

Estudios preliminares sobre el empleo de polen irradiado en la obtención de plantas haploides de girasol

Nazario MUÑOZ-FERNÁNDEZ y José M^a DURAN-ALTISENT

Departamento de Producción Vegetal: Fitotecnia. Universidad Politécnica de Madrid.
28040 Madrid (España)

Resumen

La radiación gamma, a las dosis ensayadas (0-800 Gy), no inhibió la germinación del polen *in vitro* ni *in situ*, pero disminuyó su poder de fecundación. El porcentaje de embriones obtenidos con polen no irradiado, irradiado a 50 Gy e irradiado a 100 Gy fue del 80 %, 10 % y 0 % respectivamente. El polen de girasol puede ser considerado muy sensible a la radiación gamma.

A los 24 días de la polinización se encontraron dos clases de embriones con tamaños muy distintos. Tanto los embriones grandes como los pequeños se pusieron a germinar en un medio artificial. Las plántulas desarrolladas a partir de embriones grandes resultaron ser diploides. Entre las plántulas obtenidas de embriones pequeños una fue haploide.

Introducción

En el género *Helianthus* se han obtenido plántulas haploides tanto por cultivo *in vitro* de anteras como por cultivo de ovarios y primordios seminales (YANG *et al.* 1990), pero se trata de técnicas laboriosas, con una frecuencia de obtención de plántulas haploides baja y en muchos casos dependientes del genotipo. El cultivo de microsporas aisladas también ha sido ensayado en girasol, pero con escasos resultados hasta el momento (GÜREL *et al.* 1991, ZHONG 1992).

Combinando la polinización con polen irradiado con rayos- γ y el rescate *in vitro* de los embriones producidos se han regenerado plantas haploides en una docena de especies (DORÉ 1989, RAQUIN 1990, MEYNET *et al.* 1994). En esta comunicación se presentan los estudios realizados sobre el efecto de la radiación gamma en la germinación y capacidad de fecundación del polen de girasol y la posibilidad de emplear polen irradiado para obtener plantas haploides.

Material y Métodos

El polen, procedente de plantas de girasol de los híbridos Toledo 2 (Arlesa Semillas) y Topflor (Agrar Semillas) cultivadas al aire libre, fue recogido entre 9 y 11 h (a.m.) de flores recién abiertas, tamizado, desecado en gel de sílice y conservado a 4 °C. El polen fue

irradiado con una bomba de ^{60}Co a una intensidad de $10.24 \text{ Gy min}^{-1}$. Con el polen irradiado se polinizaron capítulos de la línea androestéril CMS-300 previamente embolsados para evitar polinizaciones no deseadas.

La germinación *in vitro* del polen irradiado se realizó sobre papel de celofán según la técnica de ALEXANDER Y GANESHAN (1989), empleando un medio de cultivo compuesto por 400 g L^{-1} de sacarosa, 30 mg L^{-1} de ácido bórico, 600 mg L^{-1} de nitrato cálcico y pH ajustado a 9 con KOH (MUÑOZ-FERNÁNDEZ 1995). La germinación se evaluó a las 24 horas, observando 300 granos de polen en cada tratamiento. El control de la germinación del polen irradiado sobre el estigma se realizó a las 24 horas de la polinización, empleando la técnica de MARTIN (1959). Para conocer las diferencias entre poblaciones y realizar comparaciones múltiples se empleó el test G según lo indicado por SOKAL y ROHLF (1969) para poblaciones binomiales y multinomiales.

Tres días después de la polinización los ovarios de flores polinizadas con polen irradiado fueron puestos en cultivo siguiendo un protocolo diseñado para el cultivo de ovarios no polinizados de girasol (GÉLÉBART y SAN 1987, MUÑOZ-FERNÁNDEZ 1995).

Veinticuatro días después de la polinización se extrajeron los embriones existentes y se hicieron germinar en un medio sólido compuesto por los macroelementos de MURASHIGE Y SKOOG (1962) diluidos a la mitad, los microelementos señalados por éstos mismos autores, 6 g L^{-1} de Phytigel (Sigma) y una concentración variable ($20\text{-}60 \text{ g L}^{-1}$) de sacarosa según el tamaño del embrión.

Se empleó orceína acética para determinar el número de cromosomas en los meristemos radiculares de las plántulas obtenidas *in vitro*.

