

Dos casos de poliploidía en alfalfa (1) (*Medicago sativa* L.)

POR EL

ING. ACR. GINO A. TOMÉ (2)

En alfalfa, considerada por la mayoría de los investigadores, como una planta tetraploide con cuatro series de ocho cromosomas, se han comprobado dos casos de poliploidía (octoploides) que se describen en el presente trabajo.

A. — POLIPLOIDIA OBTENIDA ARTIFICIALMENTE.

Dada su posible importancia fitotécnica — además de su interés en genética pura — se trató de obtener plantas poliploides de alfalfa, mediante dos de los procedimientos conocidos para tal fin: colchicina y altas temperaturas.

Hasta el momento de plantearse esta experiencia era conocido un solo caso de duplicación del número normal de cromosomas en alfalfa, obtenido por Cooper en 1939, ⁴ (*), aplicando las técnicas ensayadas con éxito en otras especies por Randolph (1932), Dorsey (1936), Atwood (1936), Müntzing, Tomeport y Mundt-Petersen (1936), Lutkov (1938), Karpechenko (1938) y otros (**), y basadas todas ellas en el empleo de las altas temperaturas.

(1) Recibido para su publicación en Julio de 1945.

(2) Auxiliar de enseñanza de Forrajes y Jefe de la Sección Forrajes.

(*) Los números superiores hacen referencia a las citas bibliográficas.

(**) La abundante bibliografía del tema ha sido recientemente revisada por F. F. González. *Producción experimental de tetraploides por medio de altas temperaturas*. Tesis Fac. Agr. y Vet. Buenos Aires, 1941. En *Ingeniería Agronómica*. 6: 113-119. 1944.

TÉCNICA EXPERIMENTAL.

Según trabajos anteriores de Cooper³, la fecundación se produce 24 a 48 horas después de la polinización y las primeras divisiones tienen lugar hasta 72 horas después de la misma. Queda así determinado el período durante el cual es necesario hacer actuar la colchicina o el calor, para tener más probabilidades de sorprender las primeras divisiones cigóticas.

Con el fin de aumentar la fertilidad, se trató de provocar la fecundación cruzada, haciendo «explotar» la columna sexual sobre los granos de polen de otra planta elegida como padre. (*)

Como padres para los distintos cruzamientos se utilizaron individuos del plantel de selectas del Instituto, que a juicio del autor, tuvieran probabilidad de dar una descendencia fitotécnicamente interesante en caso de lograrse la duplicación del número de cromosomas. Pero siendo el objeto de este trabajo dar a conocer los resultados obtenidos solamente desde el punto de vista de la poliploidía, no nos extenderemos en consideraciones de orden fitotécnico.

ENSAYOS CON COLCHICINA.

A pesar de los resultados negativos obtenidos y a solo título de información, comunicamos haber tratado con soluciones de colchicina de 0,5 a 0,25 ‰, racimos florales que habían sido polinizados 48 horas antes del tratamiento.

Se ensayaron los sistemas de la pipeta con aplicación de continuas gotas y el de inmersión en soluciones por espacio de 12 horas.

Si bien es cierto que se notaron los efectos comunes del alcaloide, variables en su intensidad con la concentración de las soluciones, la observación de los estomas y granos de polen de las 341 plantas obtenidas de los granos cosechados, demostró que todas eran normales.

ENSAYOS CON ALTAS TEMPERATURAS.

Adaptando los distintos implementos que Randolph⁵ utilizó en la obtención de los maíces poliploides, se consiguió envolver con los fomentos

(*) Empleando un pequeño trozo de papel rugoso, según técnica descripta por Burkart y Ragonese¹ se tiene la casi seguridad de que, sin previa castración, el polen extraño germinará más rápidamente que el de la misma planta, y hará que prepondere la fecundación cruzada, de acuerdo a las experiencias de numerosos investigadores y a las observaciones personales del autor. Burkart² resume la bibliografía extranjera sobre este tema y detalla numerosos experimentos realizados con alfalfa bonaerense.

eléctricos, a una serie de tallos florales y someterlos a la acción del calor artificial.

Aumentando progresivamente la cantidad de calor en el ambiente que rodeaba las flores y obtenida la temperatura deseada, se procuró mantenerla más o menos constante por espacio de una hora.

