

PLANTAS DOBLE HAPLOIDES GENERADAS POR CRUZA INTERGENÉRICA DE TRIGO x MAÍZ¹

Double haploid plants generated by wheat x maize intergeneric crosses¹

Claudio Jobet^{2*}, Javier Zúñiga² y Hugo Campos de Quiroz³

ABSTRACT

The use of double haploid techniques in plant breeding has the potential of shortening genetic improvement cycles in comparison to conventional methods, by means of the fast production (one cycle) of homozygous lines derived from segregant populations, which facilitates rapid homogenization and genetic stabilization. The parental material used (F₃) was previously selected under field conditions. A high level of efficiency was reached in obtaining embryos (31.1%), which were rescued and germinated *in vitro* cultivation to later, by means of duplication via colchicine, to obtain more than 1000 double haploid wheat plants.

Key words: *Triticum aestivum* L., *Zea mays* L., double haploids, breeding, selection.

RESUMEN

El uso de la técnica de dobles haploides en mejoramiento de plantas tiene el potencial de acortar los ciclos de mejoramiento genético en comparación a los métodos convencionales, mediante la producción rápida (un ciclo) de líneas homocigóticas provenientes de poblaciones segregantes, lo que conlleva a la rápida homogeneización y estabilización genética. El material utilizado (F₃) en este trabajo fue previamente seleccionado bajo condiciones de campo. Se alcanzó una alta eficiencia en la obtención de embriones (31,1 %) los cuales fueron rescatados y germinados *in vitro* para posteriormente, por medio de duplicación vía colchicina, obtener más de 1.000 plantas de trigo doble haploides.

Palabras clave: *Triticum aestivum* L., *Zea mays* L., dobles haploides, mejoramiento, selección.

INTRODUCCIÓN

La producción de dobles haploides (DH) en trigo (*Triticum aestivum* L.), a través de la cruce intergenérica entre trigo y maíz (*Zea mays* L.), fue reportada por primera vez por Laurie y Bennett en 1988. Desde entonces, de acuerdo con Suenaga *et al.* (1991), Suenaga *et al.* (1997) y Ma *et al.* (1999), plantas DH en trigo han sido exitosamente producidas por medio de la cruce de estas dos especies, demostrando tener una menor dependencia genotípica y una mayor eficiencia en alcanzar la haploidía cuando es comparado con otros sistemas,

como son la cruce entre trigo hexaploide y cebada silvestre perenne (*Hordeum bulbosum* L.) (Snape *et al.*, 1979), y el cultivo de anteras (Kisana *et al.*, 1993).

La metodología utilizada en general para la obtención de DH ofrece múltiples ventajas para el mejoramiento genético de plantas. La más importante radica en la posibilidad de alcanzar rápidamente una completa homocigosis pudiendo de esta manera reducir el tiempo y el costo en desarrollar nuevos potenciales cultivares (Khush y Virmani, 1996; Howes *et al.*, 1998, Liu *et al.*,

¹ Recepción de originales: 12 de noviembre de 2001.

La investigación reportada fue financiada por el Proyecto FONDEF D98I1074.

² Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro de Investigaciones Carillanca, Casilla 58-D, Temuco, Chile. E-mail: cjobet@carillanca.inia.cl *Autor para correspondencia.

³ Semillas Pioneer, Chile. E-mail: camposh@phibred.com

2002). Este procedimiento, de acuerdo con Goldringer *et al.*, (1997), permite evaluar poblaciones para caracteres cuantitativos y cualitativos, y desarrollar un efectivo análisis genético de las relaciones epistáticas y varianzas genéticas existentes en trigo. Otros beneficios asociados al uso de DH, de acuerdo con Snape (1988; 1989) e Inagaki y Mujeeb-Kazi (1998), están en la posibilidad de detectar ligamientos genéticos y determinar valores de recombinación génica, así como también evaluar posibles interacciones genéticas y eliminar el componente dominante de la varianza, lo cual permite la expresión diferencial de caracteres de naturaleza recesiva. Se estima, según Snape (1989), que sobre 95% de los caracteres requeridos en un genotipo elite de trigo son regulados por genes recesivos, por lo tanto, todo mecanismo que permita la expresión diferencial de genes de condición recesiva necesariamente permitirá desarrollar mejoramiento genético de un modo eficaz y focalizado. Del mismo modo, el uso de DH facilita el retorno más acelerado de la inversión en investigación, ya que incrementa sustancialmente la velocidad de respuesta del mejoramiento genético a los requerimientos del mercado (Hu, 1997).

