



## MUTAGENESIS IN *Lupinus polyphyllus* A TOOL FOR PRODUCING SPRING VARIANTS?

FATTA N.<sup>1</sup>, MASCARINI A.<sup>2</sup>, LOPEZ S.<sup>3</sup>

*Genetics (1) and Floriculture (2) Departments Facultad de Agronomía UBA Av. San Martín 4453 Buenos Aires City.  
Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA) (3)*

*nafatta@yahoo.com.ar*

---

### SUMMARY

*Lupinus polyphyllus* remains vegetative during the first year, stores cold during winter and is induced to blossoming in the second year. Inflorescences are attractive and varied coloured terminal clusters. In Buenos Aires the historical average winter temperature is 11.5 °C and the number of hours of cold are not enough for *L. polyphyllus* to flower so there is no commercial offer in pots. The line of work chosen to produce genetic variability in *L. polyphyllus*, was induced mutagenesis with the purpose of rescuing genetic variants that meet the required cold naturally in Buenos Aires and capable of flowering and producing viable seeds. Seeds harvested in Bariloche were sown on september 4, 2003. 600 seedlings received gamma radiation at a rate of 50 Gy and were grown in pots in a greenhouse at the Facultad de Agronomía. 18 plants were transplanted to the soil in the winter of 2004 and after flowering, 30 seeds were harvested (BA) which were sown in pots on may 20, 2005 together with 93 seeds from Bariloche (WILD). Once, the number of leaves was counted in the 6 surviving plants from BA and the WILD 93, finding significant statistical differences in favour of the former. The objective pursued was attained since individual plants that were capable of blossoming and bearing fruit naturally in Buenos Aires were obtained. The descendance of these individuals would be the appropriate germoplasm to initiate a genetic improvement plan that could originate a plant variety of *L. polyphyllus* apt for Buenos Aires.

**Additional key words:** vernalization, qualitative character, gamma radiation, plant variety

### RESUMEN

*Lupinus polyphyllus* permanece vegetativa durante el primer año, acumula frío durante el invierno y en el segundo se induce a floración. Las inflorescencias son racimos terminales atractivos de variados colores. En Buenos Aires la temperatura invernal media histórica es 11.5 °C, el número de horas de frío es insuficiente para que *L. polyphyllus* florezca y no se registra oferta comercial de plantas en maceta. Se optó por la vía de la mutagénesis inducida como fuente de variabilidad genética en *L. polyphyllus* con el objetivo de rescatar variantes genéticas que satisfagan su necesidad de frío naturalmente en Buenos Aires, sean capaces de florecer y dar semillas viables. Semillas cosechadas en Bariloche fueron sembradas el 4/9/2003. 600 plántulas recibieron radiación gamma en dosis de 50 Gy y se cultivaron en macetas en un invernáculo de la Facultad de Agronomía. 18 plantas fueron trasladadas al suelo en el invierno 2004 y después de la floración se cosecharon 30 semillas (BA) que se sembraron el 20/5/2005 en macetas junto con una entrada de 93 semillas procedentes de Bariloche (SALVAJES). En una oportunidad se contó el número de hojas de las 6 plantas BA sobrevivientes y de las 93 SALVAJES hallándose diferencias estadísticas significativas a favor de las primeras. Se alcanzó el objetivo propuesto ya que se recuperaron individuos que alcanzaron a florecer y fructificar naturalmente en Buenos Aires. La descendencia de estos individuos sería un germoplasma apropiado para iniciar un plan de mejoramiento genético que podría originar una variedad vegetal de *L. polyphyllus* apta para Buenos Aires.

**Palabras claves adicionales:** vernalización, carácter cualitativo, radiación gamma, variedad vegetal.

## INTRODUCCIÓN

*Lupinus polyphyllus* es una especie perenne que permanece vegetativa y en roseta durante el primer año. En el segundo año rebrota de tallos seudorizomatosos (Planchuelo, 2004), se elonga hasta 1.5 m y se induce a floración (Wareing y Phillips, 1970; Planchuelo, 2004). La inflorescencia en racimos terminales y erectos (Ulibarri et al, 2002) tiene numerosas flores papilionoideas de colores azules, rojos, rosados, blancos y variegados (Dimitri, 1978). Sus raíces pivotantes son profundas y en las raíces secundarias pueden presentarse nódulos del género *Rhizobium* (Cohen, 2005).

