

NOTAS BREVES

USO DEL GAMETOCIDA HYBREX PARA AUMENTAR LA ANDROGENESIS EN TRIGO¹

The use of the gametocide Hybrex to augment androgenesis in wheat

Nicole Hewstone O.², Colette Nitsch³, Cristián Hewstone M.⁴ y Carlos Muñoz S.²

SUMMARY

In order to determine the effect of the gametocide Hybrex on the androgenic capacity of wheat, anther donor plants were treated with 1.4 g/L of the product before microspores reached the stage of meiosis. Anthers with microspores at the late uninucleate stage were plated in N₆ basal media, after a cold pretreatment (4 °C for 2 to 3 days). Induced calli were transferred to a regeneration media for plantlet induction. Hybrex had a significant effect in augmenting from 2 to 20 times callus per anther induction on the breeding lines, but plantlet obtention was significantly increased only in one of the breeding lines.

Key words: anther culture, androgenesis, wheat, gametocide.

INTRODUCCION

La técnica del cultivo de anteras para la obtención de plantas haploides se ha desarrollado como un complemento del mejoramiento convencional, ya que permite alcanzar la homocigosis en una generación. Esto tiene una enorme importancia en la producción de variedades de autopolinización, como en el caso del trigo, en el cual se requiere a lo menos seis generaciones para alcanzar un alto grado de homocigosis.

En trigo, sin embargo, esta técnica aún tiene un uso limitado, porque la frecuencia de obtención de plantas es baja y no todos los genotipos presentan igual capacidad androgénica (Liang, Xu y Hoang-Tang, 1987; Moraes-Fernandes y Picard, 1983; Hewstone, Muñoz y Cortázar, 1990).

Desde hace bastante tiempo, se sabe que cualquier condición que afecte el balance sexual, como el dimorfismo de polen, la macho esterilidad y la presencia de sustancias feminizantes, puede incrementar la producción de haploides derivados del cultivo de anteras (Becraft y Taylor, 1989; Picard y otros, 1987).

En trigo, se ha determinado la existencia de dimorfismo de polen. Después de la primera mitosis, la mayoría de los granos de polen aumentan de tamaño en forma similar hasta su maduración, pero en una pequeña proporción este aumento es menor. En estos granos de polen el citoplasma sólo se tiñe levemente con acetocarmín. Estos granos, que han sido llamados granos-p, originan normalmente gametofitos masculinos no funcionales. Sin embargo, en condiciones de cultivo *in vitro*, pueden originar los embriones que posteriormente producirán las plantas haploides (Horner y Street, 1978; Bhojwani y Roxdon, 1983; Jun-Yai, 1980). Se piensa que la cantidad de granos-p producidos durante la microesporogénesis se puede incrementar mediante el uso de gametocidas o de otros tratamientos como el frío (Dunwell, 1985). Es así como se ha probado una serie de gametocidas con este propósito. El efecto gametocida del ácido 2-cloro ethyl fosfónico, Ethephon, sobre el polen de trigo, es conocido desde hace tiempo (Bennett y Hugues, 1972). Su acción es ejercida mediante la inducción de mitosis adicionales que alteran el desarrollo normal del polen. El descubrimiento de este efecto llevó a pensar que su aplicación podría aumentar la producción de granos-p, sin embargo, su uso no ha sido tan exitoso como se pensaba.

En Francia, Picard y otros (1987), usaron el gametocida RH0007 de la compañía Rohm y Haas, comúnmente llamado fenidazon potassium o Hybrex (Mc Rae, 1985), con muy buenos resultados. Este gametocida induce un 95 a 100% de macho-esterilidad en trigo. El mejor efecto sobre la

¹Recepción de originales: 25 de octubre de 1990.

Los autores agradecen la colaboración del Sr. Luis Barrales V. en el análisis estadístico de los datos.

²Estación Experimental La Platina (INIA), Casilla 439, Correo 3, Santiago, Chile.

³Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Gif sur Yvette, Paris, Francia.

