

# INFLUENCIA DE LA EPOCA DE POLINIZACIÓN EN EL DESARROLLO DE EMBRIONES HAPLOIDES MEDIANTE EL SISTEMA TRIGO X MAIZ

## TIMES OF POLINIZATION TO DEVELOPMENT HAPLOID EMBRYOS THROUGH WHEAT X MAIZE SYSTEM

SÁNCHEZ-CHACÓN, Carlos D.<sup>1</sup>; SILVA, José A. G. da<sup>2</sup>; LANNES, Sérgio D.<sup>3</sup>; CARVALHO, Fernando I. F. de<sup>4</sup>; OLIVEIRA, Antônio C. de<sup>4</sup>

### RESUMEN

Doce híbridos  $F_1$  de trigo hexaploide y dos genotipos de maíz fueron utilizados en cruzamientos intergenéricos, para evaluar el potencial de haploidización en diferentes épocas de polinización y verificar los efectos de la temperatura sobre la capacidad de gimnogenesis somática de las poblaciones de trigo. El trabajo fue desarrollado durante 1999, 2000 y 2001 utilizando ambientes controlados y el laboratorio de Di-haploidización e Hidroponia de la FAEM-UFPel. Los resultados alcanzados mostraron que el sistema trigo x maíz, como técnica de haploidización, puede ser una alternativa importante para el avance de generaciones y fijación rápida de la homocigosis en el mejoramiento genético de cereales menores. La formación de Granos Verdes (GV) y Embriones Haplóides (EH) está relacionada significativamente con la época de polinización y particularmente con la temperatura que determina la eficiencia fisiológica en las etapas de pre y pos polinización, y permite detectar variabilidad entre genotipos de trigo respecto del potencial de haploidización, lo cual caracteriza el grado de respuesta de ciertas constituciones genéticas para la obtención de estos productos, independientemente del germoplasma de maíz utilizado como fuente de pólen, cuyo efecto no fué evaluado en este estudio. Las condiciones de ambiente, caracterizadas por temperaturas amenas, son mas favorables para la produção de cariópses inmaduros y embriones haplóides de trigo, pues influenciaron en los resultados en forma expresiva. El análisis de regresión reveló que intervalos de temperatura entre 20 e 30°C son los mas adecuados en el proceso de haploidización.

Palabras clave: Cruzamiento intergenérico, di-haploide, embrión haplóide, temperatura.

### INTRODUCCIÓN

En los programas de mejora genética de especies autógamias, el desarrollo de germoplasma se concentra en tres etapas fundamentales: a) recombinación genética para ampliar la variabilidad; b) identificación y selección de genotipos recombinantes con caracteres de interés agronómico e c) fijación de genes en genotipos homocigotos.

La obtención de líneas puras, homocigotas y homogéneas, es uno de los mas importantes objetivos de la mejora vegetal. De manera convencional, la recombinación genética acumulada en cada generación, es evaluada a través de la selección genealógica y prueba de progenie, mediante

repetidos ciclos de selección, hasta la obtención del grado de homocigosis deseado para los caracteres de importancia agronómica. Normalmente entre seis e ocho generaciones de autofecundación y selección son necesarios para obtener líneas con adecuado nivel de homocigosis, que podrán ser liberadas como cultivares después de evaluarlas en varios locales y años

Las tecnologías modernas como la Di-haploidización-DH (producción artificial de plantas haplóides seguidas de duplicación cromosómica), contribuyen de varias maneras para la eficiencia de los programas de mejora vegetal, abreviando el proceso de obtención de homocigosis en una generación, lo que permite la evaluación precoz de líneas puras y liberación rápida de cultivares superiores y auxiliando de forma directa en el balance de la interacción entre los genes superiores y los efectos del ambiente.

La utilización del método DH resulta ventajoso por la economía de espacio y mano de obra en el proceso de selección, el tamaño de la población para seleccionar un determinado genotipo con alta probabilidad, se reduce a la raíz cuadrada del sistema convencional. Considerando la probabilidad de seleccionar un determinado genotipo, si fuesen obtenidas 20 plantas DH por cruzamiento, este número equivale en el sistema convencional a un tamaño de población de 400 plantas, pues los individuos heterocigotos no estarán presentes en las progenies DH (MORAES-FERNANDES, 1987)

Desde el punto de vista genético el método aumenta la eficiencia de la selección, pues las relaciones de dominancia y recesividad, presentes en los individuos heterocigotos, son eliminadas y solamente los homocigotos son evaluados. Según PICARD (1989), en una población DH originada de un cruzamiento, la variancia aditiva fijada es mayor que en una población de plantas  $F_2$  obtenidas por autofecundación del mismo cruzamiento; así, la expresión de todos los genes (alelos), particularmente los recesivos ocultos, valoriza y optimiza ciertos efectos aditivos o de epistacia (aditividad x aditividad).

La producción de haplóides puede ocurrir a través del cultivo de anteras (androgenesis), cuando la planta haplóide se origina a partir del micrósporo (pólen) o mediante el cultivo de embriones inmaduros (gimnogenesis), en cruces interespecíficas o intergenéricas, cuando la planta haplóide se origina a partir de la oosfera y de la eliminación del genoma de

<sup>1</sup> Eng. Agr. (Dr), Bolsista RD (CNPq), Professor colaborador do Departamento de Fitotecnia-Fitomelhoramento. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas, Campus universitário Cx Postal 354, CEP 96010-900, Pelotas-RS. E-mail: sanchez@ufpel.tche.br

<sup>2</sup> Eng. Agr.; mestrando do Curso de Pós-Graduação em Fitomelhoramento, Departamento de Fitotecnia, (FAEM-UFPel).