*L. polyphyllus* esta asilvestrado en la zona andino-patagónica argentina de inviernos marcados en donde alcanza a cubrir sus requerimientos de vernalización (Planchuelo, 1984; Vallejos et al, 2002) dándose la diferenciación a estado reproductivo. En Buenos Aires (34°35'S, 59°29'O) el invierno es suave y el número de horas de frío no es suficiente para que *L. polyphyllus* florezca.

Con suplementación de frío podría lograrse floración; sin embargo los costos de dicho tratamiento aparecen como difíciles de recuperar. Probablemente éste sea uno de los motivos por los que no se registra oferta comercial de plantas en maceta.

En función de este análisis se optó por usar la vía de la mutagénesis inducida como fuente de variabilidad genética en *L. polyphyllus* con el objetivo de rescatar variantes genéticas que satisfagan su necesidad de frío naturalmente en Buenos Aires y sean capaces de florecer y dar semillas viables.

Se han reportados casos de mutantes primaverales. En *Arabidopsis* dichos mutantes fueron útiles para evidenciar el modo de acción de las proteínas codificadas por los genes VRNs de vernalización (Levy et al, 2002). Por otra parte la selección de mutantes primaverales espontáneos de *Cicer reticulatum* ha tenido un rol destacado en la nutrición humana (Abbo et al, 2003).

Estas observaciones demuestran que en distintas poblaciones existen variantes tanto primaverales como invernales.

La mutagénesis como medio de producir variabilidad esta recomendada para caracteres cualitativos o para caracteres en que intervienen pocos genes (Poehlman, 1988). Para caracteres cuantitativos la probabilidad de provocar simultáneamente mutaciones en todos los genes que los codifican es despreciable. Frecuentemente la necesidad de vernalización es un carácter regido por uno (género *Lolium*) o por pocos genes (Wareing y Phillips, 1970 ; Levy et al, 2002). Hiort (1985) propone que algunos caracteres codificados por pocos genes podrían estarlo por una combinación de genes mayores y menores, de manera que el efecto de una mutación podría ser evidente si afectara a uno de los primeros. El efecto de una mutación también podría mostrar un gradiente de expresión, si se considera que puede mutar el gen (de vernalización) o los genes que codifican elementos de control de la expresión del gen (Hiorth, 1985). En *Arabidopsis* un mecanismo semejante involucra un mutante que confiere primaveridad aunque sería un mutante para un gen que interactúa con los genes VRN y no un mutante para un gen VRN (Zhang y van Nocker, 2002). Wareing y Phillips (1970) y Levy et al (2002) indican que son alelos recesivos los que comúnmente codifican para necesidad de vernalización por lo que la mutación de uno solo de los alelos del gen a su estado dominante podría dar un fenotipo más o menos primaveral sin necesidad de esperar mutantes sólidas. Finalmente se ha tomado en consideración el efecto dosis analizado por Xin et al (1988) y por Grande et al (2002). El efecto dosis podría determinar que el reemplazo gradual de los alelos de alto requerimiento de frío por alelos que otorgan primaveridad origine una gama de fenotipos capaces de florecer con números decrecientes de horas de frío hasta llegar al individuo primaveral que no conservaría ninguno de los alelos originales.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Semillas de *L. polyphyllus* cosechadas en 1998 en la ciudad de Bariloche (41° 10' latitud sur, 71° 20' longitud oeste), provincia de Río Negro (Argentina) y conservadas a 4°C, se ubica-

ron el 4/9/2003 en cajas de Petri sobre papel de filtro húmedo a temperaturas entre 18 y 24° C. A los 7 días, cuando habían emergido la radícula y la plúmula se sometieron a radiación gamma con una fuente de Cobalto 60, en el Laboratorio de Dosimetría de Altas Dosis de la Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA) ubicada en la ciudad de Ezeiza, en la provincia de Buenos Aires. Se suministró una dosis de 50 Gy para lo cual se requirió 42'52" a una velocidad de 1.1645 Gy/minuto con un Equipo Gammacell 220 procedente de Canadá (Atomic Energy of Canada Limited, Ottawa) y adquirido por la CNEA el 8/6/1965. Inmediatamente se plantó en 600 macetas de 12 cm de diámetro y de 1 l de volumen utilizando un sustrato constituido por resaca, perlita, turba y pinocha en partes iguales. Las macetas se dispusieron al azar en un invernáculo de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires. Se regó con agua de red y se fertilizó cada 20 días con un fertilizantes de relación N:P:K de 18:18:18 a razón de 0.5 g/l (90 ppm de N). En el invierno 2004 se plantaron en el suelo las 18 plantas sobrevivientes en un predio de la Facultad ya citada. Se continuó regando y fertilizando como se había hecho con las macetas y se colectó toda la semilla producida.

