



RIA.Revista de Investigaciones Agropecuarias
Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
revista_ria@correo.inta.gov.ar
ISSN (Versión impresa): 0325-8718
ISSN (Versión en línea): 1669-2314
ARGENTINA

2005

P. Polci / V. Conti / G. Aldao Humble / R. Miranda / V. Echenique
OBTENCIÓN DE PLANTAS HAPLOIDES DE CULTIVARES ARGENTINOS DE
TRIGO PAN (TRITICUM AESTIVUM L.) POR CULTIVO DE ANTERAS Y
CRUZAMIENTOS CON MAÍZ

RIA.Revista de Investigaciones Agropecuarias, diciembre, año/vol. 34, número 003
Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
Buenos Aires, Argentina
pp. 151-176

Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal

Universidad Autónoma del Estado de México

<http://redalyc.uaemex.mx>



OBTENCIÓN DE PLANTAS HAPLOIDES DE CULTIVARES ARGENTINOS DE TRIGO PAN (*Triticum aestivum* L.) POR CULTIVO DE ANTERAS Y CRUZAMIENTOS CON MAÍZ

POLCI, P.^{1*}; CONTI, V.^{2*}; ALDAO HUMBLE, G.²; MIRANDA, R.³; ECHENIQUE, V.²

RESUMEN

La utilización de haploides duplicados, dihaploides o doblehaploides en un programa de mejoramiento de trigo permite acortar el tiempo requerido para el lanzamiento al mercado de un nuevo cultivar. El objetivo del presente trabajo fue evaluar dos metodologías de obtención de haploides para su utilización en programas de mejoramiento de trigos argentinos. La técnica de cultivo de anteras fue utilizada en 24 genotipos y cultivares. Los mejores resultados se obtuvieron cultivando anteras de plantas creciendo en condiciones normales de campo y utilizando frío como pretratamiento. Un promedio de 9,93% de las anteras cultivadas generaron callos a partir de los cuales se obtuvieron plantas verdes y albinas (2,47 y 0,74% de las anteras cultivadas, respectivamente). Cinco líneas resultaron recalitrantes para la inducción de callo. Considerando solamente los genotipos respondedores, con las micrósporas en estado uninucleado medio y en medio de inducción líquido con 10% (p/v) de ficoll-400, 1,5 mg.l⁻¹ de 2,4-D y 0,5 mg.l⁻¹ de cinetina, suplementado con maltosa, se obtuvo una media de 9,2% de plantas verdes. En cuanto a los cruzamientos intergenéricos, el 12,2% de un total de 26976 flores polinizadas produjeron embriones en un rango de 0,3 a 33,2%, dependien-

*Estos autores contribuyeron igualmente en el trabajo.

¹ Universidad Nacional del Sur. San Andrés 800, 8000 – Bahía Blanca Argentina. Teléfono: (0291) 456 6130.

² Universidad Nacional del Sur, CONICET. Correo electrónico: echeniq@criba.edu.ar

³ Universidad Nacional del Sur, Asociación de Cooperativas Argentinas Coop. Ltd.

do del genotipo y la fecha de corte de las espigas. El 19,6% de los embriones cultivados, en promedio, desarrollaron en plantas verdes, con un máximo de 45,7% en uno de los genotipos utilizados. El número de plantas verdes producidas cada 100 flores polinizadas varió de 0 a 8%, con una media general de 2,4. Con este tratamiento no se obtuvieron plantas albinas. También fue posible determinar el período más apropiado para la recolección de espigas, que abarcó desde que la mitad de la espiga fue visible hasta la emergencia total. En ese período se obtuvieron valores promedio de 7,15 embriones por espiga (22%) y 1,67 plantas por espiga (5,2%). Las diferencias entre los genotipos y las fechas de corte de las espigas en relación con la producción de embriones y plantas fueron altamente significativas.

Comparando ambas técnicas y en función de la menor influencia del genotipo, facilidad de aplicación, ausencia de albinismo, rapidez y menores costos involucrados, la técnica de trigo x maíz resulta más conveniente para la obtención de haploides de trigo pan. No obstante, el cultivo de anteras podría incluirse en los programas argentinos de mejoramiento de trigo pan, especialmente cuando los genotipos más respondedores se encuentren involucrados en los cruzamientos.

Palabras clave: *doblehaploides, capacidad androgénica, trigo x maíz, rescate de embriones, mejoramiento genético, biotecnología.*

ABSTRACT

HAPLOID PLANT PRODUCTION FROM ARGENTINIAN GENOTYPES OF BREAD WHEAT (*Triticum aestivum* L.) THROUGH ANTHHER CULTURE AND INTERGENERIC CROSSES

Doubled haploids can be used to shorten the time needed for the release of a new cultivar in wheat breeding programs. The aim of this work was to evaluate two techniques of haploid production in order to include them into Argentinean wheat breeding programs. Twenty-four cultivars and genotypes were tested for anther culture response. The best results were obtained by culturing anthers of plants growing under field conditions and using cold as a pretreatment. An average of 9.93% of the cultured anthers produced calli, from which green and albino plants were recovered (2.47 and 0.74% of the cultured anthers, respectively). Five lines were recalcitrant for callus induction. Considering only the responsive genotypes, culturing anthers with microspores at medium uninucleate stage and using liquid media with 10% (w/v) of Ficoll-400, 1.5 mg.l⁻¹ of 2,4-D, 0.5 mg. l⁻¹ of kinetine, supplemented with maltose, the average of green plants obtained was 9.2%. Concerning distant hybridization, from a total of 26976 pollinated florets, 12.2%

produced embryos that ranged from 0.3 to 33.2% depending on the genotype and spike harvesting date. An average of 19.6% of the embryos developed into green plants, with a maximum of 45.7% in one of the genotypes utilized. The number of green plants produced per 100 pollinated florets ranged from 0 to 8% with an overall mean value of 2.4%. There was no evidence of albinism in the regenerated plants. It was possible to determine the most suitable interval for the harvest of the spikes, from the appearance of the half uncovered spike to its complete emergence. In that period mean values of 22% (7.15 embryos per spike) and 5.2% (1.67 plants per spike) were obtained. Differences among wheat genotypes and spike harvesting date for embryo formation and plantlet production were highly significant. The less genotype influence, easeness of application, absence of albinism, rapidness and fewer costs involved make the wheat x maize hybridization technique more convenient than anther culture for the production of haploids in our plant materials. However, anther culture could also be included into Argentinean breeding programs, especially when the more responsive genotypes are involved in the crosses.

Key words: *doubled haploids, androgenic capacity, wheat x maize, embryo rescue, genetic improvement, biotechnology.*

INTRODUCCIÓN

El trigo es uno de los principales recursos económicos de nuestro país y el mayor producto agrícola a nivel mundial. El valor de la producción triguera argentina representa más de 1200 millones de dólares y el mismo podría incrementarse si se logra ofrecer al mercado, tanto interno como externo, una variada gama de variedades que satisfagan las demandas cada día más exigentes de los países compradores y de los consumidores locales. El mejoramiento genético de este cereal ha sido practicado por cientos de años y, si bien cada año se liberan al mercado numerosas variedades, éstas no persisten demasiado y los métodos tradicionales resultan insuficientes para sortear los problemas al ritmo que requiere la producción mundial (Bajaj y Gosal, 1986).

El tiempo requerido para la obtención de un nuevo cultivar de trigo de ciclo invernal, a través de los métodos tradicionales, es de 10 años aproximadamente. Cualquier tecnología que permita reducirlo redundará en grandes beneficios para los mejoradores (Baenziger y Schaeffer, 1983). Entre éstas, la biotecnología se presenta como una alternativa atrac-

tiva. Específicamente, los doblehaploides permiten reducir hasta en 5 años el tiempo necesario para la liberación al mercado de una nueva variedad de trigo, ya que evitan las sucesivas generaciones de autopolinización requeridas para lograr la homocigosis. Cuando se aplica esta técnica se pueden obtener líneas homocigotas en sólo 8-9 meses, es decir, de 1 a 3 años luego del cruzamiento inicial, dependiendo de la elección del material de partida (F1, F2 o F3). Esto se traduce en una economía de dinero, mano de obra y espacio en el campo experimental.