<sup>3</sup> Eng. Agr., doutorando, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa-MG

<sup>4</sup> Eng. Agr. (Ph.D), Professor do Departamento de Fitotecnia-Fitomelhoramento (FAEM/UFPel).

(Recebido para Publicação em 08/10/2002, Aprovado em 09/10/2003)

la especie donante del pólen (LAURIE & BENNETT, 1986). El cultivo del embrión inmaduro promueve el desarrollo de una planta haploide, la cual después de la duplicación del número cromosómico se torna homocigota (MORAES-FERNANDES, 1990).

La producción de haploides en trigo via androgénesis, utilizada por varios años, presenta dificultades y limitantes determinados por la capacidad de regeneración de los genotipos y desarrollo de plantulas verdes (FADEL & WENZEL, 1990), debido a la interacción del citoplasma del micrósporo o por factores maternos heredados portadores de genes nucleares que controlan esta respuesta (HASAN & KONZAK, 1991), o también por falta de afinidad entre el genotipo con el medio de cultivo (GHAEMI et al., 1993).

Los cruzamientos interespecíficos e intergenéricos surgieron para superar las dificultades encontradas. El método denominado de *Hordeum bulbosum* en el mejoramiento de cebada, fué adoptado para la obtención de haploides androgenéticos con éxito relativo, debido a la influencia de varios factores como: variación somaclonal asociada al cultivo de tejidos, formación de aneuploides, especificidad genotípica (PICARD, 1989) y a las fluctuaciones ambientales (HAYES & CHEN, 1989; BOZORGIPOUR & SNAPE, 1991).

En esta misma línea de trabajo, cruza entre diversos genotipos de trigo hexaploide con maíz (LAURIE & BENNETT, 1988a; LAURIE & REYMONDIE, 1991); sorgo y millete (LAURIE & BENNETT, 1988b; OHKAWA et al., 1992; INAGAKI & MUJEEB-KAZI, 1995); "teosinte" *Z. mays ssp. Mexicana* (USHIYAMA et al., 1991); "tripsacum" *Tripsacum dactiloides* (L.) L. (RIERA-LIZARAZU & MUJEEB-KAZI, 1993); trigo tetraploide x maíz (RIERA-LIZARAZU & MUJEEB-KAZI, 1990), demostraron mayor eficiencia en la obtención de haploides.

En vista del constante perfeccionamiento de estas técnicas, la incorporación y adaptación de las metodologías modernas en los procedimientos de la mejora vegetal clásica, es una importante alternativa para la investigación y capacitación en este tema.

La implementación del laboratorio y de ambientes controlados, para la adopción de las técnicas de haploidización, y el desarrollo de líneas DH a partir de cruza intergenéricas trigo x maíz, propiciaron el inicio de las investigaciones en esta área del programa de mejoramiento genético de cereales menores, de la Facultad de Agronomía Eliseu Maciel de la Universidad Federal de Pelotas (FAEM-UFPEL).

La validación de las técnicas de haploidización mediante el sistema trigo x maíz fué realizada en condiciones controladas de invernadero y laboratorio. La capacidad de gimnogénesis somática de diferentes constituciones genéticas de trigo y la influencia de varias épocas y temperaturas de polinización, fueron los objetivos mayores que llevaron a los primeros resultados obtenidos en experimentos realizados durante 1999, 2000 y 2001 y que se presentan en este trabajo.

## MATERIAL Y MÉTODOS

El germoplasma utilizado fué constituido de doce poblaciones F<sub>1</sub> de trigo desarrolladas por la Embrapa-Trigo, a partir de cruzamientos entre 15 genotipos con potencial de adaptación y caracteres de importancia agronómica e industrial (Tabla 1).

Dos genotipos de maíz, con características deseables relacionadas con estatura de planta, tamaño de las anteras y prolificidad de pólen, el híbrido precoz AG 6018 (maíz común)

y la variedad BR-400, (maíz dulce), fueron las fuentes donantes de pólen, cuya influencia no fué estudiada en esta investigación.

Semillas F<sub>1</sub> de cada cruzamiento fueron sembradas en invernadero en baldes de plástico con tierra orgánica adicionada de fertilizante. Simultáneamente, semillas de maíz donantes de pólen, fueron sembradas en el campo en el verano y en ambiente protegido (invernadero) durante el invierno en el Campus de la FAEM-UFPEL. Estos experimentos fueron realizados durante 1999 y 2000, utilizando similares procedimientos.

Tabla 1 - Poblaciones F<sub>1</sub> originadas del cruzamiento entre genotipos de trigo con diferentes características de importancia agronómica. Embrapa-Trigo. 1998.

Población F <sub>1</sub>	Cruzamiento
1	BR 35 / CEP 24
2	CEP 24 / BR 35
3	CEP 24 / PF 87504
4	CEP 24 / PF 93167
5	FUNDACEP 29 / ANAHUAC
6	FUNDACEP 29 / BR 18
7	EMBRAPA 49 / EMBRAPA 120
8	EMBRAPA 120 / EMBRAPA 49
9	PF 92231 / SONORA 64
10	EMBRAPA 119 / TB 951
11	EMBRAPA 49 / BR 23
12	BR 23 / PF 950354

La siembra de los genotipos de trigo fué realizada semanalmente durante tres meses, cada mes fué definido como Época (E<sub>I</sub> – E<sub>II</sub> – E<sub>III</sub>), utilizando cuatro semillas por maceta e dos macetas en cada época. Los genotipos de maíz fueron sembrados de forma continua cada 4-5 días para disponer permanentemente de pólen (Tabla 2). Cuidados durante el desarrollo de las plantas fueron devidamente tomados, mediante irrigación y control de enfermedades y plagas.