⁴Estación Experimental Carillanca (INIA), Casilla 58-D, Temuco, Chile.

androgénesis se logra cuando se aplica antes de la meiosis, en dosis de 1 kg/ha. El uso de este producto permite un aumento de 5 a 20 veces en el número de haploides y plantas homocigotas, obtenidas según el genotipo. Además, alarga el período óptimo de cosecha de las anteras para su establecimiento en cultivo, haciendo más fácil y productivo el trabajo. Por último, también acelera el desarrollo de los embriones, reduciendo el período en cultivo a 8 días (Picard y otros, 1987).

En la presente nota se informa de los primeros resultados obtenidos con el gametocida Hybrex, utilizado como medio para aumentar la androgénesis en germoplasma chileno de trigo.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron tres líneas F_1 de trigos invernales y una línea F_3 de una cruce de trigo alternativo con triticales (Cuadro 1). Estas líneas fueron sembradas directamente en el campo de la Estación Experimental Carillanca del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), durante la temporada 1989/90.

CUADRO 1. Progenie y características del material vegetal tratado con el gametocida Hybrex previo al cultivo de anteras

TABLE 1. Progenie and characteristics of the plant material treated with Hybrex before anther culture

Línea	Cruza	Tipo de material
11277	Car-3018/Zg 909-85	F1 trigo de invierno
11308	Stetson/Zg 909-85	F1 trigo de invierno
11336	Emika/Zg 1004-85	F1 trigo de invierno
5851	Tca 72-86/Dalcahue	Triticale x Trigo F_3 primavera

Se seleccionaron tres plantas de cada línea, las que al momento de la meiosis, determinada mediante tinciones del tejido esporofítico, fueron pulverizadas manualmente con una solución acuosa conteniendo 1,4 g/L del gametocida Hybrex MR y 0,03% de Triton X-100. Se dejaron dos macollas por planta sin tratar, en cuatro líneas, para usarlas como testigo. Las espigas se cosecharon cuando el polen estaba en estado uninucleado, dándoles un pretratamiento de frío a 3-4 °C por 2 a 3 días, después del cual las anteras fueron extraídas y sembradas en el medio de cultivo N_6 (Shimada, 1981), suplementado con Acido 2,4 dicloro-fenoxiacético (1,5 mg/L), Kinetina (0,5 mg/L), Inositol (2,5 g/L), Sacarosa (90 g/L) y Agar (3,5 g/L). Las

anteras sembradas en frascos de 40 ml de capacidad, conteniendo 10 ml de medio, se incubaron en oscuridad a 25 °C hasta que se observó formación de callos.

Los callos obtenidos fueron sub-cultivados en el medio N_6 suplementado con Acido naftalén acético (0,5 mg/L), Kinetina (0,5 mg/L), Acido indol acético (0,5 mg/L), 30 g/L de Sacarosa y 2,0 mg/L de Inositol. La siembra se hizo en frascos de 40 ml de capacidad conteniendo 10 ml de medio regenerativo. La incubación se hizo en una cámara de crecimiento a 25 °C con una irradiación de 50 $\mu E m^2 seg^{-1}$ y con un fotoperíodo de 16 hr de luz y 8 hr de oscuridad. Después de un período variable entre 2 y 6 semanas se logró la diferenciación de brotes, los que enraizaron en el mismo medio.

Las plántulas regeneradas que fueron "endurecidas" plantándolas en frascos con tierra y tapas plásticas estériles, en las cuales fueron incubadas durante 15 días, bajo las mismas condiciones ya descritas para la cámara de crecimiento. Posteriormente, fueron trasladadas a un invernadero donde se les disminuyó paulatinamente la humedad hasta que crecieron normalmente, lo que ocurrió luego de dos meses.

