



**UNIVERSIDAD DE CORDOBA**

Departamento de Genética

**PROTOCOLO PARA LA PRODUCCIÓN DE PLANTAS  
DIHAPLOIDES DE TRIGO DURO MEDIANTE  
CRUZAMIENTOS CON MAÍZ**

TESIS DOCTORAL

Doctorando:

Carmen García Llamas

Director:

Juan J. Ballesteros Ruiz

Tutor:

Antonio Martín Muñoz

2005



## ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO I	11
1. INTRODUCCIÓN GENERAL:	13
1.1. Importancia económica del trigo duro y usos del mismo.	16
1.2.- Mejora Genética del trigo: Interés de los dihaploides.	20
1.3. Técnicas para producir plantas dihaploides de trigos.	24
1.3.1. Embriogénesis de polen.	24
1.3-2.- Hibridación interespecífica.	25
1.4. La técnica de los cruzamientos trigo × maíz.	27
1.4.1. Siembra y cultivo de las plantas de trigo duro.	39
1.4.2. Siembra y cultivo de los polinizadores.	30
1.4.3. Castración de las flores de trigo.	31
1.4.4. Cultivo de espigas castradas.	33
1.4.5. Polinización de las flores de trigo.	34
1.4.6. Aplicación de auxinas.	35
1.4.7. Rescate de los embriones haploides.	38
1.4.8. Cultivo in-vitro de los embriones haploides.	40
1.4.9. Trasplante a maceta y cultivo de plantas haploides.	41
1.4.10. Duplicación cromosómica de las plantas haploides.	42
1.5. Objetivos.	44

CAPÍTULO II: Low relative humidity increases haploid production in durum wheat × maize crosses. 47

Resumen. 51

Abstract. 53

Introduction. 55

Plant materials. 57

Emasculation and pollination of wheat spikes. 57

Auxin treatment of pollinated spikes. 58

Embryo rescue and culture. 58

Results and Discussion. 59

CAPÍTULO III: Effect of maize and millet pollinators on durum wheat haploid production. 65

Resumen. 67

Abstract. 69

Introduction. 71

Plant materials. 72

Crosses and culture of detached tillers. 73

Experimental design and statistical analysis. 74

Results and Discussion. 74

CAPÍTULO IV. Differences among auxin treatments on haploid production in durum wheat × maize crosses.	79
Resumen.	83
Abstract.	85
Introduction.	87
Materials and methods.	89
<i>Plant materials.</i>	89
<i>Crosses and culture of detached tillers.</i>	90
<i>Auxin treatments and embryo rescue</i>	90
<i>Statistical analysis.</i>	90
Results.	91
Discussion.	92
 CAPÍTULO V. Producción de dihaploides de trigo duro y harinero para un programa comercial de mejora.	 97
Introducción.	99
Materiales y métodos.	100
Genotipos y condiciones de cultivo.	100
Cruzamientos.	102
Aplicación de auxinas.	103
Rescate de embriones.	103

Tratamiento con colchicina.	104
Recolección de granos dihaploides.	105
Análisis de datos.	105
Resultados y discusión.	106
CAPÍTULO VI. Conclusiones generales.	123
BIBLIOGRAFÍA.	127

## ÍNDICE DE TABLAS

### CAPÍTULO I

<u>Tabla 1.</u> - Especies del género Triticum.	15
<u>Tabla 2.</u> - Producciones mundiales de trigo duro.	17
<u>Tabla 3.</u> - Producciones de trigo duro en la UE.	18
<u>Tabla 4.</u> - Comercio Europeo de trigo duro.	19
<u>Tabla 5.</u> - Comercio nacional de trigo duro.	19
<u>Tabla 6.</u> - Tratamientos hormonales aplicados por diferentes investigadores.	37
<u>Tabla 7.</u> - Rendimientos obtenidos en la producción de plantas haploides y dihaploides de trigos duros por diferentes investigadores.	45

### CAPÍTULO II

<u>Table 1.</u> - Mean values of caryopses, embryos and haploid plants per spike in 38 F <sub>3</sub> lines, from eight crosses of durum wheat, pollinated with maize under two humidity regimes (LHR, HHR).	61
--	----

### CAPÍTULO III

Table 1.- Results from the crosses of two durum wheat lines with four sources of fresh maize pollen. 77

Table 2.- Results from crosses of two durum wheat lines with four sources of frozen pearl millet pollen 78

### CAPÍTULO IV

Table 1.- Mean numbers of caryopses, embryos and haploid plants produced in the three durum wheat lines following different auxin treatments 95

### CAPÍTULO V

Tabla 8.- Producción de dihaploides de trigo harinero. 109

Tabla 9.- Producción de dihaploides de trigo duro. 110

Tabla 10.- Presupuesto para la obtención de plantas dihaploides de trigo. 111

Tabla 11.- Calendario propuesto para producir trigos dihaploides en Andalucía. 121



## ÍNDICE DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

<u>Figura 1.-</u> Filogenia de los trigos.	14
<u>Figura 2.-</u> Producción de plantas dihaploides de trigo por el método del maíz.	28
<u>Figura 3.-</u> Trigos parentales en invernadero.	29
<u>Figura 4.-</u> Invernadero climatizado.	29
<u>Figura 5.-</u> Maíz sembrado escalonadamente en invernadero.	30
<u>Figura 6.-</u> Espiguilla de trigo.	31
<u>Figura 7.-</u> Componentes de un antecio de trigo.	31
<u>Figura 8.-</u> Flor de trigo abierta.	32
<u>Figura 9.-</u> Espiga de trigo duro castrada.	32
<u>Figura 10.-</u> Cultivo de tallos en cámara.	33
<u>Figura 11.-</u> Granos con endospermo (autofecundaciones ).	39
<u>Figura 12:</u> Granos sin endospermo.	39
<u>Figura 13.-</u> Embrión diploide (autofecundación).	39
<u>Figura 14.-</u> Embrión haploide	39
<u>Figura15.-</u> Embriones haploides soldados por el escutelo.	39
<u>Figura 16.-</u> Embrión haploide con dos coleótilos.	39
<u>Figura 17.-</u> Cultivo <i>in vitro</i> de embriones haploides.	40

<u>Figura 18.</u> - Plántulas haploides en placa Petri.	40
<u>Figura 19.</u> - Trasplante de plantas haploides a maceta.	41
<u>Figura 20.</u> - Aplicación de colchicina con vial invertido.	43
<u>Figura 21.</u> - Espigas con algunos granos dihaploides.	43

## CAPITULO V

<u>Figura 22.</u> - Habitáculo en invernadero para el maíz.	101
<u>Figura 23.</u> - Esquema del programa de mejora propuesto.	119

## **CAPÍTULO I**



## 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

El trigo (*Triticum spp.*) es uno de los primeros cultivos domesticados y durante 8000 años ha sido la base alimenticia de los habitantes de Europa, del oeste de Asia y del norte de África (Curtis, 2002). Sus granos son ricos en almidón y contienen de media entre el 10% y el 15% de proteínas. Además, una vez secos, se recolectan fácilmente y se pueden conservar durante un largo periodo de tiempo sin que ello haga perder sus cualidades y valores alimenticios.

Actualmente hay descritas seis especies de trigo: dos diploides ( $2n=2x=14$ ), dos tetraploides ( $2n=4x=28$ ) y dos hexaploides ( $2n=6x=42$ ) (Tabla 1), pero el trigo que se cultiva en el mundo pertenece casi en su totalidad a dos subespecies: *Triticum turgidum* L. (Thell). ssp. *durum* (Desf.) Husn. ( $2n=4x=28$ ; AABB) conocido como trigo duro y *Triticum aestivum* L. ssp. *aestivum* ( $2n=6x=42$ ; AABBDD) conocido como trigo común o harinero. Ambos, así como los demás trigos tetraploides y hexaploides, son aloploidos, es decir, se han producido por hibridación interespecífica y posterior duplicación cromosómica del híbrido (Figura 1). En concreto, los trigos duros (*T. turgidum*) se originaron del cruzamiento entre dos especies diploides silvestres: una especie cercana a *Aegilops speltoides* Tausch que les aportó el genoma B y *Triticum urartu* Tum. ex Gand. que les aportó el genoma A. Posteriormente los trigos harineros (*T. aestivum*) se originaron del cruzamiento de trigos duros cultivados con *A. tauschii* Cosson que les aportó el genoma D.

Figura 1.- Filogenia de los trigos. (Gill and Friebe, 2002).

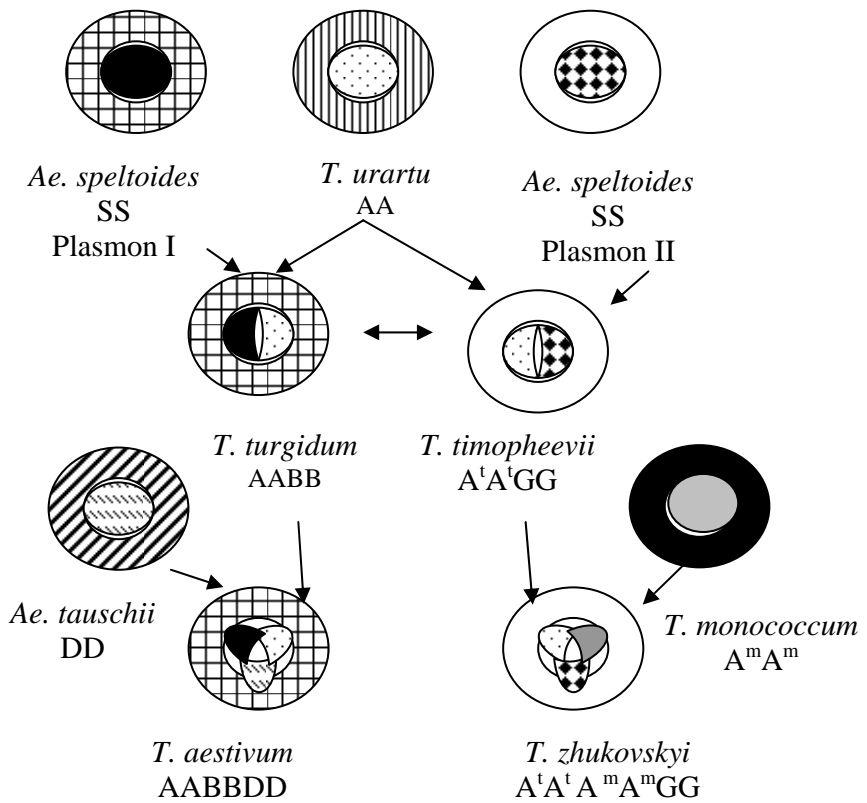


Tabla 1.- Especies del género *Triticum* y su constitución genómica (Van Slageren, 1994).

