



PROGRAMA DE MEJORAMIENTO GENÉTICO DE COLZA EN EL INTA

Milisich, H.J.; Gieco, L.; Acosta, M.G.; Gallardo, M.; Schutt, L.; Bessone, V.

Grupo Genética Mejoramiento y Biotecnología Vegetal. Estación Experimental Agropecuaria Paraná del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Ruta 11 Km 12,5 - 3100 - Oro Verde - Entre Ríos, Argentina.

INTRODUCCIÓN

El Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) de Argentina, desarrolla, a partir del año 2007, un programa de mejoramiento genético de colza. Este programa se enfoca en el desarrollo de líneas inéditas de alto rendimiento, buena plasticidad de siembra, resistencia a enfermedades, principalmente a *Leptosphaeria maculans* (Anam. *Phoma lingam*), y con buena calidad industrial. Con el fin de generar variabilidad genética se aplican técnicas convencionales (cruzamientos programados/dirigidos) y no convencionales (inducción de mutaciones). La generación de variabilidad inédita para calidad de aceites se aborda a través de técnicas de mutagénesis física. El uso de agentes mutagénicos permite inducir una gran cantidad de nuevos alelos, algunos de los cuales pueden ser de utilidad para la selección de estos caracteres de interés agronómico. La calidad del aceite de colza puede ser mejorada aumentando el contenido de ácido oleico, que posibilita la mayor duración del aceite en la cocción y la reducción del ácido linolénico que mejora la estabilidad del aceite (Schierholt A. and Becker H.C., 2001; Carré *et al.*, 2003; Somers *et al.*, 1998). Para reducir el período necesario que permite obtener materiales estabilizados se utiliza la técnica de cultivo *in vitro* mediante el uso de microsporas. Esto permite acelerar la obtención de homocigosis logrando el acortamiento del período necesario que permite el desarrollo de líneas para obtener nuevos cultivares (Ferrie *et al.*, 2011; Bhowmik *et al.*, 2011; Prem *et al.*, 2012). La selección de los materiales se realiza en ambientes representativos de las zonas de siembra de colza de la Argentina. En la zona norte en Paraná, latitud 31° 50' 59" S, y en la zona sur en Barrow, latitud 38° 30' S. El objetivo de este programa es desarrollar genotipos de colza adaptados a las diferentes zonas de cultivo del país, mediante la selección de los mismos en dichas regiones.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Cruzamientos, endocría y selección de poblaciones segregantes. Se realizan los cruzamientos artificiales entre materiales primaverales e invernales con el fin de obtener poblaciones segregantes con ciclos adaptados a las condiciones agroecológicas de la región. Se realizan cruza simples y top crosses. Durante las generaciones de endocría, el método de conducción empleado es el masal modificado (eliminación de material con características negativas). La F4 se implanta en Paraná (norte) y en Barrow (sur), con el objetivo de seleccionar poblaciones en los dos ambientes, localidades Las poblaciones F5 se siembran en fecha óptima para comenzar el proceso de selección. Se seleccionan poblaciones, y de éstas se eligen plantas de buen tipo agronómico. La semilla proveniente de cada planta F5 seleccionada se siembra en parcelas (F6), donde se realiza la selección por tipo agronómico, altura, fenología, resistencia a los principales patógenos y contenido de aceite.

Ensayos comparativos de rendimiento. Las líneas seleccionadas en F6 se implantan en ensayos comparativos de rendimiento, con testigos comerciales. Paralelamente, en condiciones de invernáculo, se evalúa el comportamiento a *Phoma lingam* (Bansal *et al.*, 2002), y en el laboratorio de calidad se determina el contenido de aceite. Las líneas seleccionadas por rendimiento, ciclo,

calidad y sanidad en estos ensayos, participan en el ensayo comparativo de rendimiento regional (ECR Regional). El ECR regional se implanta en diferentes ambientes con el objetivo de evaluar el rendimiento y comportamiento agronómico en la región de cultivo de colza en Argentina, y también la estabilidad de los materiales a través de los ambientes. Las localidades que participan en este ensayo son: Paraná y Concepción del Uruguay (Entre Ríos), Reconquista (Santa Fe), Barrow (Buenos Aires) y Viedma (Río Negro).