El principal problema asociado al proceso de haploidía es que la planta se somete a un solo ciclo de recombinación meiótica, considerado insuficiente debido a que normalmente existen efectos de ligamiento genético (Ma *et al.*, 1999). De esta manera, el potencial de variación genética que se obtiene como resultado de la recombinación del material genético aportado por los progenitores, pudiese no estar disponible y, por lo tanto, utilizable en próximas generaciones (Hu, 1986). Para evitar esta situación, diferentes estrategias en mejoramiento de plantas han sido propuestas, siendo una de ellas el realizar la haploidización en generaciones más avanzadas como F_2 o F_3 , con el fin de favorecer la recombinación génica, y/o realizar una selección de aquellos caracteres de interés antes de la producción de haploides (Hu, 1997, Ma *et al.*, 1999).

El objetivo de la presente investigación fue establecer la metodología para la obtención de plantas doble haploides a nivel de Población F_3

(PF_3) con el fin de incorporarla como herramienta complementaria a los programas de mejoramiento genético de plantas.

MATERIALES Y MÉTODOS

El material parental (Cuadro 1) fue seleccionado sobre la base de parámetros de adaptabilidad (resistencia a enfermedades fungosas prevalentes en la zona sur del país, precocidad, hábito de desarrollo y crecimiento), agronómicas (vigor de macolla, altura de planta, resistencia a tendadura, tipo de espiga y color), de productividad (número y tamaño de espigas, peso de grano) y de calidad molinera y panadera (volumen de sedimentación, contenido de proteínas en el grano, calidad de gluten, proteínas de alto peso molecular, entre otras). Las cruza se realizaron en el Centro Regional de Investigación, INIA-Carillanca (38°41' lat. Sur y 72°25' long. O.) en 1997, sembrándose la PF_1 en 1998, la PF_2 en 1999 y la PF_3 en el 2000. Para evitar la desventaja descrita por Hu (1986), en el sentido que poblaciones F_1 no alcanzan a tener suficiente recombinación meiótica, las poblaciones utilizadas para la cruza intergenérica correspondieron a material segregante F_3 , las cuales habían sido derivadas de una población F_2 sometidas previamente a un proceso de selección en campo, específicamente para los caracteres antes descritos.

Siembra de poblaciones segregantes de trigo

La progenie F_2 de cada una de las ocho cruza utilizadas, previamente vernalizada, fue sembrada bajo condiciones de invernadero en surcos de 2 m con una separación 0,20 m entre cada uno. Al suelo, previamente esterilizado, se le aplicó una fertilización equivalente, de acuerdo a análisis de suelo, de 260 kg ha⁻¹ de N (salitre sódico y urea), a la siembra y a la macolla (estados 0 y 26, respectivamente, escala de Zadoks *et al.*, 1974. Un total de 72,9 kg ha⁻¹ de P (superfosfato triple) y 65 kg ha⁻¹ de K (sulfato de potasio) fueron aplicados a la siembra. Un grano de cada F_2 fue sembrado a 10 cm sobre la hilera en un total de 20 hileras, repitiéndose este proceso cada 20 días, con el fin de mantener las plantas de trigo PF_3 receptivas para ser polinizadas por el maíz .