Los métodos más utilizados en la actualidad para la obtención de doblehaploides son la hibridación interespecífica e intergenérica y el cultivo de anteras. La principal ventaja del cultivo de anteras es que, potencialmente, cada micróspora puede dar origen a una planta (Bhojwani y Razdan, 1996). La mayor desventaja es la elevada influencia del genotipo sobre la capacidad androgénica. En trigo esta técnica ha sido utilizada exitosamente, habiéndose informado e inscripto como variedades comerciales muchos trigos doblehaploides que superaron en rendimiento y aptitud a los controles en los ensayos oficiales (Hu, 1986; De Buyser *et al.*, 1987; Seseck *et al.*, 1994; Pauk *et al.*, 1995). Sin embargo, su incorporación masiva a los planes convencionales de mejoramiento genético se ha visto limitada por los porcentajes variables (1-12%) de anteras que resultan en la regeneración de plantas verdes (Seseck *et al.*, 1994) y, si bien la optimización de las condiciones para el cultivo de anteras ha mejorado la eficiencia del método a través de los años, es indispensable ajustar las condiciones para adaptar la técnica a las necesidades locales en cada situación particular.

En cuanto a la hibridación interespecífica, la alternativa más apropiada es la utilización de cruza intergenéricas utilizando maíz como polinizador (Suenaga, 1994). Los óvulos de trigo son fertilizados por el polen del maíz y, como consecuencia de la eliminación de los cromosomas de maíz, dan origen a embriones haploides (Laurie y Bennett, 1986) que son rescatados en un medio de cultivo apropiado (Laurie y Bennett, 1988). Esta técnica es menos dependiente del genotipo que el cultivo de anteras y más eficiente en la obtención de plantas que los cruzamientos con *Hordeum bulbosum* o el cultivo de anteras (Suenaga *et al.*, 1997).

El único antecedente de obtención de embriones y regeneración de plantas por cultivo de anteras para caracterizar variedades argentinas de trigo corresponde a Ortiz *et al.* (1991). Si bien se ha intentado incorporar la técnica como herramienta complementaria en planes de mejoramien-

to, aún no se ha inscripto en nuestro país ninguna variedad obtenida por esta tecnología. Esto probablemente se deba a la falta de información acerca del potencial de respuesta de los genotipos utilizados en los bloques de cruzamiento de las compañías mejoradoras de trigo.

El objetivo de este trabajo fue optimizar una metodología para la obtención de doblehaploides con el fin de ser incorporada como herramienta complementaria en los programas de mejoramiento que se llevan a cabo en el Criadero de Cereales de Invierno de la Asociación de Cooperativas Argentinas (ACA) Coop. Ltd.

MATERIALES Y MÉTODOS

Origen y condiciones de crecimiento de las plantas: todos los materiales de trigo (*Triticum aestivum* L.) utilizados en este trabajo provienen del Criadero de Cereales de Invierno de la Asociación de Cooperativas Argentinas Coop. Ltd. de Cabildo, provincia de Buenos Aires. Las plantas utilizadas como donantes de anteras y embriones fueron cultivadas en condiciones de campo durante la estación normal de crecimiento de trigo entre los años 1998–2001. El suelo de la región es franco arenoso y se realizaron dos fertilizaciones, una con fosfato diamónico (110 kg/ha) a la siembra y otra con urea (85 kg/ha) en el período de macollaje.

Como donantes de polen para los cruzamientos se utilizaron tres genotipos de maíz (*Zea mays* L.) de floración temprana: Rodeo (*Petoseed*), Champ (*Asgrow*) y P-3901 (*Pioneer*). Las plantas de maíz se cultivaron en invernáculo, a 25°C, con riego y fertilización frecuente. A fin de acelerar el período de antesis se incrementó la intensidad lumínica mediante la utilización de lámparas de luz mezcla OSRAM HWL de 500 W distribuidas homogéneamente. A fin de sincronizar los momentos de floración se realizaron dos siembras semanales de maíz durante todo el período de crecimiento vegetativo del trigo.

Un ensayo preliminar sobre cultivo de anteras realizado a contraestación (siembra de verano) proveyó información adicional que se incluye también en este trabajo.

Cultivo de Anteras:

a) Material vegetal: se utilizaron anteras provenientes de productos de 7 cruzamientos (Gametos F_2) de 10 familias segregantes F_3 y de 7

cultivares comerciales de trigo pan, que se detallan en la Tabla 1. Los genotipos se seleccionaron de acuerdo a su valor agronómico y capacidad androgénica. Esta fue establecida en base a la fórmula de cruzamiento, observando la presencia de ancestros de conocida capacidad de respuesta al cultivo *in vitro* (Ortiz *et al.*, 1991; Lashermes *et al.*, 1991; Otani y Shimada, 1995).

Tabla 1. Genotipos de trigo utilizados para el cultivo de anteras y la correspondiente fórmula del cruzamiento.

Genotipo	Fórmula de cruzamiento
<i>Cultivares</i>	
Buck Ombú (BOMB)	CNO'S'/GLL/3/TOB/BMAN//BB/4/TZPP/SON64//TZPP*2/AN
Seri 82 (SE82)	KVZ/BUHO//KAL/BB
Sonora 64 (SON64)	YT54/N10B//2*Y54
Cooperación Liquén	185.69/TACUARI INTA//COCA'S'
Cooperación Nahuel	CONA'S'/NS87.94
CB-113	MV PALMA
CB-189	ZG2324.94
<i>F1</i>	
9061.98	BARR/CONA
9064.98	BOPA/4/F60314.76/ALDAN//TTM'S'/3/32.83
9075.98	KLCA/3/COBA'S'/COCA'S'//BÑDU
9106.98	NAHUEL/3/COBA/COCA'S'/KLCA
9247.98	685.87/SNB'S'//BCAT
9248.98	685.87/SNB'S'/3/PELON90//TX69A5092/...
F1-38.98	N/A.
<i>F3</i>	
2062.3	DKBT/82.64//BCIM/3/CONA//YDS/MN721
2062.7	
2062.96	
2103.2	COMAI/4/9.72/BNAP//COCA'S'/3/BPAT
2103.7	
2103.96	
2152.1	9.72/BNAP//COCA'S'/3/BPAT/4/BOMB
2152.4	
2152.96	
2186.1	BOMB/4/9.72/BNAP//COCA'S'/3/BPAT
2186.2	
2186.3	
2186.6	
2186.96	

Nota: Las fórmulas de los cruzamientos son de acuerdo a la nomenclatura de CIMMYT. '...' significa fórmula incompleta.

b) Estadio de desarrollo de las micrósporas: La identificación al microscopio se realizó a partir de una antera de una flor basal de una espiguilla ubicada en el centro de la espiga, a través de dos métodos: tinción con orceína o sin tinción, que consistió en observaciones por contraste, de las micrósporas obtenidas de media antera, suspendidas directamente en agua destilada. La identificación se basó en la determinación de la posición relativa del núcleo y la vacuola en relación al poro, corroborada por la observación con orceína del estadio de las micrósporas aisladas de la otra mitad de la antera. Las micrósporas uninucleadas se hallaron en anteras de 2,0 - 2,5 mm de longitud, de color verde claro, en espigas embuchadas con el extremo superior a 1-2 cm de la lígula de la hoja bandera.