En la época de otoño-invierno de 1999 (mayo-julio), así como en la época de primavera-verano de 2000 (septiembre-noviembre), en cada población de trigo fué realizada la emasculación de las espigas en anthesis, procediendo a abrir con cuidado las estructuras florales de cada espiguilla, eliminando las flores secundarias y retirando las anteras; seguidamente, cada espiga fué protegida con un glacine para conservar la humedad del estigma e identificada con una etiqueta registrando la fecha de emasculación e el responsable del trabajo.

Después de 3 días fué realizada la polinización con pólen de maíz recién colectado, abriendo las flores con una pinza y pincelando una pequeña cantidad de pólen sobre los estigmas, cubriendolas nuevamente.

Una solución de 1,0 mg/l de la hormona de crecimiento 2,4 D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético), fué inyectado en el tallo por debajo de la inserción de cada espiga, en dos períodos, 24 y 48 horas después de la polinización para favorecer al desarrollo del embrión somático. La cosecha de las espigas inmaduras de trigo fué realizada entre 15 y 20 días después de la polinización, en función de las diferencias de temperatura que ocurrieron entre las épocas.

En el laboratorio de di-haploides, en todas las espigas colectadas se realizó la identificación y contaje del número de flores polinizadas y de los carióspsides inmaduros

denominados “granos verdes” (GV). Seguidamente fué realizada la desinfección de los mismos con solución de hipoclorito de sodio y agua esterilizada (1:1) y alcohol 70% por 5 minutos, respectivamente. En la cámara de flujo laminar con auxilio de estereomicroscópio y bisturi, los embriones haploides inmaduros (EH) fueron retirados, contabilizados y colocados en tubos de ensaio con medio de cultivo

modificado, batata-dextrosa-agar BDA, (CHUANG et al., 1981), preparado con antecedencia. Los tubos fueron protegidos, identificados y colocados en la cámara de crecimiento BOD, donde permanecieron por tres días en obscuridad y después con iluminación permanente para propiciar el desarrollo de las plántulas haploides, la temperatura utilizada fué de 25°C.

Tabla 2 - Épocas de siembra y de polinización de trigo y maíz, para la obtención de haploides, durante 1999 y 2000. FAEM-UFPel.

Año	Actividad	Epoca I	Epoca II	Epoca III
1999	Siembra de trigo	Enero	Febrero	Marzo
	Polinización	Abril-Mayo	Mayo-Junio	Junio-Julio
	Siembra de maíz	Febrero-Marzo	Abril-Mayo	Junio-Julio
2000	Siembra de trigo	Junio	Julio	Agosto
	Polinización	Septiembre/Octubre	Octubre-Noviembre	Noviembre-Diciembre
	Siembra maíz	Julio-Agosto	Septiembre/Octubre	Noviembre-Diciembre

Seguendo la metodología descrita para los ensaios anteriores, un tercer ensayo fué realizado en el verano-otoño de 2001, utilizando semilla F<sub>2</sub> de los cruzamientos: Embrapa 120 / Embrapa 49 y PF 92231 / Sonora 64, que fueron los mas eficientes en los primeros trabajos.

La siembra fué realizada semanalmente entre los meses de enero hasta mayo, con el objetivo de estudiar la influencia de la temperatura durante el proceso fisiológico de la polinización, así como en la secuencia de eventos relacionados con el desarrollo somático del embrión haploide.

La polinización, fué realizada siempre a partir de medio día e la temperatura durante este período fué registrada en grados Celcius (C°) mediante un termómetro.

El análisis estadístico realizado fué mediante un delineamiento completamente al azar, en arreglo factorial de sus componentes: Épocas de polinización y Genotipos de trigo (poblaciones F<sub>1</sub>), para los ensayos realizados en 1999 y 2000.

La variación de la temperatura observada durante la polinización y su influencia en la formación de EH en 2001, fué analizada estadísticamente. Mediante análisis de regresión entre el número de EH y las temperaturas observadas que variaron entre 14 y 34°C, fué estimado el punto térmico mas adecuado para optimizar el desarrollo de embriones somáticos durante esta etapa en el proceso de haploidización. Los

análisis de variancia, las comparaciones entre las medias (Scott Knott a 5%), así como los análisis de regresión, fueron ejecutados mediante los programas estadísticos GENES y EXCEL.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El número de granos verdes formados (GV) y el número de embriones haploides inmaduros recuperados (EH), fueron las variables estudiadas en el presente trabajo para explorar el potencial de las técnicas de haploidización en el proceso de mejoramiento genético del trigo.

El comportamiento de los genotipos de trigo y de las épocas de polinización en relación a las variables indicadas, fueron examinadas mediante análisis de variancia que permitió evidenciar la influencia de los genotipos y de las épocas sobre la frecuencia de GV, siendo posible establecer claramente efectos altamente significativos de las épocas de polinización sobre los genotipos de trigo y sus interacciones en la formación de carióspsides. El desarrollo de EH de manera general fué baja y no fué posible detectar diferencias estadísticas entre las variancias y tampoco sobre sus interacciones (Tabla 3).

Tabla 3 - Resumen del análisis de variancia conjunto para las variables número de Granos Verdes (GV) y número de Embriones Inmaduros Haploides (EH), durante 1999 y 2000. FAEM-UFPel.