Cuadro 1. Variedades de trigo (*Triticum aestivum* L.) utilizadas como progenitores para la obtención de poblaciones segregantes F₃.**Table 1. Wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars used as parents to obtain F₃ segregant populations.**

Cultivar (cruza)	Origen	Hábito de crecimiento	Hábito de desarrollo	Sanidad	Calidad
Karl (macho)	USA	Invierno precoz	Rastrero	Baja	Alta
Pukém (hembra)	Chile	Invierno	Semirrastrero	Intermedia	Baja
Renán (macho)	Francia	Invierno	Rastrero	Intermedia	Alta
Dalcahue (hembra)	Chile	Primavera tardío	Erecto	Intermedia	Intermedia
Genial (macho)	Francia	Invierno precoz	Rastrero	Alta	Intermedia
Pukém (hembra)	Chile	Invierno	Semirrastrero	Intermedia	Baja
Avital (macho)	Francia	Invierno	Rastrero	Alta	Baja
Kona (hembra)	Chile	Invierno precoz	Erecto	Alta	Alta
Baroudeur (macho)	Francia	Invierno precoz	Rastrero	Intermedia	Intermedia
Renaico (hembra)	Chile	Alternativo	Semirrastrero	Alta	Intermedia
Baroudeur (macho)	Francia	Invierno precoz	Rastrero	Intermedia	Intermedia
Kona (hembra)	Chile	Invierno precoz	Erecto	Alta	Alta
Avital (macho)	Francia	Invierno	Rastrero	Alta	Baja
Renaico (hembra)	Chile	Alternativo	Semirrastrero	Alta	Intermedia
Baroudeur (macho)	Francia	Invierno precoz	Rastrero	Intermedia	Intermedia
Dalcahue (hembra)	Chile	Primavera tardío	Erecto	Intermedia	Intermedia

Siembra genotipos de maíz

Para efectos del presente trabajo se utilizaron como polinizantes maíces regionales llamados Rodeo y Codopille, por sus características de mayor precocidad y menor tamaño de planta, lo que facilitó su manejo en el invernadero. Cada grano fue pregerminado con el fin de acelerar la germinación, y posteriormente sembrado en invernadero bajo condiciones de alta luminosidad (60.000 a 80.000 lux) y temperatura (38°C), de acuerdo a lo descrito por Mendoza (1998).

Metodología

El procedimiento se basó en los protocolos desarrollados por Suenaga y Nakajima (1989) y Laurie *et al.* (1990), con algunas modificaciones establecidas por Mujeeb-Kazi (2000). En general la metodología consistió en lo siguiente: las flores de cada espiga principal de cada planta de trigo F₃ seleccionada fueron emasculadas manualmente

3-4 días antes de la antesis (estado 57, escala de Zadoks), cortándose cada una en la base del tallo y manteniéndolas en una cámara de crecimiento a 22°C y fotoperíodo de 16: 8 (luz y oscuridad), cubiertas con bolsas de polietileno, con el propósito de evitar la deshidratación, para finalmente proceder a polinizar cada flor con polen fresco de maíz. Las espigas polinizadas se mantuvieron en cámara de crecimiento, con las condiciones descritas anteriormente, en solución acuosa que contenía 100 mg L⁻¹ de 2,4-D, 40 g L⁻¹ de sacarosa y 8 ml L⁻¹ de ácido sulfuroso (24%). Aproximadamente catorce días después, se procedió al rescate de los embriones, desinfectando las semillas con una solución de NaHCl al 20% y 1% de Tween 20, durante 15 min, depositando los embriones en tubos con medio basal de acuerdo a lo descrito por Suenaga y Nakajima (1989), esto es medio basal Murashige & Skoog 0,5X más 20 g L⁻¹ de sacarosa y 6% de agarosa.