El estadio de las micrósporas es un factor muy importante para lograr respuesta androgénica. Por esta razón, se analizaron cada una de las espigas a cultivar, 252 en total.

c) Preacondicionamiento de las espigas: una vez cortadas las espigas se eliminaron las espiguillas superiores e inferiores. De las 10 espiguillas centrales se conservaron solamente las dos flores basales. El resto fue eliminado y las aristas fueron seccionadas a un centímetro de la inserción. Esto facilitó en gran medida el aislamiento. La desinfección consistió en inmersión de las espigas en etanol al 70% por 1 minuto, seguida por 20 minutos en una solución de hipoclorito de sodio comercial al 15% (60 gr/L de cloro activo) con *Tween* 20 (1% v/v) y tres enjuagues con agua destilada estéril.

d) Pretratamientos Térmicos: se llevaron a cabo dos tratamientos, frío y calor. El primero consistió en el almacenamiento de las espigas a 4°C, en oscuridad, con los tallos sumergidos en agua corriente durante los 4 a 15 días previos al cultivo *in vitro* de las anteras (Lazar *et al.*, 1985). Antes de la siembra de las anteras en el medio de cultivo se chequeaba el estadio de éstas. El tratamiento de calor consistió en el cultivo de anteras recién extraídas (en el mismo día) a 32 °C, en oscuridad, durante 8 días (Hu *et al.*, 1980).

e) Medios de cultivo: se utilizaron 4 medios de inducción, tres de ellos líquidos, suplementados con Ficoll-400 al 10%: MN6mal (Chu *et al.*, 1990), W14mal (Otani y Shimada, 1995) y P4 (Zhou *et al.*, 1991). El cuarto medio

fue P4, solidificado con 0,5% de agar (Konzak y Zhou, 1991). El medio de regeneración fue el 190-2 de Ponitka y Sluzarkiewicz-Jarzina (1996). Las anteras de cada mitad de las espigas (30 anteras) se cultivaron sobre dos diferentes medios de inducción estableciendo muestras apareadas a fin de reducir la variabilidad para el análisis estadístico.

f) Condiciones de cultivo: los cultivos líquidos se llevaron a cabo utilizando tubos de vidrio con 3 ml de medio de inducción. En el caso del medio sólido se utilizaron cajas de Petri de 120 mm de diámetro. Las anteras se cultivaron a 25°C en oscuridad hasta que se evidenció la presencia de estructuras embriogénicas. La regeneración de plantas tuvo lugar a 25°C con 16 horas de luz.

g) Aclimatación: las plántulas haploides en estado de 1–4 hojas fueron extraídas del medio de cultivo, contadas y transplantadas a recipientes plásticos de 150 ml que contenían material inerte (perlita). Las macetas fueron fertilizadas cada 15 días con un fertilizante comercial (N-P-K 15-13-12, con microelementos). A fin de prevenir una muy rápida deshidratación las plantas fueron cubiertas con bolsas de polietileno que se abrieron gradualmente hasta lograr la adaptación completa a las condiciones de invernáculo. Esto fue reemplazado luego por una cámara de crecimiento donde se colocaron las macetas a 6-8°C con un fotoperíodo de 16: 8 h de luz: oscuridad. Luego de dos meses de crecer en estas condiciones, las plantas haploides estuvieron listas para la duplicación cromosómica.

h) Análisis del nivel de ploidía: los ápices radicales fueron pretratados con colchicina al 0,05%, fijados en solución de *Clarke* (3:1, etanol absoluto: ácido acético) y mantenidos en etanol al 70% a 4°C. La tinción fue realizada por el método de Feulgen luego de la hidrólisis en HCl 1N a 60°C durante 15 min. Se analizó una muestra al azar de 15 plantas.

i) Duplicación cromosómica: las plantas que habían desarrollado suficientes hojas y macollos fueron tomadas de la maceta, las raíces fueron lavadas y cortadas hasta dejarlas de un tamaño de aproximadamente 3–4 cm de longitud. Las plantas fueron entonces sumergidas hasta la base de los macollos en una solución de colchicina al 0,05% conteniendo 2% de dimetil sulfóxido (Kisana *et al.*, 1993). Este tratamiento se realizó duran-

te 6 horas a temperatura ambiente, en condiciones de oscuridad, con aireación continua. Luego se lavaron las raíces con agua corriente por unos pocos minutos y fueron plantadas en tierra. Se colocaron por 14 días en el cuarto de cultivo, luego de lo cual se transfirieron al invernáculo y, una vez aclimatadas, al campo experimental.

j) Diseño experimental y análisis estadístico: la habilidad para inducir callos y regenerar plantas fue calculada como el número de callos inducidos y plántulas haploides regeneradas (de 1–4 hojas) por cada 100 anteras cultivadas, respectivamente.

Para el análisis estadístico fueron considerados cuatro factores fijos:

- pretratamiento térmico, con 2 niveles, frío y calor,
- estado de desarrollo de las micrósporas, con 3 niveles, uninucleado temprano, medio y tardío,
- medio de inducción, con 4 niveles: P4 líquido, W14mal, MN6mal y P4 sólido,
- genotipo.

Para analizar el efecto de los diferentes medios de cultivo y eliminar la gran variabilidad existente entre las distintas espigas provenientes del mismo genotipo, se realizó un diseño de muestras apareadas (Kozak y Zhou, 1991). Este *test* consiste en la aplicación de dos tratamientos (un par de medios de cultivo) a cada unidad experimental (cada espiga, con 60 anteras seleccionadas para el cultivo *in vitro*). Cada espiga se dividió en dos subunidades experimentales (constituidas por las 30 anteras de cada lado de la espiga dística de trigo). Las unidades experimentales fueron elegidas al azar. Los pares de medios de cultivo fueron elegidos arbitrariamente como: 'P-4 líq' vs. 'W14mal' y 'MN6mal' vs. 'P-4 sol'.

Por otro lado, se analizaron aquellas muestras no apareadas, donde cada tubo o caja de cultivo conteniendo 30 anteras constituyó una unidad experimental. Se demostró, a través de una tabla de contingencia sometida a una prueba de Chi cuadrado (*test* de homogeneidad), que cada uno de los tratamientos contó con igual número de tubos y cajas conteniendo los cuatro medios de cultivo (Anexo A).

Para el análisis de los factores pretratamiento térmico y estadio de las microsporas se realizaron tests de análisis de la varianza (ANOVA) dobles y de *Tuckey* para comparación de medias. Debido al acotado período de disponibilidad de anteras en el estadio apropiado (30 días) y a la disponi-

bilidad discontinua de espigas de un mismo genotipo, el diseño resultó desbalanceado. Se utilizó el programa SYSTAT 7.0 (1997). Los datos fueron transformados de acuerdo a Box y Cox (1964) con $l = -2$.

Cruzamientos Trigo x Maíz:

a) Material vegetal: treinta y seis genotipos segregantes de trigo pan (Tabla 2) fueron utilizadas como progenitores femeninos: 12 F_2 , 16 F_3 y 8 F_4 .

b) Acondicionamiento de las espigas para la castración: antes de la castración las espigas fueron cortadas dejando tallos de 35–40 cm de longitud y se sumergieron en agua (1 a 2 días antes de la ocurrencia de la antesis) (Mujeeb-Kazi, 1998). De igual manera que para el cultivo de anteras, las espiguillas superiores e inferiores de la espiga fueron eliminadas, así como las flores centrales de cada espiguilla.

c) Castración: se eliminaron manualmente las anteras de las 32 flores basales de las espiguillas centrales de cada espiga. Las espigas castradas fueron mantenidas en agua corriente hasta la polinización (Mujeeb-Kazi, 1998) y cubiertas con bolsas de polietileno a fin de evitar la desecación de los estigmas.

d) Polinización: las flores fueron polinizadas de uno a tres días luego de la castración (dependiendo del estado del estigma) con una mezcla de polen fresco colectado a partir de tres genotipos de maíz. La polinización fue repetida al día siguiente, siempre a la misma hora de la mañana (10 h). Luego de la polinización las espigas fueron mantenidas a 25°C, con luz solar no directa, con los tallos sumergidos en una solución conteniendo 100 mg/L de 2,4-D, 40 g/L de sacarosa, y 8 ml/L de ácido sulfuroso (6% SO_2) (Mujeeb-Kazi, 1998). Con el fin de mantener el nivel y la concentración del líquido la solución se renovó semanalmente.

e) Rescate de embriones: los granos conteniendo los embriones inmaduros fueron rescatados a los 18-20 días posteriores a la polinización, esterilizados en una solución de 1,65 g/L de cloro activo (suplementada con 2-3 gotas de *Tween* 20) durante 20 min, y enjuagados tres veces con agua destilada estéril. Los embriones fueron separados asépticamente de los granos bajo microscopio estereoscópico y cultivados *in vitro* so-

Tabla 2. Genotipos de trigo utilizados para los cruzamientos con maíz y la correspondiente fórmula del cruzamiento.

