale. Se observaron cromosomas retrasados en ambos tricepiro, probablemente debido a la mayor cantidad de genomios en estos anfidiplóides. Los genotipos de triticale demostraron mayor estabilidad citológica ya que no presentaron anomalías en meiosis. En las líneas segregantes de tricepiro, y en función del recuento de bivalentes en la meiosis de células madres de granos de polen, la línea C94/528 se diferenció de Cumé y Eronga cuando se utilizó a Don Noé como progenitor masculino, y solo con Cumé cuando se utilizó a SH16. El recuento de MxT registró diferencias significativas entre los trigopiros solo cuando se utilizó como progenitor femenino a Eronga. El triticale C94/528 como progenitor femenino presentó significativamente una menor cantidad de micronúcleos que Eronga y Cumé cuando se utilizó a SH16 como padre. Las diferencias, indicarían un comportamiento distinto de los triticales como progenitores femeninos, mientras que los trigopiros se mostraron ser más estables como progenitores masculinos. Todos los materiales son hexaploides.

Palabras clave: Estabilidad Citológica; Bivalentes; Micronúcleos.

SUMMARY

Interspecific hybridization is used to incorporate desirable characters into the cultivated germplasm. In the UN of Río Cuarto, triticale (wheat x rye) and tricepiro (triticale x trigopiro) germplasm were developed. This work was carried out in two chapters. In the first, the level of ploidy and the meiotic behavior of two tricepiros and a triticale obtained in the UN of Río Cuarto, and of a triticale line introduced. In the second, the ploidy level was studied and the micronucleus/tetrad (MxT) count of six segregating tricepiro lines obtained from three triticales as female progenitors and two trigopiros as male progenitors. First, the number of bivalents in the meiosis of stem cells of pollen grains was determined and then compared by t-tests. The analysis of advanced lines showed that the tricepiro genotypes showed a greater range of variation of the bivalents in the meiosis of stem cells of pollen grains, registering significant differences when compared to triticale. Delayed chromosomes were observed in both tricepiro, probably due to the greater amount of genomia in these amphidiploids. Triticale genotypes showed greater cytological stability as they did not show abnormalities in meiosis. In the tricepiro segregant lines, and as a function of the bivalent count in the meiosis of pollen grain stem cells, the C94 / 528 line differed from Cumé and Eronga when Don Noé was used as the male parent, and only with Cumé when SH16 was used. The MxT count recorded significant differences among trigopiros only when used as a female progenitor to Eronga. Triticale C94 / 528 as a female progenitor had significantly fewer micronucleus than Eronga and Cumé when SH16 was used as the parent. Differences would indicate a different behavior from triticales as female progenitors, whereas trigopiros were more stable as male progenitors. All materials are hexaploids

Key words: Cytological stability; Bivalent; Micronucleus

INTRODUCCIÓN

La diversificación de cultivos en los agroecosistemas actuales, es un factor que contribuye a asegurar la producción y balancear racionalmente los componentes de los mismos, por lo que es necesario disponer de nuevos y mejores cultivares (Ferreira *et al.*, 2007). Ante la escasa oferta forrajera de las gramíneas perennes durante el invierno y la necesidad de emplear cultivos estacionales en las cadenas forrajeras, los investigadores vieron la necesidad de realizar estudios en especies invernales (Ferreira *et al.*, 2007).

Uno de los principales estudios, capaz de contribuir con esto, es la hibridación interespecífica e intergenérica, especialmente en las tritíceas, debido a que la hibridación dentro de esta tribu tiene gran importancia tanto para la síntesis y el mejoramiento de nuevos cultivos, como para dilucidar las relaciones entre especies y su composición genómica (Ferreira *et al.*, 2007).

Así es como hace más de veinte años comenzaron a desarrollarse en nuestro país programas de mejoramiento de nuevas forrajeras de invierno. La búsqueda de estas variedades, llevó a evaluar especies híbridas con potencial para complementar o competir con los cereales tradicionales, por aportar forraje fresco o diferido, o como grano de buena calidad (Ferreira *et al.*, 2007).

El primer caso concreto de hibridación intergenérica es el del triticales (*Triticosecale* Wittmack), resultante del cruzamiento entre *Triticum aestivum* x *Secale cereale*. El objetivo inicial del mejoramiento de este híbrido a nivel mundial estuvo enfocado en el rendimiento y la calidad de grano, mientras que en Argentina prevaleció una orientación hacia la obtención de cultivares forrajeros, justificado en su momento por la vigencia de los sistemas pastoriles. La experimentación con este cultivo se inició hacia la década del '60 y en los años '70 se incorporaron en la tarea de mejoramiento de las Universidades Nacionales de Río Cuarto y de Córdoba (Badiali y Lovey, 2001), en donde se han obtenido cultivares forrajeros priorizando la producción de biomasa vegetativa (Ferreira y Szpiniak, 1994).

En cuanto a sus usos, además del consumo directo como forraje y henificado, ciertas variedades utilizadas en dietas de terminación de parrilleros y en cerdos en engorde obtuvieron excelentes resultados productivos, en especial los cultivares de alto contenido proteico que permitieron reducir la cantidad de harina de soja en la mezcla alimenticia (Estevez *et al.*, 1999).

Otro ejemplo de hibridación intergenérica, más reciente, lo constituye el tricepiro resultante de la combinación de *Triticum* L., *Secale* L. y *Agropyron*, a través de

cruzamientos entre triticales y trigopiros (*Triticum L. x Thinopyrum Á. Löve*); este es motivo de investigación y desarrollo tanto por las potenciales recombinaciones genómicas que se pueden obtener como por su productividad, rusticidad y valor nutritivo (Ferreira y Szpiniak, 1994; Ferreira *et al.*, 2007).

Si bien sus potenciales usos son mayores a los del híbrido triticales, el tricepiro tiene escasa difusión, ya que al combinar tres especies, con diferentes modos de reproducción, se produce esterilidad inicial. Es necesario mucho trabajo de mejoramiento para estabilizarlo, sin embargo, es una línea de investigación muy interesante por el potencial que tiene en cuanto a la rusticidad invernal y al uso para pastoreo directo (Ferreira *et al.*, 2007).

En la mayoría de los países productores de carne, los granos constituyen la base de la alimentación del ganado (44% de la producción agrícola mundial), mientras que en Argentina la principal fuente de alimento la constituyen los pastizales nativos y las especies forrajeras cultivadas (60% y 10% de la superficie, respectivamente) que representan la principal ventaja económica de la producción pecuaria del país (Díaz *et al.*, 2004).

Es necesario continuar con el estudio y mejoramiento de estas especies híbridas y asegurar estabilidad genómica de las mismas, para alcanzar el máximo potencial que permita promover su uso e inclusión en las cadenas forrajeras invernales.