Espece y subespece	Nivel ploídico	
<i>Triticum monococcum</i> L.	Diploide $2n=2x=14$	
ssp. <i>aegilopoides</i> (Link) Thell.		Silvestre
ssp. <i>monococcum</i>		Cultivado, grano vestido
<i>Triticum urartu</i> Tum. ex Gand.	Diploide $2n=2x=14$	Silvestre
<i>Triticum timopheevii</i> (Zhuk.) Zhuk.	Tetraploide $2n=4x=28$	
ssp. <i>armeniicum</i> (Jakubz.) van Slageren		Silvestre
ssp. <i>timopheevii</i>		Cultivado, grano vestido
<i>Triticum turgidum</i> L. (Thell.)	Tetraploide $2n=4x=28$	
ssp. <i>diccoides</i> (Körn. ex Asch. & Graebn.) Thell.		Silvestre
ssp. <i>dicoccon</i> (Schrank) Thell.		Cultivado, grano vestido
ssp. <i>paleocolchicum</i> (Men.) A. Löve & D. Löve		Cultivado, grano vestido
ssp. <i>parvicoccum</i> Kislev		Cultivado, grano desnudo
ssp. <i>durum</i> (Desf.) Husn.		Cultivado, grano desnudo
ssp. <i>turgidum</i>		Cultivado, grano desnudo
ssp. <i>polonicum</i> (L.) Thell.		Cultivado, grano desnudo
ssp. <i>turanicum</i> (Jakubz.) A. Löve & D. Löve		Cultivado, grano desnudo
ssp. <i>carthlicum</i> (Nevski) A. Löve & D. Löve		Cultivado, grano desnudo
<i>Triticum zhukovskii</i> Men. & Er.	Hexaploide $2n=6x=42$	Cultivado, grano vestido
<i>Triticum aestivum</i> L.	Hexaploide $2n=6x=42$	
ssp. <i>spelta</i> (L.) Thell		Cultivado, grano vestido
ssp. <i>macha</i> (Dek. & Men.) MK		Cultivado, grano vestido
ssp. <i>aestivum</i>		Cultivado, grano desnudo
ssp. <i>compactum</i> (Host) MK		Cultivado, grano desnudo
ssp. <i>sphaerococcum</i> (Percival) MK		Cultivado, grano desnudo

La adición del genoma D a los trigos duros originó una nueva especie con mayor adaptabilidad que permitió ampliar el área de cultivo del trigo. Hoy en día el trigo harinero se cultiva en prácticamente todo el mundo, desde los límites del Ártico hasta las proximidades del Ecuador y desde el nivel del mar hasta los 3.000 m de altitud que se alcanzan en Kenia o los 4.570 m en el Tíbet (Curtis, 2002). A diferencia del trigo harinero, el trigo duro es un cultivo de gran importancia en el área Mediterránea, donde se sitúan más de la mitad de las hectáreas dedicadas a este cereal en el mundo

### *1.1. Importancia económica del trigo duro y usos del mismo*

En el año 2004 el trigo continuó siendo el cereal más cultivado en el mundo (217 millones de hectáreas) y fue el segundo en producción (624 millones de toneladas métricas; Mt), detrás del maíz (705 Mt) y delante del arroz (608 Mt) (Fuente: FAOSTAT 2004). De la producción total de trigo (624 Mt) 40.4 Mt correspondieron a trigo duro (Tabla 2).

La Unión Europea (UE) es el primer productor de trigo duro a nivel mundial, seguida de Canadá, Turquía, Estados Unidos, Marruecos, Argelia y Túnez (Tabla 2). En la UE la producción se concentra en cuatro países: Italia, España, Francia y Grecia. En 2004 la UE produjo 11.4 Mt, el 28% de la producción mundial, de las cuales 2.8 Mt correspondieron a España y 1.7 Mt a Andalucía (Tabla 3).



**Tabla 2.-** Producciones mundiales de trigo duro (millones de toneladas métricas) (Fuente: International Grains Council, EUROSTAT y COCERAL).

<b>Países</b>	<b>Años</b>			
	<b>2001</b>	<b>2002</b>	<b>2003</b>	<b>2004</b>
<b>UE</b>	8.5	9.7	8.2	11.4
<b>Canadá</b>	3.0	3.9	4.3	4.9
<b>US</b>	2.3	2.2	2.6	2.4
<b>Turquía</b>	3.0	3.0	3.2	3.2
<b>Argelia</b>	1.2	1.0	1.8	1.9
<b>Marruecos</b>	1.0	1.0	1.8	2.0
<b>Túnez</b>	0.9	0.4	1.6	1.2
<b>Otros</b>	13.4	14.1	14.2	13.4
<b>Mundial</b>	32.3	35.3	37.7	40.4

**Tabla 3.- Producciones de trigo duro en la Unión Europea (UE)**  
(miles de toneladas métricas) (Fuente: EUROSTAT y COCERAL).

<b>Países</b>	<b>Años</b>			
	<b>2001</b>	<b>2002</b>	<b>2003</b>	<b>2004</b>
<b>Italia</b>	3624	4183	3500	5000
<b>España</b>	1899	2073	2249	2742
<b>Francia</b>	1339	1614	1428	2058
<b>Grecia</b>	1429	1402	840	1300
<b>Portugal</b>	103	348	175	194
<b>Otros</b>	76	34	101	134
<b>Total UE-15</b>	8470	9713	8293	11428
<b>Andalucía</b>	1300	900	1300	1700

Tabla 4.- Comercio Europeo de trigo duro (miles de toneladas métricas). Fuente: M.A.P.A.  
<http://www.mapya.es/es/agricultura/pags/cereales/Europea/TrigoDuro.htm>

<b>Campaña</b>	<b>Producción</b>	<b>Importaciones</b>	<b>Exportaciones</b>	<b>Consumo</b>
<b>1999/00</b>	8.378,00	757,00	873,00	7.170,00
<b>2000/01</b>	9.680,00	1.045,00	1.235,00	7.808,00
<b>2001/02</b>	8.344,00	1.306,00	1.395,00	7.352,00
<b>2002/03</b>	9.801,00	693,00	2.288,00	6.737,00

Tabla 5.- Comercio nacional de trigo duro (miles de toneladas métricas). Fuente: M.A.P.A.  
<http://www.mapya.es/es/agricultura/pags/cereales/Nacional/TrigoDuro.htm>

<b>Campaña</b>	<b>Producciones</b>	<b>Importaciones</b>	<b>Exportaciones</b>	<b>Consumo</b>
<b>1999/00</b>	726,40	392,50	337,90	831,50
<b>2000/01</b>	1.916,80	226,30	859,90	1.108,20
<b>2001/02</b>	1.837,40	180,00	875,00	1.217,40
<b>2002/03</b>	2.073,20	236,83	1.489,20	820,83

El consumo de trigo duro en la UE está estabilizado en torno a 7Mt y el balance comercial (exportaciones-importaciones) depende de los años, aunque en general las exportaciones igualan o superan a las importaciones (Tabla 4). El consumo español ha oscilado en los últimos años entre 0.83 y 1.2 Mt y las exportaciones han superado ampliamente a las importaciones (Tabla 5).

Los países europeos y americanos usan el trigo duro principalmente para la producción de pasta, mientras que en Oriente Próximo y en el Norte de África la mitad del consumo es para la fabricación del pan local y el resto se usa para la fabricación de pastas, cuscus y otros productos.

### *1.2.- Mejora Genética del trigo: Interés de los dihaploides*

En plantas autógamas como el trigo un cultivar consiste generalmente en un sólo genotipo homocigótico. En los programas de mejora de estas especies la homocigosis se obtiene de un modo automático, ya que en cada generación de autofecundación o retrocruzamiento, si el parental recurrente es homocigótico, se reduce a la mitad el nivel de heterocigosis.

El método genealógico es el usual en la mejora de plantas autógamas. Se comienza con la selección de parentales y los cruzamientos entre ellos. Las plantas  $F_1$  resultantes se autofecundan para obtener grandes poblaciones  $F_2$  (2000-3000 plantas). De cada población  $F_2$  se seleccionan entre 50-100 espigas y la descendencia de cada una de ellas constituye una familia  $F_3$ . En la generación  $F_3$  se seleccionan las mejores familias y dentro

de estas familias se seleccionan las mejores plantas. El proceso de selección, primero familiar y después intrafamiliar, se repite normalmente hasta la generación  $F_5$ . En la generación  $F_6$  el nivel de homocigosis es tan alto que no cabe esperar respuesta a la selección intrafamiliar.

A partir de la generación  $F_6$ , y hasta las generaciones  $F_{10}$  o  $F_{11}$ , sólo se realiza selección familiar y se lleva a cabo un proceso de depuración para alcanzar el alto grado de uniformidad que se exige para el registro de variedades. La selección de las mejores familias se suele realizar en cada generación basándose en ensayos multilocales de rendimiento, calidad, etc. El aumento en la uniformidad se consigue, en las sucesivas generaciones, multiplicando cada familia seleccionada con la descendencia de una única planta.

De lo expuesto se desprende que la mejora de plantas autógamas es un proceso largo que necesita entre diez y doce generaciones de autofecundación para obtener una variedad. Este proceso se puede acortar en el tiempo obteniendo y evaluando más de una generación por año o bien mediante la producción de plantas dihaploides.

En muchos programas de mejora de trigos se obtienen dos generaciones por año sembrando en dos localidades con diferente climatología. En una localidad las plantas se desarrollan con el ciclo normal de cultivo (otoño-invierno-primavera o invierno-primavera) y en la otra se desarrollan durante el verano-otoño. Los programas de mejora se pueden acelerar aún más en ambientes controlados, obteniéndose tres o cuatro generaciones por año. En cualquier caso, hay que sembrar inmediatamente después de cosechar, lo que acarrea dos problemas fundamentales: por un lado se selecciona acortando el periodo de dormancia, con lo que se favorece

que los granos maduros germinen en las espigas en condiciones de alta humedad. Por otro lado el método plantea problemas con los trigos que tienen requerimientos de vernalización.