Genotipo	Fórmula de cruzamiento
F2	
700	V14//199T
757	435.94/3/HAMMER
763	4FWYT8/809.97
767	CC6044/274TI
769	873.97/600.92
772	809.97/600.92
774	341.97/PICOLIBRI
778	600.92/873.97
785	BPON/PICOLIBRI
797	COHUEL/47-1//COHUEL
800	COCAL/CONA//47-1/3/COHUEL
818	NS732/AU//COHUEL(Ar)
F3	
466	341.94/3/Zg-2324/92
495	4FWYT8/809.97
860	ARRIERO//99.92
861	CAUDILLO//99.92
862	CAUDILLO/3/155.94
1055	F60314.76/ALDAN//TTM'S/3/32.83/4/BPO
1056	COCAL/CONA/3/BPON//BNDU/157.69
1059	BPON/4/PI/FUNO//VLD/3/CO723595
1061	COUEL/3/KLCA/BNDU//CONA
1066	99.92//CALQUIN
1067	266.93/6/133.93
1074	NAHUEL/3/435.94
1076	NANIHUE/CAUQUEN
1079	CAUDILLO//99.92
1080	CAUDILLO/3/155.94
1081	ALAZAN/OGALLALA
F4	
923	COMAI//COCAL/CONA
928	KLCA//CONA/3033.83
931	KLCA//CONA/3033.83
1125	MRTV - 17/3/COBA/COCA'S//KLCA
1126	MRTV - 17/3/CONA/KLCRI//BPON
1127	MRTV - 17/KLCA
1131	CC4277/3/KLCA/BNDU//CONA
1161	BUL482-2-1-3/BPON//B*DU/157.69

Nota: Las fórmulas de los cruzamientos son de acuerdo con la nomenclatura de CIMMYT: '...' significa fórmula incompleta.

bre un medio MS a la mitad de su concentración suplementado con 20 g/L de sacarosa y solidificado con 8 g/L de agar, pH 5,8 (Mujeeb-Kazi, 1998).

f) Condiciones de cultivo: los embriones rescatados fueron incubados en oscuridad a 4 °C, durante una semana a fin de romper la dormancia, luego de lo cual la temperatura fue mantenida a 23–24 °C. Los embriones germinados se sometieron a un fotoperíodo de 16 horas a 23–24 °C por alrededor de 3 meses.

g) Aclimatación, h) Análisis del nivel de ploidía, i) Duplicación cromosómica: fueron realizados de la manera descripta para el cultivo de anteras.

j) Análisis estadístico: la eficiencia en la formación de embriones y regeneración de plantas fue calculada como el número de embriones y plantas producidas por espiga respectivamente, y expresada como un porcentaje de las flores polinizadas.

Se consideraron las espigas como unidades experimentales y los factores fueron genotipo y también se consideró día de corte de las espigas en el campo.

Como en el caso del cultivo de anteras, la disponibilidad de espigas para cada genotipo resultó desbalanceada.

Los datos fueron analizados mediante tests de análisis de la varianza simples y comparación de medias LSD (*Fisher's Least-Significant-Difference*) utilizando el programa SYSTAT 7.0 (1997).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cultivo de anteras:

Influencia de las condiciones de crecimiento de las plantas donantes de anteras sobre la capacidad androgénica: los ensayos realizados a contraestación no dieron resultados positivos en cuanto a respuesta androgénica. A partir de 13.000 anteras cultivadas en 4 medios de inducción sólo se obtuvieron 4 estructuras embriogénicas. Estas estructuras (Fig. 1 A-C) fueron obtenidas en dos de los genotipos investigados, Seri 82 y 2186-3. Seri-82 ha sido mencionado previamente como un cultivar

respondedor (Lashermes *et al.*, 1991; Otani y Shimada, 1995) y la F3-2186 tiene a Buck Ombú dentro de su genealogía, cultivar citado por Ortiz *et al.* (1991) como respondedor. Si bien la respuesta fue pobre, aún en condiciones altamente desfavorables estos genotipos lograron responder al cultivo (Tabla 1). No obstante, otros genotipos que tienen a Buck Ombú en su genealogía en estas condiciones no dieron respuesta favorable (Tabla 1).

Los resultados fueron diferentes cuando se utilizaron como donantes de anteras plantas creciendo en la estación normal para el cultivo de trigo. En este caso, con todos los tratamientos considerados, se obtuvieron 1056 callos compactos (6,88% de inducción) a partir de 15360 anteras cultivadas, lo cual condujo a la regeneración de 245 plantas verdes (1,6% de regeneración) y 90 plantas albinas (Tabla 3, Fig. 1). Las estructuras embriogénicas fueron evidenciadas 40 días después del cultivo de las

Tabla 3: Inducción de callos y regeneración de plantas haploides a partir de anteras de *Triticum aestivum* L utilizando 4 medios de cultivo y 2 pretratamientos térmicos, frío y calor.

Tratamiento	Nº anteras	Nº callos	%callos/ant	Nº pl. vdes.	Nº pl. albinas	%pl.alb/ant	%pl.vdes/ant
CALOR							
P4 líquido	1740	49	2,82	2	13	0,75	0,11
W14 mal	1530	16	1,05	4	1	0,07	0,26
MN6mal	1470	23	1,56	0	5	0,34	0,00
P4 sólido	990	12	1,21	1	0	0,00	0,10
Total	5730	100	1,75	7	19	0,33	0,12
FRÍO							
P4 líquido	2350	215	9,15	82	17	0,72	3,49
W14 mal	2640	187	7,08	67	19	0,72	2,54
MN6mal	2220	421	18,96	82	35	1,58	3,69
P4 sólido	2420	133	5,50	7	0	0,00	0,29
Total	9630	956	9,93	238	71	0,74	2,47
TOTAL	15360	1056	6,88	245	90	0,59	1,60

anteras. También fue posible observar, aproximadamente 20 días después del cultivo de las anteras, la aparición de callos acuosos y translúcidos, no morfogénicos, tanto en medio sólido como líquido.

Estadio de desarrollo de las micrósporas: los estadios uninucleado medio y tardío han sido citados como los más adecuados para obtener respuesta al cultivo de anteras *in vitro* (Sesek *et al.*, 1994) y es necesario determinarlos de manera precisa a fin de optimizar el protocolo. Si bien la técnica de tinción con orceína es bastante rápida, en este estudio se