El mejoramiento genético convencional ha tenido un gran impacto en el incremento del rendimiento, la calidad y la resistencia a plagas y enfermedades en cereales y oleaginosas pero en las especies forrajeras los progresos han sido significativamente menores, especialmente en lo referido al rendimiento (Díaz *et al.* 2004). Esto obedece a varios factores, como por ejemplo, un proceso más reciente de domesticación, la complejidad de objetivos, entre ellos el aumento en la producción de semillas sin disminuir la producción de biomasa, problemas reproductivos, problemas de mercado y las menores inversiones realizadas en el área de investigación para mejoramiento genético. Sumado a esto, y no menos importante, cabe mencionar el nivel de ploidía elevado de los cultivos forrajeros (desde tetraploides a decaploides) lo que refleja una mayor complejidad en la expresión de los caracteres de interés agronómico, dificultando la selección clonal para la obtención de variedades sintéticas (Díaz *et al.*, 2004).

A pesar de estas dificultades, entre 1950 y 1960 se obtuvo en Argentina un elevado número de cultivares de especies forrajeras, muchos de los cuales son aún utilizados. Para ello se seleccionaron genotipos de ciertas especies exóticas adaptados a las condiciones locales (Díaz *et al.*, 2004).

En nuestro país, hacia el año 1972, se inició en Universidad Nacional de La Pampa el desarrollo de germoplasma de tricepiros obtenidos de dos cruzas artificiales de triticales x trigopiro y además se identificó un híbrido natural. Luego de varias generaciones de selección, una de las líneas más promisorias se registró como cultivar con el nombre “Don René INTA”, sin embargo y a pesar de los años de selección aún mantiene diversidad fenotípica (Ferreira *et al.* 2007).

A mediados de la década de 1990, el mejoramiento genético comenzó nuevamente a aportar materiales para reemplazar a los tradicionales y se inscribieron nuevos cultivares, producto de la domesticación de especies nativas y la generación de anfiploides artificiales. Un ejemplo de esto fue el desarrollo de germoplasma de Tricepiro en la Universidad Nacional de Río Cuarto, empleando triticales hexaploides y trigopiros octoploides (Ferreira y Szpiniak, 1994, Ferreira *et al.* 2007). Cabe recalcar que la ploidía inicial de las cruzas y las diferentes contribuciones genómicas sugieren que, aún después de varias generaciones, los tricepiros pueden tener inestabilidad cromosómica, desórdenes meióticos y diferencias de fertilidad entre cruzamientos (Ferreira *et al.*, 2007). Al evaluar una craza es aconsejable examinar además de los progenitores, la F1, la F2 y las siguientes generaciones segregantes (Poggio y Naranjo, 1997).

HIPÓTESIS

- En triticales y/o tricepiro el conteo cromosómico se estabiliza en líneas avanzadas.
- En generaciones tempranas de tricepiro existen diferencias en anormalidades meióticas cuando se utilizan distintos parentales en los cruzamientos.

En función de las hipótesis planteadas, el siguiente trabajo se organizó en dos capítulos, cada uno con sus respectivos objetivos. El primer capítulo se basó en el análisis citogenético de líneas avanzadas de triticales y tricepiros, mientras que el segundo capítulo hace hincapié en el estudio citogenético de genotipos segregantes de tricepiros.

CAPÍTULO I

CITOGENÉTICA CLÁSICA EN LÍNEAS AVANZADAS DE TRICEPIRO Y TRITICALE

OBJETIVOS

- a. Realizar conteos de bivalentes durante la meiosis de líneas avanzadas de triticales y tricepiros.
- b. Determinar el nivel de ploidía de líneas avanzadas de triticales y tricepiros.
- c. Comparar la estabilidad citológica entre triticales y tricepiros.

MATERIALES Y MÉTODOS

- Los genotipos utilizados fueron dos triticales: C94/528 y Genú HA; y dos tricepiros: 53 x Hor./6 y 65 x Hor./4, todos líneas avanzadas con posibilidades de ser registradas como cultivares.
- Se determinó el número de cromosomas y el nivel de ploidía, mediante el recuento de bivalentes en el apareamiento cromosómico de preparados meióticos. Además, se determinaron anomalías durante la meiosis I para estudiar la estabilidad citológica de los materiales.
- Los preparados meióticos se realizaron con células de anteras de flores inmaduras, extraídas de espigas previamente fijadas en alcohol absoluto-ácido acético en proporción 3:1 durante 24 h, a temperatura ambiente, a las que luego se les volcó el fijador y se les agregó alcohol 70° y se conservaron a 5-6° C (Ferrari, 2004), y se confeccionaron mediante aplastado y tinción con carmín acético.
- Aproximadamente 50 meiocitos de cada material, permitieron el conteo de bivalentes. Para comparar los valores medios se realizó una prueba t-Student. Los análisis estadísticos se realizaron con el software estadístico InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2016).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con los preparados meióticos obtenidos de las líneas avanzadas de triticales y tricepiros se determinó el número cromosómico por medio del recuento del número de bivalentes de células madres de polen (II/CMP). El nivel de ploidía de estas líneas resultó en 6x (hexaploides; $2n=42$). El análisis descriptivo de los datos se observa en el Cuadro 1.

Cuadro 1: Valores medios, coeficiente de variación, mínimos y máximos del número cromosómico en líneas avanzadas de triticales y tricepiros. Río Cuarto, Córdoba. 2016.

Línea	n	Variable	Valor medio	Coeficiente de Variación	Valor mínimo	Valor máximo
53 x Hor./6	59	N° de bivalentes	20	9	15	24
		N° cromosomas	40		30	48
65 x Hor./4	46	N° de bivalentes	20	5	18	21
		N° cromosomas	40		36	42
C 94/528	49	N° de bivalentes	21	3	19	22
		N° cromosomas	42		38	44
Genú HA	48	N° de bivalentes	21	3	19	21
		N° cromosomas	42		38	42

La comparación del número de cromosomas entre los materiales mostró diferencias estadísticas significativas, que podrían interpretarse como distinta estabilidad meiótica entre líneas avanzadas de triticales y tricepiros (Cuadro 2). Esas diferencias, podrían explicarse por la mayor cantidad de genomas intervinientes en los tricepiros, y probablemente debido a una mayor presencia de irregularidades. En estos híbridos confluyen genomas provenientes de especies con diferentes modos de reproducción y genomas que tienen tiempos meióticos diferentes y funcionan en el citoplasma de trigo (Lacadena, 1970). Además, se observó mayor rango de variación de los bivalentes por células madres de polen en los tricepiros (Figura 1).

Cuadro 2: Comparación entre tricepiros y triticales del número de bivalentes por célula madre de polen. Río Cuarto, Córdoba. 2016

Especie	N° de bivalentes	Mínimo	Máximo	T	Significancia
Tricepiro	20	15	24	-2,93	**
Triticale	21	19	22		

Ref.: ns: No Significativo; *: Significativo al 5%; **: Significativo al 1%; ***: Significativo al 1%.

