

UN APOORTE A LA SELECCIÓN DE SEMILLAS

Federico Santiñaque || Beatriz López || Gustavo Folle

Investigadores*

Ahora en Uruguay es posible analizar, en forma rápida y con elevada precisión, la calidad genética de lotes de semillas de especies forrajeras de interés productivo, gracias al empleo de una moderna tecnología: la citometría de flujo.

Como sabemos, toda la información necesaria para el desarrollo de un organismo vivo se encuentra codificada en el ácido desoxirribonucleico (ADN). Esta compleja molécula está empaquetada en los cromosomas, verdaderos vehículos del material hereditario.

El número y estructura de los cromosomas de cada especie es algo estrictamente establecido, y si este equilibrio es alterado pueden aparecer patologías o variaciones en la constitución de los organismos. Tal es el caso del fenómeno denominado «poliploidía», que se define como un aumento en el contenido de ADN, que triplica, cuadruplica, quintuplica, etc, el número de cromosomas de una especie.

Este evento, letal para la mayoría de los animales, es asombrosamente tolerado en el reino vegetal, donde suele generar un aumento en la producción de biomasa y/o nutrien-

tes. Esta plasticidad del genoma vegetal es frecuentemente usada para el mejoramiento genético de distintas especies de interés agroindustrial, cuando se busca un mayor rendimiento de las praderas o cultivares. Por lo tanto las semillas poliploides — con mayor contenido de ADN — son las que se cotizan mejor en el mercado.

Actualmente en nuestro país y la región suele plantearse el problema de que variedades con un menor nivel de ploidía contaminan lotes de semillas poliploides, lo cual genera importantes pérdidas productivas y económicas al descender la calidad del lote en su conjunto. Debido a esto, existe una gran demanda por el análisis de posibles contaminaciones en los lotes de semillas disponibles en plaza. Por un lado, los productores agropecuarios constatan a nivel de campo que en algunos casos el rendimiento observado está por debajo de lo esperado para una variedad poliploide, y solicitan un estudio del porcentaje de poliploidía del lote de semillas adquirido. Por otra parte, las empresas proveedoras de semillas necesitan un método rápido para verificar la calidad de sus productos.

La cuantificación de los niveles de poliploidía en lotes de semillas no es una tarea sencilla, ya que se requiere el análisis de un número muy elevado de simientes para alcan-



Plántulas de raigrás correspondientes a un lote de semillas suministrado por el INASE para estudio de poliploidía.

zar valores estadísticamente significativos. Hasta ahora en la región la única posibilidad era realizar ese estudio mediante el conteo cromosómico por microscopía óptica. Esta técnica es muy lenta, laboriosa y prácticamente imposible de realizar a gran escala. Además es bastante subjetiva en sus resultados, dado que depende de la persona encargada del estudio, y el número de semillas que se suelen analizar es apenas suficiente.

Recientemente, en el Servicio de Clasificación Celular y Citometría de Flujo (SECF) del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), y en colaboración con el Instituto Nacional de Semillas (INASE), se ha optimizado un método basado en la citometría de flujo (CF) para cuantificar los niveles de poliploidía en lotes de semillas. Dicho emprendimiento fue sugerido por el INASE al tomar conocimiento de que un laboratorio de Estados Unidos (Oregon State University Seed Laboratory) desarrollaba estos estudios de ploidía en semillas empleando la citometría de flujo.

Sin embargo, el protocolo del análisis citométrico llevado a cabo en esta universidad

no estaba disponible al público. Por lo tanto fue necesario elaborar en nuestro laboratorio un protocolo basándonos en la experiencia previa en citometría de plantas e incorporando numerosos ajustes metodológicos.

UNA PODEROSA TECNOLOGÍA

La técnica de la citometría de flujo surge por la necesidad de analizar y/o caracterizar miles de células, cromosomas, bacterias, etc, en un tiempo muy corto, algo muy difícil de lograr empleando microscopios ópticos o electrónicos. En un citómetro de flujo las células no están adheridas a un portaobjetos, como en los estudios microscópicos convencionales, sino que viajan en una corriente líquida. Esto acelera de manera considerable el tiempo de análisis de cada una.

El flujo de células es impactado por un haz muy potente de luz láser que permite obtener mucha información sobre las mismas (tamaño, complejidad, presencia de antígenos, etc). Por ejemplo, tiñendo los núcleos celulares con un colorante fluorescente específico para el ADN es posible detectar y cuantificar diferencias

* Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. Integrantes del Servicio de Clasificación Celular y Citometría de Flujo. Colaboraron en el desarrollo de esta metodología los ingenieros agrónomos Deneb Manfrini y Jorge Machado (INASE).



Tubo con núcleos celulares de raigrás en suspensión.



Flujo de 70 micras por donde circulan los núcleos que son analizados por el citómetro.

en cuanto al contenido de éste en muestras vegetales debidamente procesadas.

Como podemos ver, los citómetros de flujo son instrumentos sumamente complejos que combinan tecnologías de avanzada en dinámica de fluidos, luz láser, fluorescencia, óptica, electrónica y procesamiento computacional. Lo interesante de esta metodología es que no sólo aporta muchísimos datos en forma simultánea (análisis multiparamétrico) sino que lo hace a una velocidad asombrosa: es capaz de obtener resultados de más de mil células en solamente un segundo.

VALORACIÓN DE LA CALIDAD GENÉTICA DE SEMILLAS FORRAJERAS

Empleando la citometría de flujo hemos diseñado un protocolo para determinar el porcentaje de poliploidía en lotes de semillas de la gramínea forrajera *Lolium multiflorum* (raigrás), utilizada frecuentemente en praderas para pastoreo del ganado, que presenta dos variedades: diploide (tal como aparece en la naturaleza) y tetraploide (creada por duplicación artificial de los cromosomas). Este protocolo ha sido cuidadosamente elaborado

mediante una optimización del procesamiento de las muestras y las determinaciones citométricas. El método resultante permite cuantificar de forma rápida y certera el porcentaje de poliploidía en lotes de semillas y está siendo utilizado para analizar las de raigrás.

Recientemente se ha implementado —junto con el INASE— un servicio a nivel nacional para la cuantificación del porcentaje de poliploidía en lotes de semillas. Según lo acordado, los productores o empresas interesadas en analizar sus semillas deben enviar muestras de los lotes al INASE, donde serán debidamente codificadas y colocadas a germinar.

En un plazo de dos o tres semanas las plántulas son enviadas para su análisis al SECIF, que entrega el informe correspondiente en un plazo menor a las 48 horas. Este servicio SECIF-INASE está abierto a la recepción de muestras de cualquier punto del país. Es de sumo interés extender este método a otras especies vegetales de importancia en el ámbito productivo. En este sentido, creemos que esta metodología puede constituir un valioso aporte para el mejoramiento de la calidad de los lotes de semillas de nuestro país. ■

«Humean en la vieja cocina hospitalaria / los rústicos candiles... Madrugadora leña / infunde una sabrosa fragancia lugareña; / y el desayuno mima la vocación agraria...»

Fragmento de *El alba*, poema de Julio Herrera y Reissig.