Fuentes de variación	Cuadrado medio			
	GV / 1999	GV / 2000	EH / 1999	EH / 2000
Genotipos (G)	2,22**	9,53**	0,11 <sup>ns</sup>	0,33 <sup>ns</sup>
Épocas (E)	25,57**	18,19**	1,54 <sup>ns</sup>	1,46 <sup>ns</sup>
Genotipos x Épocas	1,21**	2,49**	0,04 <sup>ns</sup>	0,10 <sup>ns</sup>
Error	0,31	0,25	--	--

\*\* Significativo al 1% ns No significativo

De modo general, los valores encontrados para los caracteres estudiados fueron bajos, apreciándose un comportamiento variable entre los genotipos, y entre las épocas de polinización, que fueron específicas para cada ensayo en las condiciones experimentales (invernadero). De todas maneras, la formación de GV y el desarrollo de EH, fué mejor en todos los genotipos en el segundo ensayo en 2000.

En las poblaciones F<sub>1</sub> de trigo sembradas en tres épocas

diferentes en el primer ensayo durante 1999 y en el segundo ensayo durante 2000, un total de 4.150 flores fueron polinizadas utilizando pólen de maíz disponible que produjeron 815 GV y 72 EH. La media de GV fué de 7,18 en 1999 y 15,78 en 2000; mientras tanto que la media de EH reveló índices aún menores: 1,17 y 4,83 en los años 1999 y 2000, respectivamente. De acuerdo con BOZORGIPOUR & SNAPE, 1991, la pequeña cantidad de

embriones recuperados se considera como un factor limitante de la metodología DH en el mejoramiento genético de algunas especies.

La influencia de las épocas de polinización en los dos ensayos mostró que la mayor frecuencia de GV en 1999, ocurrió cuando la polinización fué realizada entre abril y mayo (I época) lo que representa 32,70%, declinando progresivamente en mayo-junio (II época) con 14,34% y junio-julio (III época) con 7,56% de granos verdes.

Este efecto de las épocas en la formación de carióspsides fué observado de manera parecida en el segundo ensayo durante 2000, donde la II época (octubre-noviembre) y III época (noviembre-diciembre) con 23,27% y 20,10% de GV, respectivamente, fueron un poco mas favorables que en la I época (septiembre-octubre) con 17,72% de eficiencia.

El desarrollo de EH en el primer ensayo en 1999 ocurrió apenas durante la I y II épocas de polinización y la pequeña frecuencia observada fué de aproximadamente 6%. La III época resultó desfavorable para la formación de embriones en todas las poblaciones.

Durante el segundo ensayo en 2000 la II y III épocas fueron mais favorables con aproximadamente 10% de EH, disminuyendo para 7,14% en los meses de septiembre-octubre de la I época. Mediante análisis de las Figuras 1 y 2, se puede apreciar el desempeño de las poblaciones de trigo en las épocas de polinización.

Los resultados alcanzados mostraron la importancia de las épocas de polinización y su influencia en este proceso, lo cual permite verificar la hipótesis de la interacción entre los factores del ambiente y las constituições genéticas a través de la capacidad de gimnogenesis somática observada. Entre los componentes del ambiente, de manera particular la temperatura durante la microsporogénesis y la germinación del tubo polínico en el maíz, así como en el proceso de formación del embrión somático en el trigo, parece tener influencia significativa.

Así, la mayor frecuencia de GV y EH en 1999 ocurrió cuando la temperatura ambiente era amena, característica de los meses de abril y mayo, decayendo progresivamente a fines de mayo y sobre todo en los meses de junio-julio, que corresponden a la época fría de invierno.

Por otro lado en el año 2000, el desarrollo de GV y EH fué mejor, principalmente entre octubre y diciembre, caracterizados también por temperaturas mas favorables. Sin embargo, los ajustes realizados en la metodología y control del ambiente para el desarrollo del germoplasma de maíz y la obtención de pólen viable, pueden haber contribuído también para incrementar la frecuencia, sobre todo de embriones haploides en este segundo ensayo.

La interacción genotipo x ambiente, específicamente relacionada con la temperatura, fué observada por GRANDO et al. (1994), en cruza intergenéricas utilizando avena. THÖRN, (1992), encontró que polinizaciones realizadas entre enero-abril influenciaron favorablemente en los resultados en el sistema *H. vulgare* x *H. bulbosum* y los meses mas fríos (junio-julio-agosto) provocaron alteraciones en el desarrollo fisiológico del pólen y del estigma. SITCH & SNAPE, (1987) en el sistema trigo x *H. bulbosum*, verificaron reducción de la fertilización en temperaturas elevadas que afetaron la receptividad del estigma y el crecimiento del tubo polínico.

De acuerdo con estas observaciones es posible sugerir que las condiciones adversas de ambiente, particularmente las temperaturas extremas que ocurrieron en algunas épocas de polinización, pueden haber alterado el pólen de maíz, debido a

la frágil estructura de protección, así como la receptividad de los estigmas de trigo en temperaturas elevadas.

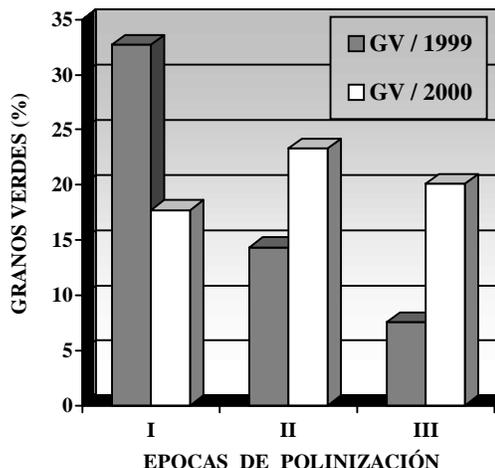


Figura 1 - Granos verdes formados en doce poblaciones de trigo y três épocas de polinización. FAEM-UFPeL, 1999-2000.