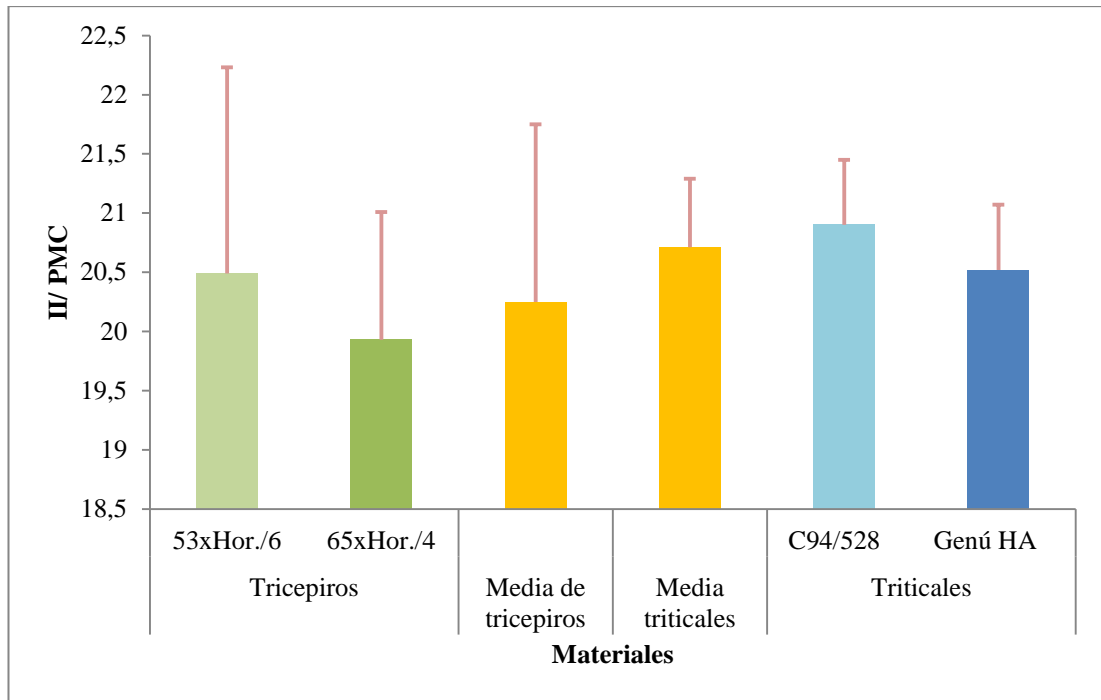


Figura 1: Valor medio y Desvíos Estándar de bivalentes por célula madre de polen para triceiros y triticales. Río Cuarto, Córdoba. 2016.

Se observaron cromosomas retrasados en ambos triceiros analizados, registrándose con mayor presencia en 65 x Hor./4 (Figura 2).

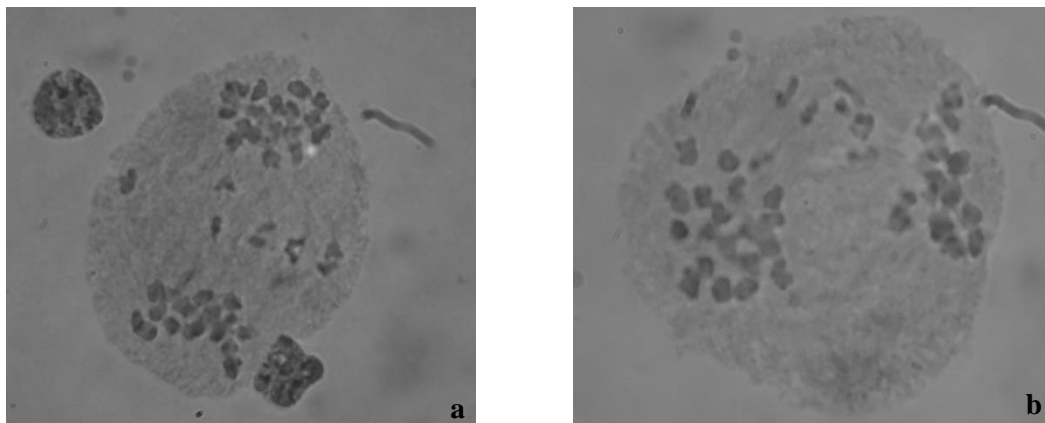


Figura 2: a) Genotipo 65 x Hor./4: anafase I, cinco pares de cromosomas retrasados ubicados en el plano ecuatorial celular. b) Genotipo 65 x Horv./4: anafase I, tres pares de cromosomas retrasados, ubicados en la parte superior de la célula.

Del total de células observadas no se encontraron cromosomas retrasados u otras anomalías en todas, sino que se registraron de forma reiterada en triceiros (Figura 3).

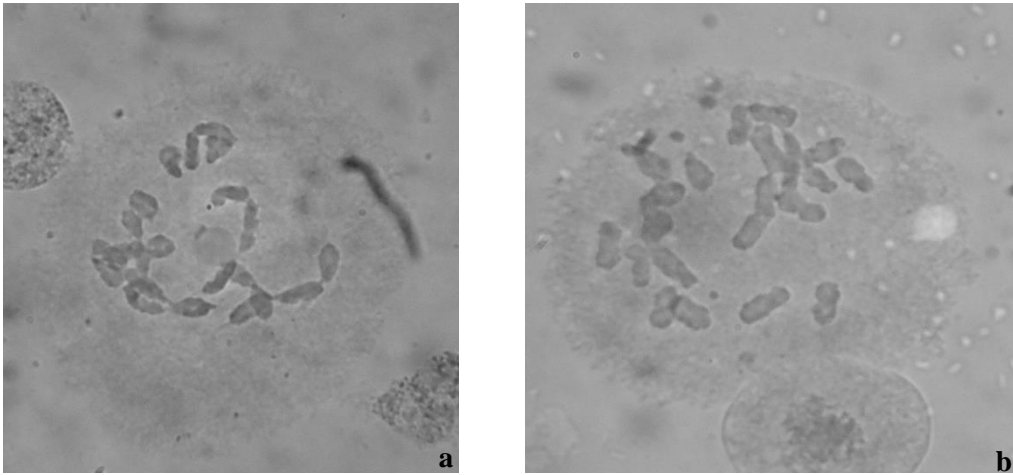


Figura 3: a) Genotipo 53 x Hor./6: conteo de figuras bivalentes. b) Genotipo 65 x Hor./4: conteo de figuras bivalentes.

Cabe destacar, la reiterada observación de cromosomas retrasados en este híbrido y también la repetida aparición de formaciones de puentes entre cromosomas, tríadas y univalentes, como se muestran en las figuras 4 y 5.