Cuando las plántulas alcanzaron alrededor de 1-2 cm, se trasladaron a la cámara de crecimiento hasta un desarrollo de dos a tres hojas (estado 12 a 13, escala de Zadoks). En este estadio fueron trasplantadas a macetas individuales (suelo y vermiculita), y mantenidas en salas con temperaturas de 22 °C y fotoperíodo de 16 : 8 (luz y oscuridad) hasta alcanzar las cuatro a seis hojas verdaderas (estado 14 a 16, escala Zadoks). En esta etapa, las raíces de cada planta fueron introducidas en una solución de colchicina de 500 mg L⁻¹ en 2% dimetil sulfoxido (DMSO) y mantenidas por 6 h a una temperatura de 22 °C, con aireación permanente y protegidas de la luz directa. Luego, las plantas fueron transferidas a macetas individuales, las que contenían suelo esterilizado y con una mezcla equivalente a 245 kg ha⁻¹ de N (Supernitro), 72,9 kg ha⁻¹ de P (Superfosfato triple) y 66,4 kg ha⁻¹ de K (Sulfato de potasio), las cuales finalmente fueron establecidas en invernadero hasta su posterior cosecha.

Se confirmó el estado haploide y el éxito en la duplicación por medio del recuento de cromosomas mediante observación microscópica en extensiones teñidas de meristema radicular (Mujeeb-Kazi y Miranda, 1985), el cual se realizó antes y después de la duplicación de cada planta. Finalmente, cada planta DH fue cosechada en forma individual y la semilla fue sembrada en el 2001 en invernadero y en el campo del Centro Regional de Investigación Carillanca, del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se destaca la fuerte variación fenotípica que se observó en la población DH, entre y dentro de las cruzas, donde fue posible observar plantas de diferente altura, precocidad, vigor a la macolla y en general tipo agronómico diversos y diferentes con respecto a sus progenitores. Esta situación confirma lo expresado por Hu (1986), en el sentido de incrementar la posibilidad de mayor recombinación génica postergando la selección del material madre hasta etapas posteriores de segregación, F₂ y F₃. Se utilizaron dos genotipo de maíz, Rodeo y Codopille, ya que la utilización

de determinados genotipos de maíz, según Suenaga y Nakajima (1989), puede tener una influencia significativa sobre el desarrollo de embriones y planta haploide. Por otro lado, Inagaki y Tahir (1990), encontraron que las diferencias significativas para la obtención de embriones entre cruzas intergenéricas, dependían de los efectos aportados por el genotipo del trigo. En este contexto, y considerando esta premisa se trabajaron con progenies derivadas de nueve genotipos de trigo de diverso origen.

Sobre la base de los resultados obtenidos en la presente investigación, se alcanzó un alto nivel de eficiencia, el cual como promedio superó 21% de embriones obtenidos a partir de semillas producidas en todos y cada uno de los cruzamientos (Cuadro 2). Es importante considerar el alto porcentaje de éxito logrado en la generación de plantas DH a partir de embriones haploides (31,1%), cifras ya reportadas en los trabajos publicados por Suenaga (1994), Suenaga *et al.* (1997), Mendoza (1998), y Mujeeb-Kazi *et al.* (2001), destacándose la cruce Baroudeur x Dalcahue-INIA (39,3%) y Baroudeur x Renaico-INIA (39,1%). El hecho que se repita uno de los progenitores sugiere la existencia de un efecto genotípico por parte de la madre, tal como lo establecieron Inagaki y Tahir (1990).

Al respecto, varios autores destacan la existencia de efectos asociados a los genotipos, los cuales han mostrado variaciones en la eficiencia entre un 0,9 y 35% para la obtención de embriones productos de cruza trigo x maíz (Suenaga y Nakajima, 1989; Suenaga *et al.*, 1991; Mendoza, 1998). Por su parte, Laurie y Reymondie (1991) encontraron que las diferencias observadas estaban con relación al hábito de desarrollo de los trigos (invierno y/o primavera) y que dentro de estos grupos no existen diferencias en la producción de haploides. Esta situación no fue del todo clara entre los cruzamientos utilizados en la presente investigación, los cuales incluyeron genotipos de un mismo o de distinto hábito de crecimiento, siendo la eficiencia de semilla a embriones y embriones a DH similar y sin un patrón definido entre genotipos (Cuadro 2).