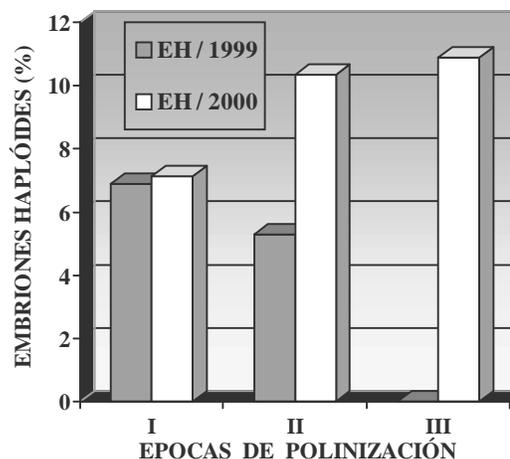


Figura 2 - Embriones haploides recuperados en doce poblaciones de trigo y três épocas de polinización. FAEM-UFPeL, 1999-2000.

De acuerdo con SUZIN (1994), en cruza avena x maíz y avena x millete, el efecto significativo de determinadas combinaciones específicas asociadas con el ambiente, pueden indicar la existencia de combinaciones genéticas mas favorables que otras respecto de la formación de carióspsides, de manera independiente del polinizador.

Por otro lado, los genotipos de maíz utilizados como polinizadores en este estudio, aunque las bajas temperaturas inhibieron la producción de pólen, no fueron determinantes "per se" en el comportamiento variable de los genotipos de trigo para la formación de granos y desarrollo de embriones.

En relación a la participación de los genotipos de trigo en estos ensayos, las diferencias estadísticas significativas detectadas a través del análisis de variancia entre las poblaciones para la variable formación de GV en los 2 ensayos, permitió discriminarlos mediante análisis de las

medias, estableciéndose un ordenamiento gradativo como se muestra en la Tabla 4.

Debido a la interacción significativa observada entre los genotipos y las épocas, no fué posible determinar los mejores cruzamientos en relación a las variables estudiadas en este trabajo. La superioridad genotípica depende de la eficiencia fisiológica del polinizador y de la respuesta del receptor asociados a determinadas condiciones del ambiente, donde una determinada combinación de genotipos puede ser superior en una determinada época e inferior en otra para los caracteres analizados; sin embargo, es importante destacar la estabilidad observada en las poblaciones 7 (Embrapa 49/Embrapa 120) 8 (Embrapa 120/Embrapa 49) e 9 (PF 92231/Sonora 64), que presentaron valores superiores a la media de manera consistente en los dos ensayos y

demonstraron la posible especificidad genotípica de estas constituciones genéticas para la formación de carióspsides.

Las poblaciones 10 (Embrapa 119/TB951) 5 (Fundacep29/Anahuac) e 11 (Embrapa 49/BR 23), fueron importantes para esta variable de manera independiente en 1999 y 2000, respectivamente.

Debido a la baja frecuencia de embriones haploides recuperados, no fueron detectadas diferencias estadísticas entre los genotipos y épocas en los dos ensayos. Mientras tanto, el mayor número de embriones fué encontrado en las poblaciones 7 y 8 oriundas de los cruzamientos recíprocos entre Embrapa 120 y Embrapa 49, así como el cruzamiento 10 (Embrapa 119/TB 951). Por otro lado, la población 9 (PF 92231/Sonora 64), fué importante en el segundo ensayo en 2000 (Tabla 5).

Tabla 4 - Medias del número de Granos Verdes (GV) resultantes de las combinaciones entre genotipos y épocas estudiadas durante 1999 y 2000. FAEM-UFPel.

Nº	Población F <sub>1</sub>	Media / 1999	Media / 2000
7	Embrapa 49 / Embrapa 120	10,00 *	17,30 *
8	Embrapa 120 / Embrapa 49	9,00 *	26,30 *
4	CEP 24 / PF 93167	9,00 *	10,00
11	Embrapa 49 / BR 23	8,30 *	15,70
10	Embrapa 119 / TB 951	8,00 *	14,00
9	PF 92231 / Sonora 64	7,70 *	22,00 *
1	BR 35 / CP 24	7,00	9,70
5	Fundacep 29 / Anahuac	7,00	19,30 *
6	Fundacep 29 / BR 18	5,70	17,30 *
3	CEP 24 / PF 87504	5,70	10,70
2	CEP 24 / BR 35	5,00	12,70
12	BR 23 / PF 950354	4,70	14,30
	Media Geral	7,18	15,78

\* Valores superiores a la media, de acuerdo con la prueba de SCOTT & KNOTT a 5% de probabilidad

Tabla 5 - Número de Embriones haploides (EH) resultantes de las combinaciones entre genotipos y épocas estudiadas durante 1999 e 2000. FAEM-UFPel.

Nº	Población F <sub>1</sub>	EH / 1999	EH / 2000
8	Embrapa 120 / Embrapa 49	4 *	14 *
7	Embrapa 49 / Embrapa 120	3 *	9 *
10	Embrapa 119 / TB 951	2 *	3
11	Embrapa 49 / BR 23	1	3
9	PF 92231 / Sonora 64	1	16 *
6	Fundacep 29 / BR 18	1	3
4	CEP 24 / PF 93167	1	2
3	CEP 24 / PF 87504	1	2
1	BR 35 / CEP 24	0	1
2	CEP 24 / BR 35	0	2
5	Fundacep 29 / Anahuac	0	2
12	BR 23 / PF 950354	0	1
	MEDIA	1,17	4,83

\* Valores superiores a la media

La formación y desarrollo somático del embrión, según diversos autores, es un proceso delicado y puede ser afectado por varios factores, incluyendo la propia capacidad de respuesta de los genotipos cuando participan en cruzamientos intergenéricos. Segundo FALK & KASHA, 1981; SNAPE et al., 1979, la capacidad de combinación entre trigo x *H.bulbosum* es genéticamente controlada por los genes dominantes Kr<sub>1</sub> e Kr<sub>2</sub> en el cromosoma 5B y 5A, respectivamente; sin embargo

LAURIE & BENNETT, 1986, observaron que el pólen del maíz puede inducir a la formación somática del embrión del trigo independientemente de la presencia de los genes Kr.