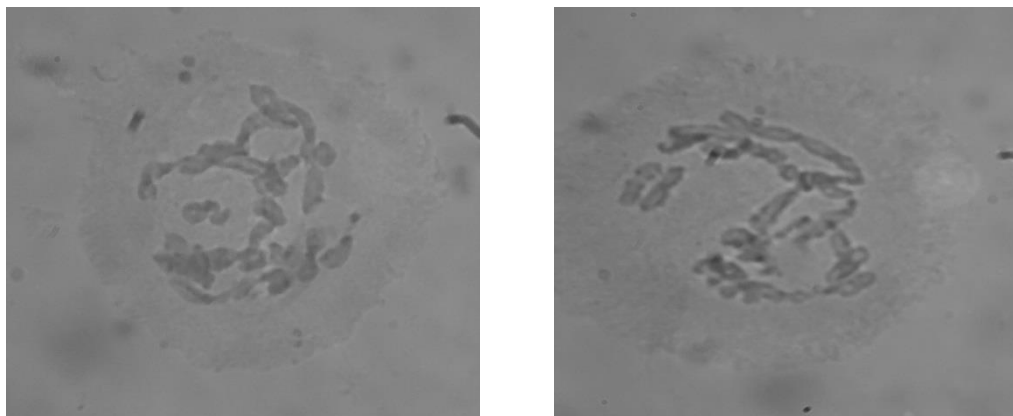


Figura 4: Genotipo 65 x Hor./4 en diacinesis: cromosomas aglomerados en la región basal, en formación de cadena hacia el centro, formación en “flor”, en el margen superior derecho, en ambas células.

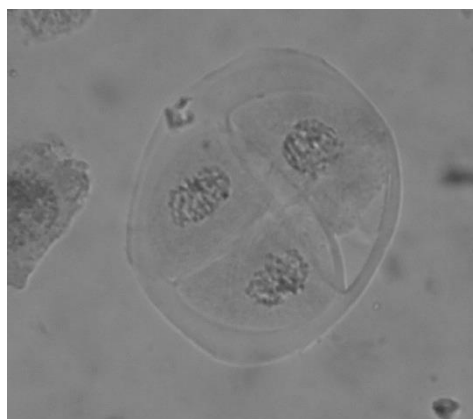


Figura 5: Genotipo 65 x Hor./4: Formación anormal de una tétrada, formación en “Triada”.

Para la línea 53 x Horv./6, a pesar de una menor presencia de cromosomas retrasados, también se observaron anomalías como cromosomas con puentes (Figura 6).

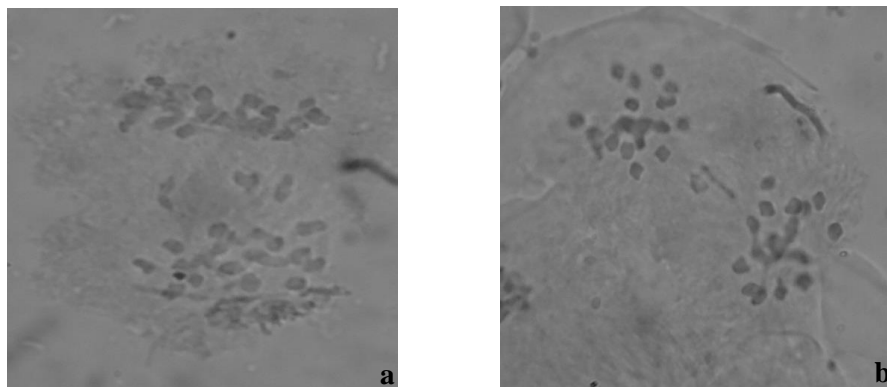


Figura 6: a) anafase I: tres pares de cromosomas retrasados en la región ecuatorial, cromosomas con puentes en la región superior. b) anafase I: dos pares de cromosomas retrasados en la zona ecuatorial, cromosomas con puentes en la región central.

Por otra parte, los triticales mostraron mayor estabilidad citológica, basados tanto en una escasa observación de cromosomas retrasados como en que no se observaron anomalías en meiosis (puentes, univalentes, malformaciones de cuartetos) (Figura 7).

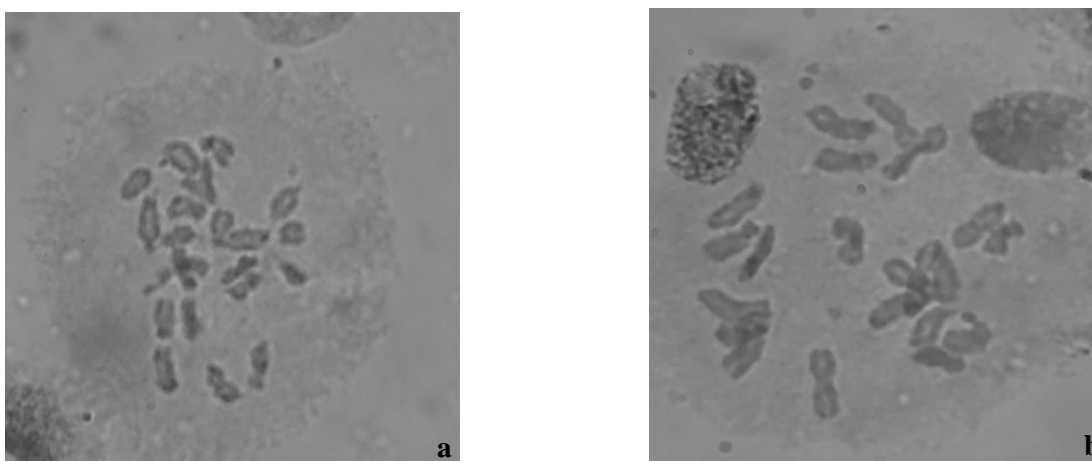


Figura 7: a) Genotipo Genu HA: conteo de figuras bivalentes sin anomalías, 21 II/CMP. b) Genotipo C94/528: conteo de figuras bivalentes sin anomalías, 21 II/CMP.

El análisis citológico de células madres de granos de polen, y posterior individualización de figuras en diacinesis, permite determinar el número cromosómico. Por ejemplo, aplicando esta metodología, Guillen (2005) presentó por primera vez los números

cromosómicos de *Asplenium ulbrichtii* var. *Serratodentatum*, diploide ($2x=72$) y de *Asplenium triquetrum*, tetraploide ($2n=4x=144$). De la misma manera, para *Dasyllirion cedrosanum* el análisis citológico mostró la formación de 19 bivalentes, concordando con el número somático de cromosomas ya estudiado ($2n=2x=38$) (Hernández, 2013).

Por otra parte, y al igual que lo observado en el desarrollo de este trabajo, es de esperar que esta técnica indique anomalías cromosómicas presentes en los híbridos bajo estudio. En estudios realizados en híbridos obtenidos de *Nicotiana tabacum* L. x *Nicotiana megalosiphon*, se encontró que los genotipos anfiploides ($2n=38$; $2n=62$) mostraron irregularidades en diferentes fases de la meiosis, lo que determinó baja viabilidad del polen y características morfológicas de estructuras florales y granos de polen diferentes a sus progenitores (Rodríguez, 2012).

Además del estudio de anomalías cromosómicas, otros datos podrían aportar a la tarea de selección de líneas para utilizarse en cruzas con fines de mejoramiento. Por ejemplo, observaciones de la morfología de las anteras para establecer como maduran dentro de una espiga así como la velocidad con que se cumple cada fase reproductiva en cada línea, podrían utilizarse para establecer la duración del ciclo para líneas con diferentes propósitos.