Multiplicación de líneas promisorias. Las mejores líneas de los ECR regional se multiplican en forma aislada para contar con semilla suficiente en caso de proceder a la inscripción en el Instituto Nacional de Semillas.

Inducción de mutaciones. En el Instituto de Genética de INTA Castelar se realizan tratamientos por métodos físicos para la inducción de mutaciones. Los tratamientos consisten en la aplicación de radiaciones ionizantes sobre semillas, por medio de un equipo *Philips MG 160 Constant Potential X-Ray System*.

Determinación de FAD2 y FAD3. Luego de la inducción de mutaciones con agentes físicos (rayos X) se evalúan plantas M3 provenientes de 3 dosis diferentes de intensidad del agente mutagénico mediante el genotipado por marcadores moleculares alelos-específicos para FAD2 y FAD3 (Yang *et al.*, 2012) para la detección de variantes en el perfil de ácidos grasos.

Cultivo de microsporas. Para acelerar la obtención de homocigosis se trabaja según protocolo estandarizado por Bhowmik *et al.*, 2011, controlando estrictamente las condiciones de crecimiento de la planta donante. Para ello se colocan las macetas en cámaras de cultivo con un fotoperíodo de 16 horas y una temperatura de 20/15 °C día/noche (Prem *et al.*, 2012). Antes de la formación de los botones florales, la temperatura en la cámara de crecimiento se reduce a 10/5 °C. Para el cultivo de microsporas y la regeneración de plantas se seleccionan botones florales en función de su tamaño (3-4mm). Posteriormente se cultivan según Ferrie *et al.* 2011.

Determinación de contenido de aceite: Mediante análisis sobre semilla entera y por medio de un analizador de resonancia magnética nuclear (NMR) (*Newport 4000, Oxford Institute Limited, Oxford, Inglaterra*), se determina el contenido de aceite de las líneas seleccionadas que se incluyen en los ensayos comparativos de rendimiento.

Determinación del perfil de ácidos grasos: Se trabaja con un cromatógrafo de fase gaseosa HRGC-3000C Konik Instruments (Barcelona, España) equipado con un detector de ionización de llama y una columna capilar Restek de 30 metros de longitud y 0.25 milímetros de diámetro. Las temperaturas de trabajo seleccionadas son: columna 240 °C, inyector 250 °C y detector 250 °C. Como gas transportador se utilizó nitrógeno. Los datos obtenidos son procesados mediante un software específico (IST_Crom). El perfil de AG se calculó como área por ciento. Se midió el área del pico correspondiente a cada ácido graso.

Inoculación con *Phoma lingam*. La inoculación se realiza sobre los cotiledones, en plántulas de 10 a 12 días de edad, lesionando previamente ambos cotiledones con aguja histológica. Las plántulas permanecen a 100% de humedad relativa por 48 hs y en condiciones de invernáculo con fotoperíodo de 16 h. de luz y temperatura $\geq 12-15$ °C (óptimo 20-22 °C). La evaluación de los síntomas se realiza entre los días 10 a 14 posteriores a la inoculación, utilizando la escala de severidad adaptada de Bansal *et al.* 1994. Se calcula la severidad promedio de cada línea utilizando la siguiente fórmula: $Sev.Phoma = \frac{\sum [\text{Número de plantas con la categoría } n \text{ de severidad} \times \text{categoría de la escala de severidad (0 a 4)}]}{\text{Número total de plantas}}$ (Bansal *et al.*, 2002). Los materiales se clasifican, de acuerdo a la severidad promedio obtenida en: Inmune (Grado 0), Resistente (Grados 1 y 2) y Susceptible (grados 3 y 4).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el desarrollo de nuevos cultivares de colza se prioriza la selección de materiales que presenten, además de alto potencial de rendimiento, resistencia a enfermedades y mejora de la calidad industrial. En el año 2007 se inició el programa de mejoramiento por técnicas convencionales,

realizándose los primeros cruzamientos artificiales. A modo de ejemplo se presenta en la tabla 1 un esquema de trabajo para un ciclo.

