

**DESARROLLO DE HERRAMIENTAS PARA EL MEJORAMIENTO DE LAS
APTITUDES FORRAJERAS DE
CROTALARIA JUNCEA L.
Bassi, Martín**

*Laboratorio de Biología Evolutiva y Molecular de Plantas (BEMP) – Instituto de Ciencias Agropecuarias
(IciAgro) del Litoral - FCA-UNL-CONICET
Director/a: Uberti Manassero, Nora Graciela
Codirector/a: Cuffia, Maira*

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: *Crotalaria juncea* - Mutantes tilling - Mejoramiento de forrajes.

INTRODUCCIÓN

Desde hace décadas diferentes instituciones han alertado sobre la necesidad, considerando todos los objetivos y consecuencias de la actividad humana, de la búsqueda de soluciones que disminuyan el deterioro de la biosfera. Entre las actividades sobre las que se ha hecho foco se encuentran la agricultura y la ganadería. Existen millones de hectáreas en nuestro país subutilizadas o no utilizadas actualmente debido a un mal uso previo, o a la falta de aplicación de tecnologías sobre las mismas, pero con un potencial enorme. Entre estos millones algunos se encuentran en el norte de la provincia de Santa Fe.

Este proyecto se relaciona con la recuperación de los suelos para una ganadería sustentable y rentable mediante el uso de un cultivo de doble propósito, forrajero y de servicio: *Crotalaria juncea*. Esta leguminosa no solo ha demostrado la capacidad mediante simbiosis de aportar N al suelo, sino además de aportar una elevada cantidad de proteínas a la alimentación animal, sumado a un gran desarrollo de biomasa y resistencia a condiciones ambientales adversas. Sin embargo, sobre este cultivo se ha realizado muy poco proceso de mejoramiento y se tiene escaso conocimiento a nivel molecular.

Por lo antes mencionado, uno de los objetivos del proyecto es obtener una biblioteca de mutantes mediante TILLING de *C. juncea* de alrededor de 1000 líneas, y sobre éstas realizar una caracterización fenotípica y muestreo en la generación M2. Desde éstas se construirá una biblioteca de ADN para realizar la secuenciación e identificación de mutaciones de interés.

Título del proyecto: DESARROLLO DE HERRAMIENTAS PARA EL MEJORAMIENTO DE LAS APTITUDES FORRAJERAS DE CROTALARIA

Instrumento: ASACTEI PEIC I+D

Año de la convocatoria: 2021

Organismo financiador: Secretaria de Ciencia, Tecnología e Innovación del Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación del Gobierno de Santa Fe

Director/a: Dezar Carlos Alberto A.

OBJETIVO

Desarrollar herramientas biotecnológicas que permitan el mejoramiento de *C. juncea* para su uso como cultivo forrajero y de servicio principalmente en el norte santafesino.

METODOLOGÍA

En el comienzo de este proyecto se procedió a la obtención de las semillas de *C. juncea* y el mutágeno (Anai T 2012).

Como primera actividad para la obtención de la biblioteca de *tilling* se trabajó en la puesta a punto del tratamiento con el mutágeno EMS (Barkley N and Wang M, 2008); Comai L and Henicoff S, 2006). Para esto se realizaron diferentes ensayos dosis/ respuesta, considerando como variables el tiempo de exposición de las semillas al agente mutágeno y el porcentaje de EMS utilizado (Guha, T.K.; Wai, A.; Hausner, G, 2017; Taheri, S.; Abdullah, T.; Jain, S.; Sahebi, M. and Azizi, P, 2017).

En un primer ensayo se seleccionaron semillas de *C. juncea*, de aspecto normal y poder germinativo del 100%. Estas semillas fueron sometidas a tres tratamientos distintos, en concentraciones del 0, 1, 2 y 3% (P/V) de EMS diluido en agua destilada durante 6 horas. Cada tratamiento contenía 100 semillas por dosis. Se evaluó el porcentaje de germinación y desarrollo de las plántulas, teniendo en cuenta su viabilidad y persistencia. Los ensayos se realizaron en plantineras con sustrato estéril, cultivadas en invernáculo, durante dos semanas. Considerando que los resultados obtenidos mostraban que el porcentaje de germinación de semillas y viabilidad de plántulas superaba el 50%, se procedió a repetir el ensayo, manteniendo las dosis y aumentando el tiempo de exposición al mutágeno, a 12 y 24 horas. En este último se determinó que 24 horas era el tiempo de exposición adecuado, obteniendo un 10% de las semillas germinadas con respecto al tratamiento de 6 y 12hs, en los cuales los porcentajes de semillas germinadas superaban el 90 y el 60% respectivamente.