RESULTADOS Y DISCUSION

En todas las líneas tratadas con Hybrex, el porcentaje de callos obtenidos fue bastante alto y superior al testigo no tratado, especialmente en la línea 11308 (Cuadro 2). La evaluación estadística de los datos se hizo aplicando modelos logarítmicos lineales (Haberman, 1978). El análisis de datos usando este tipo de modelo permitió determinar que el modelo que mejor se ajustó a los datos, fue aquel que indica que existe un efecto diferencial entre la aplicación o no de gametocida con respecto a la formación de callos, es decir, las plantas donantes tratadas con gametocida presentan una mayor probabilidad de obtener callos, que aquellas no tratadas. Además, se aprecia un efecto significativo del genotipo de acuerdo al modelo logarítmico lineal de independencia completa entre línea y formación de callos. Así, la línea 11308 resultó con una mayor capacidad androgénica dentro de todas las líneas que fueron tratadas con Hybrex (Cuadro 2). Es sabido que esta capacidad es heredable y es transmitida por genes del núcleo (De Buyser y Henry, 1986; Hu, 1986; Ouyang, 1986; Kudirka, Schaeffer y Baenziger, 1986), lo que permite sugerir que la capacidad androgénica de 11308 se deriva especialmente de

CUADRO 2. Número de anteras sembradas, número de callos y plantas obtenidos y porcentaje de callos y plantas por antera, para los distintos tratamientos y líneas utilizadas¹

TABLE 2. Number of plated anthers, number of callus and plantlets obtained and callus per 100 anthers plated, for the different treatments and lines used

Línea	Tratamiento	Anteras sembradas Nº	Callos/ obtenidos Nº	Callos/ antera %	Plantas obtenidas Nº	Plantas/ antera %
11277	sin Hybrex	155	1	0,64	0	0,00
	con Hybrex	250	13	5,2	0	0,00
11308	sin Hybrex	67	4	2,98	0	0,00
	con Hybrex	302	143	47,35	49	15,56
11336	sin Hybrex	80	0	0,00	0	0,00
	con Hybrex	314	9	2,86	2	0,63
5851	sin Hybrex	76	0	0,00	0	0,00
	con Hybrex	266	10	3,76	0	0,00

¹Resultados estadísticamente significativos de acuerdo al modelo logarítmico lineal de no Interacción de segundo orden, que indica que existe un efecto del tratamiento y de la línea sobre la formación de callos, y no existe Interacción de segundo orden.

Stetson, ya que el otro padre, Zg 909-85, también es progenitor de la línea 11277 y ésta no mostró la misma capacidad androgénica. Estos resultados parecen indicar que se debería considerar la línea 11308 en programas de mejoramiento de trigo como fuente de una alta capacidad androgénica.

Además, se confirmó lo observado por Picard y otros (1987), en cuanto a que el uso de Hybrex acelera el desarrollo de los callos o embriones, ya que se observaron los primeros callos sólo después de dos semanas de incubación, en cambio en los testigos esto ocurrió a las cuatro semanas.

El porcentaje de regeneración de plantas fue muy bajo, debido a un error experimental en el medio regenerativo. Sin embargo, en la línea 11308 se obtuvo un 15,56% de plantas verdes por antera sembrada.

Dado que Hybrex es un producto que actualmente no se comercializa, se realizó un ensayo adicional con el objetivo de determinar el efecto del Ethrel sobre la androgénesis, ya que éste sí es un producto de fácil obtención. Sin embargo, los resultados no mostraron ventajas en el uso de este gametocida.

Los resultados obtenidos demuestran que se debe seguir trabajando con gametocidas, ampliando el rango de cultivares utilizados, variando las dosis de aplicación y momento de aplicación.

RESUMEN

En el presente trabajo se presenta un ensayo preliminar para determinar el efecto del gametocida Hybrex sobre la androgénesis en trigo. Para ésto se pulverizaron las plantas donantes de anteras con 1,4 g/L de producto común antes de la meiosis. Las anteras se sembraron en el estado uninucleado del polen, después de un tratamiento de frío (4 °C por 2 a 3 días), sobre el medio de cultivo N₆. Al mes de incubación los callos fueron traspasados a un medio regenerativo para la formación de plantas, las que posteriormente fueron "endurecidas" en invernadero.