Se sometieron a las cigotas en división a distintos tratamientos de temperaturas entre 41 y 45 grados, con oscilaciones en cada tratamiento de aproximadamente un grado, durante la hora que duraron los mismos.

Fueron tratadas más de 500 flores que habían sido fecundadas 48 a 64 horas antes.

Se comprobó que los tratamientos más intensos dañaban considerablemente a los órganos vegetativos; plasmolizando racimos florales, hojas y yemas apicales; sin embargo del tratamiento más intenso, se obtuvo la única planta octoploide (fig. 1).

Los frutos fueron cosechados a su madurez (marzo 1941) y de la trilla de los mismos se seleccionaron aproximadamente 500 granos en buenas condiciones.

Sembrados inmediatamente en invernáculo, arraigaron 444 plantas, que en la primavera se trasplantaron al campo experimental.

Se efectuó un corte para uniformar el desarrollo de todas las plantas y cuando los nuevos tallos tenían una altura aproximada de 0,20 m. se comenzaron las observaciones sobre estomas y células epidérmicas.

OBSERVACIONES DE ESTOMAS Y CÉLULAS EPIDÉRMICAS.

Teniendo en cuenta que los estomas y las células epidérmicas tienen un tamaño variable según la edad de la hoja a que pertenecen y que también influyen sobre estas medidas las condiciones de estación y de medio, se tomaron pequeños trozos de epidermis del foliolo mediano de la tercer hoja bien desarrollada de cada uno de los tallos. En algunos casos se fijaron los trozos de epidermis y se colorearon con safranina (*), lo que permitió observar mayores contrastes en las preparaciones y tomar mejores fotografías (fig. 1).

Se observó la epidermis de las 444 plantas, notándose que especialmente la señalada con el N° 124 presentaba marcadas diferencias con sus hermanas de tratamiento, que eran normales, y que desde ese momento fueron tomadas como plantas testigo en todas las determinaciones.

(*) *Fijador*: alcohol (50/70 %), 90 cm³; ácido acético glacial 5 cm³; formol, 5 cm³.
Solución colorante: Safranina, 1 g.; alcohol (95 %), 50 cm³; agua, 50 cm³; agua de anilina, 1 gota.

