

METODO DE CULTIVO DE ANTERAS Y CAPACIDAD ANDROGENICA DE GERMOPLASMA CHILENO DE TRIGO¹

Anther culture methods and androgenic capacity of Chilean wheat germplasm

Nicole Hewstone O.², Carlos Muñoz S.² y René Cortázar S.²

SUMMARY

In order to determine the androgenic capacity of 19 wheat genotypes and to establish the best methodology for haploid production, three different treatment and five nutrient media were evaluated. A cold treatment was applied, either to the spikes, previous to anther extraction, or to the anthers in culture, using 4°C, for 4 to 7 days. A 0.8 M Mannitol solution was used, to submit the anthers to high osmotic pressure. Cultured anthers were kept under a permanent irradiance of 50 $\mu\text{E m}^{-2}/\text{seg}$, for 16 hr, or in darkness for 10 days, previous to incubation at $25 \pm 4^\circ\text{C}$.

The cold treatment to the spikes, apparently was the best for callus induction; however, the use of Mannitol, with no cold treatment, produced the largest number of plantlets. There was no significant difference between light or dark incubation; but on a percent basis, dark incubation was better for callus induction and plantlet formation. Also, dark incubation significantly reduced the occurrence of albino plants.

N_6 , followed by Potato-2, were the best culture media. Genotypes differed in their androgenic ability, 'Onda-INIA' and '29 DH' being the two cultivars producing more plantlets. 'F.78208-1', 'Chris', 'Lanco-INIA', and 'Centurk' showed intermediate capacity for callus production, and the first three cultivars also showed intermediate capacity for plantlet formation.

From 37,457 cultured anthers, only 63 plants were obtained, 20 of which were albinos. This low production rate may limit the use of this technique; nevertheless, in the best treatments and genotypes, the rate of plantlet production/anther was over 13%.

INTRODUCCION

El método de mejoramiento genético más empleado en trigo es el genealógico. El principal problema de este método es el largo tiempo necesario para obtener un nivel adecuado de homocigosis, que permita la evaluación de los caracteres de interés agronómico. Este problema puede ser minimizado, si se utilizan haploides para la obtención de homocigotos directos.

La técnica del cultivo de anteras para la obtención de haploides, fue desarrollada por Guha y Maheshwari en 1964 (Schaeffer, Baenziger y Worley, 1979). En trigo, el

uso de esta técnica es limitado, porque la frecuencia de obtención de plantas es generalmente baja y un alto porcentaje de las plantas regeneradas pueden ser albinas. Varios factores influyen en la efectividad de la técnica, siendo uno de los más importantes la variabilidad existente entre genotipos (Liang, Xu y Hoang-Tan, 1987; Lazar, Baenziger y Schaeffer, 1984; Marsolais, Séguin-Swartz y Kasha, 1984). Otros factores que la afectan, son las condiciones de crecimiento de las plantas donantes de anteras, el estado de desarrollo del polen al momento de extraer las anteras, los tratamientos previos al cultivo de las anteras y las condiciones de cultivo de éstas (Jones y Petolino, 1988; Hu, 1986; Ouyang, 1986; Marsolais y otros, 1984; Wenzel y Foroughi-Wehr, 1984).

El presente trabajo se realizó para evaluar la capacidad androgénica de algunos genotipos de trigo utilizados por el Programa de Mejoramiento Genético de Trigo del INIA- La Platina, y para determinar una metodología que permita una mayor eficiencia en la obtención de haploides.

¹Recepción de originales: 6 de Julio de 1989.

Trabajo realizado con el apoyo financiero del Organismo Internacional de Energía Atómica (IAEA-R.C. 5096/RB).

Parte de la Tesis de Grado presentada por la autora, para optar al título de Ingeniero Agrónomo en la Pontificia Universidad Católica de Chile.

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

MATERIALES Y METODOS

Los experimentos fueron realizados en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Estación Experimental La Platina (INIA).

Se evaluaron 15 líneas y variedades chilenas, las que fueron elegidas tratando de evitar pedigrees comunes, para evaluar un mayor número de genotipos. Además, se incluyeron genotipos como 'Chris', 'Centurk', F₄ 29 DH y F₄ 431 DH, que son citados en la literatura por poseer una alta capacidad androgénica. Los genotipos evaluados fueron sembrados en el campo, a partir de junio de 1988, en tres épocas de siembra.

El método empleado para la obtención de haploides, comprendió cuatro etapas: establecimiento de las anteras en medio de cultivo, para la inducción de callos o embriones; regeneración de brotes, a partir de los callos o embriones generados; inducción de raíces en los brotes; y aclimatación de las plantas obtenidas.

Las espigas se cosecharon cuando los ápices de las inflorescencias alcanzaban aproximadamente a 3/4 de la distancia existente entre la base de la vaina de la segunda hoja, con respecto a la lígula de la hoja bandera, antes que las espigas emerjan. En este momento, según Kudirka, Schaeffer y Baenziger (1986), las microesporas se encuentran en estado uninucleado medio a tardío.