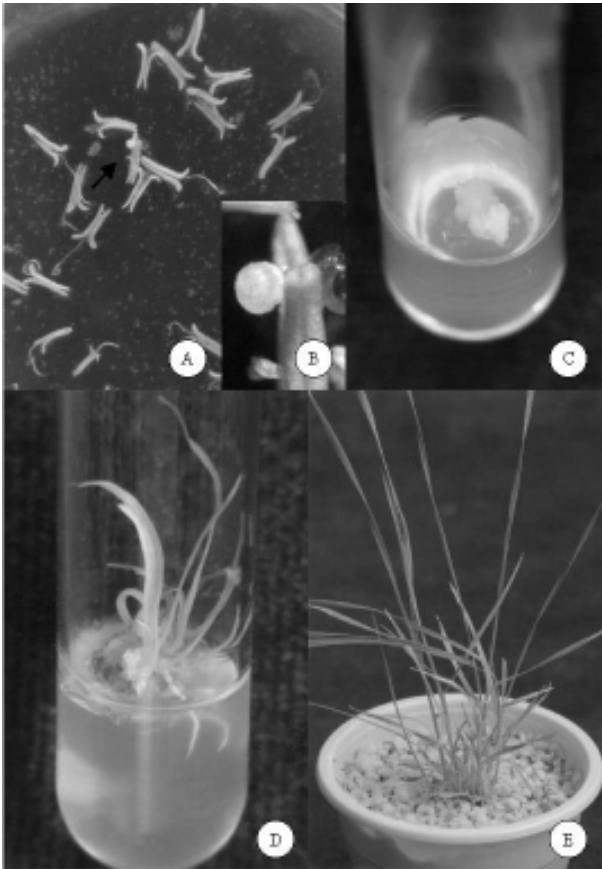
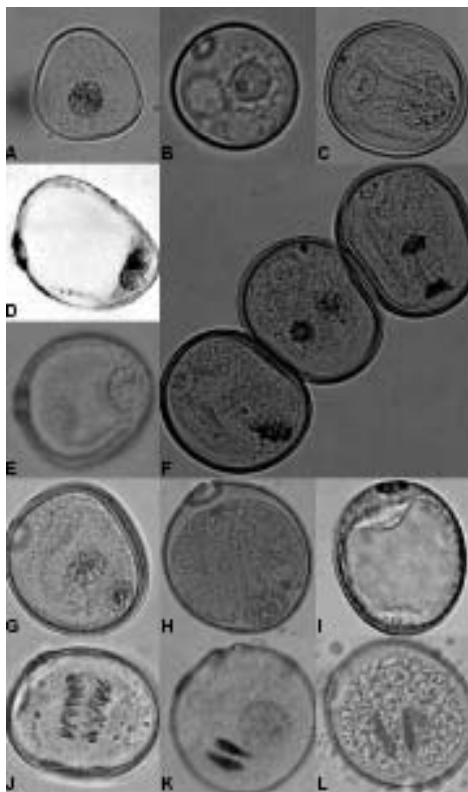


Figura 1. Producción de callos y plantas haploides a partir del cultivo de anteras de *Triticum aestivum*. **A.** Callo blanco y compacto sobre una antera (flecha). **B.** Detalle del callo señalado en (A). **C.** Callo transferido a medio de cultivo para regenerar planta. **D.** Plántula regenerada con sistema radicular en formación. **E.** Planta haploide completa finalizando la etapa de rusticación, creciendo sobre sustrato inerte (Perlita).

encontró una forma más rápida aún que no requiere del uso de coloración para realizar la observación. Se trata de observar al microscopio, con contraste de fase, la posición relativa del núcleo y la vacuola dentro de la micróspora en relación a la ubicación del poro (Fig. 2). En este

Figura 2. Secuencia de desarrollo normal del grano de polen de *Triticum aestivum*. El núcleo y la vacuola de las microsporas de trigo sufren cambios durante el estadio uninucleado. Por eso, esta fase ha sido dividida en tres subestadios en función del tamaño, la forma y la posición del núcleo y de la ausencia o presencia y el tamaño de la vacuola. Durante el estado de tétrade, las microsporas adquieren la polaridad que regirá la posiciones futuras del núcleo y de la vacuola. Estas células son pequeñas y contienen un solo núcleo esférico situado en el centro y numerosas vesículas pequeñas en la periferia. Luego de separarse de la tétrada, comienzan a aumentar de tamaño y a formar la exina y el poro (**p**) (estadio uninucleado temprano, **A**). Después las vesículas se fusionan en vacuolas (**v**) menores (**B**) hasta formar una única vacuola central. Para entonces, el núcleo (**n**) ha migrado al borde de la célula y migrará al lado opuesto al poro, conservando su forma circular (**nl**: nucleolo, estadio uninucleado medio, **C**). La vacuola, que sigue aumentando de tamaño, comprime al núcleo contra a pared de la microspora y le confiere una forma aplastada (estadio uninucleado tardío, **D**) que perdura hasta que cesa la fase de expansión (crecimiento en tamaño de la célula). Entonces, el núcleo retoma la forma circular (**E**: estado premitótico) y se divide (**t**: telofase, **F**). Se llega así al estadio binucleado (**G**). Luego sobreviene la citocinesis que resulta en dos células de diferente tamaño. La mayor constituirá la célula del tubo polínico (**ctp**) y su núcleo vegetativo (**nv**) se ubica adyacente al poro. La menor (célula generativa, **cg**) persiste en el lado opuesto (**ng**: núcleo generativo, **H** e **I**). Los cambios acontecidos hasta aquí insumen de cinco a siete días. Luego la célula generativa se mueve al centro de la microspora y se divide (anafase, **J**) generando dos células espermáticas (**ce**) de forma ahusada (**K**), alcanzando así la fase de polen trinucleado; mientras la célula del tubo, con su núcleo en interfase, se encuentra abocada a la síntesis de sustancias de reserva (**ga**: gránulos de almidón, **L**).



A, C, F, G, H, J, K y L: tinción con orceína; **B, E e I:** suspensión en agua destilada y sin tinción. **D:**

trabajo las anteras con micrósporas en estadio uninucleado medio mostraron una clara tendencia a dar mejor respuesta al cultivo (Fig.3).

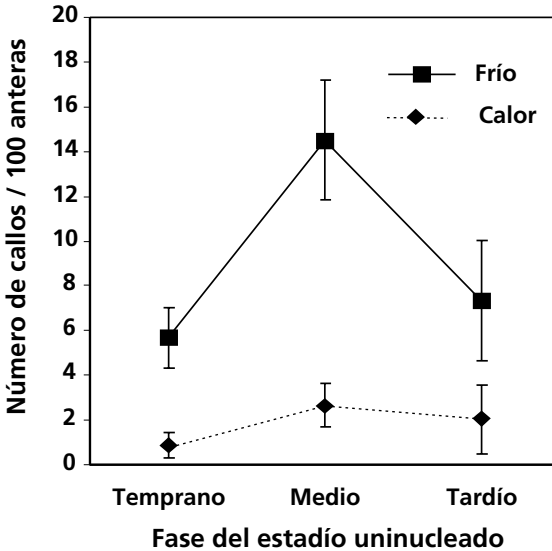


Figura 3. Producción de callos por cada 100 anteras cultivadas, en función del estadio de las micrósporas y del pretratamiento térmico aplicado. (medias \pm 1 E.S.)

Pretratamientos térmicos: el test de ANOVA doble permitió detectar diferencias significativas ($p < 0,05$) en inducción de callos entre pretratamientos (frío y calor), siendo frío mejor que calor (Tabla 3, Fig. 3). No se detectó interacción entre pretratamientos y estadios de las micrósporas.

La obtención de plantas fue muy reducida (0,12%) cuando se utilizó calor como pretratamiento. Esto indicaría que no sólo la inducción de callos fue inhibida por el efecto de este pretratamiento, sino también la regeneración de plantas (Tabla 3). El valor correspondiente para el pretratamiento frío fue de 2,5% de plantas verdes. Se concluye, por lo tanto, que el calor no es un pretratamiento adecuado para la inducción de androgénesis en los materiales considerados en este trabajo.

Medios de cultivo: en las comparaciones de muestras apareadas se observó que la inducción de callos en medio sólido fue significativamente menos efectiva ($p < 0,05$) que en los medios líquidos (5,5% vs 18,96%). No se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los medios líquidos (P4liq = W14mal) (Tabla 3). El medio sólido también resultó el de menor efectividad para la regeneración de plantas. Sin embargo, fue el único que permitió recuperar exclusivamente plantas verdes.

El pretratamiento de frío combinado con la utilización de medio líquido resultó en una producción de plantas verdes de 2,5 a 3,7%, siendo MN6mal el más efectivo de los medios líquidos bajo estas condiciones. No obstante, este último condujo a la mayor producción de plantas albinas. Por ello, se considera que su eficiencia no fue diferente a la de P-4 líquido.