La otra alternativa para reducir la duración de los programas de mejora es la producción de plantas dihaploides. Un dihaploide es una planta obtenida de la duplicación cromosómica de una planta haploide y por lo tanto es totalmente homocigótica. Las técnicas para producir dihaploides permiten obtener líneas puras de un parental heterocigótico en una sola generación, por lo que, dependiendo de la generación que se utilice como parental de los dihaploides, se pueden obtener variedades en 4-6 años: un año para el cultivo de la generación parental y la producción de los dihaploides, otro para su multiplicación y dos años de ensayos multilocales.

Los dihaploides se pueden producir en cualquier generación filial y el ahorro de tiempo es máximo si se producen de plantas  $F_1$ . Sin embargo, con este sistema necesitamos grandes poblaciones para poder encontrar plantas con las combinaciones génicas deseadas. Por ejemplo, si las plantas  $F_1$  portan  $n$  genes independientes de interés en heterocigosis, la proporción de dihaploides con la combinación génica deseada será  $(1/2)^n$ . Con  $n=10$  sólo 1 de cada 1024 dihaploides tendría la combinación génica buscada. Esta proporción es aún menor cuando existen ligamientos indeseados entre genes.

Teniendo en cuenta esto y que la producción de dihaploides es mucho más cara que la autofecundación, el número de cruzamientos que se pueden manejar en los programas de mejora se reduce considerablemente. Este problema se puede obviar utilizando como parentales de los dihaploides plantas  $F_3$  o  $F_4$  seleccionadas. Con esta estrategia la ganancia en tiempo es menor pero tiene dos ventajas importantes: no se reduce el número de

cruzamientos que se manejan y aumentamos los ciclos de recombinación y, con ello, las posibilidades de romper los ligamientos indeseados entre genes.

Además del ahorro de tiempo la producción de dihaploides aumenta la eficiencia en la selección, pues facilita la identificación de los genotipos superiores. En el caso de caracteres cualitativos controlados por alelos recesivos aumenta la frecuencia de los genotipos buscados. Así, en una familia  $F_x$  obtenida por autofecundación de una planta  $F_{x-1}$ , la proporción de individuos que portan los alelos recesivos deseados es  $(1/4)^n$ , siendo  $n$  el número de loci independientes que están en heterocigosis en la planta  $F_{x-1}$ . En cambio, en una población de dobles haploides derivada del mismo parental  $F_{x-1}$ , esta frecuencia es mucho más alta,  $(1/2)^n$ .

Para caracteres cuantitativos la ventaja principal de los dobles haploides radica en que es mayor la varianza genética aditiva que en sus correspondientes familias obtenidas por autofecundación (Snape, 1989). El resultado es mayor posibilidad de discriminación entre genotipos y mayor respuesta a la selección.

### *1.3. Técnicas para producir plantas dihaploides de trigos*

Básicamente hay dos grupos de técnicas para producir plantas dihaploides de trigo: la embriogénesis de polen y la hibridación interespecífica.

#### 1.3.1. Embriogénesis de polen

La embriogénesis de polen es la producción de plantas haploides a partir de gametos masculinos-microsporas- cultivadas *in vitro*. Este proceso incluye los cultivos de anteras y de microsporas aisladas. El estadio de desarrollo de las microsporas y la aplicación de un pretratamiento de estrés son esenciales para cambiar el patrón de desarrollo de las microsporas de gametofítico a esporofítico (Liu et al., 2002; Zheng, 2003). Después del pretratamiento las anteras o las microsporas aisladas se cultivan en un medio de inducción, dónde se producen callos o embriones que se transfieren a un medio de regeneración para que se desarrollen a plantas.

Desde que se obtuvo la primera planta verde de una microspora de trigo harinero (Ouyang et al., 1973) se han conseguido grandes avances en los cultivos de anteras y microsporas de esta especie (Tuveesson et al., 2000; Barnabás et al., 2001). En trigos duros, en cambio, la eficiencia de esta técnica es aún muy baja, debido a una fuerte dependencia del genotipo de trigo y a una elevada producción plantas albinas (J'Aiti et al., 1999; Dogramaci-Altuntepe et al., 2001).



### 1.3-2.- Hibridación interespecífica

La hibridación interespecífica se ha practicado ampliamente en trigos para transferirles genes de interés de otras especies (Sharma and Gill, 1983). Ocasionalmente se ha empleado en la síntesis de nuevos anfiploides para su cultivo (Martín et al., 1999; Zillinsky, 1974) y hace tres décadas se descubrió su utilidad para producir plantas haploides de trigo. En este sentido, Kasha and Kao (Kasha and Kao, 1970) observaron que los cruzamientos *H. vulgare* (2x) × *H. bulbosum* (2x) producían plantas haploides de *H. vulgare* y plantearon que este era un método prometedor para obtener plantas haploides de cebada y quizás de otras especies .

Cinco años después, se confirmó que los cruzamientos *T. aestivum* × *H. bulbosum* (2x y 4x) producían plantas haploides de trigo (Barclay, 1975) y más recientemente se han obtenido plantas haploides de trigo cruzándolos con maíz (*Zea mays* L.) (Laurie and Bennett, 1986; Laurie and Bennett, 1988a; Laurie and Reymondie, 1991) y con otras especies de la subfamilia Panicoideae: *Sorghum bicolor* L. ssp. *bicolor* (Inagaki and Mujeeb-Kazi, 1995; Laurie and Bennett, 1988b), *Pennisetum glaucum* (L.) R. Br. (Inagaki and Mujeeb-Kazi, 1995) *Zea mays* spp. *mexicana* (Suenaga et al., 1998; Ushiyama et al., 1991), *Tripsacum dactyloides* (L.) L. (Li et al., 1996; Riera-Lizarazu and Mujeeb-Kazi, 1993).

La base común de estos cruzamientos es que se producen algunos cigotos híbridos y después, en las sucesivas divisiones mitóticas, se eliminan espontánea y selectivamente los cromosomas del parental masculino obteniéndose embriones haploides de trigo (Barclay, 1975; Laurie and Bennett, 1989).

Una restricción importante de los cruzamientos trigo  $\times$  *H. bulbosum* se debe a la baja cruzabilidad de los trigos que portan genes dominantes *Kr* (Falk and Kasha, 1981; Falk and Kasha, 1983; Sitch and Snape, 1986; Sitch and Snape, 1987; Sitch et al., 1985; Snape et al., 1979). Los alelos dominantes *Kr* actúan deteniendo el crecimiento de los tubos polínicos en la base del estilo, impidiendo así que alcancen el micropilo y penetren en el saco embrionario (Jalani and Moss, 1980; Lange and Wojciechowska, 1976; Lange and Jochemsen, 1976; Snape et al., 1980). Esta barrera a la cruzabilidad no se ha conseguido romper todavía, por lo que los cruzamientos trigo  $\times$  *H. bulbosum* están restringidos a los trigos que portan los alelos recesivos *kr1* y *kr2*.

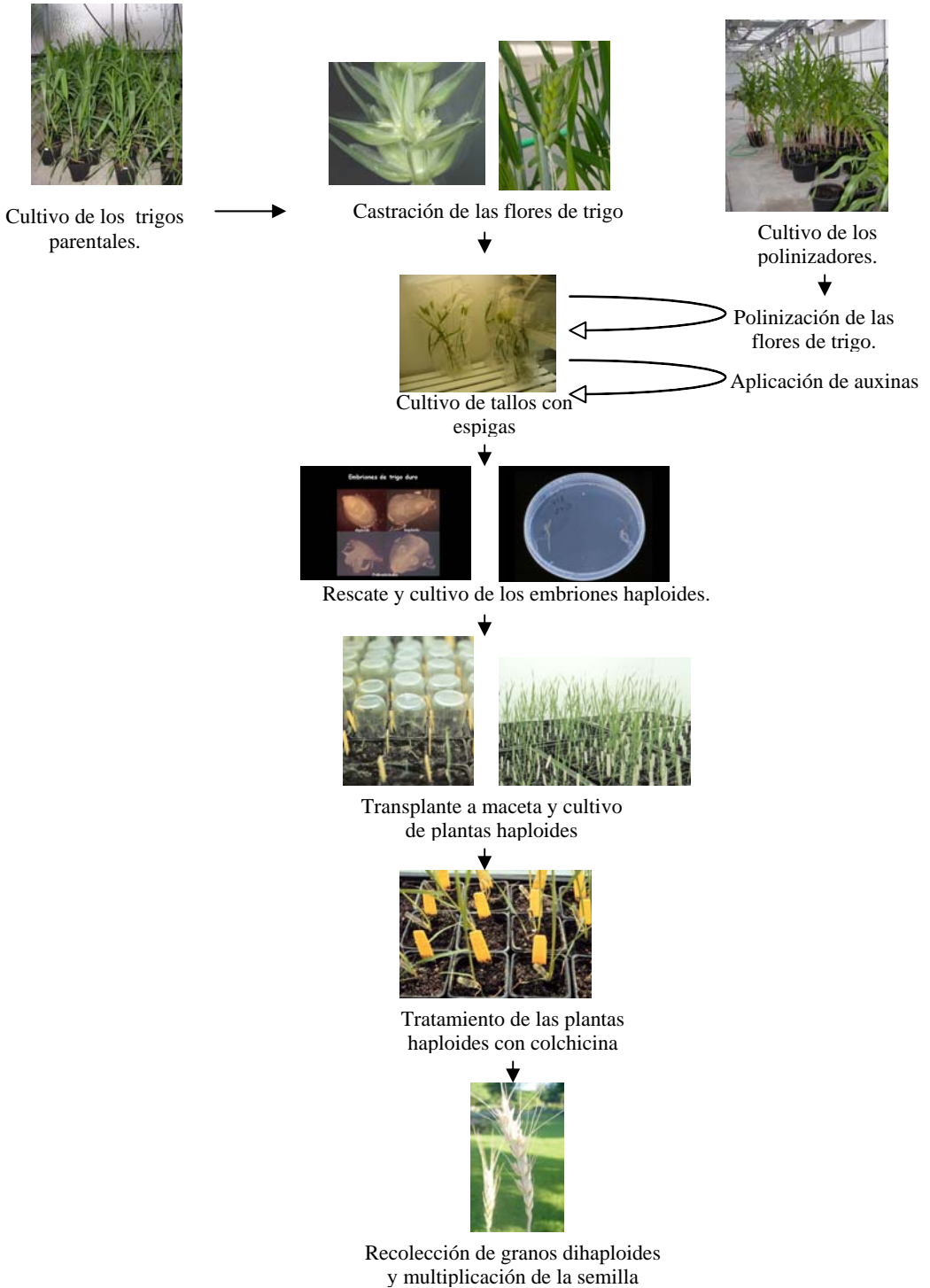
Los cruzamientos trigo  $\times$  maíz son insensibles a la acción de los genes *Kr* y han sido superiores (tasas más altas de fertilización y producción de embriones) a los cruzamientos con *H. bulbosum*, no sólo con trigos que portan alelos dominantes *Kr* sino también con trigos que portan los alelos recesivos (Laurie and Bennett, 1987; Laurie and Reymondie, 1991; O'Donoghue and Bennett, 1994b). Esta técnica es pues la que elegimos para producir plantas dihaploides de trigo duro.