Resultados y Discusión

La radiación no alteró de forma significativa ($p = 0.05$) la germinación del polen *in vitro* (Tabla 1), a pesar de que las dosis poco elevadas tuvieron un ligero efecto promotor y las dosis mayores una tendencia a inhibir la germinación. La germinación sobre el estigma tampoco fue inhibida por los rayos- γ (Tabla 2). En todos los casos se encontraron granos de polen germinados sobre el estigma, con independencia de la dosis de irradiación, e incluso se observó una disminución del porcentaje de estigmas sin ningún grano de polen germinado en su superficie al aumentar la irradiación.

La radiación gamma, a las dosis ensayadas, no redujo significativamente la emisión del tubo polínico, pero en cambio impidió la fecundación normal del saco embrionario. El porcentaje de ovarios con embriones en su interior disminuyó del 80 % al emplear polen no irradiado al 10 % con polen irradiado con 50 Gy, no obteniéndose ningún embrión para dosis de irradiación superiores (Tabla 3). Además, el empleo de polen irradiado ocasionó la aparición de desarrollos anormales del primordio seminal (sin embrión visible pero con una estructura similar al endospermo), posiblemente ocasionados por una fecundación parcial del saco embrionario similar a la observada en endivia (*Cichorium intybus* L) por LEVIEIL (1987). Al aumentar la dosis de irradiación la frecuencia de anomalías disminuyó prácticamente a cero.

En comparación con otras especies el polen de girasol mostró una elevada sensibilidad a los rayos- γ . En girasol 100 Gy fueron suficientes para inhibir completamente la formación de embriones, mientras que en endivia se precisaron 360 Gy (LEVIEIL 1987) y en peral con 500 Gy y en rosal con 1500 Gy se obtuvieron embriones (BOUVIER *et al.* 1993, MEYNET *et al.* 1994).

De forma similar a lo que ocurría en la planta, mediante el cultivo *in vitro* de ovarios no se obtuvieron embriones de las flores polinizadas con polen irradiado con 100 o más Gy (Tabla 4). De los 4 embriones obtenidos con polen irradiado a 50 Gy solo se pudo determinar la dotación cromosómica en uno de ellos, resultando ser diploide. El porcentaje de embriones obtenidos, tanto de flores polinizadas con polen no irradiado como de flores polinizadas con polen irradiado a 50 Gy, es mucho menor cuando los ovarios son puestos en un medio artificial que cuando son dejados madurar en la planta. Será necesario mejorar las condiciones de cultivo y repetir las experiencias llevadas a cabo para poder evaluar correctamente el potencial de ésta técnica para la obtención de plantas haploides de girasol.

Veinticuatro días después de la polinización con polen irradiado se extrajeron del ovario y se pusieron en cultivo tanto los embriones bien desarrollados como los embriones poco desarrollados. Todos los embriones grandes en los que se pudo determinar su dotación cromosómica resultaron ser diploides. De los dos embriones poco desarrollados obtenidos con polen irradiado a 50 Gy en uno no se pudo determinar su dotación cromosómica y el otro resultó ser haploide. Los resultados no permiten sacar conclusiones acerca de la inducción de la ginogénesis con polen irradiado en girasol, pero la obtención de una plántula haploide con ésta técnica es un aliciente para continuar con su estudio.

Conclusiones

1. La germinación del polen de girasol, tanto *in vitro* como *in situ*, no fue afectada significativamente por la radiación gamma a las dosis ensayadas (50 - 800 Gy).
2. El poder de fecundación del polen de girasol fue afectado de forma importante por los rayos- γ . En la polinización con polen irradiado con dosis superiores a 100 Gy no se obtuvieron embriones.
3. El girasol, en lo referente a la capacidad de fecundación del polen, puede ser considerado como una especie muy sensible a la radiación gamma.
4. Creemos que sería interesante continuar con el estudio del rescate *in vitro* de los embriones de pequeño tamaño obtenidos empleando polen irradiado como técnica para obtener plantas haploides de girasol.