Como fué observado con los genotipos Embrapa 120 y Embrapa 49, que presentaron un desempeño superior y consistente en el primero y segundo ensayo, es posible que factores genéticos hayan determinado este comportamiento, sobre todo cuando los otros factores del ambiente fueron adecuados.

De manera específica, según diversos autores, la oscilación de la temperatura interfiere en los procesos fisiológicos de pre e pos-polinización, siendo más decisiva durante las etapas meióticas y mitóticas de la división celular tanto en la microsporogénesis, como en la germinación del tubo polínico, así como durante los eventos de diferenciación somática del embrión (embrión joven o pro-embrión) a partir de la estimulación de la oosfera en las etapas que caracterizan a la gametogénesis no gamética (CAMPBELL et al., 1998).

Para verificar la hipótesis de la interferencia de la temperatura en el proceso fisiológico de la formación de cariopsis y embriones somáticos, durante los primeros meses de 2001 fué realizado un ensayo utilizando las poblaciones 8 y 9 de trigo-F<sub>2</sub> oriundas de los cruzamientos Embrapa 120 / Embrapa 49 y PF92231 / Sonora 64, respectivamente. El factor temperatura registrado durante el momento de la polinización, que osciló entre 14 y 34°C, distribuido escalonadamente en siete clases, fué analizado

estadísticamente en relación a la formación de GV e EH. Los resultados revelaron efectos significativos en todos los intervalos para los dos genotipos, de acuerdo con el análisis de variancia realizado que se presenta en la Tabla 6.

Un total de 2.759 flores de trigo fueron emasculadas y seguidamente polinizadas con maíz, originando 1.239 GV (44,9%) y 85 EH (6,8%). De acuerdo con estos resultados, comparativamente las dos poblaciones mostraron mejor producción de GV y EH que en los ensayos anteriores, observándose nuevamente la superioridad de la población 8 para estas variables (Tabla 7).

Tabla 6 - Resumen del análisis de variancia de las diferentes temperaturas de polinización para la obtención de EH en dos poblaciones F<sub>2</sub> de trigo. FAEM/UFPel, 2001.

Fuentes de Variación	Cuadrado Medio	
	Población 8 (Emb.120/Emb.49)	Población 9 (PF 92231/Sonora 64)
Temperatura	0,253*	0,269*
Error	0,105	0,098

\* significativo a 5% CV= 26,75 %

Tabla 7 - Temperatura de polinización (T°P) Número de flores polinizadas (N°FP) Número de Granos Verdes formados (N°GV) y número de Embriones Haplóides recuperados (N°EH), en dos poblaciones F<sub>2</sub> de trigo en diferentes temperaturas de polinización, FAEM/UFPel, 2001.

Pop.	T° P	N°EP	N°FP	N°GV	N°ER	%NER	MN°ER
F <sub>2</sub> P <sub>9</sub> PF 92231/Son.64	14 a 16	8	132	42	0	0	0
	17 a 19	8	101	48	1	0,99	0,12
	20 a 22	16	268	121	4	1,49	0,25
	23 a 25	17	316	150	15	4,75	0,88
	26 a 28	8	154	67	7	4,54	0,87
	29 a 31	12	244	119	9	3,69	0,75
	32 a 34	8	122	40	2	1,63	0,25
	-	-	-	-	-	-	-
	TOTAL	77	1337	587	38		
F <sub>2</sub> P <sub>8</sub> Emb.120/Bem.49	14 a 16	12	212	74	3	1,42	0,25
	17 a 19	9	120	44	4	3,33	0,44
	20 a 22	10	176	81	9	5,11	0,90
	23 a 25	13	262	132	11	4,2	0,85
	26 a 28	7	148	74	7	4,73	0,87
	29 a 31	18	354	201	10	2,82	0,56
	32 a 34	10	150	46	3	0,2	0,3
	-	-	-	-	-	-	-
	TOTAL	79	1422	652	47		

Los valores correspondientes al número de GV y EH obtenidos se distribuyeron de forma normal entre las escalas de temperatura de 14 a 34°C y el análisis de regresión permitió establecer claramente la relación entre las dos variables, siendo posible observar que el incremento de la temperatura en la polinización estimulaba la formación de un mayor número de EH. Los rangos de temperatura entre 14 y 19°C y superiores a 31°C, fueron menos favorables para el desarrollo de GV y EH en los dos genotipos estudiados y los intervalos entre 20 y 30°C mostraron los mejores resultados. Con esta tendencia de comportamiento se verificó un intervalo específico óptimo de temperatura para cada genotipo evaluado; así, en las poblaciones 8 y 9 el mayor número de EH fué conseguido entre 21 y 28°C y 22 y 30°C, respectivamente; sin embargo, es posible que otras constituciones genéticas sean eficientes en intervalos de temperatura diferentes, debido a la interacción observada entre los genotipos y la temperatura durante la polinización tal como se observa en las Figuras 3 y 4.

os resultados alcanzados en esta etapa permiten establecer que las diferencias de temperatura que ocurrieron entre los períodos de polinización en los dos primeros ensayos, influenciaron significativamente tanto en el proceso de inducción de la formación somática de las estructuras del embrión y del endosperma del trigo, como en el desarrollo del tubo polínico en el pólen del maíz que comprometieron la propia viabilidad, en este sentido CAMPBELL et al.(1998),

indican que la eficiencia del sistema trigo x maíz en el proceso de haploidización, depende de la época del año en la cual los cruzamientos son realizados, especialmente en relación a factores como temperatura y luminosidad.