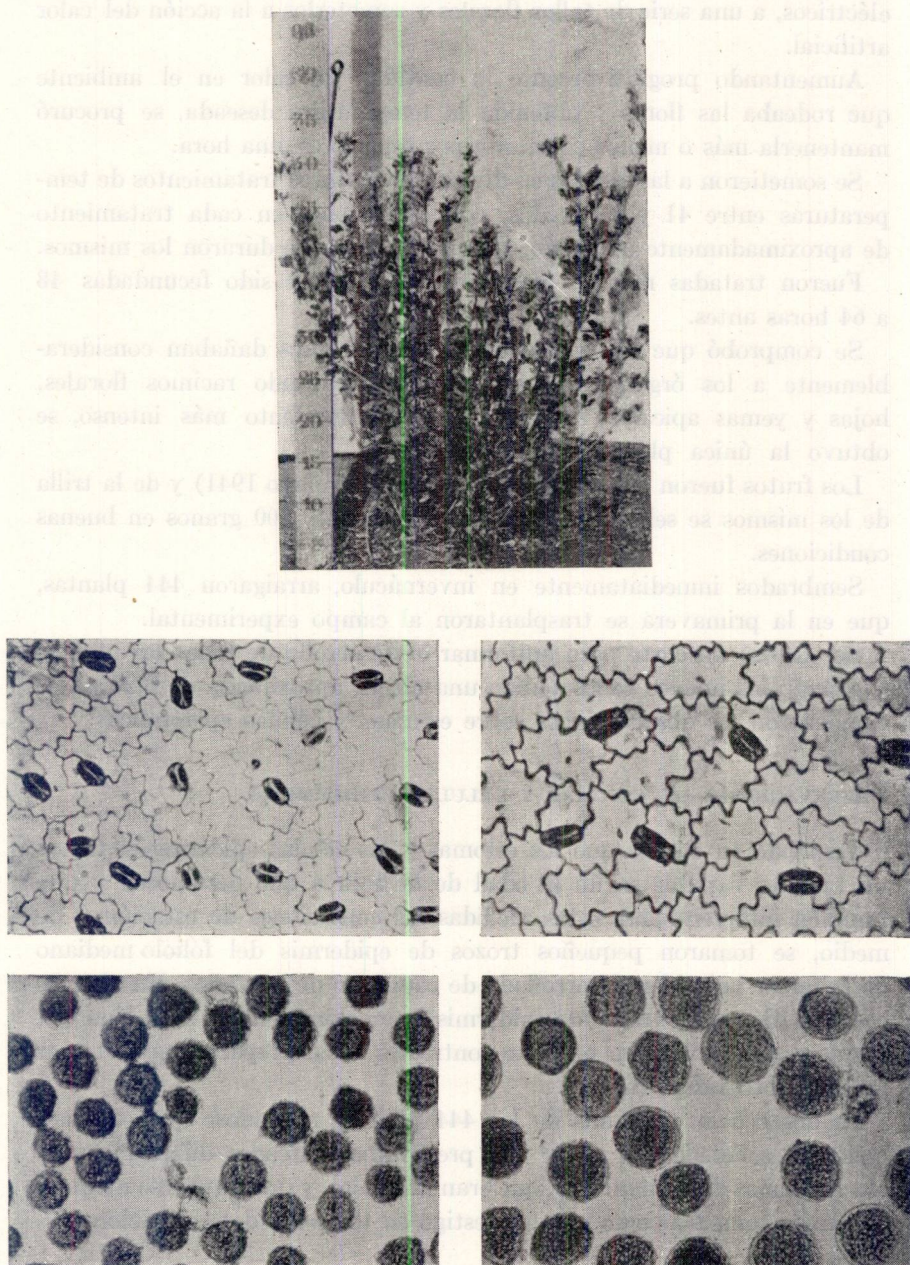


Fig. 1. Arriba: Planta de alfalfa poliploide; Centro: Estomas y células epidérmicas X 200; Abajo: Granos de polen X 200; Izquierda: Normales; Derecha: Poliploides.

Empleando el ocular micrométrico, se midieron los diámetros mayores de los estomas y se pudo comprobar, que mientras el largo del estoma en micrones en las plantas testigo eran de $21 \pm 0,21$, la planta N° 124 presentaba una longitud media de $29 \pm 0,22$; siendo tales, los valores de las medias con sus respectivas desviaciones.

El número de estomas medidos en cada caso fué de cuarenta y se comprobó que la diferencia entre las dos medias era altamente significativa.

Para comprobar los tamaños de las células epidérmicas se determinó con planímetro la superficie total cubierta por la proyección de un grupo de 10 células, observadas al microscopio y dibujadas con cámara clara. Se midieron, para cada planta, las superficies de 25 de estos grupos de 10 células.

Los grupos de 10 células de las plantas comunes dieron una superficie de proyección de $2.120 \text{ mm}^2 \pm 73 \text{ mm}^2$. Los de la planta 124 midieron $3.540 \text{ mm}^2 \pm 105 \text{ mm}^2$; lo que significa un aumento de superficie celular de 67 %.

OBSERVACIÓN DE LOS GRANOS DE POLEN.

Al llegar el momento de la floración de los tallos ya desarrollados, se recogió polen de las plantas que en las observaciones anteriores, hubiesen presentado cierta diferencia con el tipo normal, que también en este caso se utilizó como testigo.

Efectuando observaciones microscópicas de los granos de polen suspendidos en solución de Lugol, se notó que efectivamente la planta N° 124 hacia excepción en estas determinaciones, por el diámetro mayor de sus granos de polen (fig. 1).

Con sus respectivas desviaciones y expresadas en micrones, las medidas resultaron ser de $43 \pm 0,60$ en la planta N° 124 y de $29 \pm 0,36$ en las plantas normales.

Se dan promedios de 25 determinaciones y las diferencias señaladas resultan ser altamente significativas.

OBSERVACIONES CROMOSÓMICAS.

a) En meiosis.

Habiéndose notado tales diferencias en la planta N° 124, se comenzó el estudio de la meiosis con el método del carmín acético.