Los cultivos se realizaron bajo una cámara de flujo laminar, en condiciones de asepsia. Las espigas fueron desenvueltas de las hojas que las protegen y esterilizadas con etanol al 70%, por 2 min. Las anteras fueron removidas de la espiga y "sembradas" sobre 10 ml del medio de cultivo contenido en frascos de 40 ml de capacidad. El material fue incubado en una cámara de crecimiento a 25°C, con una irradiación de 50 $\mu\text{E m}^2/\text{seg}$ y con un fotoperíodo de 16 hr de luz y 8 hr de oscuridad.

Para la inducción de callos o embriones, se evaluó cinco medios de cultivos distintos, que en la literatura aparecen citados como eficientes para la obtención de haploides en trigos: Potato-2 (Hu, 1986), 85 D3 (Liang y otros, 1987), Moraes-F (Moraes-Fernandes y Picard, 1983), N₈ (Shimada, 1981) y MS (Murashige y Skoog, 1962, citados por George y Sherrington, 1984).

Con el objeto de aumentar la frecuencia de inducción de callos o embriones, se utilizó una serie de tratamientos, dados antes o después de "sembradas" las anteras. Ellos fueron los siguientes:

Frío: Se dio tres tratamientos: a) frío aplicado a las espigas después de cosechadas (Ouyang, 1986);

b) frío aplicado a las anteras una vez "sembradas" en el medio de cultivo (Moraes-Fernandes y Picard, 1983; Lazar, Schaeffer y Baenziger, 1985); y c) el material vegetal no recibió tratamiento de frío. Se empleó una temperatura de 4°C, por 4 a 7 días.

Presión Osmótica: La mitad de las anteras sembradas en cada tratamiento fue introducida en una solución de Manitol 0,8M, por 1 hr, antes de ser "sembradas" en el medio de cultivo. La presión osmótica tiene el efecto de inducir a la célula a producir un aminoácido, que favorece la embriogénesis.

Luz: Los tratamientos con y sin frío a las espigas fueron incubados bajo la luz o en completa oscuridad, por 10 días, inmediatamente después de "sembradas" las anteras. Los tratamientos con frío a las anteras, sólo permanecieron en la oscuridad, ya que los frascos se mantuvieron en un refrigerador, a 4°C por 4 a 7 días, y luego se llevaron a la cámara de crecimiento, hasta completar los 10 días de oscuridad.

Para la regeneración de brotes a partir de los callos, se debió utilizar un medio distinto. Este medio fue el descrito por Ouyang (1986) y corresponde al de Murashige y Skoog, suplementado con ácido naftalen acético (0,5 mg/lt), kinetina (0,5 mg/lt), tiamina (1 mg/lt) y sacarosa (30 g/lt).

Quando los brotes desarrollados en el medio regenerativo no produjeron raíces, se traspararon a un medio de enraizamiento, de igual composición que el de regeneración, pero sin ácido naftalen acético, ni kinetina y con una concentración de 1 mg/lt de ácido indol acético. La sacarosa se disminuyó también a 1,5% (Ouyang, 1986).

A las plantas producidas *in vitro* se les dio un período de aclimatación, colocándolas primero en un frasco con tierra estéril, para luego llevarlas a invernadero, donde se mantuvieron en cámara húmeda con temperatura basal (25°C), hasta que completaron este período. Después, fueron transplantadas a macetas, donde se dejaron crecer hasta su madurez fisiológica (Ouyang, 1986).

Para el análisis de los resultados se considerarán separadamente los efectos de los tratamientos sobre la formación de callos y sobre la formación de plantas, ya que se ha sugerido que la formación de plantas puede ocurrir por embriogénesis directa (Liang y otros, 1987), o bien mediante la rediferenciación de los callos generados por las microesporas (Shimada, 1981).

Debido a la composición de los datos, se aplicó el Test del Signo para realizar comparaciones pareadas entre los distintos tratamientos, los cuales son de tipo categórico, presentan o no presentan resultados.

RESULTADOS Y DISCUSION

Formación de Callos

Efecto de los Medios de Cultivo. De acuerdo con el porcentaje de callos por antera, el mejor medio de cultivo fue el N₆, seguido por el Potato-2 y el MS. El medio 85 D3 estuvo en cuarto lugar y el peor medio resultó ser el Moraes-F (Cuadro 1). El medio de cultivo N₆, se diferencia de los otros en el contenido de algunos elementos, como serina, glicina, glutamina y mayor cantidad de inositol, lo que favorece el desarrollo de embriones (Nitsch, comunicación personal). El medio Potato-2 contiene 10% de extracto de papa, el que aporta dichos elementos, junto con los micronutrientes.