Efecto del genotipo: los niveles más elevados de inducción de callos, calculados como un promedio de todos los medios de cultivo y todos los estados de desarrollo de micrósporas, utilizando frío como pretratamiento y en función de 100 anteras cultivadas, correspondieron a Seri 82 (27,8%) y 2186-3 (17,1%) (Tabla 4). De igual manera en estos genotipos se registraron los máximos valores puntuales de inducción, con frío como pretratamiento y micrósporas en estado uninucleado medio. Estos fueron 73,3% para Seri 82 en medio P-4 líquido y 86,7% para 2186-3 en NM6mal.

Dos de las tres filiales hermanas de la familia F3 2186-3 mostraron una elevada inducción de callos (12,5% 2186-2 y 8,6% 2186-6) (Tabla 4). Esto confirmó la hipótesis de que es más probable lograr éxito al trabajar con materiales segregantes dentro de una misma familia cuando se ha determinado que una de las filiales posee capacidad de respuesta. Los genotipos Buck Ombú, Cooperación Liqueñ, F1-38.98, CB-113 y 2103-2 regeneraron plantas verdes en todos los tratamientos térmicos y medios de cultivo en que se cultivaron las anteras (Tabla 4).

Albinismo: el pretratamiento de frío condujo a una menor producción de plantas albinas (23% del total) en comparación con calor (73%), lo cual concuerda con lo informado por Ouyang (1986). La producción de plantas albinas también varió de acuerdo al genotipo y al medio de cultivo, siendo el medio MN6mal (29,9%) donde se encontraron los valores más elevados. No se obtuvieron plantas albinas en el medio P4 sólido (Tablas 3 y 4).

Tabla 4. Obtención de callos y de plantas verdes y albinas por cultivo de anteras de distintos genotipos de *Triticum aestivum* utilizando frío como pretratamiento.

Genotipo	Número Anteras	Callos		Plantas Verdes		Plantas Albinas			Relación		
		núm.	%	núm.	% ant.	% callo	núm.	% ant.	% callo	PV%	PA%
2152-1	540	92	17,0	5	0,9	5,4	1	0,2	1,1	83,3	16,7
2152-4	270	15	5,6	1	0,4	6,7	2	0,7	13,3	33,3	66,7
2186-1	390	4	1,0	1	0,3	25,0	1	0,3	25,0	50	50
2186-2	1170	146	12,5	12	1,0	8,2	10	0,9	6,8	54,5	45,5
2186-3	1170	200	17,1	54	4,6	27,0	13	1,1	6,5	80,6	19,4
2186-6	630	54	8,6	16	2,5	29,6	8	1,3	14,8	66,7	33,3
2103-7	390	2	0,5	0	0	0	0	0	0	-	-
2103-2	390	39	10,0	25	6,4	64,1	0	0	0,0	100	0
2062-3	450	6	1,3	0	0	0	1	0,2	16,7	0	100
2062-7	390	9	2,3	1	0,3	11,1	1	0,3	11,1	50	50
9247.98	600	40	6,7	3	0,5	7,5	0	0	0	100	0
F1-38.98	180	7	3,9	1	0,6	14,3	0	0	0	100	0
CB-189	120	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-
C. Liquén	510	10	2,0	2	0,4	20,0	0	0	0	100	0
C. Nahuel	240	0	0	0	0	-	0	0	-	-	-
B. Ombú	690	76	11,0	12	1,7	15,8	0	0	0	100	0
Seri 82	900	250	27,8	103	11,4	41,2	33	3,7	13,2	75,7	24,3
Son 64	540	6	1,1	0	0	0	1	0,2	16,7	0	100

a) Porcentaje de plantas verdes y albinas calculado sobre el total de plantas regeneradas.

Cruzamientos Trigo x Maíz:

Rescate de embriones: embriones haploides de apariencia normal y estructura bien definida fueron encontrados generalmente dentro de granos blanco-verdosos, sin endosperma (Fig. 4). También se observaron cariopses con endosperma acuoso que no contenían embriones en su interior, y otros más compactos provenientes de autofecundaciones accidentales. Estos diferentes tipos de granos fueron fácilmente identificables a simple vista o con la ayuda de un microscopio estereoscópico. El tamaño de los embriones fue variable, de 1 a 5 mm de longitud. En general, los más pequeños presentaron dificultades para la regeneración de plantas. Una característica de este sistema fue la presencia de poliembrionía, encontrándose de 2 a 16 embriones por semilla poliembriónica. Algunos de estos embriones presentaban formas anormales, dando estructuras casi amorfas y translúcidas. Debido a esto fue difícil determinar el número exacto de embriones, siendo los valores presentados en este trabajo una subestimación de los reales.

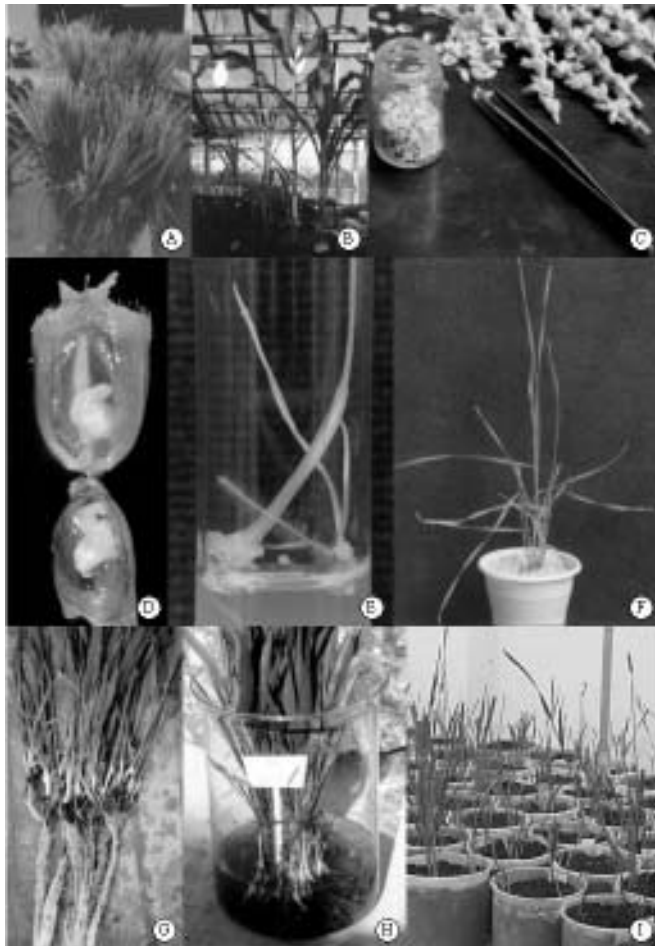


Figura 4. Producción de haploides de *Triticum aestivum* por cruzamientos de trigo x maíz (*Zea mays*). **A.** Espigas de trigo cortadas en el campo y castradas en el laboratorio. **B.** Plantas de maíz (donantes de polen) crecidas en invernáculo. **C.** Desgrane de espigas para realizar la desinfección de los granos y posterior rescate de embriones. **D.** Grano con dos embriones haploides (poliembriónia). **E.** Embriones inmaduros rescatados y creciendo *in vitro*. **F.** Planta rusticada. **G y H.** Plantas con 3-5 macollos con sus raíces sumergidas en solución de colchicina para la duplicación cromosómica. **I.** Plantas tratadas con colchicina y llevadas a macetas con tierra en cámara de crecimiento.

Respuesta global para todos los genotipos y fechas de corte: el 12,2% de un total de 26.976 flores polinizadas condujeron a la formación de embriones, en un rango que fue de 0,3 a 33,2%, dependiendo del genotipo y de la fecha de recolección de la espiga (Fig. 5). Estos valores se encuentran dentro de los rangos publicados por Suenaga y Nakajima (1989), Riera-Lizarazu y Mujeeb-Kazi (1990) y Kisana et al. (1993) utilizando diferentes variantes del mismo método. De 3284 embriones cultivados el 19,6%, en promedio, desarrolló en plantas verdes, con un máximo del 45,7% en la línea 466 F3. El número de plantas verdes producidas por cada 100 flores polinizadas fue del 0 al 8%, con una media general de 2,4%.