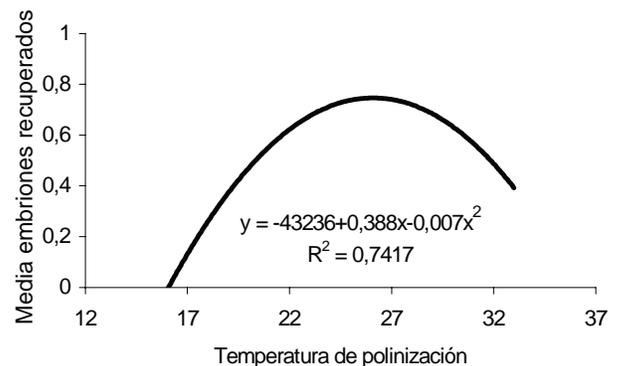


Figura 3 - Influencia de la temperatura de polinización en el desarrollo de Embriones Haplóides. Trigo F<sub>2</sub> Embrapa 120 / Embrapa 49, FAEM – UFPel, 2001.

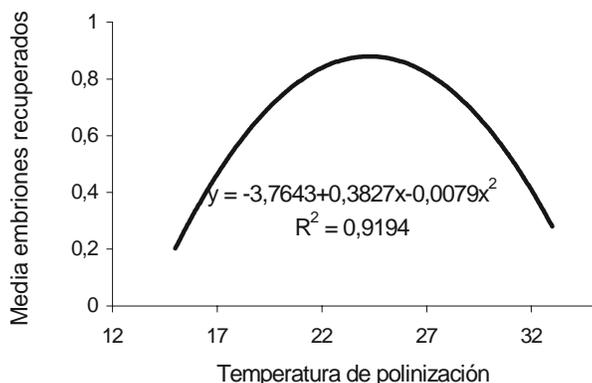


Figura 4 - Influencia de la temperatura de polinización en el desarrollo de Embriones Haplóides. Trigo F<sub>2</sub> PF 92231 / Sonora 64, FAEM – UFPel, 2001.

La aplicación de las técnicas de haploidización utilizando el sistema trigo x maíz, puede ser una alternativa importante para el avance de generaciones y fijación rápida de la homocigosis en el mejoramiento genético de cereales de clima frío. Con la intención de viabilizar el uso de estas técnicas en las condiciones de la FAEM-UFPel, nuevos estudios en esta línea de investigación relacionados específicamente con el potencial genotípico y eficiencia de los polinizadores; la influencia de los factores del ambiente; los medios de cultivo para recuperación, inducción y crio-preservación de los embrioides y plantas haploidizadas, serán necesarios.

### CONCLUSÕES

Existe un desempeño variable entre los genotipos de trigo estudiados en relación al potencial de haploidización, medidos a través de la formación de cariopses inmaduros (granos verdes) y embriones somáticos, lo cual caracteriza a ciertas constituciones genéticas como de mejor respuesta para la obtención de estos productos.

Las épocas de polinización caracterizadas por temperaturas amenas, son más favorables para la formación de granos verdes y embriones haploides. En 1999 la Época I (abril-mayo). En 2000 las Épocas II (octubre-noviembre) y Época III (noviembre-diciembre), proporcionaron las mejores condiciones ambientales e influenciaron en los resultados de manera expresiva.

Intervalos de temperatura entre 20 y 30°C son los más adecuados para el proceso de haploidización.

### ABSTRACT

A group of 12 F<sub>1</sub> hexaploid wheat hybrids and two *Zea mays* L. parents were used in intergeneric crosses with maize to test the haploidization potential at different times of polinization and the temperature effect on the somatic gynogenesis capacity of wheat genetic constitutions. The work was carried out in 1999, 2000 and 2001 in the FAEM-UFPel greenhouse and laboratory of haploidization & hydroponic system. The results showed that wheat x maize haploidization system can be an important alternative for the progress of generation and rapid fixation of homozygosity on breeding of small grain cereals. The green seeds and haploid embryo development is significantly related with the time of polinization and the temperature

particularly which determine the physiological efficiency at pre and post polinization. It were observed differences among genotypes for haploidization potential, characterising some genetic constitutions with responsive effect, independently of maize pollen germplasm used. Mild temperatures are adequate to maize pollen viability and wheat stigma receptivity, greatly influencing the results. The regression analysis showed that temperature range between 20 and 30°C is adequate for the haploidization process.

Key words: Double haploid, haploid embryo, hidroponic, intergeneric crossing, temperature.