En el Cuadro 2, puede observarse el resultado de las comparaciones pareadas entre los medios de cultivo, para la formación de callos. De ambos cuadros, se desprende que el mejor medio de cultivo para la formación de callos fue el N₆, seguido el Potato-2.

Estos resultados concuerdan con lo señalado por Hu (1986), quien también concluye que dichos dos medios de cultivo son los que mejor resultado han dado para la inducción de callos en anteras de trigo.

Efecto de los Tratamientos. En cuanto al porcentaje de callos por antera, aparentemente los tratamientos de frío a la espiga, incubación bajo oscuridad y no utilización de presión osmótica, fueron los más efectivos, aunque las diferencias en porcentaje son muy bajas (Cuadro 3).

En el Cuadro 4, se presenta los resultados de las comparaciones pareadas para el conjunto de 4 ó 5 tratamientos realizadas mediante el Test del Signo. Este cuadro confirmaría los resultados indicados en el cuadro anterior, en cuanto a que el tratamiento sin presión osmótica fue mejor que la aplicación de ésta y el frío a la espiga, fue significativamente superior al frío a las anteras y al tratamiento sin frío. Resultados similares han sido informados por varios autores, quienes han observado un efecto benéfico en el uso de tratamientos con frío a 4° C, por tiempos variables entre 48 hr y 1 a 2 semanas (Lazar y otros, 1984; Lazar y otros, 1985; Wenzel y Foroughi-Wehr, 1984; Hu, 1986; Kleijer, Schmid y Winzeler, 1986; Kudirka y otros, 1986). Además, han informado que el frío aumenta la frecuencia de doblamiento espontáneo de cromosomas. La incubación bajo luz, según este cuadro, no fue significativamente distinta de la incubación bajo oscuridad.

CUADRO 1. Número de anteras sembradas, número de callos y porcentaje de callos/antera, para los distintos medios de cultivo ensayados
TABLE 1. Number of anthers planted, number of callus formed, and callus/anther, according to culture media

Medios de cultivo	Anteras sembradas	Callos Nº	Callos/ Antera %
MS	6.394	101	1,57
85 D3	7.304	80	1,09
N ₆	8.690	171	1,97
Moraes-F	6.126	53	0,86
Potato-2	8.943	164	1,83
Total/promedio	37.457	569	1,52

CUADRO 2. Resultados de las comparaciones pareadas entre medios de cultivos utilizando el Test del Signo, para la formación de callos

TABLE 2. Statistical analysis for the paired comparisons, using the sign test, among culture media, for callus induction

Medio	MS	85 D3	N ₆	Moraes-F	Potato-2
MS	-	NS	M	NS	NS
85 D3	NS	-	NS	NS	NS
N ₆	P	NS	-	P	P
Moraes-F	NS	NS	M	-	M
Potato-2	NS	NS	M	P	-

La significación es en sentido vertical. NS: no hay diferencia; M: es significativamente mejor; P: es significativamente peor.

CUADRO 3. Número de anteras sembradas, número de callos obtenidos y porcentaje de callos/anteras, para el conjunto de los distintos tratamientos de frío, de luz y de presión osmótica
TABLE 3. Number of planted anthers, number of callus obtained, and callus/anther (%) for each treatment (cold, dark incubation, and osmotic pressure)

Tratamiento	Anteras sembradas	Callos Nº	Callos/ Antera %
Frío Espiga	18.278	306	1,67
Sin Frío	12.258	190	1,55
Frío Anteras	6.921	73	1,05
Incubación con Luz	14.643	191	1,30
Incubación sin Luz	22.814	378	1,66
Con Presión Osmótica	12.190	178	1,46
Sin Presión Osmótica	25.267	391	1,54

CUADRO 4. Resultados de las comparaciones pareadas, de conjuntos para la formación de callos

TABLE 4. Statistical analysis for the paired comparisons among groups of 4-5 treatment, for callus induction

	Sin Presión Osmótica	Frío a Espiga	Oscuridad	Sin Frío
Presión osmótica	M	-	-	-
Sin Frío	-	M	-	-
Luz	-	-	NS	-
Frío Antera	-	M	-	NS

La significación es en sentido vertical. NS: no hay diferencia; M: es significativamente mejor.

En el Cuadro 5, aparecen los resultados obtenidos cuando se combinaron 2 ó 3 tratamientos y se consideraron colectivamente todos los genotipos utilizados. El tratamiento de oscuridad fue mejor que el de luz; sin embargo, no se puede asegurar la superioridad de los otros tratamientos con respecto a los comparados.

En el Cuadro 6, se muestra los resultados de las comparaciones pareadas realizadas mediante el Test del Signo para las mismas combinaciones. Someter a las anteras a presión osmótica previo a la "siembra" tuvo un efecto aparentemente depresivo sobre la formación de callos. Lo mismo pudo observarse en el Cuadro 4; sin embargo, las diferencias de los Cuadros 3 y 5, no permiten llegar a esta conclusión, pues son mínimas. Ouyang (1986) señala que someter a las anteras a presión osmótica aumenta la frecuencia de inducción de callos.