Se tropezó con algunos inconvenientes en los trabajos, por el escaso número de células madres del polen que se encontraban en división y

por el reducido contraste visual con que aparecían los cromosomas teñidos según esta técnica.

Con estas observaciones se llegó a tener la casi seguridad de que efectivamente se trataba de una planta poliploide, ya que con cierta aproximación se contaban 32 cromosomas en lugar de los 16 correspondientes a la alfalfa común.

b) En mitosis.

Se juzgó necesario hacer observaciones de cromosomas en raicillas para confirmar que se había logrado la poliploidía.

Con ese objeto se pusieron a germinar cuatro de las trece semillas cosechadas en la planta N° 124 y a la vez algunos granos de las plantas testigos.

Se fijaron los extremos radiculares con el líquido de Craft y después de incluidos en parafina y seccionados en trozos de doce micrones de espesor, se colorearon con cristal violeta (*).

Se confirmó la poliploidía de la planta N° 124, por el recuento de $2n = 64$ cromosomas en las células en división, con el consiguiente aumento del volumen celular y cromosómico, cuando se le compara con los testigos de $2n = 32$ cromosomas (fig. 2).

OBSERVACIONES COMPLEMENTARIAS.

En general, la planta octoploide, difiere al compararla con el tipo común, en el sentido de que sus tallos, no muy numerosos, son más robustos y erectos; sus hojas más consistentes, carnosas y de nervaduras más prominentes; las flores mayores que las tetraploides, con cáliz más pubescente, se desenlazan en la forma normal y dan lugar a unos pocos frutos, en general uniseminados, que si bien tienden a la forma espiralada no llegan a completar una espira; las semillas provenientes de frutos del tipo señalado, tienen la particularidad de ser todos iguales en su tamaño y en su forma.

B. — POLIPLDIDIA ESPONTÁNEA.

En un plantel de más de tres mil selectas de alfalfa, donde se efectuaban observaciones individuales tendientes a la selección de las mejores formas forrajeras, se descubrió en julio de 1942 una planta que difiriendo netamente del tipo común, se asemejaba a la alfalfa poliploide obtenida mediante las altas temperaturas según informamos en este mismo trabajo.

(*) Dejo expresa mi gratitud hacia el Ing. Agr. F. Saura, Jefe de la Sección Cito-
logía, quien se hizo cargo del montaje de las preparaciones.

ORIGEN DEL MATERIAL.

Después de una rigurosa selección masal de un conjunto de plantas madres que se llevaban a ensayo comparativo de rendimientos y longevidad, se quiso estudiar el valor de las mismas por su descendencia. Para ello se inició la siembra en macetas y se trasplantaron 110 plantas de cada una de las plantas madres.