Considerando los 36 genotipos de trigo analizados se recuperaron, en promedio, 4,1 embriones por espiga, siendo el genotipo 1061 el más productivo, con una media de 10,6 embriones por espiga. El promedio general de plantas verdes por espiga fue de 0,7, con un valor máximo de 2,5.

No se encontraron plantas albinas utilizando esta metodología. Como en el caso del cultivo de anteras, todas las plantas obtenidas fueron haploides.

Efecto del genotipo y fecha de corte: las diferencias entre los 36 genotipos de trigo para formación de embriones y regeneración de plantas fueron altamente significativas ($p < 0,01$). También fueron altamente significativas ($p < 0,01$) las diferencias para estas variables en las distintas fechas de recolección de las espigas (sin considerar que son diferentes genotipos).

A fin de determinar si las diferencias observadas entre genotipos eran influenciadas por las diferencias en el momento de recolección de las espigas, se llevó a cabo un test de ANOVA. Para ello se tuvieron en cuenta los datos obtenidos durante el intervalo más productivo – 6 al 9 de noviembre (Tabla 5). Este análisis permitió detectar diferencias altamente significativas en el número de embriones y de plantas por espiga para los 14 genotipos analizados en ese intervalo de 4 días. Al tratarse de un intervalo pequeño, donde las diferencias en el momento de recolección pueden considerarse despreciables, toda la variación observada para las variables consideradas fue atribuible al genotipo. Otros autores, Sadasivaiah et al. (1999) y Bitsch et al. (1998) también detectaron influencias del genotipo utilizando este tipo de técnica.

Respuesta dentro del período central (6 al 9 de noviembre) de corte de espigas: el número más elevado de embriones y la mayor cantidad de plantas regeneradas fueron obtenidos dentro de este intervalo, al-

Tabla 5. Embriones y plantas obtenidos a partir de 14 genotipos de *Triticum aestivum* procesados en 4 días consecutivos por cruzamientos con maíz

genotipo	466	495	860	861	862	923	1055	1056	1059	1061	1066	1067	1074	1076	total
n° esp.tot.	36	33	22	33	32	21	20	20	22	13	22	18	6	7	305
n° embr.tot.	175	229	132	237	272	161	172	185	148	138	178	103	30	20	2180
embr/esp(prom)	4,9	6,9	6,0	7,2	8,5	7,7	8,6	9,3	6,7	10,6	8,1	5,7	5,0	2,9	7,15
n° pl.tot.	80	43	45	80	57	30	40	30	56	13	29	1	3	1	508
pl/ esp.(prom)	2,22	1,30	2,05	2,42	1,78	1,43	2,00	1,50	2,55	1,00	1,32	0,06	0,50	0,14	1,67
% pl/ embr.	45,7	18,8	34,1	33,8	21,0	18,6	23,3	16,2	37,8	9,4	16,3	1,0	10,0	5,0	23,3
% embr / fl.	15,2	21,7	18,8	22,4	26,6	24,0	26,9	28,9	21,0	33,2	25,3	17,9	15,6	8,9	22
% pl / fl.	6,9	4,1	6,4	7,6	5,6	4,5	6,3	4,7	8,0	3,1	4,1	0,2	1,6	0,4	5,2
filial	F3	F3	F3	F3	F3	F4	F3	F3	F3	F3	F3	F3	F3	F3	F3
fecha corte	6/11	6/11	7/11	7/11	7/11	7/11	8/11	8/11	8/11	8/11	9/11	9/11	9/11	9/11	9/11

canzando valores promedio de 7,15 embriones por espiga (22%) y 1,67 plantas por espiga (5,2%). Un promedio de 19,3% para formación de embriones y de 6,29% para regeneración de plantas fueron informados como muy buenos por Sadasivaiah *et al.* (1999). Otros autores (Bitsch *et al.*, 1998) informan frecuencias menores a las obtenidas en este trabajo para el caso de obtención de embriones (4,9 embriones por espiga). Sin embargo los valores informados de regeneración de plantas fueron mayores, de 2,8 plantas por espiga en el caso de Bitsch *et al.* (1998) y 5 plantas por espiga en el de Suenaga *et al.* (1998).

El intervalo más adecuado, dentro de la etapa de floración, para castrear las flores de trigo, fue desde que la mitad de la espiga era visible fuera de la hoja bandera hasta que quedaba completamente por fuera de ésta. Aunque esto es altamente dependiente de las condiciones ambientales, en general coincide muy bien con el estadio en que el color de las anteras es verde.

Aclimatación: en primer lugar se utilizó el método de la bolsa cubriendo la maceta para evitar una excesiva evapotranspiración a 25°C, que en muchos casos conspiraba con la sobrevida de la planta. La posterior utilización de una cámara de crecimiento con bajas temperaturas (8-10°C) permitió superar este problema de muerte prematura.

Análisis del nivel de ploidía: el conteo cromosómico confirmó la naturaleza haploide de las plantas regeneradas.

Duplicación cromosómica: este es uno de los períodos más críticos del proceso de obtención de doblehaploides debido a que la utilización de colchicina es un factor sumamente estresante para las plantas. A esto se suma el pasaje a condiciones de invernáculo, que implica un estrés adicional. Si bien se considera que el método aquí informado es exitoso debido a que de cada 10 plantas tratadas, en promedio, sobrevivieron 3 (que en condiciones de campo produjeron semilla) consideramos que aún puede mejorarse en gran medida el rendimiento.

CONCLUSIONES

En la Tabla 6 se resumen y comparan ambos métodos en función de los resultados obtenidos con los materiales analizados. En relación al método de cultivo de anteras, nuestra experiencia permitió confirmar que la respuesta androgénica es compleja, dependiendo de la interacción de factores como el genotipo, las condiciones de cultivo y el estado fisiológico de las plantas donantes de anteras. El tratamiento de frío fue superior al de calor, conduciendo a una mayor eficiencia en la inducción de callos y regeneración de plantas verdes. Los genotipos más respondedores pudieron ser inducidos aún en condiciones muy adversas de crecimiento de las plantas donantes, lo cual estaría indicando que la influencia del genotipo es muy elevada y quizá el factor preponderante.

Para trigo pan la obtención de un 5% de plantas verdes es considerada una buena respuesta, que justifica la inclusión de la técnica en un programa de mejoramiento (Lashermes *et al.*, 1991). Los niveles de respuesta androgénica obtenidos con nuestros materiales fueron, en general, de medio (3,7 plantas verdes por cada 100 anteras, como promedio para todos los genotipos considerados, utilizando frío como pretratamiento y un medio líquido adecuado) a elevado, si se consideran solamente los genotipos respondedores (11.4%).

En los cruzamientos intergenéricos se observó que las condiciones ambientales (día de corte) pueden influir en la respuesta. Sin embargo, en este caso, no hubo genotipos de respuesta nula, indicando una menor influencia del genotipo sobre la obtención de plantas haploides. Es frecuente encontrar en la literatura afirmaciones tales como que el método de trigo x maíz es más apropiado que el cultivo de anteras para la obtención de haploides por ser menos dependiente del genotipo (Kisana *et al.*, 1993; Fedak *et al.*,

Tabla 6. Comparación entre los métodos de cultivo de anteras y cruzamientos interespecíficos para la obtención de haploides en trigo.

	Anteras	Trigo x Maíz
Flores polinizadas		26976
Anteras cultivadas	15360	
Callos	1056	
Embriones		3284
% de inducción de callo	(=6,88 %) (0-27,8%)	
% de inducción de embriones		(=11,8%) (0,3-33,2%)
% plantas verdes	(=1,6%) (0-11,4%)	(=2,4%) (0-8.0%)
% plantas albinas	0 – 100 %	0 %
Tiempo desde inicio a Regeneración de planta	aprox. 100 días	entre 30 – 40 días
Influencia del genotipo	alta	media
Costo	elevado	bajo
Riesgo de variación somaclonal	medio-elevado	muy bajo

1997). Los resultados con nuestros materiales confirmarían esta aseveración, lo cual sumado a la ausencia de albinismo, el escaso riesgo de variación somaclonal, la facilidad de aplicación, la rapidez para llegar al resultado final y los menores costos de implementación de la técnica, la hacen más conveniente para la obtención de haploides en trigo. No obstante, si se usan genotipos de elevada respuesta androgénica la cantidad de plantas obtenidas por cultivo de anteras no es despreciable.