Si bien esta información no hace al objetivo de esta investigación, puede utilizarse como base para proyectar nuevos trabajos de investigación, dirigidos al mejoramiento de híbridos interespecíficos.

CONCLUSIONES

Es posible establecer el número cromosómicos en líneas avanzadas de triticales y tricepiros mediante el recuento de bivalentes en células madre de polen.

El nivel de ploidía de los anfiploides artificiales se estableció como $6x$ ($2n=42$).

La comparación de la estabilidad citológica entre triticales y tricepiros, permite inferir que los primeros son más estables citológicamente, a pesar de presentar el mismo nivel de ploidía.

CAPÍTULO II

ESTUDIO CITOGENÉTICO DE GENOTIPOS SEGREGANTES DE TRICEPIROS

OBJETIVOS

- a) Realizar conteos cromosómicos de materiales segregantes de tricepiros.
- b) Determinar anomalías y posibles pérdidas de ADN durante la meiosis de materiales segregantes de tricepiros obtenidos por distintos cruzamientos.

MATERIALES Y MÉTODOS

- Se utilizaron seis tricepiros primarios en F₆ obtenidos a partir de tres triticales utilizados como progenitores femeninos:
 - Línea C94/528 (CIMMyT): $2n=6x=42$
 - Cultivar Cumé (UNRC): $2n=6x=42$
 - Cultivar Eronga (INTA): $2n=6x=42$y dos Trigopiros como progenitores masculinos
 - Don Noé (INTA): AABDDJJ; $2n=8x=56$
 - SH 16 (INTA): A⁵A⁵BBD²D²JJ; $2n=6x=42$
- Los análisis meióticos (recuento de bivalentes y determinación de anomalías en el apareamiento cromosómico) se realizaron con las técnicas detalladas en Materiales y Métodos del Capítulo I.
- Los materiales fueron analizados citológicamente mediante el índice meiótico (Löve, 1984) que mide la estabilidad meiótica a través de la presencia de anomalías en las cuartetos. Para ello se observaron 100 cuartetos por genotipo. Para comparar los valores medios de los materiales estudiados se realizó una prueba t-Student. Los análisis estadísticos se realizaron con el software estadístico InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2016).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El conteo del número de bivalentes en la meiosis de células madres de polen (II/CMP), para cada tricepiro primario, permitió determinar el nivel de ploidía de los genotipos.

Si bien cada progenitor masculino (trigopiros) intervienen con diferente número de genomas (Don Noé=2n=8x=56; SH 16=2n=6x=42), en estas tritíceas se observó una marcada tendencia a estabilizarse en el nivel hexaploide.

Al analizar el número de bivalentes de las cruzas, no se observaron diferencias significativas en función del efecto de los trigopiros como progenitores masculinos considerando sus diferencias de ploidía (Cuadro 3 y Figura 8).

Cuadro 3: Comparación del número de bivalentes por célula madre de polen, para cada tricepiro primario en función del efecto de los trigopiros. Río Cuarto, Córdoba. 2016.

Progenitor Femenino	Progenitor Masculino	Nº de Bivalentes	T	Significancia
94/528	Don Noé	19,9 ± 8,20	-1,27	ns
	SH 16	20,26 ± 5,80		
Cumé	Don Noé	20,83 ± 4,21	0,82	ns
	SH 16	20,69 ± 3,30		
Eronga	Don Noé	20,73 ± 4,50	0,34	ns
	SH 16	20,65 ± 6,19		

Ref.: ns: No Significativo; *: Significativo al 5%; **: Significativo al 1%; ***: Significativo al 1%.

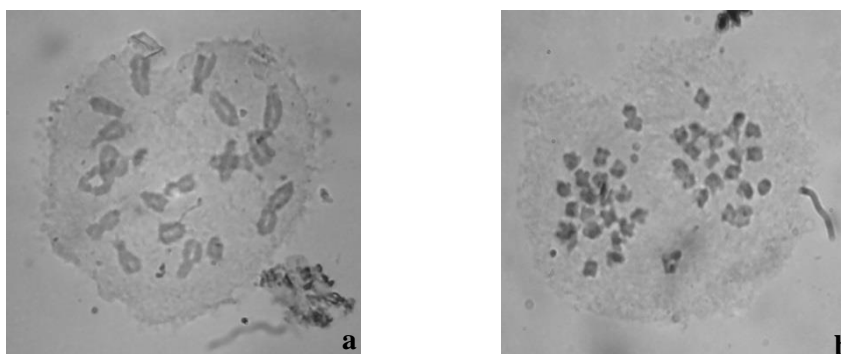


Figura 8: a) Genotipo 94/528 x Don Noé: célula en diacinesis con 21 bivalentes; b) Genotipo Cumé x SH 16: célula en anafase I tardía, con cromosomas retrasados en el plano ecuatorial.

Al analizar los triticales como progenitores femeninos, se observaron diferencias significativas en el recuento de bivalentes. Así, la línea C94/528 se diferenció de Cumé y Eronga cuando se utilizó a Don Noé como progenitor masculino; mientras que sólo lo hizo con Cumé cuando se cruzó con SH16 (Cuadro 4). Las diferencias observadas indican una cierta inestabilidad genómica de C94/528, principalmente con Don Noé; debido probablemente a la mayor cantidad de genomas intervinientes.

Cuadro 4: Comparación del número de bivalentes por célula madre de polen, para cada tricepiro primario en función del efecto de los triticales. Río Cuarto, Córdoba. 2016.

Progenitor Masculino	Progenitor Femenino	Nº de Bivalentes	T	Significancia
Don Noé	94/528	19,90 ± 8,20	-3,5	***
	Cumé	20,83 ± 4,21		
	94/528	19,90 ± 8,20	-3,01	**
	Eronga	20,73 ± 4,50		
	Cumé	20,83 ± 4,21	0,52	ns
	Eronga	20,73 ± 4,50		
SH 16	94/528	20,26 ± 5,80	-2,25	**
	Cumé	20,69 ± 3,30		
	94/528	20,26 ± 5,80	-1,58	ns
	Eronga	20,65 ± 6,19		
	Cumé	20,69 ± 3,30	0,23	ns
	Eronga	20,65 ± 6,19		

Ref.: ns: No Significativo; *: Significativo al 5%; **: Significativo al 1%; ***: Significativo al 1%.

Por otra parte, las comparaciones del número de bivalentes por célula madre de polen entre Cumé y Eronga, no indican diferencias significativas con respecto a los dos trigopiros utilizados como progenitores masculinos.

Al estudiar el comportamiento meiótico, se observó la presencia de cromosomas retrasados al utilizar la línea C94/528 (Figura 9).

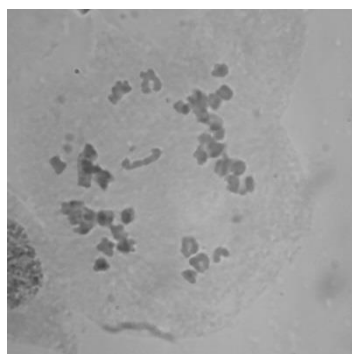


Figura 9: Genotipo C94/528 x Don Noé: célula en anafase I tardía, con cromosomas retrasados en el plano ecuatorial.

