

Evaluación de la regeneración de dobles haploides de maíz suave variedad INIAP-101 mediante el cultivo de anteras

Zárate Oviedo Andrea

Escuela Politécnica del Ejército; Instituto Autónomo Nacional de Investigaciones Agropecuarias

RESUMEN

Este estudio involucra la androgénesis *in vitro* de *Zea mays* L. variedad INIAP-101 mediante cultivo de anteras. Se probaron diferentes concentraciones de colchicina (0, 30, 60, 90 mg/L) en el medio YP para la duplicación genómica de las microsporas contenidas en las anteras. Después las anteras fueron transferidas al medio YP sin colchicina pero suplementado con inhibidores de etileno (AgNO_3 y AVG) y modificando sucrosa por maltosa para la formación de callo. En la tercera fase se probó con diferentes reguladores de crecimiento (dicamba, ABA, BAP y 2,4-D) para inducir la embriogénesis. Se encontró que la variedad puede ser inducida hasta un nivel celular, las microsporas cambian su desarrollo gametofítico al esporofítico, mas no son capaces de producir callos, embriones y por tanto no puede regenerar plantas, haciendo al INIAP-101 un maíz no apto para el cultivo de anteras.

Palabras clave: Cultivo de anteras, maíz, doble haploide, colchicina, inhibidores de etileno, reguladores crecimiento.

INTRODUCCIÓN

El cultivo de anteras está guiado a reemplazar los métodos de fitomejoramiento vegetal para la obtención de especies doble haploides que puedan ser parentales de híbridos superiores. Es bien conocido que el maíz es una especie recalcitrante, por lo que su manipulación *in vitro* es posible solamente con variedades específicas.

Desde que Kuo *et al.* (1978) introdujo la técnica el principal reto fue encontrar variedades con capacidad androgénica que

respondan al cultivo de anteras y que sean capaces de generar a partir de una microspora una planta fértil; para ello realizó un amplio screening en el germoplasma de maíz chino, con lo cual se empezó a desarrollar la técnica dependiendo de cada genotipo en estudio. Otros estudios pertenecientes a Petonilo and Jones, 1986; Barnabás et al., 1999; Obert et al., 2005 trabajando también con germoplasma chino, mientras que pocos científicos como Brettell et al., 1981; Ting et al., 1981; Genovesi and Collins, 1982; Nitsch et al., 1982 (citados por Petonilo & Jones, 1986); Saisingtong et al., 1996, lograron reproducir la técnica con maíces no procedentes de China e implementaron pre tratamientos, elementos y compuestos al protocolo original y establecieron ciertas características que se deben tener en cuenta para el éxito de la técnica.

Además del genotipo, los aspectos más importantes son el estado fisiológico de la planta donante, el estadio de las microsporas en el momento de la recolección, el medio de cultivo, el etileno y la presión osmótica generada en el medio, condiciones de pre-tratamiento frío e incubación.

Una microspora de una especie androgénica genera una planta haploide, más con el uso de colchicina en el medio de introducción es posible duplicar los cromosomas al impedir la formación del uso acromático y evitando la anafase. El objetivo de la presente investigación fue evaluar la reacción de las anteras de la variedad INIAP-101 en el cultivo de anteras para la obtención de plántulas doble haploides.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal: El genotipo de maíz INIAP-101 (proveído por el Programa de Maíz del INIAP-Santa Catalina), fue utilizado como planta donante. El maíz fue sembrado en camas de siembra del Departamento Nacional de Biotecnología y en el Sector Oriental en la sección perteneciente al programa de maíz. Los maíces fueron sembrados desde octubre del 2011 hasta octubre del 2012 de manera escalonada, además fueron fertilizados y regados incrementando esto último en la época de verano.

Inducción de doble haploidía: Las espigas fueron recolectadas antes de su emergencia y se verificó el estadio de las microsporas microscópicamente mediante la tinción con azul de metileno y acetocarmín. Las espigas conteniendo microsporas en estado uninucleado fueron esterilizadas con hipoclorito de sodio al 30% por media hora en constante agitación. Las anteras fueron extraídas en condiciones asépticas y colocadas en cajas Petri de vidrio de 60x15 mm con 4 ml de medio YP (Barnabás, 2003), suplementado con 0, 30, 60, 90 mg/L para el doblaje de cromosomas. La colchicina fue disuelta en agua destilada y añadida al medio. Los cultivos fueron incubados en *phytotron* a 80% de humedad y 28°C en completa oscuridad por 3 días.