*1.4. La técnica de los cruzamientos trigo × maíz.*

El proceso para la obtención de trigos duros dihaploides mediante cruzamientos con maíz, se recoge en la figura 2, y consta de los siguientes pasos:

- Siembra y cultivo de las plantas de trigo duro.
- Siembra y cultivo de los polinizadores.
- Castración de las flores de trigo.
- Cultivo de tallos con espigas (opcional).
- Polinización de las flores de trigo.
- Aplicación de auxinas.
- Rescate de los embriones haploides.
- Cultivo in-vitro de los embriones haploides.
- Trasplante a maceta y cultivo de plantas haploides.
- Tratamiento de las plantas haploides con colchicina.
- Recolección de granos dihaploides y multiplicación de la semilla.

**Figura 2.-** Producción de plantas dihaploides de trigo por el método del maíz.



### 1.4.1. Siembra y cultivo de trigos duros

Las plantas de trigo parentales de los dihaploides pueden cultivarse en campo, invernaderos, etc. Con independencia de dónde se cultiven deben tener un buen desarrollo y estar exentas de plagas y enfermedades para tener éxito en los cruzamientos. En este sentido el cultivo en invernadero (figuras 3 y 4) es más adecuado que el cultivo en campo, pues permite un mejor control de las condiciones ambientales: temperaturas, fotoperiodo, etc. y de las prácticas culturales: abonados, riegos, tratamientos fitosanitarios, etc. Otra de las ventajas del cultivo en invernadero es que se puede elegir la fecha de siembra y por lo tanto cuando se realizarán los cruzamientos .



Figura 3.- Trigos parentales en invernadero.

Figura 4.- Invernadero climatizado.

#### 1.4.2. Siembra y cultivo de los polinizadores.

En la época de floración de los trigos hay que disponer de polen viable en cantidad suficiente. Si se poliniza con maíz el polen debe ser fresco y para conseguirlo se hace una siembra escalonada de los genotipos de maíz que se van a utilizar como polinizadores (Figura 5).

Además de maíz se pueden utilizar otras especies como polinizadores: *Tripsacum dactyloides* (Li et al., 1996), *Pennisetum glaucum* (Inagaki et al., 1997), etc. La ventaja de utilizar *Pennisetum glaucum* radica en que su polen puede conservarse congelado después de secarlo (Hanna, 1990; Inagaki et al., 1997; Inagaki and Mujeeb-Kazi, 1998).



Figura 5.- Maíz sembrado escalonadamente en invernadero.

1.4.3. Castración de las flores de trigo.

La inflorescencia de los trigos es una espiga compuesta de un tallo central de entrenudos cortos llamado raquis. En cada nudo se asienta una espiguilla protegida por dos glumas que contiene de 2 a 5 flores, no siendo todas las flores fértiles (Figuras 6 y 7). El número de espiguillas por espiga varía entre 8 y 30.

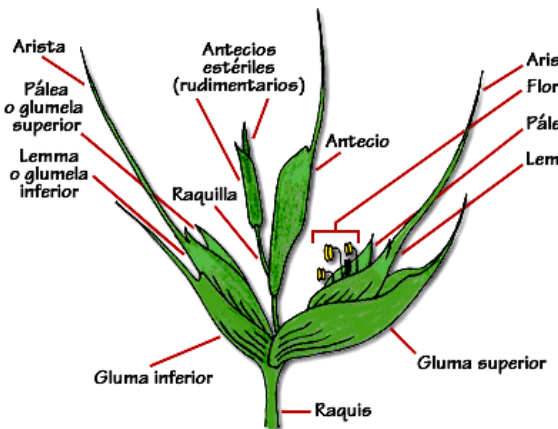


Figura 6.- Espiguilla de trigo compuesta por cinco antecios.

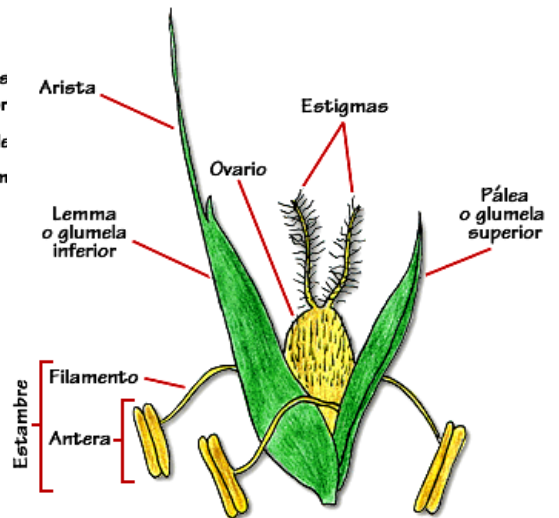


Figura 7.- Componentes de un antecio de trigo.

La castración se realiza de uno a tres días antes de la antesis y tiene como finalidad eliminar las tres anteras de cada flor para evitar autofecundaciones. Esta operación se suele realizar manualmente dejando las glumas intactas (Figuras 8 y 9) o bien recortándolas para facilitar la extracción de las anteras y la polinización posterior. Laurie (Laurie, 1989b) comparó ambos métodos y obtuvo mejores resultados dejando las glumas intactas. Esta operación necesita mucha mano de obra por lo que algunos investigadores han buscado métodos alternativos como la castración con agua caliente (Nagamine et al., 1996; Suenaga et al., 1997) o la polinización sin castrar (Matzk and Mahn, 1994; Suenaga et al., 1997).

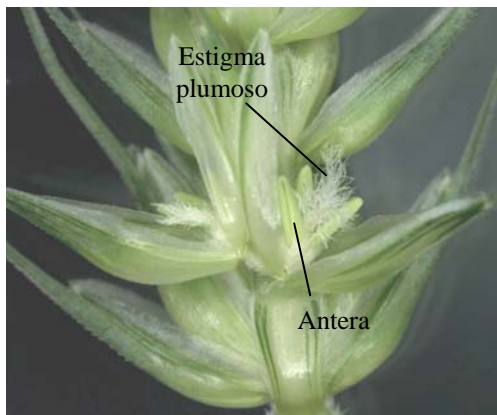


Figura 8.- Flor de trigo abierta.



Figura 9.- Espiga de trigo duro castrada.



#### 1.4.4. Cultivo de las espigas castradas.

Las espigas castradas se pueden dejar sobre las plantas madres o bien cortarlas y cultivarlas en medio nutritivo. Esta última opción permite controlar muy bien, en un espacio reducido, las condiciones de cultivo durante la polinización y el desarrollo posterior de los embriones. Hay varias alternativas a esta opción entre las que cabría destacar el cultivo de espiguillas (Laurie and Bennett, 1988a), y el de tallos cortados con las espigas (Inagaki et al., 1997; Kato et al., 1990; Riera-Lizarazu et al., 1992) (Figura 10) .



Figura 10.- Cultivo de tallos en cámara.

#### 1.4.5. Polinización de las flores de trigo

La polinización consiste en depositar polen del parental masculino sobre los estigmas del trigo, lo que se puede hacer utilizando una brocha, una lanceta, etc. El éxito de esta operación depende de que se realice en el momento adecuado y con polen en buenas condiciones.

El momento óptimo para polinizar una flor es el día de antesis o uno o dos días antes (Laurie, 1989b). Teniendo en cuenta esto, y que hay una diferencia de uno o dos días entre las flores de una espiga en llegar a antesis, el momento óptimo para polinizar todas las flores de una espiga es cuando lleguen a antesis las primeras. Este estadio se reconoce por el estado plumoso de los estigmas y porque las glumillas se separan ligeramente debido a que las lodículas se hinchan. También se puede dejar una flor sin castrar en cada espiga para saber cuando polinizar. Posiblemente esta flor se autofecunde pero el grano que resulte tendrá endospermo y se podrá distinguir de los granos híbridos que no lo tienen.

Como antes se ha dicho, si se poliniza con maíz el polen debe ser fresco. Este polen se recoge por las mañanas y tiene un color amarillo intenso que se va tornando anaranjado con el paso de las horas. Si se utiliza polen congelado de *Pennisetum* hay que descongelarlo antes de polinizar. La descongelación se puede hacer sumergiendo los tubos con el polen en agua a 38 °C durante 5 minutos (Inagaki and Mujeeb-Kazi, 1998).

#### 1.4.6. Aplicación de auxinas

En los cruzamientos trigo × maíz los tubos polínicos alcanzan los sacos embrionarios, a 20 °C, en 4-5 horas (Laurie, 1989b) y en los cruzamientos trigo × *T. dactyloides* en 1 hora (Li et al., 1996). En estos cruzamientos lo normal es que se fecunden sólo el óvulo o el óvulo y los núcleos polares y en un porcentaje mucho menor se fecundan sólo los núcleos polares (Laurie and Bennett, 1987; Li et al., 1996; O'Donoghue and Bennett, 1994a). El número de sacos embrionarios fertilizados es relativamente alto y supera en muchos casos el 55% de las flores polinizadas (Laurie, 1989a; Laurie, 1989b; Laurie and Bennett, 1988a; Laurie and Reymondie, 1991; Li et al., 1996; O'Donoghue and Bennett, 1994a).