CUADRO 5. Número de anteras sembradas, número de callos obtenidos y porcentaje de callos por antera para la combinación de los distintos tratamientos ensayados

TABLE 5. Number of anthers planted, number of callus formed, and callus/anther (%), when all treatments were analysed collectively

Tratamiento ¹	Anteras sembradas	Callos N ²	Callos/Antera %
SF/L/PO	2.564	35	1,36
SF/O/PO	2.363	43	1,82
FE/L/PO	2.468	35	1,41
FE/O/PO	2.457	41	1,66
FA/O/PO	2.338	24	1,02
SF/L	3.349	33	0,98
SF/O	3.982	79	1,98
FE/L	6.262	88	1,40
FE/O	7.091	142	2,00
FA/O	4.583	49	1,07
Total	37.457	569	1,52

¹FE: Frío a la espiga; SF: Sin frío; FA: Frío a la antera; PO: Con presión osmótica; L: Incubación bajo luz; O: Incubación bajo oscuridad.

El frío aplicado a la espiga es mejor que el frío aplicado a la antera. Sin embargo, al contrario de lo señalado en el Cuadro 4, no hubo diferencias entre los tratamientos de frío a la espiga y los respectivos tratamientos sin frío. Tampoco hubo diferencias entre el frío aplicado a la antera y sin frío (Cuadro 4), a pesar que porcentualmente sin frío aparenta ser algo mejor (cuadros 3 y 5).

CUADRO 6. Resultados de las comparaciones pareadas, entre los diferentes tratamientos inductivos de la formación de callos

TABLE 6. Results of the paired comparisons between different treatments inductive of callus formation

Tratamiento ¹	FE/L	FE/O/PO	FE/O	SF/L/PO	SF/L	SF/O/PO	SF/O	FA/O/PO	FA/O
FE/L/PO	NS	NS	-	NS	-	-	-	-	-
FE/L	-	-	NS	-	NS	-	-	-	-
FE/O/PO	-	-	M	-	-	NS	-	-	-
FE/O	-	-	-	-	-	-	NS	-	-
SF/L/PO	-	-	-	-	NS	NS	-	-	-
SF/L	-	-	-	-	-	-	NS	-	-
SF/O/PO	-	-	-	-	-	-	M	NS	-
SF/O	-	-	-	-	-	-	-	-	NS
FA/O/PO	-	M	-	-	-	-	-	-	M
FA/O	-	-	M	-	-	-	-	-	-

La significación es en sentido vertical. NS: no hay diferencia; M: es significativamente mejor.

¹FE: Frío a la espiga; SF: Sin frío; FA: Frío a la antera; PO: Con presión osmótica; L: Incubación bajo luz; O: Incubación bajo oscuridad.

El frío a la antera ha presentado efectos negativos, disminuyendo la potencialidad de las microsporas para diferenciarse en plántulas, posiblemente debido a deshidratación (Moraes-Fernandes y Picard, 1983). Sin embargo, Lazar y otros (1985) no encontraron diferencias significativas entre la aplicación de frío a las anteras en cultivo o a las espigas, previo a la inoculación.

En cuanto a los tratamientos de luz, a pesar de no haberse encontrado diferencias significativas entre ellos, porcentualmente la oscuridad fue beneficiosa. Moraes-Fernandes y Picard (1983), Lazar y otros (1984) y Liang y otros (1987), demostraron un efecto favorable de la incubación bajo la oscuridad, después del tratamiento de frío.

Efecto de Genotipo. Ya se ha señalado que el genotipo de las plantas donantes tiene gran influencia en la respuesta de éstas a la androgénesis (Lazar y otros, 1984; Wenzel y Foroughi-Wehr, 1984; De Buyser y Henry, 1986; Hu, 1986; Ouyang, 1986; Kudirka y otros, 1986). En el Cuadro 7, se aprecia el número de callos y los porcentajes de los mismos por anteras sembradas, obtenidos para cada genotipo utilizado en el presente trabajo.

CUADRO 7. Número de anteras sembradas, número de callos formados y porcentaje de callos por antera, por genotipo

TABLE 7. Number of anthers planted, number of callus formed and callus/anther (%), for each genotype

Variedad o Línea	Anteras sembradas N°	Callos N°	Callos/Antera %
Bow	1.966	23	1,17
Onda-INIA	2.477	95	3,83
Sauce-INIA	2.193	17	0,77
F.78208-1	2.373	43	1,81
Chagual-INIA	2.124	14	0,65
Chasqui-INIA	2.339	20	0,85
Bjy/Pho	2.375	16	0,67
Nac 76/Vee	2.298	42	1,83
Talhuén-INIA	1.843	12	0,65
10241	1.628	12	0,73
10263	1.982	11	0,55
10301	1.652	11	0,66
10309	2.078	24	1,55
Cunco-INIA	1.888	24	1,27
Lanco-INIA	1.586	29	1,82
431 DH	2.174	45	2,07
29 DH	1.592	70	4,40
Chris	963	28	2,90
Centurk	1.926	33	1,71
Total	37.457	569	1,52

Las comparaciones pareadas entre los genotipos para la formación de callos, realizadas mediante el Test del Signo, cuando se consideran colectivamente todos los tratamientos; se presentan en el Cuadro 8.