Las diferencias en el número de bivalentes y el comportamiento meiótico inestable que se observó al utilizar al triticales C94/528 en los cruzamientos, indican de que esta línea no sería conveniente en cruzamientos para la obtención de líneas productoras de grano, esto debido a que la reducción de la fertilidad podría deberse a disturbios meióticos tales como la presencia de univalentes en metafase I, cromosomas retrasados y puentes en anafase I y II, que

finalmente se manifiestan como micronúcleos en las cuartetos y pueden producir gametos aneuploides (Tarkowski, 1968; Scoles y Kaltsikes, 1974; Ganum, 2009).

Al medir la estabilidad meiótica a través del Índice Meiótico, se observó que no existen diferencias significativas que permitan distinguir el efecto de los trigopiros como progenitores masculinos o de los triticales como progenitores femeninos (Cuadros 5 y 6)

Para todos los cruzamientos se observó al menos un micronúcleo por cuarteta (Cuadro 7 y Figura 10).

Cuadro 5: Comparación de trigopiros, respecto a un mismo triticales, en función del Índice Meiótico. Río Cuarto, Córdoba. 2016.

Progenitor femenino	Progenitor Masculino	Índice Meiótico	T	Significancia
94/528	Don Noé	0,51 ± 0,07	-0,34	ns
	SH 16	0,55 ± 0,18		
Cumé	Don Noé	0,35 ± 0,13	-0,38	ns
	SH 16	0,40 ± 0,21		
Eronga	Don Noé	0,51 ± 0,20	0,52	ns
	SH 16	0,43 ± 0,25		

Ref.: ns: No Significativo; *: Significativo al 5%; **: Significativo al 1%; ***: Significativo al 1%.

Cuadro 6: Comparación de triticales, respecto a un mismo trigopiro, en función del Índice Meiótico. Río Cuarto, Córdoba. 2016.

Progenitor masculino	Progenitor femenino	Índice Meiótico	T	Significancia
Don Noé	94/528	0,51 ± 0,07	1,85	ns
	Cumé	0,35 ± 0,13		
	94/528	0,51 ± 0,07	0,00	ns
	Eronga	0,51 ± 0,20		
	Cumé	0,35 ± 0,13	-1,34	ns
	Eronga	0,51 ± 0,20		
SH 16	94/528	0,55 ± 0,18	0,84	ns
	Cumé	0,40 ± 0,21		
	94/528	0,55 ± 0,18	-1,17	ns
	Eronga	0,43 ± 0,25		
	Cumé	0,40 ± 0,21	0,14	ns
	Eronga	0,43 ± 0,25		

Ref.: ns: No Significativo; *: Significativo al 5%; **: Significativo al 1%; ***: Significativo al 1%.

Cuadro 7: Valor medio, desvío estándar, rango de variación de micronúcleos por tétrada, para cada tricepiro. Río Cuarto, Córdoba. 2016.

Progenitor Femenino	Progenitor Masculino	Valor medio	Desvío estándar	Rango de variación
94-528	Don Noé	1,84	2,22	0 - 7
	SH 16	1,25	1,56	0 - 6
Eronga	Don Noé	1,61	2,49	0 - 9
	SH 16	2,57	1,83	0 - 11
Cumé	Don Noé	2,38	2,23	0 - 10
	SH 16	1,8	2,67	0 - 7

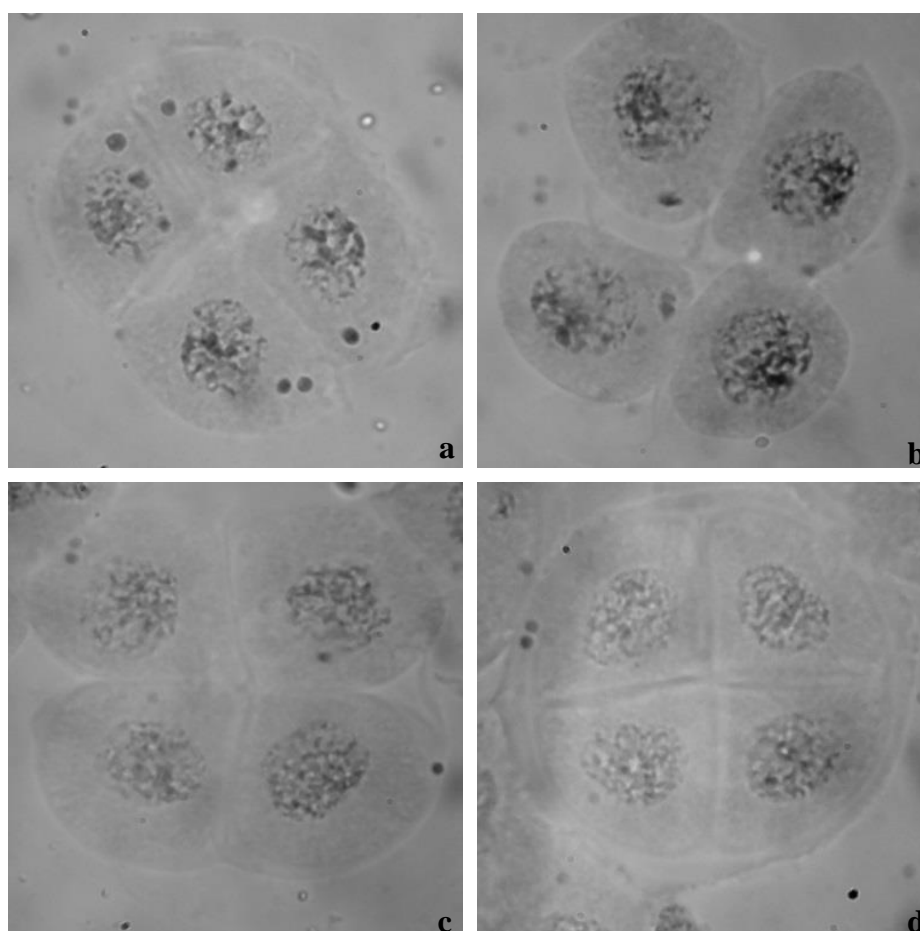


Figura 10: Tétradras con micronúcleos. a) Eronga x SH16; b) 94/528 x Don Noé; c) Cumé x SH16; d) Eronga x Don Noé.

La alta variabilidad en el número de micronúcleos registrada para cada una de las cruza, requirió de una transformación de los datos. De acuerdo a lo observado cuando se

analizó el número de bivalentes por célula madre de polen, se esperaba que las líneas en las que se utilizó C94/528 presentaran mayor cantidad de micronúcleos por cuarteta debido al comportamiento meiótico inestable que mostró esta línea, pero los resultados obtenidos no se correspondieron con los esperados (Cuadro 8).