La fertilización de los óvulos produce cigotos híbridos que inicialmente contienen todos los cromosomas de ambos parentales. Posteriormente, en las 3-4 primeras divisiones mitóticas, se eliminan los cromosomas de la Panicoidae debido a que falla su unión al huso acromático. Como resultado de esta eliminación se producen cigotos haploides de trigo (Laurie, 1989a; Laurie and Bennett, 1987; Laurie and Bennett, 1988a; Laurie and Bennett, 1988b). La viabilidad de estos cigotos es muy baja y la mayoría abortan en los primeros estadíos, sin embargo, la aplicación de auxinas induce su desarrollo y el de los ovarios (Almousslem et al., 1998; Laurie and Bennett, 1988a).

Las auxinas inducen el desarrollo de los ovarios a granos aunque estén sin fertilizar (David et al., 1999; Wedzony et al., 1998), pero los óvulos han de estar fertilizados para que se desarrollen a embriones (Laurie and Reymondie, 1991; Zhang et al., 1996). Por otro lado, las auxinas producen una rápida vacuolización e hidratación de los sacos embrionarios y ya no es

posible la fertilización (Matzk, 1991). Por ello, para permitir que se produzca la fertilización, las auxinas deben aplicarse después de la polinización

El tipo de auxina, la concentración y el momento en que se aplica son variables que afectan a los resultados de estos cruzamientos, sobre las que no hay uno valores con aceptación general (Tabla 6). Como se puede observar en dicha tabla la mayoría de los investigadores han utilizado 2,4-D, pero otros han obtenido mejores resultados con la aplicación de dicamba (Knox et al., 2000). Las auxinas se han aplicado inmediatamente, un día, o dos días, después de la polinización y las concentraciones han variado entre 3 y 100 mg/l, siendo 100 mg/l la más utilizada. En trigos blandos las concentraciones óptimas de 2,4-D y dicamba están entre 50-100 mg/l y el momento óptimo para su aplicación entre dos y cuatro días después de la polinización (Matzk and Mahn, 1994).

También se puede observar en la tabla 6 que hay diversos métodos para aplicar las hormonas: inyección en el último entrenudo, colocación de gotas directamente sobre los estigmas, pulverización o inmersión de las espigas, añadiéndolas al medio de cultivo, etc. La elección de uno u otro debe estar en función del coste de aplicación, pues todos son efectivos y no se han encontrado diferencias entre ellos, al menos en trigos harineros (Matzk and Mahn, 1994; Suenaga et al., 1997).

**Tabla 6.-** Tratamientos hormonales aplicados para la producción de plantas haploides de trigo duro por diferentes investigadores.

	Auxina	Concentración mg/l	Aplicación Nº de horas desde la polinización	Método de aplicación y duración del tratamiento
(Riera-Lizarazu et al., 1992)	2,4-D	100	0	En el medio de cultivo de los tallos durante 48 horas.
(Riera-Lizarazu and Mujeeb-Kazi, 1993)	2,4-D	50	24	Inmersión de las espigas una sola vez.
(Amrani et al., 1993)	2,4-D	10	24	Inyección en el último entrenudo.
(O'Donoghue and Bennett, 1994a)	2,4-D	5	48	Una gota diaria sobre las flores durante dos semanas.
(David et al., 1999; Inagaki and Hash, 1998; Inagaki et al., 1998)	2,4-D	100	0	En el medio de cultivo de los tallos todo el tiempo.
(Almouslem et al., 1998)	2,4-D	3	24	Pulverización diaria sobre las espigas durante dos semanas.
(Cherkaoui et al., 2000; Saïdi et al., 1998)	2,4-D	100	24	Inyección en el último entrenudo más 1 gota sobre las flores a las 24 horas, además en el medio de cultivo a partir del 4-6 día de la polinización.
(Savaskan et al., 1997)	Dicamba	100 y 20	24	Inyección en el último entrenudo (100mg/l) más 1 gota sobre las flores (20 mg/l), una sola vez.
(Knox et al., 2000)	2,4-D Dicamba	100 50	24	Pulverización sobre las espigas dos veces; 24 horas y 7 días después de la polinización.

#### 1.4.7. Rescate de los embriones haploides

Los nucleos polares se fertilizan en muchos sacos embrionarios pero después degeneran (Zhang et al., 1996). Como consecuencia los granos de estos cruzamientos, tengan o no tengan embrión, carecen de endospermo o está mal desarrollado. Hay, por lo tanto, que rescatar los embriones y cultivarlos in-vitro para que se desarrollen a plantas.

Esta operación consta básicamente de dos pasos:

- Recolección y desinfección de los granos híbridos.
- Extracción de los embriones sobre una superficie estéril y colocación en un medio nutritivo.

Para recolectar los granos se abren una a una las flores de cada espiga y se cogen los granos desarrollados, descartando las autofecundaciones. Los granos híbridos se distinguen porque carecen de endospermo y tienen una consistencia blanda mientras que los granos procedentes de las autofecundaciones son más grandes, tienen endospermo y la consistencia es más dura (Figuras 11 y 12). No hay un protocolo estandarizado para desinfectar los granos pero los productos más utilizados en la desinfección son etanol y lejía comercial. Una vez desinfectados los granos se abren bajo una lupa sobre una superficie estéril, se extraen los embriones y se colocan sobre un medio nutritivo. Es importante no dañar los embriones y colocarlos con el coleoptilo hacia arriba y el escutelo en contacto con el medio (Figuras 13 a 16).

El rescate se suele realizar entre 14-18 días después de la polinización aunque algunos investigadores han observado que se desarrollan mejor los embriones de 14 días (Cherkaoui et al., 2000).

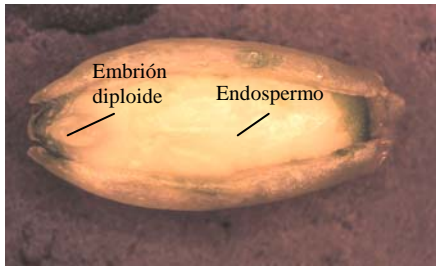


Figura 11.- Grano con endospermo (Autofecundación ).

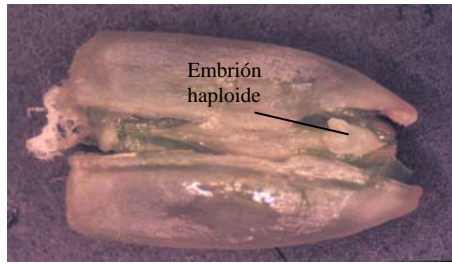


Figura 12: Grano sin endospermo.



Figura 13.- Embrión diploide (Autofecundación).

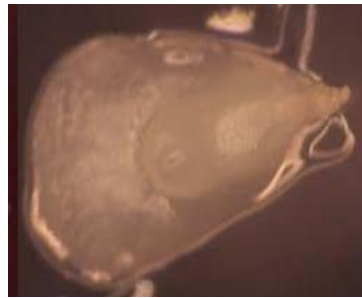


Figura 14.- Embrión haploide

### POLIEMBRIONÍA

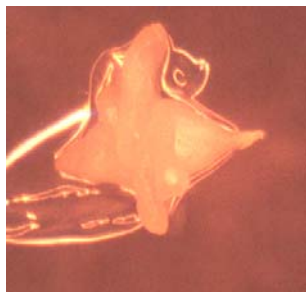


Figura 15.- Dos embriones haploides soldados por el escutelo.

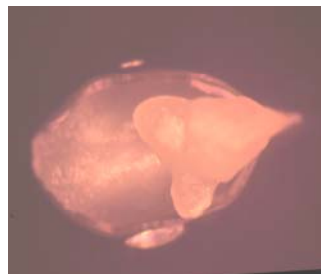


Figura 16.- Embrión haploide con dos coleoptilos.

#### 1.4.8. Cultivo in-vitro de los embriones haploides.

Los embriones han de cultivarse en medios nutritivos para que se desarrollen a plantas (Figuras 17 y 18). Entre los medios de cultivo más utilizados están el medio MS (Murashige and Skoog, 1962), MS/2 y el medio B5 (Gamborg et al., 1968). Los embriones se suelen cultivar durante varios días en oscuridad y después con luz aunque algunos investigadores los cultivan directamente con luz (David et al., 1999). En la oscuridad las temperaturas pueden ser bajas (5°C) (Knox et al., 2000; Riera-Lizarazu and Mujeeb-Kazi, 1993) o medias (20-25°C) (Almouslem et al., 1998; Cherkaoui et al., 2000; Lefebvre and Devaux, 1996). Las horas de luz varían entre 12-16 horas diarias y las temperaturas de cultivo a la luz varían entre 18-22 °C.

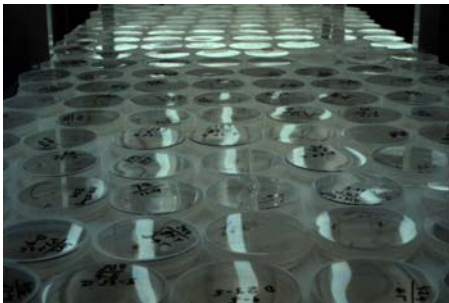


Figura 17.- Cultivo *in vitro* de embriones haploides.



Figura 18.- Plántulas haploides en placa Petri.



#### 1.4.9. Trasplante a maceta y cultivo de plantas haploides.

El trasplante a maceta se realiza cuando las plantas tienen 2-3 hojas, aproximadamente un mes después de colocar los embriones a la luz. Lo más importante de esta operación es mantener un nivel alto de humedad alrededor de las plantas trasplantadas, durante 3-4 días. Esto se puede conseguir colocando botes de plástico o cristal invertidos sobre las plantas (Figura 19).