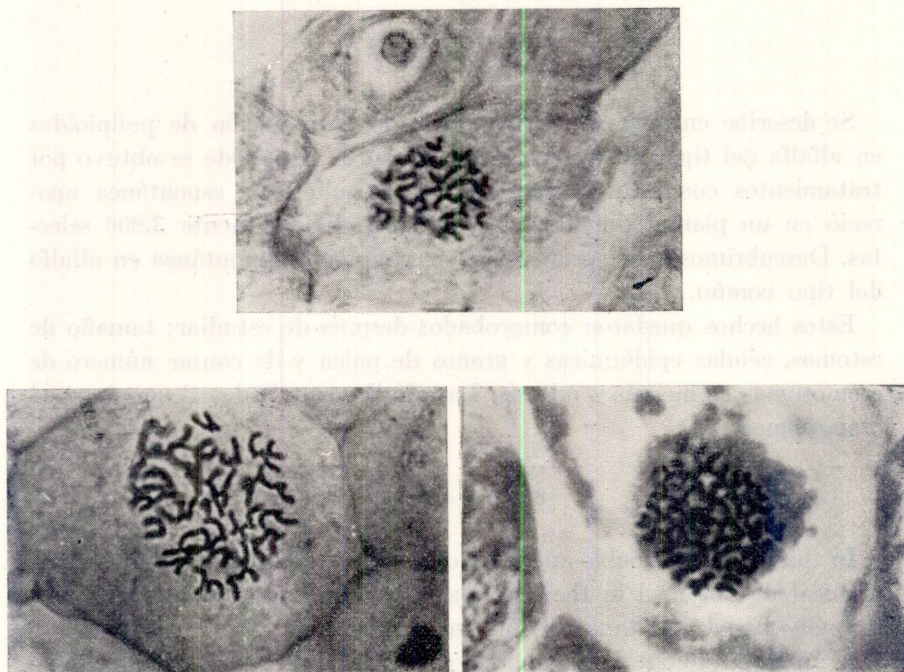


Fig. 2. Cromosomas en mitosis X 2000; Arriba: Alfalfa común; (32 cromosomas); Abajo: Alfalfas poliploides (64 cromosomas); Izquierda: obtenida artificialmente; Derecha: espontánea.

La semilla provenía de la polinización libre entre las 28 plantas que después de seleccionadas, se dejaron aisladas en el momento de la floración.

OBSERVACIONES CITOLÓGICAS.

La planta individualizada con el número 455-43, que presentara características muy similares a las de la alfalfa poliploide que se obtuviera

con el empleo de las altas temperaturas, fué analizada cariológicamente. Para ello se descubrió parte del sistema radicular de la planta y en hora conveniente, se recogieron extremos de raicillas jóvenes que se fijaron y colorearon según técnica señalada anteriormente.

Del recuento cromosómico resultó que la planta en estudio poseía $2n = 64$, cromosomas. (fig. 2).

Nos encontramos así, ante un interesante caso de octoploidía, aparecido espontáneamente en alfalfa del tipo común.

RESUMEN

Se describe en el presente trabajo la doble obtención de poliploides en alfalfa del tipo común. La primera planta octoploide se obtuvo por tratamientos con altas temperaturas y la poliploide espontánea apareció en un plantel donde se estudiaban individualmente 3.000 selectas. Descubrimos así el primer caso de poliploidía espontánea en alfalfa del tipo común.

Estos hechos quedaron comprobados después de estudiar: tamaño de estomas, células epidérmicas y granos de polen y de contar número de cromosomas en meiosis y mitosis. Las alfalfas estudiadas tienen $2n = 64$ cromosomas.

SUMMARY

In this work the double aparition of polyploid plants in alfalfa is communicated. Obtained in the first place by temperature treatments and secondly found spontaneously in an open field.

A. In regard to obtaining a polyploid alfalfa, for the sake of its possible economic and scientific importance we have treated flowers of the common type previously pollinated under control, with different concentrations of colchicine during a period of 12 hours and secondly applying high temperatures ranging from 41 to 45° C for 1 hour.

As to the first treatment with colchicine no results were obtained. From the seeds obtained after the temperature treatments, resulted one polyploid plant ($2n = 64$ chromosomes). The evidence of this plant being polyploid was testified by studying the sizes of stomatas, epidermic cells and pollen grains and counting the chromosomes number on both, the pollen mother cells and root tips developed from the seeds obtained.

B. With reference to the polyploid found spontaneously in an open field we beg to inform that in a plot of more than 3.000 plants one was

observed differing from the common type and resembling very much the polyploid plant obtained by temperature as referred to here above. This case was studied cytologically finding a count of $2n = 64$ chromosomes.

In this way we met with the first case of natural polyploidy in the common type of alfalfa.

BIBLIOGRAFIA

1. BURKART, A. y A. RAGONESE. *Investigaciones relacionadas con la biología floral de la alfalfa bonaerense*. Rev. Cent. Est. Agron. 26 (147): 54-66. Buenos Aires, 1933.
2. BURKART, A. *Frecuencia de la fecundación cruzada en la alfalfa, según experiencias con plantas recesivas de flor blanca. Consideraciones sobre el mejoramiento de esta forrajera*. Rev. Arg. Agr. 4 (2): 83-100. 1937.
3. COOPER, D. C. *Macrosporogenesis and embryology of Medicago*. Jour. Agr. Res. 51 (5): 471-477. 1935.
4. COOPER, D. C. *Artificial induction of polyploidy in alfalfa*. Am. Jour. Bot. 26(2) 65-67. 1939.
5. RANDOLPH, L. F. *Some effects of high temperatures on polyploidy and other variation in maize*. Proc. Nation. Acad. Sci. 18 (3): 222-229. 1932.