De los 19 genotipos utilizados, destacan dos por su buena capacidad de formación de callos: 'Onda-INIA' y la F4 brasilera '29 DH', los que superaron a 13 genotipos. Una capacidad media mostraron cuatro de los genotipos ensayados: 'F.78208-1', 'Chris', 'Lanco-INIA' y 'Centurk', los que superaron a lo menos a cinco otros genotipos. Otros ocho genotipos resultaron con baja eficiencia en la formación de callos: 431 DH, Bow "s", Chagual-INIA, F₁ 10309, Nac 76/Vee, Sauce-INIA, Chasqui-INIA y Cunco-INIA. El F₄ 431 DH se incluyó por su origen semejante a 29 DH y sus buenos antecedentes en Brasil; sin embargo, en este trabajo no mostró una buena respuesta. Cunco y Lanco (variedades de hábito alternativo del sur de Chile, sin similitud de origen), resultaron con distinta eficiencia en la formación de callos. Talhuén-INIA, Bjy/Pho y tres de los cuatro F₂ utilizados (10241, 10263, 10301), destacaron como los peores genotipos para la formación de callos.

Obtención de Plantas

Efecto de los Medios de Cultivo. En el Cuadro 9, se presenta un ordenamiento de los medios de cultivo en cuanto a su capacidad para inducir la formación de plantas, basado en el porcentaje de plantas obtenidos por número de anteras sembradas.

Al igual que para el caso de la inducción de callos, el medio N₈ aparece como el mejor. Le sigue el Potato-2 y luego el 85 D3. Los medios de cultivo Moraes-F y MS, no mostraron prácticamente diferencia entre ellos y fueron en los que se formaron un menor porcentaje de plantas.

Uno de los principales problemas en el cultivo de anteras de cereales, es la formación de un gran número de plantas albinas (Wenzel y Foroughi-Wehr, 1984). De 63 plantas obtenidas, 20 fueron albinas (31,7%). De los tres medios con mayor cantidad de plantas, el medio N₈ resultó ser también el que produjo un mayor porcentaje de albinismo; aun así, fue el que produjo un mayor porcentaje de plantas verdes/antera (Cuadro 9). No se conoce bien la causa de este fenómeno; algunos factores, como las altas temperaturas de cultivo, la naturaleza del medio regenerativo, la concentración de KNO₃ y de sacarosa en el medio de cultivo, pueden aumentar la producción de plantas albinas (Ouyang y otros, 1973; Hong Feng y Ouyang, 1988; De Buyser y Henry, 1986).

CUADRO 8. Resultado de las comparaciones entre genotipos, para la formación de callos
TABLE 8. Statistical analysis of the comparisons among genotypes, for callus induction

Variedad o Línea	1	3	6	9	12	13	23	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Bow (1)	-	M	NS	M	NS	P	NS	NS	P	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	M	NS	NS
Onda-INIA (3)	P	-	P	NS	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	NS	NS	NS	NS	P
Sauce-INIA (6)	NS	M	-	NS	NS	NS	NS	NS	P	NS	NS	NS	NS	NS	M	NS	M	NS	NS
F.78208-1 (9)	P	NS	NS	-	P	P	NS	NS	P	NS	P	NS	P	NS	P	NS	M	NS	NS
Chagual-INIA (12)	NS	M	NS	M	-	NS	NS	M	P	NS	NS	NS	NS	NS	M	M	M	M	NS
Chasqui-INIA (13)	M	M	NS	M	NS	-	NS	M	NS	NS	NS	NS	NS	NS	M	NS	M	NS	M
Bjy/Pho (23)	NS	M	NS	NS	NS	NS	-	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	M	M	M
Nac 76/Vee (29)	NS	M	NS	NS	P	P	NS	-	P	NS	NS	P	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Talhuén-INIA (30)	M	M	M	M	M	NS	NS	M	-	NS	NS	NS	M	M	M	M	M	M	M
10241 (31)	NS	M	NS	M	M	NS	NS	NS	NS	-	NS	NS	NS	NS	NS	NS	M	M	NS
10263 (32)	NS	M	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	-	NS	M	NS	M	NS	M	M	M
10301 (33)	NS	M	NS	M	NS	NS	NS	M	NS	NS	NS	-	NS	NS	M	M	M	M	M
10309 (34)	NS	M	NS	NS	NS	NS	NS	NS	P	NS	P	NS	-	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Cunco-INIA (35)	NS	M	NS	M	NS	NS	NS	NS	P	NS	NS	NS	NS	-	NS	NS	M	NS	NS
Lanco-INIA (36)	NS	NS	P	NS	P	P	NS	NS	P	NS	P	P	NS	NS	-	NS	NS	NS	NS
431 DH (37)	NS	NS	NS	NS	P	NS	NS	NS	P	NS	NS	P	NS	NS	NS	-	M	NS	NS
29 DH (38)	P	NS	P	P	P	P	NS	P	P	P	P	P	NS	P	NS	P	-	P	NS
Chris (39)	NS	NS	NS	NS	P	NS	P	NS	P	P	P	P	NS	NS	NS	NS	M	-	NS
Centurk (40)	NS	M	NS	NS	NS	P	P	NS	P	NS	P	P	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Número ¹	2	13	1	7	2	0	0	4	0	0	0	0	2	1	6	3	13	6	5