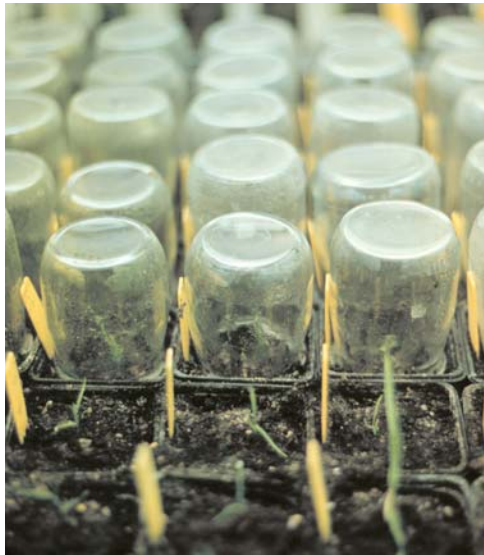


Figura 19.- Trasplante de plantas haploides a maceta.

#### 1.4.10. Duplicación cromosómica de las plantas haploides.

Las tasas de duplicación cromosómica espontánea de los haploides son muy bajas por lo que se aplican productos químicos para incrementarlas. La sustancia más empleada es la colchicina, alcaloide que se extrae del cólquico o azafrán silvestre (*Colchicum autumnale* L.). Aplicada a células en metafase impide la formación del huso acromático y la separación de las cromátidas una vez que el centromero se ha dividido (Suzuki et al., 1992). Como resultado, se obtienen algunas células dihaploides en las que cada cromosoma es idéntico a su homólogo y por lo tanto todos sus genes están en homocigosis. Las células dihaploides tienen una meiosis normal y, por lo tanto, aquellas flores que se desarrollen a partir de ellas serán fértiles y producirán granos con embriones dihaploides (Figura 21).

Para aplicar la colchicina se han empleado diferentes métodos. El más utilizado consiste en sumergir las raíces y la base de las plantas, durante 2-3 horas, en una solución de colchicina (1-2 g de colchicina disueltos en una disolución 0.5%-2% de dimethyl sulphoxide) (Knox et al., 2000; Thomas et al., 1997). Otro método para aplicar la colchicina es el del vial invertido (Jensen, 1977) (Figura 20).



Figura 20.- Plantas haploides con el tratamiento de colchicina mediante la técnica de vial invertido.



Figura 21.- Espigas con algunos granos dihaploides.

### *1.5. Objetivos*

La importancia del trigo duro como cultivo en Europa y en España justifica que se desarrollen aquí tecnologías, como la producción de diahaploides, que pueden acortar los ciclos de mejora. De lo expuesto previamente se desprende que el método del maíz es, hoy en día, el más adecuado para producir plantas dihaploides de trigo duro. No obstante, la eficiencia en la producción de plantas dihaploides varía mucho entre investigadores y es aún baja (Tabla 7) por lo que hay que mejorar este método para poder aplicarlo de forma generalizada en los programas de mejora.

En el año 2000 comenzamos a producir plantas dihaploides de trigo duro para el Programa Nacional de Mejora del Trigo Duro. El protocolo que elegimos fue el cultivo de tallos cortados (Inagaki et al., 1997) por las ventajas que presenta: control de las condiciones ambientales después de la castración, reducción de costes en el tratamiento hormonal, posibilidad de programar en el tiempo los cruzamientos. Se identificaron tres factores que afectaban notablemente a los resultados de estos cruzamientos: humedad relativa de las cámaras de cultivo, genotipo del polinizador y tratamiento hormonal. El objetivo de esta tesis fue mejorar estos factores para conseguir una producción alta y estable de plantas dihaploides con el mayor número posible de genotipos de trigo.

Tabla 7.- Rendimientos obtenidos por diferentes investigadores en la producción de plantas haploides y dihaploides de trigos duros. Valores medios e intervalos (rendimiento del mejor y peor trigo).

	Nº de Trigos	Plantas haploides/ 100 flores			Plantas dihaploides/ 100 plantas haploides		
		Media	Intervalo		Media	Intervalo	
(Riera-Lizarazu et al., 1992)	5	12.5	14.7	8.5	69.5	46.2	77.3
(Riera-Lizarazu and Mujeeb-Kazi, 1993)	3	17.8	22.5	14.8	-	-	-
(Amrani et al., 1993)	14	-	9.62	0	-	-	-
(Sarrafí et al., 1994)	6	0.4	1.62	0	-	-	-
(O'Donoghue and Bennett, 1994)	2	-	8.7	6.7	-	-	-
(Savaskan et al., 1997)	3	1.8	3.1	0.5	69.2	80.0	66.7
(Saidi et al., 1998)	7		4.0	0			
(Inagaki et al., 1998)	25	1.4	-	-	40.8	-	-
(Almouslem et al., 1998)	7	-	13.5	0.2			
(Cherkaoui et al., 2000)	10	-	3.4	0.09			
(Knox et al., 2000)	3	6.4	11.9	5.75	47.5	55.6	41.4



**CAPÍTULO II:**  
**LOW RELATIVE HUMIDITY INCREASES HAPLOID  
PRODUCTION IN DURUM WHEAT×MAIZE CROSSES.**





La humedad relativa baja incrementa la producción de haploides en los cruzamientos trigo duro × maíz

**2. Low relative humidity increases haploid production in durum wheat × maize crosses.** (La humedad relativa baja incrementa la producción de haploides en los cruzamientos trigo duro × maíz).

Publicado como:

J. Ballesteros, C. García-Llamas, M.C. Ramírez and A. Martín **Low relative humidity increases haploid production in durum wheat × maize crosses.** Plant Breeding 122, 276-278 (2003)



### **Resumen:**

La haploidización es una herramienta útil en la mejora de plantas y para estudios genéticos, pero ha sido difícil conseguir un protocolo satisfactorio para producir plantas haploides en trigo duro. El objetivo de este estudio fue analizar la influencia de la humedad relativa del ambiente, durante el cultivo de los tallos cortados, en la producción de plantas haploides de trigo duro por el método del maíz. Treinta y ocho líneas F<sub>3</sub> de trigo duro, derivadas de ocho cruzamientos, se polinizaron con una mezcla de polen de tres híbridos comerciales de maíz. Se aplicó una mezcla 2,4-D y dicamba como tratamiento hormonal. Se evaluó la producción de cariósides, embriones y plantas haploides. El nº de plantas haploides por espiga se incrementó considerablemente cuando se cambió la humedad relativa de 65-85% (luz-oscuridad) a 55-65% (luz-oscuridad). Este incremento se debió fundamentalmente a un incremento en la producción de cariósides. De media se obtuvieron 15.2 vs. 9.3 cariósides 5.0 vs. 2.8 embriones y 3.1 vs. 0.6 plantas haploides por espiga con los regímenes bajo y alto de humedad respectivamente.

**Palabras clave:** *Triticum durum*- hibridación interespecífica-rescate de embriones-producción de haploides.



### **Abstract**

Haploidization is a useful tool for genetic analysis and plant breeding, but a consistent and satisfactory protocol for haploid production has been difficult to achieve in durum wheat. The objective of this study was to analyse the influence of the relative humidity of the environment, when culturing detached tillers during the production of haploids plants in durum wheat by the maize method. Thirty-eight F<sub>3</sub> lines from eight crosses of durum wheat were pollinated with bulked pollen from three commercial maize hybrids. A mixture of 2-4D and dicamba was used as a hormone treatment. The numbers of caryopses, embryos and haploids plants were scored. When 65-85% (light-dark) humidity was substituted for 55-65% the number of haploids per spike increased notably. This increased frequency was largely attributed to a rise in the production of generated caryopses. On average, 15.2 vs. 9.3 caryopses, 5.0 vs. 2.8 embryos and 3.1 vs. 0.6 haploid plants, per spike, were produced under low and high humidity regimes respectively.

**Key words:** *Triticum durum*- interspecific hybridization- embryo rescue-haploid production



In self-pollinating crops, such as durum wheat, doubled haploid plants are used, not only for genetic studies, but also to speed up trait fixation of segregating individuals and therefore to reduce the duration of breeding programmes. Nowadays, two types of method are mainly used for producing doubled haploid plants in wheat: androgenesis, which includes both anther and isolated microspore culture or intergeneric hybridization, which includes crosses of wheat with *Hordeum bulbosum* and crosses of wheat with several species of the Panicoideae subfamily.

A major limitation of androgenesis is the effect of the wheat genotype on haploid plant production. In durum wheat only few genotypes respond to microspore culture and the frequencies of green haploid plant production are still low (J'Aiti et al., 1999; Orlov et al., 1993). Likewise the crossability of wheat × *H. bulbosum* depends on the wheat allelic composition for the *Kr* genes. The dominant alleles inhibit or reduce this crossability (Falk and Kasha, 1983; Snape et al., 1979) and therefore crossing wheat × *H. bulbosum*, as a method for haploid production, is confined to *kr*-bearing varieties.

The wheat genotype also affects, though in minor degree, the production of haploid plants by the maize method. This technique has been superior to both androgenesis (Fedak et al., 1997; Kisana et al., 1993; Sadasivaiah et al., 1999) and the *H. bulbosum* method (Laurie and Reymondie, 1991; O'Donoghue and Bennett, 1994b), nevertheless the

production of haploid and dihaploid plants differs considerably between different reports (David et al., 1999; Inagaki et al., 1998; Knox et al., 2000; Riera-Lizarazu et al., 1992). Consequently improvement of the maize method is necessary in order to achieve an efficient and consistent protocol for massive doubled haploid production as needed to make it a useful breeding tool.

Since 2000 doubled haploid plants are being produced by the maize method, for the Spanish National Durum Wheat programme, at the Institute of Sustainable Agriculture in Córdoba, Spain. Detached tillers are cultured in a growth chamber (Inagaki et al., 1997) because it allows optimum control of environmental growing conditions during pollination and afterwards during embryo development. Also it permits a reduction in the cost of hormone application. Initially the humidity of the growth chamber was not controlled and great variation between days and/or periods in the production of caryopses was observed, associated with changes in the weather conditions. The highest productions of caryopses coincided with long periods (> 10 days) in which the weather was dry and the lowest production coincided with rainy periods. When the humidity varied greatly over short periods of time the production of caryopses was erratic. These observations led to the suggestion that the range of humidity of the growth chamber (which depends on the outside conditions) could be fundamental for maintaining the high and reliable production of caryopses and embryos. The objective of this work was to compare the production of durum wheat haploid plants when culturing detached tillers in two growth chamber humidity regimes.