Estas semillas que se identificaron como BA, se sembraron el 20/5/2005 en bandejas de germinación multicelda sobre un sustrato compuesto en un 40% del preparado comercial específico para germinación, 40% perlita y 20% de arena. Además de la semilla cosechada en el predio de la Facultad de Agronomía, se sembró semilla procedente de la ciudad de Bariloche. Esta entrada se identificó como SALVAJES y se usó como representativo del material seleccionado naturalmente en climas de invierno riguroso. El 22/6/2006 se ubicaron en macetas de 6 cm de diámetro y de 0.75 l de volumen y posteriormente en macetas de 12 cm de diámetro y de 1 l de volumen utilizando un sustrato constituido por resaca, perlita, turba y pinocha en partes iguales y se dispusieron al azar en un invernáculo de la misma Facultad. Se contó el número de hojas y se hizo análisis de la varianza con el programa Infostat (<http://www.infostat.com.ar>).

## RESULTADOS

Las plantas mostraron buena sanidad durante 2004 por lo que no se efectuaron tratamientos con fitoterápicos. Las hojas palmadas aportaron motivo decorativo invernal ya que no cayeron y tomaron coloraciones rojizas. Durante enero 2005 florecieron 3 plantas (Figura 1) que alcanzaron a fructificar y dar 30 semillas que se cosecharon durante el mes de abril.



Figura 1. Plantas de *L. polyphyllus* florecidas en la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires (Argentina) durante enero 2005

En 2005 germinaron 93 semillas del grupo SALVAJES y 30 semillas del grupo BA; 6 de las últimas continuaron su desarrollo. El 23/12/05 se contó el número de hojas de todas las plantas hallándose diferencias significativas entre grupos ( $p=0.027517$ ). Los individuos BA mostraron un número promedio de hojas superior al de los individuos SALVAJES (4 y 3 respectivamente) (Figura 2).

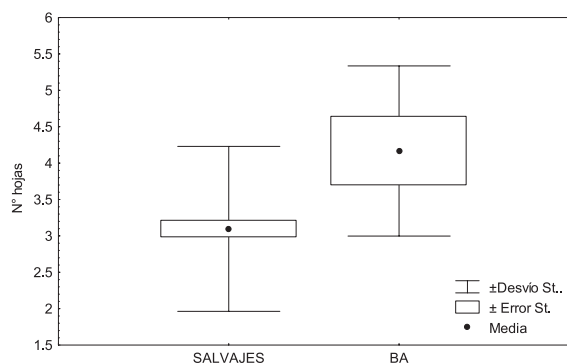


Figura 2. Números de hojas al 23/12/05

## DISCUSIÓN

Los resultados permiten concluir que se alcanzó el objetivo propuesto ya que se recuperaron individuos que alcanzaron a florecer naturalmente en Buenos Aires. La pérdida de 588 individuos durante el ciclo 2004 se adjudicó a los daños producidos por el tratamiento mutagénico y a la selección efectuada por el ambiente. Se propone que los 15 individuos que no alcanzaron a inducirse a floración no lograron satisfacer sus necesidades de frío y que los 3 individuos que florecieron se diferencian genéticamente de las poblaciones seleccionadas en los inviernos rigurosos de la patagonia argentina. Se postula que las 24 plántulas que murieron en el ensayo del año 2005 fueron afectadas negativamente por el ambiente. Es probable que los picos de alta temperatura que suceden en los otoños de Buenos Aires sean una de las causas de la muerte. Es probable que muchos genes del fondo genético hayan sufrido selección al formarse la población BA únicamente con aquellos individuos que alcanzaron a satisfacer su necesidad de frío en Buenos Aires. Esta puede ser una de las causas de las diferencias a favor detectadas en el número de hojas durante 2005 (Figura 2). Las plantas BA tuvieron buen desarrollo vegetativo e inicialmente no se evidenciaron efectos de deriva o de depresión por endogamia relacionados con el pequeño número de individuos que aportaron descendencia a esa generación. Elliot (1976) postula la existencia de mecanismos que impiden la expresión de dicha depresión e indica que en el pro-

ceso de domesticación de leguminosas como poroto y lotus que han sido sometidas a intensa selección se ha establecido un sistema genético que tolera la autofecundación.