Bibliografia

- ALEXANDER, M.; GANESHAN, S. (1989). An improved cellophane method for *in vitro* germination of recalcitrant pollen. *Stain Technology*, 64: 225-227.
- BOUVIER, L.; ZHANG, Y.; LESPINASSE, Y. (1993). Two methods of haploidization in pear, *Pyrus communis* L.: greenhouse seedling selection and *in situ* parthenogenesis induced by irradiated pollen. *Theoretical and Applied Genetics*, 87: 229-232.
- DORÉ, C. (1989). Obtention de plantes haploïdes de chou cabus (*Brassica oleracea* L. ssp. *capitata*) après culture *in vitro* d'ovules pollinisés par du pollen irradié. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris*, 309: 729-734.
- GÉLÉBART, P.; SAN, L. (1987). Obtention de plantes haploïdes par culture *in vitro* d'ovaires et d'ovules non fécondés de tournesol (*Helianthus annuus* L.). *Agronomie*, 7: 81-86.
- GÜREL, A.; NICTERLEIN, K.; FRIEDT, W. (1991). Shoot regeneration from anther culture of sunflower (*Helianthus annuus*) and some interspecific hybrids as affected by genotype and culture procedure. *Plant Breeding*, 106: 68-76.
- LEVIEIL, C. (1987). Etude cytologique et génétique de la reproduction sexuée chez la chicorée (*Cichorium intybus* L.). Tesis Doctoral, Université de Paris Sud, Paris.
- MARTIN, F. (1959). Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. *Stain Technology*, 34: 125-128.
- MEYNET, J.; BARRADE, R.; DUCLOS, A.; SIADOUS, R. (1994). Dihaploid plants of roses (*Rosa x hybrida* cv 'Sonia') obtained by parthenogenesis induced using irradiated pollen and *in vitro* culture of immature seeds. *Agronomie*, 2: 169-175.
- MUÑOZ-FERNÁNDEZ, N. (1995). Obtención de haploides ginogenéticos en girasol (*Helianthus annuus* L.). Tesis Doctoral, Universidad Politécnica de Madrid, Madrid.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.
- RAQUIN, C. (1990). Association de l'irradiation des gamétophytes et de la culture *in vitro* pour l'haploïdisation et les transferts nucléocytoplasmiques. C. Doré (ed.), *Cinquantenaire de la Culture in vitro chez les Végétaux*. INRA, Paris, pp. 187-194.
- SOKAL, R.; ROHLF, F. (1969). *Biometry*. W.H. Freeman, New York.
- YANG, H.; YAN, H.; ZHOU, C. (1990). *In vitro* production of haploids in *Helianthus*. Y.P.S. Bajaj (ed), *Biotechnology in Agriculture and Forestry. 10: Legumes and Oilseed Crops* I. Springer-Verlag, Berlin, pp. 472-484.
- ZHONG, D. (1992). Culture *in vitro* d'anthères et de microspores isolées de tournesol cultivé (*Helianthus annuus* L.). Tesis Doctoral, Université Montpellier II, Montpellier.

Tabla 1. Germinación *in vitro* de polen de girasol irradiado con rayos- γ . Los valores seguidos por la misma letra no presentan diferencias significativas ($p = 0.05$).

Irradiación (Gy)	Germinación (%)
0	3.2 ^{ab}
50	4.0 ^{ab}
100	4.5 ^a
200	3.5 ^{ab}
400	2.5 ^{ab}
800	1.5 ^b

Tabla 2. Germinación *in situ* de polen de girasol irradiado con rayos- γ . Se indica el número de estigmas observados (N°).

Irradiación (Gy)	N°	Estigmas ⁽¹⁾ (%)				DS ⁽²⁾
		0	1-5	6-15	>15	
0	78	12	41	37	10	a
50	72	8	46	28	18	a
100	84	5	32	27	36	ab
200	82	5	40	41	13	a
400	84	4	40	30	26	ab
800	68	1	18	37	44	b
NP ⁽³⁾	82	100	0	0	0	

¹ Porcentaje de estigmas que presentan 0, 1 a 5, 6 a 15 o más de 15 granos de polen germinados en su superficie a las 24 h de la polinización.

² Los niveles de irradiación representados con la misma letra no muestran diferencias significativas ($p = 0.05$).

³ Estigmas no polinizados

Tabla 3. Porcentaje de ovarios de girasol que, a los 24 días de la polinización con polen irradiado con rayos- γ , contienen: A, un embrión bien desarrollado; B, un embrión muy poco desarrollado; C, no contienen embrión, pero existe un desarrollo anormal del primordio seminal; D, no contienen ningún tipo de desarrollo.

Irradiación (Gy)	Ovarios (%)			
	A	B	C	D
0	78	2	0	20
50	6	4	46	44
100	0	0	46	54
200	0	0	32	68
400	0	0	18	82
800	0	0	4	96
NP ⁽¹⁾	0	0	0	100

¹ Ovarios de flores no polinizadas

Tabla 4. Número de embriones (E) obtenidos por cultivo *in vitro* de ovarios de girasol (Ov) de flores no polinizadas (NP) y de flores polinizadas con polen irradiado.

Irradiación (Gy)	Ov	E	(E/Ov)x100
0	168	58	34.5
50	194	3	1.5
100	109	0	0.0
200	196	0	0.0
400	155	0	0.0
800	167	0	0.0
NP	192	0	0.0