Formación de callos: Después de los tratamientos con colchicina las anteras fueron transferidas a medio semi-sólido YP sin este compuesto y suplementado con inhibidores de etileno y maltosa como una

fueron incubadas por un mes en las mismas condiciones (Barnabás, 2003). Se manejó un diseño factorial de 2x2.

Formación de embriones: Posterior al mes, las anteras se cambiaron a medios YP con DICAMBA, ABA, 2,4-D, BAP para inducir la formación de tejido embrionario.

Los datos fueron analizados con ANOVA y Duncan; para verificar la normalidad se utilizaron las pruebas de Q-Q plot y Shapiro-Wilks. Con los datos no paramétricos se usó la prueba de Kruskal-Wallis en el programa estadístico InfoStat.

RESULTADOS

Las variables de respuesta analizados fueron la sobrevivencia e hinchazón de las anteras y anteras con microsporas inducidas; otras variables como el porcentaje de callos, callos viables, embriones y embriones viables no fueron analizados debido a su ausencia.

Los resultados del ANOVA para la primera fase mostraron que para sobrevivencia ninguno de los tratamientos resulta significativamente diferente, sin embargo, para la hinchazón y la inducción de microsporas el medio YP+30mg/L de colchicina resulta el más adecuado permitiendo obtener los porcentajes más altos 69,5 y 36,5 respectivamente. En la figura 1 se observan microsporas inducidas e hinchadas a los 3 días en medio de inducción.



Figura 1. (Arriba) anteras hinchadas. (Abajo) anteras hinchadas con microsporas inducidas sobre sus paredes. Medio YP suplementado con colchicina, a los 3 días en fase de inducción.

En esta fase de inducción microscópicamente se observa que las microsporas inducidas se presentan como células oscuras y de mayor tamaño en pocas de ellas también se observó que poseían citoplasma “como estrella” un marcador de respuesta androgénica (figura 2).

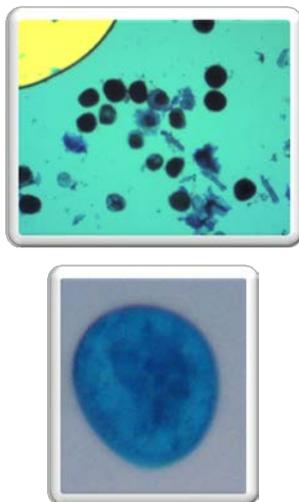


Figura 2. (Derecha) microsporas inducidas (Izquierda) microspora con “citoplasma como estrella”.

Las pruebas de Kruskal-Wallis utilizadas en la fase de formación de callo (al ser los datos no paramétricos) determinaron que los inhibidores de etileno y los azúcares no son significativos entre ellos para la reacción de anteras y microsporas, pero tal como se muestra en la figura 3 al comparar los tratamientos tomando en cuenta sólo los inhibidores de etileno, con un control YP vemos que con estos compuestos es posible mantener la viabilidad, hinchazón y cantidad de microsporas inducidas un mayor tiempo aunque no se dio la formación de tejidos.

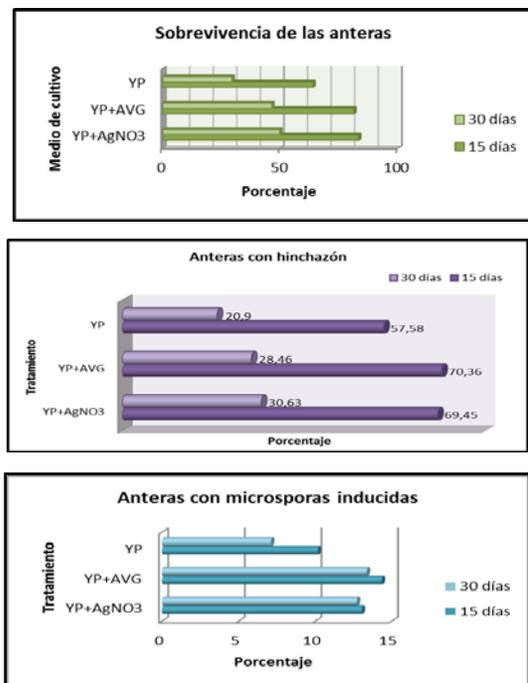


Figura 3. Promedios porcentuales de la sobrevivencia, hinchazón y microsporas inducidas de las anteras en los tratamientos para formación de callo vs. control YP.