No se ha descartado la existencia de varianza aditiva para necesidad de frío en la entrada de 1998, de manera que tendría valor distinto de cero la probabilidad que los individuos florecidos en Buenos Aires sean producto de la selección para primaveralidad.

Si bien los plazos para el lanzamiento de un material genéticamente mejorado son muy prolongados (Briggs y Knowless, 1967) este germoplasma podría ser un punto de partida hacia la búsqueda de una variedad vegetal de *L. polyphyllus* con buen comportamiento en Buenos Aires.

## AGRADECIMIENTOS

A E.Enright por la colaboración con el idioma inglés

## REFERENCIAS

1. Abbo S., Shtienber D., Lichtenzveig J., Lev Yadun S., Gopher A. (2003) The chickpea summer cropping and a new model for pulse domestication in the ancient near east. *Quarterly Review of Biology* vol 78 n° 4 435-448
2. Briggs F.N., Knowles P.F. (1967) *Introduction to Plant Breeding* Ed.Reinhold Publishing Corporation USA 425 pp
3. Cohen G.S. (2005) Inoculación de *Lupinus polyphyllus* con *Azospirillum brasilense* y su efecto sobre el crecimiento vegetativo. Tesis para acceder al Título de Técnico en Floricultura. <http://catalogosbiblioteca.agro.uba.ar/Fac.Agronomía UBA Argentina>
4. Dimitri M.J. (1978) *Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería*. 3° edic. tomo 1. Edit.ACME Buenos Aires Argentina 651 pp
5. Elliot F. *Citogenética y Mejoramiento de Plantas*. (1967) Compañía Edit.Continental S.A. DF México 474 pp
6. Grande M.D., Bartoloni N., Appendino M.L. (2002). Chromosome dosage influencing ver-

- nalization requeriment in bread wheat. JBAG 14(3) 79-83
7. Hiorth G.E. (1985) *Genética Cuantitativa I Fundamentos Biológicos* Universidad Nacional de Córdoba Facultad de Ciencias Agropecuarias Córdoba Argentina. 224 pp
  8. Levy Y.Y., Mesnage S., Mylne J. S., Gendall A. R., Dean C. (2002) Multiple roles of Arabidopsis VRN1 in vernalization and flowering time control Science 00368075 Vol. 297, Issue 5579 Academic Search Elite (On line)
  9. Planchuelo A. (1984) *Lupinus Flora Patagónica IV* 238-244
  10. Planchuelo A. (2004) Caracterización de especies de lupino de interés ornamental. II Congreso Argentino de Floricultura y plantas ornamentales Buenos Aires Argentina 63
  11. Poehlman, J. (1988). *Breeding Field Crops*. 2<sup>o</sup> Edition Iowa State University USA. 483pp
  12. Ulibarri F., Sosa E.V.G., Cialdella A.M., Fortunato R.H., Bazzano D. (2002) *Leguminosas nativas y exóticas Volumen VII L.O.L.A. Argentina* 320pp
  13. Vallejos E., Silva P., Acevedo E. (2002) *Laboratorio de Relación suelo-agua-planta*. Edit.Fac.Ciencias Agronómicas. Universidad de Chile
  14. Wareing P.F, Phillips I.D.J. (1970) *The control of Growth & Differentiation in Plants* Pergamon Press Oxford UK 303pp
  15. Xin Z.Y., Law C.N., Worland A.J. (1988) *Estudies of the effect of the vernalization responsive genes on the chromosomes of homeologous group 5 of wheat*. Proceedings of the 7<sup>o</sup>International Wheat genetics Symposium Cambridge UK
  16. Zhang H., van Nocker S. (2002) The vernalization independence 4 gene encodes a novel regulator of flowering locus. *Plant Journal* Vol.31 663-674