Tabla 1. Selección de líneas en el programa de colza.

Año	Filial	Selección
2007	Cruzamiento	
2008	F1	
2009	F2	Pobl. Segregante. Eliminación de poblaciones con caracteres indeseables.
2010	F3 / F4	Pobl. Segregante. Eliminación de poblaciones con caracteres indeseables. La F4 se implanta en Paraná y en Barrow para seleccionar poblaciones en dos ambientes.
2011	F5	Selección de plantas individuales.
2012	F6	Selección de líneas.
2013	ECR	Estabilizado. Evaluación del material para resistencia a <i>L. maculans</i> y determinación del contenido de aceite.
2014	ECR regional	Estabilizado. Multiplicación de las mejores líneas.

En el presente ciclo agrícola, los materiales estabilizados en evaluación son: 28 líneas avanzadas que se testean en 5 localidades en el ensayo comparativo de rendimiento regional y 441 líneas en ensayos comparativos de rendimiento internos.

Con respecto a la calidad industrial se llevan a cabo determinaciones del contenido de aceite y perfil de ácidos grasos. En términos generales, el contenido de aceite obtenido a la fecha ha mostrado valores dentro de la media, encontrándose porcentajes extremos de 37.5 y 52.7.

El material sometido a mutaciones físicas se evalúa utilizando cromatografía gaseosa y mediante marcadores moleculares gen-específicos. Se espera obtener un perfil de ácido grasos con bajo contenido de ácidos grasos saturados, alta concentración de ácido oleico y bajo ácido linolénico. A nivel molecular, se estudia la presencia de las desaturasas FAD2 (alto oleico) y FAD3 (bajo linolénico), utilizando oligonucleótidos específicos para cada gen. Este protocolo, aun en ejecución, permitirá detectar mutaciones puntuales en los genotipos evaluados que le otorgan un perfil modificado de ácidos grasos.

Con el objetivo de obtener plantas doble haploide de colza, se optimiza la técnica de cultivo de microsporas, según el protocolo propuesto por Bhowmik *et al.*, 2011. Esta metodología ha generado algunos resultados preliminares. Se ha podido detectar que con 7 pimpollos de 3 mm de tamaño es posible obtener una concentración de 39.000 microsporas/ml. En relación al *shock* térmico, se observó que con 24, 48 y 72 horas de inducción térmica a 32 °C no hubo diferencias cualitativas entre los genotipos analizados. Asimismo, el medio de cultivo NLN-13 es apto para la obtención de microsporas de *B. napus* en estadio globular. La utilización de formulaciones comerciales para NLN-13 y B5 simplifica tiempos, el uso de carbón activado permite la detoxificación del medio y el agregado de benzil-amino purina (BAP) y trans-zeatina al medio B5, aumenta el poder embriogénico del genotipo evaluado. Particularmente, la temperatura de crecimiento de la planta donante debe ser 20-15 °C (fotoperíodo 8/16) previo al *bolting*, luego del cual se reduce a 5-10 °C (Figura 1).