El uso del gametocida Hybrex tuvo un efecto significativo sobre la formación de callo por antera, aumentando ésta entre 2 y 20 veces, dependiendo del genotipo, pero la obtención de plantas aumentó significativamente sólo en una de las líneas tratadas.

Palabras claves: cultivo de anteras, androgénesis, trigo, gametocida.

LITERATURA CITADA

- BECRAFT, P.W. and TAYLOR, G.A. 1989. Effects of nucleus, cytoplasm and male sterile nucleus-cytoplasm combination callus initiation in anther culture of wheat. *Euphytica* 44: 235-240.
- BENNETT, M.D. and HUGUES, W.G. 1972. Additional mitosis in wheat pollen induced by Ethrel. *Nature* (London) 240: 556-568.
- BHOJWANI, S.S. and ROXDON, M.K. 1983. Plant tissue culture: theory and practice. Science Publisher B.U. New York. 502 p.
- DE BUYSER, J. and HENRY, Y. 1986. Wheat: production of haploids. Performance of doubled haploids, and yield trials. In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. 2: Crops I. Y.P.S. Bajaj (ed.). Springer-Verlag Berlin, Heidelberg. p.: 73-88.
- DUNWELL, J.M. 1985. Anther and ovary culture. In: S.W.J. Bright and M.G.K. Jones (ed.). *Cereal tissue and cell culture*. Martinus Nijhoff/Dr W. Junk Publ., Dordrecht, Netherlands. p.: 1-44.
- HABERMAN, S. 1978. *Analysis of Qualitative Data*. Volume 1 Introductory Topics. Academic Press (ed.). INC (London). 368 p.
- HEWSTONE O., NICOLE, MUÑOZS., CARLOS y CORTAZAR S., RENE. 1990. Método de cultivo de anteras y capacidad androgénica de germoplasma chileno de trigo. *Agricultura Técnica* (Chile) 50: 130-138.
- HORNER, M. and STREET, H.E. 1978. Problems encountered in the culture of isolated pollen of a Burley cultivar of *Nicotiana tabacum*. *J. Exp. Bot.* 29: 217-226.
- HU, H. 1986. Wheat: Improvement through anther culture. In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. 2: Crops I. Y.P.S. Bajaj (ed.). Springer-Verlag Berlin, Heidelberg. p.: 55-71
- JUN-YAI, Z. 1980. Pollen dimorphism and its relation to the formation of pollen embryos in anther culture of wheat (*Triticum aestivum*). *Acta Bot. Sin.* 22: 117-121.
- KUDIRKA, D.T., SCHAEFFER, G.W. and BAENZIGER, P.S. 1986. Wheat genetic variability through anther culture. In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. 2: Crops I. Y.P.S. Bajaj (ed.). Springer-Verlag Berlin, Heidelberg. p.: 41-54.
- LIANG, G., XU, A. and HOANG-TANG. 1987. Direct generation of wheat haploids via anther culture. *Cell Biology & Molecular Genetics*. *Crop Science* 27: 336-339.
- MCRAE, H.H. 1985. Advances in chemical hybridization. In: Janick J. (ed.). *Plant breeding reviews*, vol 3. Purdue University. p.: 169-192.
- MORAES-FERNANDES, M.J. and PICARD, E. 1983. Viability of haploid production by anther culture using Brazilian wheat genotypes. *Rev. Brasil. Genet.* VI. 2: 261-277.
- OUYANG, J. 1986. Induction of pollen plants in *Triticum aestivum*. In: *Haploids in Higher Plants in vitro*. Hu, H. and others (ed.). China Academic Publishers Beijing. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New-York, Tokyo. p.: 26-41.
- PICARD, E., HOURS, C., GREGOIRE, S., PHAN, T.H. and MEUNIER, J.P. 1987. Significant improvement of androgenetic haploid and doubled haploid induction from wheat plants treated with a chemical hybridization agent. *Theor Appl Genet* 74: 289-297.
- SHIMADA, T. 1981. Haploid plants regenerated from the pollen callus of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Jpn. J. Genet.* 56: 581-588.