### **Plant materials:**

Thirty-eight F<sub>3</sub> lines from eight crosses of durum wheat, *Triticum durum*, were pollinated with a bulk of pollen from three commercial maize hybrids. Two sowings of wheat were made, the first at the beginning of October 2001 and the second thirty days later. In each sowing five plants per line were grown in a greenhouse. The temperature in the greenhouse was kept (by cooling or heating) between 7°C and 25°C, and light was supplemented with high-pressure sodium vapour 400W lamps (1 lamp per 2m<sup>2</sup>) to maintain a 13h day length. Maize genotypes were seeded every 10 days for 10 weeks, starting simultaneously with the wheat sowing, and were grown in the greenhouse under the same conditions as the durum wheat. Maize pollen was collected in the morning when the glasshouse temperature was above 15 °C.

### **Emasculation and pollination of wheat spikes:**

From every plant of wheat up to two spikes were manually emasculated. The basal and top spikelets, as well as the middle florets of each spikelet, were removed leaving 20 emasculated flowers per spike. Tillers with emasculated spikes were cut off one or two days before anthesis and sprayed with insecticide and fungicide solutions. Groups of 25-30 tillers were cultured on cylindrical containers (Ø = 85 mm; 110 mm high) with 0,3 l of nutritive solution. The nutritive solution contained 40 g/l sucrose, 100 mg/l silver nitrate and 8 cm<sup>3</sup>/l sulphurous acid (Inagaki et al., 1997). Each container and its detached tillers was covered with a perforated polyolefin bag (used commercially for bread packing) and

transferred to a growth chamber with 14 h light and temperature regime of 21°C/light-16°C/dark.

### **Auxin treatment of pollinated spikes:**

Cut tillers cultured in the previously-described liquid medium were transferred to the same liquid medium, supplemented with a mixture of 5 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> of dicamba plus 95 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> of 2,4-D, one day after pollination and kept in it for 48 hours. After this treatment the tillers were put back into the initial liquid medium, without hormone, until embryo rescue was attempted.

### **Embryo rescue and culture:**

About 15-17 days after pollination spikes were excised from the tillers, immersed in a 0,8 % sodium hypochloride solution for 5 minutes and then rinsed with running water to eliminate external contamination. The caryopses were removed from these spikes and sterilized (5 min ethanol 70%, 15 min sodium hypochlorite 0,1 % and finally washed four times in sterile water). Sterilized grains were aseptically dissected under 7× magnification and excised embryos transferred on to half strength (MS/2) Murashige and Skoog medium (Murashige and Skoog 1962), supplemented with 30 g<sup>l</sup><sup>-1</sup> sucrose and 10 g<sup>l</sup><sup>-1</sup> agar, in plastic dishes. Five embryos were placed in each dish with the scutellum touching the culture medium. Dishes were sealed with a plastic film (Parafilm M®, American National Can, Chicago, IL. 60631) to avoid contamination and to maintain high humidity. Embryos were incubated for 10-14 days in the dark at 13 °C

La humedad relativa baja incrementa la producción de haploides en los cruzamientos trigo duro × maíz

and afterwards at 20 °C with a 12 hours day length. The plantlets were transferred into pots at the three leaf stage.

During November 2001 haploid plants were produced under high (65% in the light 85% in the dark) growth chamber humidity regime (HHR). Through December 2001 this process was repeated with a low relative humidity (LHR) (55% in the light 65% in the dark). In both cases data collected were: number of pollinated spikes by genotype and number of caryopses, embryos and haploid plants per spike. For each trait the mean and standard deviation per genotype were calculated. To check differences between experiments, the mean values obtained within each durum line in both experiments were compared using the t-test.

The 38 durum wheat lines produced more caryopses under the low humidity regime although in 19 of them the differences between the two humidity regimes were not statistically significant (Table 1). A similar tendency was observed in the production of both embryos and haploid plants. On the other hand, and in line with most reports (Almousslem et al., 1998; Inagaki et al., 1998; Knox et al., 2000; O'Donoghue and Bennett, 1994a; Saïdi et al., 1998) differences were found between wheat lines for the evaluated traits, in both experiments (Table 1).

The mean production of caryopses and embryos were practically twofold under low vs. high humidity regimes (Table 1). The difference in the yield of haploid plants between both regimes was even higher. This was because under HHR there was a high and erratic embryo infection rate (50 %), mostly by bacteria, whereas under LHR the infection rate was low (5 %).

The low humidity regime is similar to the one used in some other work (Riera-Lizarazu et al. 1992) but lower than in others: 60-70% (Inagaki et al. 1998); 80% (Saïdi et al. 1998; Cherkaoui et al., 2000). Expressing the present results on a percent floret basis (a spike had 20 emasculated flowers) it is observed that the production of embryos (mean 25%; range 8.5%-40.5%) and haploid plants (mean 15.5%; range 3.5%-26%), under low humidity regime, were similar to the best results obtained by Riera-Lizarazu (Riera-Lizarazu et al., 1992). Conclusions can not be extracted from these comparisons since the wheat and maize genotypes used were different. However it is important to mention that, even if it is only a coincidence, the best results were obtained with the lowest humidity regimes.

### **Acknowledgements**

Research was supported by grant RTA02-078-C4-3 from INIA of the Spanish Ministry of Science and Technology.

**Table 1.-** Mean values of caryopses, embryos and haploid plants per spike in 38 F3 lines, from eight crosses of durum wheat, pollinated with maize under two humidity regimes (LHR, HHR).

Crosses	F <sub>3</sub> line	Spikes pollinated		Caryopses per spike		Embryos per spike		Haploid plants per spike	
		LHR	HHR	LHR	HHR	LHR	HHR	LHR	HHR
ID 0409	1	9	9	16.4 a	8.4 b	5.8 a	1.9 b	4.0 a	0.2 b
	2	7	4	16.4 a	9.7 b	5.1 a	3.2 b	3.7 a	0.5 b
	3	9	5	19.4 a	10.4 b	6.3 a	2.2 b	3.6 a	0.2 b
	4	8	3	18.5 a	8.0 b	8.1 a	2.3 b	5.1 a	0.3 b
	5	7	5	18.5 a	7.2 b	7.0 a	2.8 b	3.3 a	0.0 b
ID 0414	1	7	2	8.7 a	5.0 a	3.4 a	2.5 a	1.8 a	0.0 a
	2	6	4	12.0 a	8.7 a	4.5 a	2.0 a	2.3 a	0.5 a
	3	11	4	6.7 a	2.7 b	2.0 a	1.0 a	0.7 a	0.2 a
	4	8	3	11.4 a	9.0 a	2.2 a	3.3 a	1.0 a	1.3 a
	5	9	8	12.8 a	9.2 a	4.2 a	3.0 a	2.4 a	0.6 b
ID 0415	1	5	4	15.8 a	8.0 b	5.2 a	2.7 a	3.0 a	0.0 b
	2	4	5	15.0 a	10.8 a	6.0 a	3.2 a	4.0 a	0.8 b
	3	5	7	15.8 a	10.0 b	6.6 a	5.0 a	5.2 a	1.0 b
	4	8	5	19.7 a	9.8 b	7.9 a	3.8 b	5.2 a	0.6 b
ID 0419	1	4	6	17.2 a	11.8 a	6.2 a	2.7 a	4.0 a	0.3 b
	2	9	4	17.5 a	6.0 b	7.0 a	2.2 b	4.1 a	0.0 b
	3	4	4	19.0 a	7.5 b	8.0 a	1.5 b	4.0 a	0.7 b
	4	7	4	18.0 a	15.0 a	4.3 a	5.7 a	3.3 a	1.0 a
ID 0420	1	13	7	13.7 a	11.7 a	3.7 a	5.4 a	2.1 a	2.4 a
	2	12	5	18.2 a	6.8 b	6.1 a	3.6 b	4.8 a	1.8 b
ID 0435	1	2	6	16.5 a	13.1 a	5.5 a	2.7 a	2.5 a	0.8 a
	2	6	10	18.2 a	11.2 b	5.8 a	3.0 a	2.7 a	0.5 b
	3	10	4	17.4 a	12.7 a	5.0 a	3.5 a	3.3 a	0.2 b
	4	4	4	18.7 a	12.0 a	7.5 a	4.2 a	4.7 a	1.2 b
ID 0488	1	3	2	17.3 a	16.0 a	5.3 a	7.0 a	3.0 a	1.5 a
	2	2	7	12.0 a	7.0 a	5.0 a	3.1 a	3.0 a	0.4 a
	3	6	5	15.7 a	7.6 b	3.2 a	3.8 a	2.2 a	1.2 a
	4	9	9	17.3 a	6.8 b	6.5 a	2.5 b	3.9 a	0.7 b
	5	4	9	12.7 a	7.8 a	5.7 a	1.7 a	3.5 a	0.3 a
ID 492	1	11	6	13.6 a	5.2 b	4.4 a	0.8 b	2.8 a	0.0 b
	2	7	4	13.1 a	12.0 a	4.8 a	4.7 a	2.3 a	0.2 a
	3	8	5	9.2 a	5.0 a	1.7 a	1.2 a	1.1 a	0.0 a
	4	8	4	13.6 a	5.2 b	4.0 a	0.7 b	3.1 a	0.2 b
ID 514	1	12	4	16.9 a	10.2 b	5.2 a	1.7 b	3.7 a	0.5 b
	2	8	6	18.9 a	12.5 b	6.6 a	2.3 b	4.2 a	1.2 b
	3	13	7	10.5 a	8.6 a	2.4 a	1.0 a	1.4 a	0.1 a
	4	3	6	15.3 a	11.7 a	3.6 a	2.5 a	3.3 a	0.8 a
	5	10	4	18.4 a	13.7 a	4.8 a	4.7 a	3.1 a	1.0 a
<b>Mean±SD</b>				<b>15.2±3.5 a</b>	<b>9.3±4.5 b</b>	<b>5.0±2.9 a</b>	<b>2.8±2.3 b</b>	<b>3.1±2.5 a</b>	<b>0.6±1.1 b</b>

Means of traits followed by different letters in the same row differ significantly at P= 0.05 according a t-test.

**CAPÍTULO III:**

**EFFECT OF MAIZE AND MILLET POLLINATORS ON DURUM  
WHEAT HAPLOID PRODUCTION**



**3. Effect of maize and millet pollinators on durum wheat haploid production** (Efecto de los polinizadores, maíz y mijo, en la producción de haploides de trigo duro).