Cuadro 2. Eficiencias alcanzadas a través de las etapas en la producción de plantas doble haploides en trigo (*Triticum aestivum* L.).**Table 2. Efficiencies reached through stages in the production of double haploid wheat (*Triticum aestivum* L.).**

Cruzamiento	Número de flores polinizadas por cruza	Número de semillas producidas	Número de embriones obtenidos	Porcentaje de eficiencia (semillas vs embriones)	Número de plantas haploides (H)	Número de plantas doble haploides (DH)	Porcentaje de eficiencia (embriones vs. H+DH)
Karl x Pukem	468	324	66	20,4	0	19	28,8
Renan x Dalcahue	4.015	2.248	471	21,0	20	109	27,4
Genial x Pukem	3.780	2.302	434	18,9	12	71	19,1
Avital x Kona	3.684	2.233	569	25,5	18	184	35,5
Baroudeur x Renaico	4.900	3.035	617	20,3	18	223	39,1
Baroudeur x Kona	7.530	4.315	1.017	23,6	49	227	27,1
Avital x Renaico	3.461	2.283	501	21,9	3	161	32,7
Baroudeur x Dalcahue	3.125	1.830	400	21,9	39	118	39,3
TOTAL	30.963	18.570	4.075		159	1.112	
Promedio (%)				21,7			31,1

Sin embargo, asumiendo la existencia de estas variaciones genotípicas, hoy día la gran mayoría de los cultivares utilizados en estos estudios han demostrado la capacidad de producir plantas haploides y subsecuentemente plantas DH. Si consideramos las ventajas que tienen los DH enunciadas anteriormente, permitirá que programas de mejoramiento de trigo puedan utilizar una herramienta complementaria a los esquemas convencionales utilizados al día de hoy.

CONCLUSIONES

La metodología presentada para obtener plantas dobles haploides (DH) en trigo a través de la

cruza intergenérica trigo x maíz puede ser considerada como una importante herramienta de ser utilizada por programas de mejoramiento de trigos, con el fin de traspasar y fijar rápidamente nuevos atributos como ser: tipo agronómico, resistencia a enfermedades, genes de tolerancia a stress, genes de calidad industrial, al germoplasma adaptado de una región en particular.

AGRADECIMIENTOS

A la Srta. Paola Rathgeb, Ing. Ejec. Agrícola y al Señor Gonzalo Marín, Técnico Agrícola, por su destacada participación y colaboración en el desarrollo de este trabajo.

LITERATURA CITADA

- Goldringer, I., P. Brabant, and A. Gallais. 1997. Estimation of additive and epistatic genetic variances for agronomic traits in a population of doubled haploid lines of wheat. *Heredity* 79:60-71.
- Hu, H. 1986. Variability and gamete expression in pollen-derived plants in wheat. p. 67-68. *In* H. Han, and Y. Hongyuang (eds.). *Haploids of higher plants in vitro*. Springer Verlag, Berlin, Germany.
- Hu, H. 1997. *In vitro* induced haploids in wheat. p. 73-97. *In* Jain Sopory Velleiux (ed.) *In vitro* haploid production in higher plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London.
- Inagaki, D., and A. Mujeeb-Kazi. 1998. Production of polyhaploids of hexaploid wheat using stored peral millet pollen p. 319-325. *In* H. Braun *et al.* (eds.). *Wheat: Prospects for global improvement*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London.