Además se realizaron análisis complementarios utilizando reguladores de crecimiento, diferentes medios recomendados para esta técnica y el uso de aditivos orgánicos como carbón activo para promover la generación de callos, la cual no se presentó. También se consideró el uso de un medio líquido YP, el uso de 8-hidroxiquinolina como sustituto para la colchicina, mayores concentraciones de

este último en la fase de inducción, con todas estas pruebas realizadas sólo se destacó el hecho de que con el medio YP-30mg/L de colchicina es con el que mayor reacción de las anteras se obtiene.

En la fase de formación de embriones la sobrevivencia de las anteras disminuyó notablemente al igual que las microsporas inducidas, sin embargo la hinchazón permaneció predominante debido más a la hiper hidratación de los tejidos debido más a su vejez que a la actividad de las microsporas. Los tratamientos no fueron significativos y tampoco se presentó tejido embrionario. Ensayos realizados utilizando material directamente después de la inducción tampoco permitieron la generación de tejidos.

En todo el periodo de la investigación se obtuvo un micro-callo directamente de microsporas acumuladas en el medio, al cual se lo mantuvo en medio YP suplementado con maltosa y AgNO₃ sin presentar ningún crecimiento o desarrollo notable. Al realizar el análisis histológico se encontró que contenía células de tejido meristemático, pro-embrionario y parenquimatoso (figura 4).

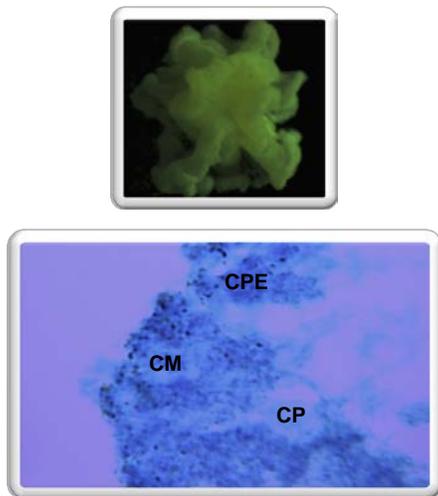


Figura 4. (Derecha) micro-callo (Izquierda) tejido con células meristemáticas (CM), pro-embrionarias (CPE) y parenquimatosas (CP).

DISCUSIÓN

El genotipo de la planta donante es el factor más influyente en el cultivo de anteras, el germoplasma chino se ha encontrado como el más androgénico capaz de cambiar su desarrollo del gametofítico al esporofítico Kuo et al., (1978), En el caso del híbrido INIAP-101 cuyo progenitor es la variedad mexicana "Cacahuazintle" (INIAP, 1984) y por tanto, sin ancestros asiáticos pero con supuesta capacidad androgénica según el estudio de Aguilar en el 2009, se ha encontrado gracias a esta investigación, que es posible su inducción con colchicina en el medio Yu Pei (YP), pero que no es capaz de regenerar plantas, tejidos meristemáticos o embrionarios en respuesta al cultivo de anteras, por lo que es probable que esta variedad no posea los genes que permiten encaminar a la microspora hacia el desarrollo esporofítico.

Como han documentado Barnabás *et al.*, (1999), Saisingtong *et al.*, (1996), Antoine-Michard & Beckert (1997); Marhic *et al.*, (1998); Delalonde & Coumans (1998) y otros científicos que han practicado el cultivo de anteras en maíz, es necesario que el crecimiento de las plantas donadoras sea realizado en cámaras de crecimiento o con programas específicos para el cultivo fitotrófico del maíz (Obert & Barnabás, 2004) y fijada para cada variedad estudiada, para que el maíz se desarrolle correctamente y las microsporas sean viables y respondan fisiológicamente a la androgénesis. Al ser INIAP-101 sembrado en campo, a expensas de anormales sequías y altas temperaturas en las fechas aptas para el cultivo de esta gramínea en el año 2012 debido al cambio climático, las plantas donantes fueron afectaron negativamente tanto en su estado fisiológico como al desarrollo y viabilidad de las microsporas desarrolladas en las anteras, a pesar del continuo riego y cuidado proporcionado, influyendo directamente en los resultados obtenidos.