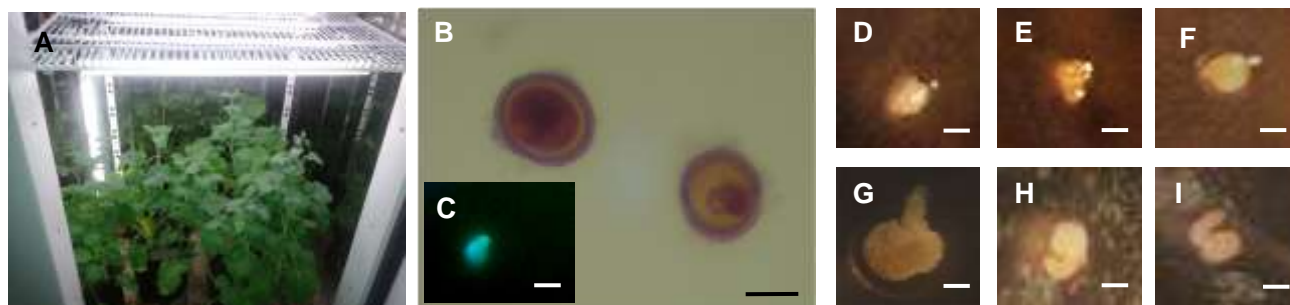


Figura 1: Cultivo de microsporas: A) Cámara de crecimiento con fotoperíodo de 16 horas a 20/15 °C día/noche. Antes de la formación de los botones florales, la temperatura en la cámara de crecimiento se reduce a 10/5 °C. B) – I) Desarrollo de embriones provenientes de microsporas de *Brassica napus*: B) y C) Microsporas de TOPAS 4079 teñidas con carmín acético observadas bajo luz transmitida y teñidas con Hoechst 33342 y observación bajo luz UV, respectivamente. Barra = 10 µm. D) – I) Microsporas de 7, 10, 14, 21, 25 y 30 días en medio B5 para regeneración de embriones. Barra = 250 µm.

CONCLUSIONES

En este trabajo se muestra el desarrollo y ejecución del programa de mejoramiento genético de colza que se está implementando en Argentina, desde el INTA. Los productos obtenidos permitirán contribuir a ampliar la oferta nacional de cultivares de colza generados para nuestras condiciones agroambientales, contribuyendo al crecimiento de la producción con estabilidad, reduciendo el uso de fungicidas, los costos de producción y minimizando las pérdidas de producción ante epifitias.

REFERENCIAS

- BANSAL, V.K.; BLENIS, P.; STRINGAM, G.; THIAGARAJAH, M., TEWARI, J. Screening of *Brassica napus* against blackleg caused by *Leptosphaeria maculans*: effects of inoculum concentration, subculturing of the pathogen, and time of disease screening. 2002. Can. J. Plant. Pathol. 24:323-326.
- BANSAL, V.K.; KHARBANDA, P.D.; STRINGAM, G.R.; THIAGARAJAH, M.R.; TEWARI, J.P. A comparison of greenhouse and field screening methods for blackleg resistance in doubled haploid lines of *Brassica napus*. 1994. Plant Disease 78: 276-281.
- BHOWMIK, P.; DIRPAUL, J.; POLOWICK, P.; FERRIE; A.M.R. A high throughput Brassica napus microspore culture system: influence of percoll gradient separation and bud selection on embryogenesis. 2011. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (106): 359-362.
- CARRÉ, P.; DARTENUC, C.; EVRARD, J.; JUDGE, A.; LABALETTE, F.; RAOUX, E.; RENARD, M. Frying stability of rape-seed oils with modified fatty acid composition. 2003. In: Proc. 11th Int. Rapeseed Congr., Copenhagen, 540–543.
- FERRIE, A. M. R.; CASWELL, K. L. Isolated microspore culture techniques and recent progress for haploid and doubled haploid plant production. 2011. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 104 (3): 301-309.
- PREM, D.; SOLÍS, M.T.; BÁRÁNY, I.; SANZ, H.R.; RISUEÑO, M.C.; TESTILLANO, P.S. A new microspore embryogenesis system under low temperature which mimics zygotic embryogenesis initials, expresses auxin and efficiently regenerates doubled-haploid plants in Brassica napus. 2012. BMC Plant Biology. 12, 127.
- SCHIERHOLT, A.; BECKER, H.C. Environmental variability and heritability of high oleic acid content in winter oilseed rape. 2001. Plant Breeding, 120: 63–66.
- SOMERS, D.J.; FRIESEN, K.R.D.; RAKOW, G. Identification of molecular markers associated with linoleic acid desaturation in Brassica napus. 1998. Theoretical and Applied Genetics, 96: 897–903.

YANG, Q.; FAN, C.; GUO, Z.; QIN, J.; WU, J.; LI, Q.; FU, T.; ZHOU, Y. Identification of FAD2 and FAD3 genes in *Brassica napus* genome and development of allele-specific markers for high oleic and low linolenic acid contents. 2012. *Theor Appl Genet* 125: 715–729. doi: 10.1007/s00122-012-1863-1.