Teniendo en cuenta todas estas consideraciones, la técnica que se recomienda para los programas de mejoramiento utilizando los materiales invernales de trigo pan de la ACA es la de cruzamientos con maíz.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al CONICET, a la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional del Sur, a la Asociación de Cooperativas Argentinas y a la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires por el apoyo económico brindado a este trabajo. También agradecen la colaboración técnica de los Sres. Pablo Roncallo, Sebastián Monteoliva, Gerardo Bellacomo e Itati Fernández.

BIBLIOGRAFÍA

- BAENZIGER, P.S.; SCHAEFFER, G.W. 1983. Dihaploid via anthers cultured in vitro. En: Beltsville Symposia in Agri. Res. VII. Genetic Engineering: Applications to Agriculture. L. Owens (ed). Rowman & Allanheld, Totowa, New Jersey, pp.269-284.
- BAJAJ, Y.P.S.; GOSAL, S.S. 1986. Biotechnology of wheat improvement. En: Biotechnology in Agriculture and Forestry Vol. 2: Crops, Cap. 1. Bajaj Y.P.S. (ed) Springer, Berlín-Heilderberg-New york, pp.3-38.
- BHOJWANI, S.S.; RAZDAN, M.K. 1996. Haploid Production. En: Plant Tissue Culture: Theory and Practice, a previewed edition. S.S. Bhojwani y M.K. Razdan (eds). Elsevier, Amsterdam, pp.167-214.
- BISTCH, C.; GROGER, S.; LELLEY, T. 1998. Effect of parental genotypes on haploid embryo and plantlet formation in wheat x maize crosses. Euphytica. 103: 319-323.
- BOX, G.; COX, D. 1964. An analysis of transformation. J. Royal. Stat. Soc. B(36): 211-243.
- CHU, C.; HILL, R.; BRULE-BABEL, A. 1990. High frequency of pollen embryoid formation and plant regeneration in *Triticum aestivum* L. on monosaccharide-containing media. Plant Sci. 66: 255-262.
- DE BUYSER, J.; HENRY, Y.; LONNET, P.; HERTZOG, R.; HESPEL, A. 1987. Florin: a doubled haploid wheat variety developed by the anther culture method. Plant Breed. 98: 53-56.
- FEDAK, G.; BURVILL, M.; VOLDENG, H.D. 1997. A comparison of anther culture and maize pollination for haploid production in wheat. J.Appl.Genet.38 (4): 407-414.
- HU, H.; XI, Z.; OUYANG, J.W.; HAO, S.; HE, M.; XU, Z.Y.; ZOU, M.Z. 1980. Chromosome variation of pollen mother cell of pollen-derived plants in wheat (*Triticum aestivum* L.). Sci. Sinica 23(7): 905-914.
- HU, D.F. 1986. Jinghua No.1, a winter wheat variety derived from pollen sporophyte. En: Haploids of higher plants in vitro. Hu, H. y Yang, H. (eds). China Academic Publishers, Beijing, pp.137-148.

- KISANA, N.S.; K.K. NKONGOLO; QUICK, J.S.; JOHNSON, D.L. 1993. Production of Doubled Haploids by Anther Culture and Wheat x Maize Method in a Wheat Breeding Programme. *Plant Breeding* 110: 96-102.
- KONZAK, C.; ZHOU, H. 1991. Anther culture methods for doubled haploid production in wheat. *Cer. Res. Comm.* 19(1-2): 147-164.
- LASHERMES, P.; ENGIN, G.; ORTIZ FERRARA, G. 1991. Anther culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) adapted to dry areas of West Asia and North Africa. *J. Of Gen. Breed.* 45(1): 33-37.
- LAURIE, D.A.; BENNETT, M.D. 1986. Wheat x maize hybridization. *Can. J. Genet. Cytol.* Vol 28, pp.313-316.
- LAURIE, D.A.; BENNETT, M.D. 1988. The production of haploid wheat plants from wheat x maize crosses. *Theor Appl Genet* 76: 393-397.
- LAZAR, M.D.; SCHAEFFER, G.W.; BAENZIGER, P.S. 1985. The physical environment in relation to high frequency callus and plantlet development in anther cultures of wheat (*Triticum aestivum* L.) cv. Chris. *J. Plant Physiol.* 121: 103-109.
- MUJEEB-KAZI, A. 1998. An analysis of the use of haploidy in wheat improvement. In: *Application of Biotechnologies to Wheat Breeding*. Kohli M.M. & Francis M. (eds.). INIA As Estanzuela, Colonia, Uruguay, pp.33-48.
- ORTIZ, J.P.A.; MROGINSKI, L.A.; PICARDI, L.A. 1991. Obtención de plantas haploides de trigo (*Triticum aestivum* var. Buck Ombú) por cultivo de anteras. *Phyton* 52(2): 113-118.
- OTANI, M.; SHIMADA, T. 1995. Effect of synthetic medium on pollen embryo formation of common wheat and tetraploid wheat species. *Bull. Res. Inv. Agric. Resources* 4: 45-51.
- OUYANG, J.W. 1986. Induction of pollen plants in *Triticum aestivum*. En: *Haploids of Higher Plants in vitro*. Cap. 2. H. Hu, Y. Hongyuan (eds). China Academic Publishers, Beijing, pp.76-110.
- PAUK, J.; KERTÉSZ, Z.; BEKE, B.; BÓNA, L.; CSÖSZ, M.; MATUZ, J. 1995. New winter wheat variety: G.K. Delibab developed via combining conventional breeding method and in vitro androgenesis. *Cer. Res. Comm.* 23: 251-256.
- PONITKA, A.; S'LUZARKIEWICZ-JARZINA, A. 1996. Anther culture response in F₁ hybrids of winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *J. Appl. Genet.* 37(3): 253-260.
- RIERA-LIZARAZU, O.; MUJEEB-KAZI, A. 1990. Maize (*Zea mays* L.) mediated wheat (*Triticum aestivum* L.) polyhaploid production using various crossing methods. *Cereal Res. Commun.* 18:339-345.
- SADASIVAIAH, R.S.; ORSHINSKY, B.R.; KOZUB, G.C.. 1999. Production of wheat haploids using anther culture and wheat x maize hybridization techniques. *Cereal Research Communications*, Vol 27, iss 1-2, pp.33-40.
- SESEK, S.; BOROJEVIC, K.; RADOJEVIC, L.; SCHAEFFER, G. 1994. Efficiency of anther culture technique in wheat breeding. *Arch. Biol. Sci.* 46(3-4): 57-63.
- SUENAGA, K.; MORSHEDI, A.R.; DARVEY, N.L. 1998. Evaluation of teosinte lines as

- pollen parents for wheat haploid production. *Cereal Research Communications*. Vol. 26, Nro. 2.
- SUENAGA, K.; MORSHEDI, A.R.; DARVEY, N.L. 1997. Haploid production of Australian wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars through wheat x maize (*Zea mays* L.) crosses. *Aust. J. Agric. Res.* 48, 1207–11.
- SUENAGA, K.; NAKAJIMA, K. 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. 1994. Doubled Haploid System Using the Intergeneric Crosses between Wheat (*Triticum aestivum*) and Maize (*Zea mays*). Reprinted from the Bulletin of the National Institute of Agriobiological Resources (Japan) Nro. 9
- ZHOU, H.; ZHENG, Y.; KONZAK, C.F. 1991. Osmotic potential of media affecting green plant percentage in wheat anther culture. *Plant Cell Rep.* 10: 63-66.

Original recibido en junio de 2004