En INIAP-101 a diferencia de otras variedades de maíz sensiblemente androgénicas, 30 mg/L de colchicina produjeron una mayor cantidad de anteras sobrevivientes, hinchadas y más recalcable, anteras con microsporas inducidas. El porcentaje para este último aspecto fue superior al 30% del total de las anteras introducidas, mientras que con concentraciones superiores, el porcentaje promedio fue del 20% y sin colchicina en el medio, la presencia de anteras inducidas no superó este último porcentaje. La reacción de las anteras y microsporas del maíz INIAP-101 es explicable ya que por experimentación, se ha determinado que la colchicina es capaz de aumentar la inducción de las microsporas hacia el desarrollo esporofítico-embriionario, mejorar la formación de estructuras como embriones y la regeneración de plantas, además de incrementar las frecuencias del doblaje de cromosomas (Saisingtong et al., 1996); y ya que se utilizó una temperatura de 28°C en la incubación, el normal metabolismo de las anteras permitió asimilar de forma más efectiva los 30 mg/L de colchicina que el resto de concentraciones aplicadas, que probablemente sean mejor metabolizadas a menores temperaturas donde las funciones fisiológicas de las microsporas se ven retardadas y requieren de un mayor estímulo (Saisingtong et al., 1996).

Para el cultivo in vitro de anteras se sugiere el uso de medios libres de reguladores de crecimiento (Coumans et al., 1989), debido a la existencia de ácido indol acético (AIA) endógeno, sin embargo, se ha visto que el uso de compuestos como el 2,3,5-ácido triiodobenzóico (TIBA) puede mejorar la respuesta androgénica pero no crearla (Delalonde & Coumans, 1998). En el protocolo del experimento, se utilizó el medio Yu Pei en el cual está incluida esta anti-auxina; a pesar de ello, INIAP-101 no presentó una respuesta androgénica que desemboque en la

formación de tejido ya que ante todo tal como lo explica Tsay, Miao, & Widholm (1986) (citado por Delalonde & Coumans, 1998) el efecto genotípico no puede ser descuidado, puesto que para algunas variedades la respuesta androgénica pudo ser mejorada por un regulador de crecimiento, pero otras permanecieron sin cambios.

CONCLUSIONES

Al ser incapaz de regenerar plantas a partir de microsporas y no presentarse tejido meristemático, callos o embriones en el cultivo de anteras, es posible decir que el maíz INIAP-101 posee una casi nula capacidad androgénica representada por las microsporas inducidas. Está claro que en esta variedad se inicia la androgénesis pero el proceso es obstaculizado por el genotipo y en menor medida por el estado fisiológico de la planta donante; el microcallo pro-embriionario obtenido es una muestra de ello, éste se presentó como un proceso al azar, no significativo dentro del diseño aplicado.

Con la metodología aplicada se pudo inducir a las microsporas de INIAP-101 a cambiar su vía de desarrollo de la gametogénesis a la esporogénesis; un 3,4% del total inducido es capaz de sobrevivir dos meses de incubación con sucesivos cambios de medio sin que se reporte ningún cambio, crecimiento y desarrollo en su morfología o en las agrupaciones que forman sobre las anteras o sobre el medio de cultivo. El protocolo de Barnabás (2003) incluye pre-tratamiento frío y una fase de inducción o pre-cultivo para las anteras, la combinación de ambos procesos son esenciales para obtener un mínimo de androgénesis en INIAP-101. El medio semi-sólido YP de entre todos los aplicados permite mayor respuesta en INIAP-101; el carbón activado, TIBA y demás componentes toman parte dentro de la respuesta de las anteras y microsporas.

El efecto de la colchicina como agente inductor de la doble haploidía no ha podido ser verazmente comprobado debido a que no se llegó a regenerar plantas, sin embargo, este no es tóxico y tiene un efecto sobre la inducción de las microsporas aumentando la respuesta androgénica en concentración de 30mg/L; y considerando que varios autores han comprobado cierto porcentaje de doblaje de cromosomas tras la aplicación de este compuesto, es de suponer que al menos un mínimo de las microsporas inducidas tuvieran doble genoma.

El uso de azúcares e inhibidores de etileno no tienen consecuencias significativas para esta variedad, pero se observó que los medios suplementados con nitrato de plata y maltosa permitieron mayor tiempo de sobrevivencia de las anteras y microsporas. La acción de los compuestos para la formación de embriones sólo puede ser evaluada en la medida de la evolución del proceso androgénico, y ya que este no trascendió del nivel celular, éstos no influyeron sobre la generación de tejidos en las anteras de INIAP-101.