La significación es en sentido vertical. NS: no hay diferencia; M: es significativamente mejor; P: es significativamente peor.
¹Número de veces en que la variedad o línea es superior a otras variedades o líneas con que se la compara.

CUADRO 9. Anteras sembradas y plantas obtenidas, porcentajes de plantas por anteras, en los distintos medios de cultivo ensayados ordenados de acuerdo al porcentaje de plantas por anteras
TABLE 9. Number of anthers planted, number of plantlets recovered, and plantlets/anther (%) for each culture media, listed in decreasing order, according to the number of plantlets/anther

Medios de cultivo	Anteras sembradas N ²	Plantas Obtenidas				Plantas/Antera		
		Total N ²	Verdes N ²	Albinas		Total %	Verdes %	Albinas %
				N ²	%			
N ₆	8.690	31	17	14	45,2	0,356	0,196	0,161
Potato-2	8.943	20	16	4	20,0	0,224	0,179	0,045
85 D3	7.304	8	7	1	12,5	0,110	0,096	0,014
Moraes-F	6.126	2	1	1	50,0	0,033	0,016	0,016
MS	6.394	2	2	0	0,0	0,031	0,031	0,000

Efecto de los Tratamientos. El tratamiento sin frío aparece como favorable para la formación de plantas, como se aprecia en los cuadros 10 y 11. En estos cuadros, se observa que los tratamientos de frío no son tan benéficos para la formación de plantas, aunque se ve un mejor efecto del frío cuando éste se aplica a la espiga, en vez de a la antera una vez "sembrada", al igual que para el caso de la inducción de callos.

Aparentemente, la incubación de las anteras bajo oscuridad mostró un efecto benéfico en la producción de

plantas, induciendo además una mayor cantidad de plantas verdes (cuadros 10 y 11).

En este caso, se diferenciaron más plantas cuando se aplicó presión osmótica a las anteras antes de "sembrarlas", no siendo este resultado tan claro para la formación de callos. Esto puede significar que la presión osmótica tiene efecto sobre la embriogénesis directa y no sobre la inducción de callo, fenómenos que están bajo control genético independiente, según algunos autores (Kudirka y otros, 1986; Lazar y otros, 1984).

CUADRO 10. Número de anteras sembradas, número de plantas obtenidas y porcentaje de plantas por antera en el conjunto de tratamientos
TABLE 10. Number of anthers planted, number of plantlets recovered and plantlets/anther (%), when all treatments were analysed collectively

Tratamiento	Plantas Obtenidas					Plantas/Antera		
	Anteras sembradas Nº	Total Nº	Verdes Nº	Albinas		Total %	Verdes %	Albinas %
				Nº	%			
Sin Frío	12.258	31	21	10	31,25	0,25	0,17	0,08
Frío Espiga	18.278	31	21	10	32,25	0,17	0,11	0,06
Frío Antera	6.921	1	1	0	0,00	0,01	0,01	0,00
Obscuridad	22.814	39	31	8	20,50	0,17	0,14	0,03
Luz	14.643	24	12	12	50,00	0,16	0,08	0,08
Con PO	12.190	25	16	9	36,00	0,20	0,13	0,00
Sin PO	25.267	38	27	11	28,95	0,15	0,11	0,04

CUADRO 11. Número de anteras sembradas, número de plantas obtenidas y porcentaje de plantas/antenas, para los distintos tratamientos
TABLE 11. Number of anthers planted, number of plantlets recovered and plantlets/anther (%), for each treatment

Tratamiento	Plantas Obtenidas					Plantas/Antera		
	Anteras sembradas Nº	Total Nº	Verdes Nº	Albinas		Total %	Verdes %	Albinas %
				Nº	%			
SF/L/PO	2.564	12	6	6	50,0	0,460	0,23	0,23
SF/O/PO	2.363	8	5	3	37,5	0,330	0,21	0,12
FE/O	7.091	17	13	4	23,5	0,240	0,18	0,06
SF/O	3.982	9	8	1	11,1	0,220	0,20	0,02
FE/O/PO	2.457	4	4	0	0,0	0,162	0,16	0,00
FE/L	6.262	10	4	6	60,0	0,160	0,07	0,09
SF/L	3.349	2	2	0	0,0	0,059	0,05	0,00
FA/O/PO	2.338	1	1	0	0,0	0,042	0,04	0,00
FE/L/PO	2.468	0	0	0	0,0	0,000	0,00	0,00
FA/O	4.583	0	0	0	0,0	0,000	0,00	0,00

FE: Frío a la espiga; SF: Sin frío; FA: Frío a la antera; PO: Con presión osmótica; L: Incubación bajo luz; O: Incubación bajo oscuridad.