- Inagaki, D., and M. Tahir. 1990. Comparison of haploid production frequencies in wheat varieties crossed with *Hordeum bulbosum* L. and maize. *Jpn J. Breed.* 40:209-206.
- Kisana, N., K. Nkongolo, J. Quick, and D. Johnson. 1993. Production of doubled haploids by anther culture and wheat x maize method in a wheat breeding programme. *Plant Breed* 110:96-102.
- Howes, N., S. Woods, and T. Townley-Smith. 1998. Simulations and practical problems of applying multiple marker assisted selection and doubled haploids to wheat breeding programs. p. 291-296. *In* Wheat: Prospects for global improvement. H. Braun *et al.* (eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London.
- Khush, G., and S. Virmani. 1996. Haploids in plant breeding. p. 11-33. Vol. 1. *In* Jain, S.M., Sopory, S.K., Veilleux, R.E. (eds.). *In vitro* haploid production in higher plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London.
- Laurie, D., and M. Bennett. 1988. The production of haploid wheat plants from wheat x maize crosses. *Theor Appl Genet* 76:393-397.
- Laurie, D., L. O'Donoghue, and M. Bennett. 1990. Wheat x maize and other wide sexual hybrids: their potential for genetic manipulation and crop improvement. p. 95-126. *In* J. P. Gustafson (ed.). Genetic manipulation in plant improvement II. 19th Stadler Genetics Symposium. Plenum Press, New York, USA.
- Laurie, D., and S. Reymondie. 1991. High frequencies of fertilization and haploid seedling production in crosses between commercial hexaploid wheat varieties and maize. *Plant Breed.* 106:182-189.
- Liu, W., M. Zheng, E. Pollenad, and C. Konzak. 2001. Highly efficient-haploid production in wheat (*Triticum aestivum* L.) via induced microspore embryogenesis. *Crop Sci.* 42:686-692.
- Ma, H., R. Busch, O. Riera-Lizarazu, and H. Rines. 1999. Agronomic performance of lines derived from anther culture, maize pollination and single-seed descent in a spring wheat cross. *Theor. Appl. Genet.* 99:432-436.
- Mendoza, M. 1998. Production of haploid plants in selected winter wheat genotypes through anther culture and intergeneric cross with maize. 134 p. Ph.D. Thesis. Oregon State University, Corvallis, Oregon, USA.
- Mujeeb-Kazi, A. 2000. An analysis of the use of haploidy in wheat improvement. p. 33-48. *In* Kohli, M., and Francias, M. (eds.) Application of biotechnologies to wheat breeding. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, La Estanzuela, Colonia, Uruguay.
- Mujeeb-Kazi, A., S. Cano, V. Rosas, R. Delgado, J. Sánchez, and L. Juárez. 2001. Maize mediated haploid production in bread wheat: current status, constrains, and modifications. *Annual Wheat Newsletter* 467:116-117.
- Mujeeb-Kazi, A., and J. Miranda. 1985. Enhance resolution of somatic chromosome constrictions as an aid to identifying intergeneric hybrids among some *Triticeae*. *Cytologia* 50:701-709.
- Mujeeb-Kazi, A., S. Roldan, S. Sitch, and S. Farooq. 1987. Production and cytogenetic analysis of hybrids between *Triticum aestivum* L. and some caespitose *Agropyron* species. *Genome* 29:537-553.
- Snape, J. 1988. The detection and estimation of linkage using doubled haploid or single seed descent populations. *Theor. Appl. Genet.* 76:125-128.
- Snape, J. 1989. Double haploid breeding: theoretical basis and practical applications. p. 19-31. *In* A. Mujeeb-Kazi, and L. Sitch (eds.). Review of advances in plant biotechnology. 2nd Int. Symposium Genetic Manipulation in Crops. International Maize and Wheat Improvement Center and International Rice Research Institute (CIMMYT and IRRI), Manila, Phylippine.
- Suenaga, K., and K. Nakajima. 1989. Efficient production of haploid wheat (*Triticum aestivum* L.) through crosses between Japanese wheat and maize (*Zea mays*). *Plant Cell Rep.* 8:263-266.
- Suenaga, K., M. Tamaki, and K. Nakajima. 1991. Influence of wheat (*Triticum aestivum* L.) and maize (*Zea mays*) genotypes on haploid wheat production in crosses between wheat and maize. *Bulletin of the National Institute of Agrobiological Resources* 6:131-142.
- Suenaga, K., R. Morshedi, and L. Darvey. 1997. Haploid production of Australian wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars through wheat x maize (*Zea mays* L.) crosses. *Aust. J. Agric. Res.* 48:1207-1211.
- Zadoks, J., T. Chang, and C. Konzak. 1974. A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Research* 14:415-421.