Cuando se analizó a los trigopiros como progenitores masculinos en las cruzas, se encontraron diferencias significativas cuando se comparó Eronga x Don Noé y Eronga x SH 16; no así para las demás cruzas, donde no se observó diferencias significativas (Cuadro 8).

Cuadro 8: Comparación de progenitor masculino respecto a un mismo progenitor femenino en función de la cantidad de micronúcleos/tétrada. Río Cuarto, Córdoba. 2016.

Progenitor femenino	Progenitor Masculino	micronúcleos/tétrada	T	Significancia
94/528	Don Noé	1,19	1,17	ns
	SH 16	0,90		
Cumé	Don Noé	1,66	1,25	ns
	SH 16	1,32		
Eronga	Don Noé	1,01	-2,67	**
	SH 16	1,74		

Ref.: ns: No Significativo; *: Significativo al 5%; **: Significativo al 1%; ***: Significativo al 1%.

Por otra parte, los resultados fueron distintos cuando se comparó la cantidad de micronúcleos/tétrada considerando a los triticales como progenitores femeninos. En las cruzas con Don Noé, las diferencias significativas se observaron cuando se compararon Cumé y Eronga como progenitores femeninos, pero no se encontraron diferencias significativas cuando se compararon C94/528 con Cumé y con Eronga.

Para las cruzas en las que se utilizó SH16 como progenitor masculino, se registraron diferencias significativas cuando se realizó la comparación de la cantidad de micronúcleos/tétrada entre C94/528 y Eronga, como para la comparación entre C94/528 y Cumé; no así para Cumé y Eronga, la cual no registró diferencias significativas (Cuadro 9).

Cuadro 9: Comparación de triticales, respecto a un mismo trigopiro, en función la cantidad de micronúcleos/tétrada. Río Cuarto, Córdoba. 2016.

Prog. Masculino	Prog. femenino	micronúcleos/tétrada	T	Significancia
Don Noé	94/528	1,19	-1,38	ns
	Cumé	1,66		
	94/528	1,19	0,59	ns
	Eronga	1,01		
	Cumé	1,66	2,35	**
	Eronga	1,01		
SH 16	94/528	0,90	-2	**
	Cumé	1,32		
	94/528	0,90	-3,47	***
	Eronga	1,74		
	Cumé	1,32	-1,56	ns.
	Eronga	1,74		

Ref.: ns: No Significativo; *: Significativo al 5%; **: Significativo al 1%; ***: Significativo al 1%.

A diferencia del estudio del número cromosómico de las líneas mencionadas, puede observarse que al determinar presencias de micronúcleos en cuartetos, se evidencia un mayor efecto desestabilizador en las cruces en las que se hace participe al trigopiro SH 16 como progenitor masculino, encontrándose las mayores diferencias estadísticas donde antes no las había (C94/528 x SH 16 vs. Eronga x SH 16) (Figura 11).

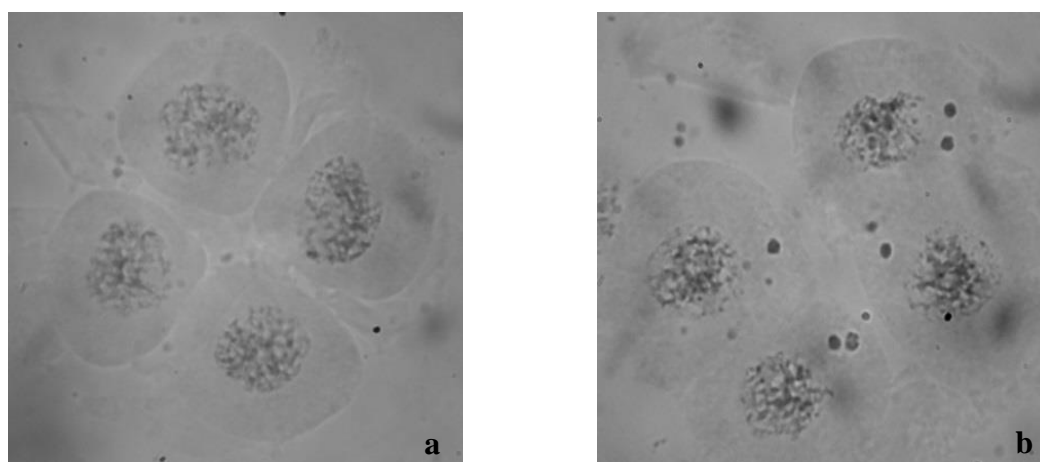


Figura 11: a) Genotipo 94/528 x SH 16: Tétrada sin micronúcleos. b) Genotipo Eronga x SH 16: Tétrada con hasta seis micronúcleos fácilmente identificables.

Cuando participa de Eronga en las cruizas, se observó una alta estabilidad en recuentos de bivalentes, pero la presencia de anomalías como univalentes y retrasos cromosómicos, es aún mayor que las observadas en el resto de las cruizas.

Es posible que mediante mecanismos de reincorporación de ADN, propios de cada célula, se amortigüen los efectos de los retrasos cromosómicos, motivo por el cual sería conveniente continuar con la investigación de estos materiales en instancias posteriores, es decir germinación y producción de granos, con el objetivo de obtener datos complementarios que permitan correlacionar variables y a su vez, permitan un estudio más completo sobre estos genotipos. En este sentido, podría correlacionarse que proporción de los retrasos cromosómicos, durante la anafase I, forman micronúcleos cuando se analizan tétradas con el objetivo de estudiar qué proporción de ADN de las especies involucradas se pierde (Fradkin, 2009).

La relación existente entre la fertilidad de la espiga y alteraciones cromosómicas es de difícil demostración sobre todo en los poliploides, ya que existen muchos factores genéticos y ambientales que interactúan, además de las irregularidades meióticas, pero debe tenerse en cuenta que cuando las deficiencias cromosómicas no se hallen correlacionadas con el número de granos, no se detectará correlación entre las anomalías meióticas y la fertilidad (Moraes Fernandes, 1982).

Las correlaciones simples, ampliamente utilizadas en la investigación de los componentes del rendimiento, no siempre resultan suficientemente informativas acerca de la relación funcional entre componentes de diferente jerarquía y producto final (Mariotti, 1986). Diversos trabajos concuerdan en que las pérdidas de ADN durante la meiosis, se evidencian inicialmente a través de retrasos cromosómicos, y a posteriori por la presencia de micronúcleos en las Cuartetas (Moraes Fernandes, 1982; Rodríguez, 2012).

En estudios realizados en híbridos obtenidos de *Nicotiana tabacum* L. x *Nicotiana megalosiphon*, se encontró que los genotipos anfiploides mostraron irregularidades en diferentes fases de la meiosis, lo que determinó baja viabilidad del polen y características morfológicas de estructuras florales y granos de polen diferentes a sus progenitores (Rodríguez, 2012).

La estabilidad citológica varía con el número de generaciones postcruzamiento, aún en F₇, algunos tricepiros tienen inestabilidad meiótica, con producción de gametos masculinos aneuploides, y seguramente también femeninos, los que normalmente transmiten las aneuploidías en mucho mayor proporción que los masculinos. En ocasiones, los resultados son diferentes si se comparan las anomalías y la fertilidad en generaciones segregantes

tempranas, entre o dentro de líneas homocigotas avanzadas o líneas con diferentes genealogías (Ganum, 2009).