### REFERÊNCIAS

- BOZORGIPOUR, R.; SNAPE, J. W. The assesment of in vitro characters and their influence on the success rates of doubled haploid production in barley. **Euphytica**, Wageningen, v. 58, n. 2, p. 137-144, 1991.
- CAMPBELL, A.W.; GRIFFIN, W.B.; CONNER, A.J. et al. The effects of temperature and light intensity on embryo numbers in wheat doubled haploid production through wheat x maize crosses. **Annals of Botany**, Australia, v. 82, p.29-33, 1998.
- CHUANG, C.C.; OUYANG, T.W.; CHIA, H. et al. A set of potato media for wheat anther culture. In: SIMPOSIUM ON PLANT TISSUE CULTURE, 1978, Peking. **Plant Tissue Culture**, Boston: Pitman, p. 51-56, 1981.
- FALK, D.E.; KASHA, K.J. Comparison of the crossabilities of rye (*Secale cereale*) and *Hordeum bulbosum* onto wheat (*Triticum aestivum*). **Canadian Journal of Genetic and Cytology**, v.23: p.81-88, 1981
- FADEL, F.; WENZEL, G. Medium-genotype-interaction on androgenetic haploid production in wheat. **Plant Breeding**, Berlin, v. 105, n. 4, p. 278 -282, 1990.
- GHAEMI, M.; SARRAFI, A.; ALIBERT, G. Influence of genotype and culture conditions on the production of embryos from anther of tetraploid wheat (*Triticum turgidum*). **Euphytica**, Wageningen, v. 65, n.2, p. 81-85, 1993.
- GRANDO, M. F.; EICHLER, L.; FONTANELI, R.S. et al. Métodos de aplicação de reguladores de crescimento para obtenção de embriões haplóides de aveia – UPF – 1993. In: REUNIÃO DA COMISSÃO SULBRASILEIRA DE PESQUISA DE AVEIA. Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: CSPA. p. 130-133, 1994.
- HASAN, E.; KONZAC, C.F. Nuclear and cytoplasmatic control of anther culture response in wheat: III. Commun. Wheat Crosses. **Crop Science**, Madison, v. 31, n. 6, p. 1432-1436, 1991.
- HAYES, P.M.; CHEN, F.Q. Genotypic variation of *Hordeum bulbosum* L. mediated haploid production in winter and facultative barley. **Crop Science**, Madison, v. 29, n. 5, p. 1184 -1188, 1989.
- INAGAKI, M.; MUJEEB-KAZI, A. Comparison of polyhaploids production frequencies in crosses of hexaploid wheat maize, pearl millet and sorghum. **Breeding Science**, p.157-161, 1995.
- LAURIE, D. A.; BENNETT, M. D. Wheat x Maize hybridization **Canadian Journal of Genet Cytology**, v.28, p. 313-316, 1986.
- LAURIE, D. A.; BENNETT, M. D. The production of haploid wheat plantas from wheat x maize crosses. **Theoretical and Applied Genetic**, v.76, p. 393-397, 1988a.
- LAURIE, D. A.; BENNETT, M. D. Cytological evidence for fertilization in hexaploid wheat x sorghum crosses. **Plant Breeding**, v. 100, p.73-82, 1988b.

- LAURIE, D. A; REYMONDIE, S. High frequencies of fertilization and haploid seedling production in crosses between commercial hexaploid wheat varieties and maize. **Plant Breeding**, Berlin, v. 106, n. 3, p. 182 – 189, 1991.
- MORAES-FERNANDES, M.I.B. Perspectivas da biotecnologia para o melhoramento de plantas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 9, p. 881-886, 1987.
- MORAES-FERNANDES, M.I.B. Obtenção de plantas haplóides através da cultura de anteras. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L.S. (Eds.) **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: EMBRAPA-CNPQ, p.311 – 332, 1990.
- OHKAWA, Y.; SUENAGA, K.; OGAWA, T. Production of hexaploid wheat plants through pollination of sorghum pollen. **Japanese Journal of Breeding**, v.42, p. 891-894, 1992
- OLSEN, F.L. Induction of microspore embryogenesis in culture and others of *Hordeum vulgare*. The effects of ammonium nitrate, glutamine and asparagine as nitrogen sources. **Carlsberg Commun**, v.52, p.393-404, 1987.
- PICARD, E. The male gamete as a tool in the genetic improvement of cereals. **Genome**, v.31,; p. 1005-1013. 1989.
- RIERA-LIZARAZU, O.; MUJEEB-KAZI, A. Maize (*Zea mays* L.) mediated Wheat (*Triticum aestivum* L.) polyhaploid production using various crossing methods. **Cereal Research Communications**, v. 18, n.4, p. 339 -345, 1990.
- RIERA-LIZARAZU, O.; MUJEEB-KAZI, A. Polyhaploid production in the *Triticeae* Wheat x *Tripsacum* crosses. **Crop Science**, v. 33, p. 973–976, 1993.
- SITCH, L.A.; SNAPE, J.W. Factors affecting haploid production in wheat using the *Hordeum bulbosum* system. 1. Genotypic and enviromental effects on pollen grain germination, pollen tub growth and the frequency of fertilization. **Euphytica**, Wageningen, v. 36, n. 2, p. 483 – 496, 1987.
- SNAPE, J.W.; CHAPMAN, V.; MOSS, J. et al. The crossability of wheat varieties with *Hordeum bulbosum*. **Heredity**, v.42, p. 291-298, 1979.
- SUZIN, M. **Análise de fatores que influenciam a obtenção de embriões de aveia (*Avena sativa* L.), através de cruzamentos intergenéricos**. Porto Alegre, 1994, 77 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia-Fitotecnia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre, 1994.
- THÖRN, E.C. The influence of genotype and enviroment on seed and embryo development in barley (*Hordeum vulgare* L.) after crossing with *Hordeum bulbosum* L. **Euphytica**, Wagenigen, v.59, n. 2-3, p. 109-118, 1992
- USHIYAMA, T.; SHIMIZU, T.; KUWABARA, T. High frequency of haploid production of wheat through intergeneric cross with Teosinte. **Japanene Journal of Breeding**, v.41: p.353-357, 1991.