No puede ser establecido un protocolo específico para obtener doble-haploides por medio del cultivo de anteras ya que la respuesta a uno u otro factor dependerá del genotipo en estudio; sin embargo compuestos como la colchicina, inhibidores de etileno, el uso de carbohidratos para regular las condiciones físicas del medio, la aplicación de pre-tratamientos fríos mejoran, en general, la respuesta androgénica aún en variedades recalcitrantes como INIAP-101.

REFERENCIAS

- Aguilar, M. (2009). *Evaluación de la respuesta androgénica de cuatro genotipos de maíz mediante la técnica de cultivo in vitro de anteras*. Escuela Politécnica del Ejército. Sangolquí-Ecuador.
- Antoine-Michard, S., & Beckert, M. (1997). Spontaneous versus colchicine-induced chromosome doubling in maize anther culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*(48), 203–207.
- Barnabás, B. (2003). Anther culture of maize (*Zea mays* L.). En M. Maluszynski, K. Kasha, B. Forster, & I. Szarejko, *Doubled Haploid Production in Crop Plants: A manual* (págs. 103-108). Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Barnabás, B., Obert, B., & Kovács, G. (1999). Colchicine, an efficient genome-doubling agent for maize (*Zea mays* L.) microspores cultured in anthero. *Plant Cell Reports*(18), 858–862.
- Brettell, R., Thomas, E., & Wernicke, W. (1981). Production of haploid maize plant by anther culture. *Maydica*, 26:101–111.
- Coumans, M. P. (1989). Plant Development from Isolated Microspores of *Zea mays* L. *Plant Cell Rep.*, 7, 618-621.
- Delalonde, M., & Coumans, M. (1998). Effect of IAA content Modulators on peroxidase activity and on endogenous IAA during cold pretreatment of maize anthers prior to androgenesis. *Plant Growth Regulation*, 26: 123–130.
- Genovesi, A. D., & Collins, G. B. (1982). In vitro production of haploid plants of corn via anther culture. *Crop Sci*, 22, 1137-1144.
- INIAP, Departamento de Comunicación del INIAP D-5. (1984). *INIAP-101: Una variedad de maíz precoz*. (I. Tufiño, Ed.) Quito, Ecuador.
- Kuo, C., Sun, A., Wang, Y., Gui, Y., Gu, S., & Miao, S. (1978). Studies on induction of pollen plants and androgenesis in maize. *Acta Botánica Sinica* 20, (págs. 204-209).
- Marhic, A., Antoine-Michard, S., Bordes, J., Beckert, M., Pollacsek, M., & Murigneux, A. (1998). Genetic improvement of anther culture response in maize: relationships with molecular, Mendelian and agronomic traits. *Theor Appl Genet*, 97: 520-525.
- Nitsch, C., Andersen, S., Godard, M., Neuffer, M., & Sheridan, W. (1982). Production of haploid plants of *Zea mays* and *Pennisetum* through androgenesis. En D. Earle, & Y. Demarly (Edits.), *Variability in Plants regenerated from Tissue Culture* (págs. 69–91). New York: Praeger Science.
- Obert, B., & Barnabás, B. (2004). Colchicine induced embryogenesis in maize. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Volume 77, Number 3, 282-285.
- Obert, B., Szabo, L., Mityko, J., Pretova, A., & Barnabás, B. (2005). Morphological events

- in cultures of mechanically isolated maize microspores. *In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant*(41), 775–782.
- Petonilo, J., & Jones, A. (1986). Anther culture of elite genotypes of maize. *Crop Science*, 26, 1072-1074.
- Petonilo, J., Jones, A., & Thompson, S. (1986). Selection for increased anther culture response in maize. *Theoretical and Applied Genetics*(176), 157-159.
- Saisintong, S., Schmid, J., Stamp, P., & Büter, B. (1996). Colchicine-mediated chromosome doubling during anther culture of maize (*Zea mays* L.). *Theor Appl Genet*, 92, 1017–1023.
- Ting YC, Y. M. (1981). Improved anther culture of maize (*Zea mays*). *Plant Sci Lett*, 23:139–145.
- Tsay, H., Miao, S., & Widholm, J. (1986). Factors affecting haploid plant regeneration from maize anther culture. *Plant Physiol*, 126: 33–4.