Además, observaciones no sistematizadas indican que tanto en triticales y tricepiros producidos en la UNRC, como en el material de cría, se mantienen irregularidades meióticas y fertilidad reducida respecto a su valor potencial, la que se expresa en mayor o menor medida según las condiciones climáticas de cada año (Grassi *et al.*, 1997).

En trabajos anteriores, se analizó el nivel de ploidía, la estabilidad citológica y la fertilidad de los tricepiros segregantes obtenidos, observándose diferencias entre las cruzas en cuanto a fertilidad, donde se verificó intermedia pero significativa relación de esta variable con los caracteres citológicos (Ferreira *et al.*, 2007).

CONCLUSIONES

Las líneas segregantes presentan nivel de ploidía hexaploide ($6x=2n=42$), inclusive aquellas obtenidas con el trigopiro octoploide.

El estudio de cuartetos de células madres del polen permitió concluir que las diferencias observadas indicarían un comportamiento diferencial de los triticales como progenitores femeninos, mientras que los trigopiros como progenitores masculinos, se presentan con mayor estabilidad.

CONCLUSIONES GENERALES

El conteo de bivalentes en células madres de polen permitió determinar el número cromosómico y el nivel de ploidía de triticales y tricepiros. Los mismos coincidieron en los materiales de líneas avanzadas como en generaciones tempranas de tricepiros estudiados, sin embargo los conteos cromosómicos se estabilizaron en las líneas avanzadas. Por otro lado, las líneas avanzadas de triticales se observaron citológicamente más estables que las líneas avanzadas de tricepiros.

La mayor cantidad de genomios intervinientes en los tricepiros, podría explicar la mayor cantidad de anomalías meióticas que las presentes en híbridos en los que intervienen un número menor de especies. Los tricepiros primarios estudiados, se comportaron citológicamente diferentes al evaluarse el efecto de cada triticales utilizado como progenitor femenino, mientras que no se observó lo mismo al evaluar a cada trigopiro como progenitor masculino, considerando el número de bivalentes por célula madre de polen y la cantidad de micronúcleos por cuartetos.

BIBLIOGRAFÍA

- BADIALI, O. y R. LOVEY. 2001 Boaglio FCA y Remedios FCA: Nuevos cultivares de triticale para la región semiárida de Córdoba. *V Congreso Nacional de Trigo y III Simposio Nacional de Cereales de Siembra Otoño Invernal*. Actas en CD, Mesa: Cereales de siembra otoño-invernal Panel N° 5, Villa Carlos Paz, Córdoba.
- DI RIENZO J.A., F. CASANOVES, M.G. BALZARINI, L. GONZALES, M. TABLADA y C. W. ROBLEDO. 2016. InfoStat versión 2016. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba.
- DIAZ, M., V. ECHENIQUE, G. SCHRAUF, S. CARDONE, P.POLCI, E. LUTZ y G.SPANGENBERG. 2004. *Biotecnología y mejoramiento genético de especies forrajeras*, INTA, Argentina.
- ESTEVEZ LEYTE R., R.O. BRAUN PATTACINI y G. SCOLES. 1999. Utilización de cereales no convencionales, Tricepiro (*Triticum x Secale x Thinopyrum*) y triticale (*Triticum x Secale*), en la alimentación de los cerdos. Dos experiencias, *Rev. Fac. Agronomía – UN La Pampa 10 (2)*.
- FERRARI, M.R. 2004. Estudio de la composición genómica de forrajeras mediante técnicas electroforéticas y de citogenética clásica y molecular. Tesis Doctoral. Fac. Ciencias Exactas y Naturales, UBA.
- FERREIRA, V. y B. SPINIAK. 1994. Mejoramiento de triticale y tricepiro para forraje en la UN de Río Cuarto. Semillas Forrajeras: producción y mejoramiento: 110-120. Orientación Gráfica Ed., Bs As., Argentina.
- FERREIRA, V., M. SCALDAFERRO, E. GRASSI y B. SZPINIAK. 2007. Nivel de ploidía, estabilidad citológica y fertilidad en cruzas de triticale x trigopiro (tricepiros), *Journal of Basic & Applied Genetics*, 18 (1): 23-27.
- FRADKIN, M. 2009. *Estudios en tritíceas de origen híbrido (triticale – trigopiro – tricepiro) mediante Técnicas de citogenética clásica y molecular*. Tesis Doctoral de la Universidad Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, 177p.
- GANUM, M. 2009. *Selección de líneas graníferas, anormalidades meióticas y fertilidad en cereales sintéticos*. Tesis de Grado, Fac. de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto, Argentina. 45 p.

- GRASSI, E., D. CROATTO, B. SZPINIAK y V. FERREIRA. 1997. Nuevo cultivar de triticale de uso forrajero. *IV Jorn. CyT, FAV-UNRC*, Actas T I: 292-294. Río Cuarto, Córdoba, Argentina.
- GUILLÉN, R.H. 2005. Estudios cromosómicos en especies de *Asplenium* (Aspleniaceae) de la Argentina. *Darwiniana* 43(1-4): 44-51.
- HERNÁNDEZ, J. 2013. Estudio de los cromosomas mitóticos y meióticos del sotol (*Dasyilirion cedrosanum* Trel.). *Phyton* vol.84 (1), Buenos Aires.
- LACADENA, J.R. 1970. *Genética Vegetal. Fundamentos de su Aplicación*. Segunda edición. Ed. Aagesa. Madrid.
- LÖVE, R.M. 1984. Conspectus of the Triticeae. *Feddes Repert.* 95: 425-521.
- MARIOTTI, J.A. 1986. *Fundamentos de genética biométrica. Aplicaciones al mejoramiento genético vegetal*. Monografía 32. OEA, Washington DC. 152 pp.
- MELLADO, M. 2008. *Antecedentes sobre el Triticale en Chile y otros países*, Instituto de Investigaciones agropecuarias, Boletín N° 183, 74 p.
- MORAES FERNANDES, M.I.B. 1982. Estudo da instabilidade meiótica em cultivares de trigo. *Pesq. Agropec. Brasileira*, 17 (8):1177-1191. Brasília, Brasil.
- POGGIO, L. y C. NARANJO. 1997 *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal*. p: 69-79.
- RODRÍGUEZ, L.R., 2012, Caracterización de híbridos interespecíficos de *Nicotiana tabacum* L.x *Nicotiana megalosiphon*. Instituto de Investigaciones del Tabaco (IIT), Cuba.
- SCOLES, G.J., KALTSIKES P.J. 1974. The cytology and cytogenetics of triticale. *Z. Pflanzzüchtg* 73:13-43.
- TARKOWSKI, C. 1968 Aneuploidy disturbances in PMC meiosis and plant fertility in triticale Nakajima. *Genética Polonica* 9:87-95.