Efecto del Genotipo. En el Cuadro 12, se establece un ordenamiento de los genotipos, de mejor a peor, en cuanto a la producción de plantas, basado en el porcentaje de plantas obtenidas por número de anteras sembradas.

Se puede apreciar que, en general, se mantienen las mismas tendencias que para el desarrollo de callos; es decir, los mejores genotipos para la formación de callos también resultaron los mejores para la obtención de plantas. De las cuatro variedades extranjeras que se incluyeron por su probada capacidad androgénica, sólo tres (Chris, F.78208-1 y 29 DH) confirmaron esta característica. Sin embargo, 'Centurk', que sólo presentó una capacidad mediana para formar callos, no formó plantas.

Resulta difícil evaluar el efecto del genotipo en la inducción de plantas albinas, debido al bajo porcentaje de plantas obtenidas. Sin embargo, considerando aquellos genotipos en que se obtuvo más de cuatro plantas, se observa un claro efecto del genotipo (Cuadro 12), ya que hubo algunos que no presentaron problemas de albinismo y otros, como 'Onda-INIA' y 'F.78208-1', en que este problema alcanzó casi al 40%. Esto concuerda con lo citado en la literatura (Schaeffer y otros, 1979; Marsolais y otros, 1984; De Buyser y otros, 1986; Liang y otros, 1987). Además, cuando se usan como progenitores variedades que producen plantas albinas, el F₁ produce un gran porcentaje de este tipo de plantas. Por otra parte, se ha determinado que los híbridos producen más plantas albinas que las variedades y que, cuando existen anomalías cromosomales, aumenta el porcentaje de aquéllas (Liang y otros, 1987; De Buyser y Henry, 1986).

CUADRO 12. Número de anteras sembradas y plantas obtenidas para los diferentes genotipos ensayados. Ordenación de genotipos de mejor a peor, basado en el porcentaje de plantas obtenidas por número de anteras sembradas

TABLE 12. Number of anthers planted, number of plantlets recovered, and plantlets/anther (%) when all genotypes were analysed collectively, irrespective of the treatment given. Genotypes are listed in decreasing order, according to the number of plantlets/anther

Variedad	Anteras sembradas Nº	Plantas Obtenidas				Plantas/Antera		
		Total Nº	Verdes Nº	Albinas		Total %	Verdes %	Albinas %
				Nº	%			
Onda-INIA	2.477	23	14	9	39,13	0,92	0,56	0,36
Chris	963	7	8	1	14,28	0,72	0,62	0,10
F.78208-1	2.373	15	9	6	40,00	0,63	0,38	0,25
29 DH	1.592	5	5	0	0,00	0,31	0,03	0,00
Lanco-INIA	1.586	4	3	1	25,00	0,25	0,19	0,06
Chasqui-INIA	2.339	3	2	1	33,33	0,12	0,08	0,04
431 DH	2.174	2	1	1	50,00	0,09	0,04	0,04
Bow	1.966	1	1	0	0,00	0,05	0,05	0,00
Chagual-INIA	2.124	1	0	1	100,00	0,04	0,00	0,04
Sauce-INIA	2.193	1	1	0	0,00	0,04	0,04	0,00
Nac 76/Vee	2.298	1	1	0	0,00	0,04	0,04	0,00
Total	22.085	63	43	20	31,74	0,28	0,19	0,09

RESUMEN

Con el objeto de evaluar la capacidad androgénica de 19 genotipos y de determinar la mejor metodología para la obtención de haploides en trigo, se "sembró" anteras en cinco medios de cultivo, aplicando tres tratamientos diferentes: frío a las espigas o a las anteras una vez "sembradas", utilizando una temperatura de 4°C, por 4 a 7 días; presión osmótica, sumergiendo las anteras por 1 hr en Manitol 0,8 M; e incubación de las anteras permanentemente bajo luz o en oscuridad por 10 días. La temperatura de la cámara de crecimiento fue de 25 ± 4°C y la irradiación de 50 µE m⁻²/seg, con un fotoperíodo de 16 hr. La evaluación de los tratamientos se hizo contando el número de anteras que formaron callos y/o plantas.