A continuación, y una vez determinado el tiempo de exposición de las semillas al mutágeno, se probaron concentraciones de EMS más bajas, con el objetivo de aumentar los porcentajes de germinación a lograr. Se probaron las concentraciones de 0, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 y 1 % (P/V). Mediante este ensayo logramos establecer que la dosis más adecuada para mutagenizar con EMS *C. juncea* era el 0.5%, que nos garantizaban un 25% de semillas germinadas y plantulas viables, en un tiempo de exposición en mutágeno, de 24hs.

Una vez seleccionados el tiempo y la dosis adecuada, se procedió a la mutagénesis de 1000 semillas de *C. juncea* divididas en dos ensayos de 500 cada uno. Luego de evaluar su porcentaje de germinación y viabilidad, 25 y 20% respectivamente, en plantineras con sustrato durante dos semanas se procedió a transplantarlas a campo, en parcelas preparadas y con riego por goteo programado.

Una vez que la primera generación de mutantes (M1) cultivadas a campo completaron su ciclo de vida, se procedió a la cosecha y trilla de las semillas, obteniendo así la segunda generación (M2) de semillas. Durante la cosecha se etiquetaron y guardaron por separado las semillas provenientes de cada mutante M1. Este procedimiento garantiza la posibilidad de conocer la procedencia de cada una de las semillas obtenidas. De esta manera, se conoce la línea generacional de cada individuo que se obtenga a partir de las semillas M2.

RESULTADOS

En el primer ensayo de 6 horas se detectaron diferencias en los tiempos de germinación, siendo directamente proporcional la concentración de mutágeno EMS con el tiempo de exposición de las semillas al mutágeno. Si bien esto era un indicativo de que el agente mutagénico tuvo efecto sobre la germinación y viabilidad de las plántulas, estas superaban el 90%. En el segundo ensayo, de 12hs, si bien hubo una demora mayor en la germinación respecto al control, sin tratar, los porcentajes finales de germinación se mantuvieron elevados, siendo estos cercanos al 60%. En el ensayo número tres, detectamos una marcada incidencia



del mutágeno sobre el poder germinativo de las semillas logrando una germinación y viabilidad inferior al 25%

En dosis de 2 y 3% no se observó germinación, mientras que en la concentración de 1% se obtuvo un 10% de semillas germinadas. Posteriormente, en la puesta a punto, en donde se usaron concentraciones de 0, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 y 1 % (P/V), logramos establecer que la dosis más adecuada para mutagenizar con EMS *C. juncea* era el 0.5%. Logrando elevar el 10% de semillas germinadas, sin superar el 25%

CONCLUSIONES

- El tiempo de germinación en semillas en *C. juncea* es directamente proporcional a la concentración de EMS
- El número de semillas germinadas de *C. juncea* es inversamente proporcional a la concentración de EMS
- Al igual que la concentración del mutágeno, el tiempo de exposición de las semillas al agente mutagénico, retrasa la germinación de las mismas y disminuye su viabilidad
- La concentración y el tiempo de exposición óptimo de mutágeno para *C. juncea* es de un 0.5% durante 24hs

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

Anai T (2012). Potential of a mutant-based reverse genetic approach for functional genomics and molecular breeding in soybean. *Breeding Science* 61: 462–467.

Barkley N and Wang M (2008). Application of TILLING and EcoTILLING as Reverse Genetic Approaches to Elucidate the Function of Genes in Plants and Animals. *Current Genomics*, 2008, 9, 212-226

Comai L and Henicoff S (2006). TILLING: practical single-nucleotide mutation discovery. *The Plant Journal* 45, 684–694. Doebley, J.F.; Gaut, B.S.; Smith, B.D. (2006). The molecular genetics of crop domestication. *Cell*, 127(7):1309–1321.

Guha, T.K.; Wai, A.; Hausner, G. (2017). Programmable Genome Editing Tools and their Regulation for Efficient Genome Engineering. *Computational and Structural Biotechnology Journal* 15. 146–160

Kumar, A.; McKeown, P.; Boualem, A.; Ryder, P.; Brychkova, G.; Bendahmane, A.; Sarkar, A.; Chatterjee, M. and Spillane, C. (2017) TILLING by Sequencing (TbyS) for targeted genome mutagenesis in crops. *Mol Breeding*, 37:14

Taheri, S.; Abdullah, T.; Jain, S.; Sahebi, M. and Azizi, P. (2017). TILLING, high-resolution melting (HRM), and next-generation sequencing (NGS) techniques in plant mutation breeding. *Mol Breeding* 37:40