Para la formación de callos, aparentemente el frío a las espigas antes de "sembrar" las anteras, tuvo un efecto benéfico; sin embargo, para la formación de plantas fue mejor "sembrar" las anteras sin tratamiento de frío, pero aplicando presión osmótica. Aunque no hubo diferencias entre la incubación bajo luz o bajo oscuridad,

porcentualmente la oscuridad fue mejor, tanto para la inducción de callos como para la formación de plantas; además, incubando las anteras bajo oscuridad, produjo un menor porcentaje de plantas albinas.

El mejor medio de cultivo fue el N₆, seguido del Potato-2. Hubo diferencias en la capacidad androgénica de los diferentes genotipos, para la formación de callos y plantas. Los dos genotipos con mayor capacidad androgénica, fueron 'Onda-INIA' y '29 DH'. Con capacidad media en cuanto a producción de callos resultaron 'F.78208-1', 'Chris', 'Lanco-INIA' y 'Centurk'. Los tres primeros, también destacaron en la producción de plantas; 'Centurk' no las produjo.

De las 37.457 anteras "sembradas", sólo se obtuvo 63 plantas, 20 de las cuales fueron albinas, lo que dificulta la utilización de este método; sin embargo, para los mejores tratamientos y los mejores genotipos, se obtuvo 13,2 plantas por 100 anteras.

LITERATURA CITADA

- DE BUYSER, J. and HENRY, Y. 1986. Wheat: Production of Haploids, Performance of Doubled Haploids, and Yield Trials. *Biotechnology in Agriculture and Forestry 2: Crops* (ed.) Y.P.S. Bajaj, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. p.: 73-88.
- GEORGE, E.F. and SHERRINGTON, P.D. 1984. *Plant Propagation by Tissue Culture. Handbook and Directory of Commercial Laboratories.* Eastern Press, Reading, Berks. Great Britain. 709 p.
- HONG FENG, G. and OUYANG, J. 1988. The effects of KNO_3 concentration in callus induction medium for wheat anther culture. *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture* 12: 3-12.
- HU, H. 1986. Wheat: Improvement through anther culture. *Biotechnology in Agriculture and Forestry 2: Crops* (ed.) Y.P.S. Bajaj, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. p.: 55-71.
- JONES, A.M. and PETOLINO, J.F. 1988. Effects of support medium on embryo and plant production from cultured anthers of soft-red winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture* 12: 253-261.
- KLEIJER, G., SCHMID, J. et WINZELER, H. 1986. La culture d'anthers: possibilités et limites dans la sélection du blé et de l'épeautre. *Revue Suisse Agric.* 18 (6): 305-311.
- KUDIRKA, D.T., SCHAEFFER, G.W., and BAENZIGER, P.S. 1986. Wheat Genetic Variability through anther culture. *Biotechnology in Agriculture and Forestry 2: Crops I.* (ed.) Y.P.S. Bajaj, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. p.: 41-54.
- LAZAR, M.D., BAENZIGER, P.S., and SCHAEFFER, G.W. 1984. Combining abilities and heritability of callus formation and plantlet regeneration in wheat (*Triticum aestivum* L.) anthers culture. *Theor. Appl. Genet.* 68: 131-134.
- LAZAR, M.D., SCHAEFFER, G.W. and 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.
- LIANG, G., XU, A., and HOANG-TANG. 1987. Direct generation of wheat haploids via anther culture. *Cell biology & molecular genetics. Crop Science* 27: 336-339.
- MARSOLAIS, A.A., SEGUIN-SWARTZ, G., and KASHA, K.J. 1984. The influence of anther cold pretreatments and donor plant genotypes on *in vitro* androgenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture* 3: 69-79.
- MORAES-FERNANDES, M.J. and PICARD, E. 1983. Viability of haploid production by anther culture using Brazilian wheat genotypes. *Rev. Brasil. Genet.* VI (2): 261-277.
- OUYANG, J., HU, H., CHUANG, C.C., and TSENG, C.C. 1973. Induction of pollen plants from anthers of *Triticum aestivum* L. cultured *in vitro*. *Scientia Sinica* 16: N° 1. Feb.
- OUYANG, J. 1986. Induction of pollen plants in *Triticum aestivum*. In: *Haploids in Higher Plants in vitro.* (ed.) Hu Han and Yang Hongyuan, China Academic Publishers Beijing, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New-York, Tokyo. p.: 26-41.
- SCHAEFFER, G.W., BAENZIGER, P.S., and WORLEY, J. 1979. Haploid plant development from anthers and *in vitro* embryo culture of wheat. *Crop Science* 19: 697-702.
- SHIMADA, T. 1981. Haploid plants regenerated from the pollen callus of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Jpn. J. Genet.* 56: 581-588.
- WENZEL, G. and FOROUGHI-WEHR, B. 1984. Anther culture of cereals and grasses. Cap. 37. In: *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Vol. 1. Laboratory Procedures and Their Applications.* (Ed.) Indra K. Vasil. p.:311-325.