Publicado como:

C. García-Llamas, M.C. Ramírez and J. Ballesteros. **Effect of maize and millet pollinators on durum wheat haploid production.** Plant Breeding 123, 201-203 (2004).





## **Resumen**

En este trabajo se analizó la influencia del polinizador en la producción de embriones y plantas haploides de trigos duros cruzados con maíz y mijo perlado, con la finalidad de encontrar un carácter adecuado para identificar a los polinizadores más eficientes y de evaluar las mezclas de polen. Dos genotipos de trigo duro, de baja y alta respuesta, se polinizaron con ocho muestras de polen: (i) tres híbridos de maíz (ii) tres líneas puras de mijo, (iii) una mezcla de polen de maíz y (iv) otra mezcla de polen de mijo. No se observaron diferencias en la producción de embriones ni de plantas haploides entre las muestras de polen de maíz, pero si hubo diferencias genotípicas claras en la producción de plantas haploides entre los genotipos de mijo. El mejor genotipo produjo más plantas haploides que los otros dos y que la mezcla de polen. No hubo correlación entre la producción de embriones y plantas haploides. Por lo tanto, la producción de plantas haploides debe ser el criterio a utilizar para identificar a los mejores polinizadores. Por otro lado, las mezclas de polen no son aconsejables, excepto si proceden de genotipos identificados previamente como buenos polinizadores.

**Palabras clave:** *Triticum durum*- hibridación interespecífica-rescate de embriones-producción de haploides.



## **Abstract**

The aim of this work was to analyse the influence of the male parent on the production of embryos and haploid plants in durum wheat crossed with maize and pearl millet, to find a proper trait to identify the most efficient pollinators and to evaluate the mixtures of pollen. Two genotypes of durum wheat, low and high responding, were crossed with eight pollen samples: (i) three maize hybrids, (ii) three pearl millet inbred lines, (iii) a mixture of maize pollen and (iv) another mixture of pearl millet pollen. No significant differences on embryos and haploid plant production were observed among the four samples of maize pollen, but there were clear genotypic differences for the production of haploids between genotypes of pearl millet. The best pearl millet genotype produced significantly more haploid plants than the other two and the mixture of pollen. There was no correlation between the production of embryos and haploid plants. Therefore, the production of haploid plants must be the criterion to identify superior pollinators. In addition, a mixture of pollen is inappropriate except when using genotypes previously identified as good pollinators.

**Key words:** *Triticum durum*- embryo rescue-haploid production - interspecific hybridization



The production of doubled haploids (DH) is an important advance in wheat breeding, because the duration of the breeding programmes is reduced. In addition, due to complete homozygosis of DH lines, the identification of superior genotypes is easier and, as a result, an enhanced response to selection is expected (Snape, 1989). The most usual methods for haploid production in wheat are anthers or microspores culture (androgenesis) and wheat  $\times$  maize crosses. The potential of androgenesis is exceptional if one considers the high number of haploids per anther that could be obtained against a maximum of one haploid per floret in wheat  $\times$  maize crosses. Even so, the maize pollination technique is still more efficient than anther culture (Fedak et al., 1997; Kisana et al., 1993; Sadasivaiah et al., 1999), mainly due to a lower dependence on wheat genotype, absence of albinism and easy application (Sadasivaiah et al., 1999). In spite of this superiority, the production of haploids per pollinated floret is still low, especially in durum wheat and, therefore, there is scope to improve this technology.

It is well known that the genotype of the male parent influences the production of haploid plants (Lefebvre and Devaux, 1996; Vinesh-Verma et al., 1999; Zhang et al., 1996), so the efficiency of the wheat maize system could be improved by testing additional genotypes. Other pollinators can be used: *Sorghum bicolor* L. ssp. *bicolor* (Inagaki and Mujeeb-Kazi, 1995; Laurie and Bennett, 1988b), *Pennisetum glaucum* (L.) R. Br. (Ahmad and Comeau, 1990; Laurie, 1989a), *Zea mays* spp. *mexicana* (Suenaga et al., 1998; Ushiyama et al., 1991), *Tripsacum dactyloides* (L.) L. (Li et al., 1996; Riera-Lizarazu and Mujeeb-Kazi, 1993). An advantage, of *P. glaucum* for

example, in relation to maize is that its pollen can be stored (frozen, after being dried) and its fertility maintained (Hanna, 1990; Inagaki et al., 1997).

Independently of the species used as pollinator, there must be a widely accepted criterion to identify the most efficient genotypes. Likewise, it is necessary to know the advantages from any mixtures of pollen. Therefore, eight samples of pollen (six genotypes plus two pollen mixtures) were tested for their influence on the production of embryos and haploid plants through interspecific crosses with two lines of durum wheat.

### **Plant materials**

Two genotypes of durum wheat [*Triticum turgidum* ssp. *Durum* (Desf.) Husn.], previously selected for its high and low response to the wheat × maize crosses, were pollinated with: (i) three maize (*Zea mays* L.) hybrids (provided by the company Semillas Verneuille, Córdoba, Spain), (ii) three pearl millet [*P. glaucum* (L.)] R. Br. inbreds (provided by Dr W. Hanna, USDA, Tifton, Georgia) and (iii) two mixtures of pollen: one from the three maize hybrids and another one from the three genotypes of pearl millet. Forty plants of each durum wheat line were grown in a greenhouse from January to April 2001. The temperature in the greenhouse was kept (by cooling or heating) between 7 and 25°C, and light was supplemented to maintain a 13-h day-length. In order to have fresh pollen during the crossing period, the genotypes of maize were seeded every 10 days, for 10 weeks, starting 2 weeks before the wheat sowing. The maize plants were grown in a greenhouse under the same conditions as durum wheat. The genotypes of pearl millet were seeded under field conditions in July 2000.

### **Crosses and culture of detached tillers**

A maximum of two spikes per wheat plant were manually emasculated. The basal and top spikelets, as well as the middle florets of each spikelet, were removed leaving 10 spikelets and 20 emasculated flowers per spike. Tillers with emasculated spikes were cut off 1 or 2 days before anthesis, sprayed with insecticide and fungicide solutions, and cultured in a solution containing 40 g/l sucrose, 100 mg/l, silver nitrate and 8 ml/l sulphurous acid (Inagaki et al., 1997). Groups of 25–30 detached tillers were covered with a perforated polyolefin bag and transferred to a growth chamber with 14-h light, and a temperature regime of 21°C (light) and 16°C (dark).

Pollination was carried out with fresh pollen of maize and frozen pollen of pearl millet, stored for 6 months at -80°C. Maize pollen was collected every day during the morning shaking tassels over a paper sheet and sieving to eliminate anther debris. When the weather conditions were unfavourable (low sun radiation or low temperature) additional illumination was supplied until anther extrusion was observed. Pearl millet pollen was collected in the same way, but in field-grown plants, during September–October 2000. The pollen harvested was dried for 2–3 h in an oven at 37°C and stored in Eppendorf tubes at -80°C.

One day after pollination, the tillers were transferred to the same medium, but supplemented with 100 mg/l of 2,4-D, and kept in it for 48 h. They were then placed again in the hormone-free medium where they remained until the embryos were rescued. From 15 to 17 days after pollination, the seeds developed were removed from the spikes and sterilized (5 min ethanol 70%, 15 min sodium hypochlorite 0.1%, finally washed four



times in sterile water). Embryos were aseptically excised and transferred on to half-strength Murashige and Skoog medium (MS/2) (Murashige and Skoog, 1962), supplemented with 30 g/l sucrose and 10 g/l agar in plastic dishes. Five embryos were placed in each dish with the scutellum touching the culture medium. Dishes were sealed with a plasticfilm to avoid contamination and to maintain high humidity. Embryos were incubated for 10–14 days in the dark at 13°C and afterwards at 20°C with 12-h day-length. The plantlets were transferred to pots at the three-leaf stage.

### **Experimental design and statistical analysis**

Two experiments, one with maize pollen and the other with pearl millet pollen, were carried out. In both cases, a randomized design with eight treatments (two wheats × four samples of pollen) and seven replications (spikes) per treatment was performed and the number of caryopses, embryos and haploid plants per spike were counted. The analysis of variance and Fisher's least significant difference comparison of means were calculated using SPSS statistical software.

The production of caryopses, embryos and haploid plants was similar with the four maize genotypes, including the mixture of pollen (Table 1). This result contrasts with other studies in which differences in the production of embryos and haploid plants have been observed among maize genotypes (David et al., 1999; Lefebvre and Devaux, 1996; Vinesh-Verma et al., 1999; Zhang et al., 1996). Possibly, this could be because all three

hybrids of maize are from the same company and, as a result, they may have similar genetic backgrounds. In any case, it is important to note that the production of embryos and haploid plants per pollinated floret (24.5% embryos, 15.5% haploid plants and 12% embryos, 5.5% haploid plants, for high and low responding wheat, respectively) was high when compared with other works in durum wheat (Almouslem et al., 1998; David et al., 1999; Inagaki et al., 1998; O'Donoghue and Bennett, 1994a) and, therefore, the three maize hybrids can be considered as good pollinators.

The production of caryopses and the production of embryos with the high responding wheat were similar for the four genotypes of pearl millet. The production of embryos with the low-responding wheat and the production of haploid plants with both wheat types showed significant differences (Table 2). For the production of grains and embryos, the best line of pearl millet (TIFT 23B) was similar to the other two (TIFT 65 and TIFT 93), and to the mixture of pollen, but the production of haploid plants with TIFT 23B was higher due to better embryo germination. Therefore, the observed differences in the production of haploid plants among the pearl millet lines were largely associated with differences in frequency of embryos that develop into plants. These results agree with others obtained in bread wheat  $\times$  maize crosses (Vinesh-Verma et al., 1999) and indicate that both frequencies, the formation and the germination of embryos are independent traits. The production of haploid plants must be the criterion for selecting the pollinator genotypes. In addition, mixtures of pollen are not appropriate without some previous evaluation of the genotypes, because the production of haploid plants is reduced with respect to the yield with the best pollinator.

**Acknowledgements** This research was supported by grant RTA02-078-C4-3 from INIA of the Spanish Ministry of Science and Technology

Table 1.- Results from the crosses of two durum wheat lines with four sources of fresh maize pollen.

Maize genotypes	Durum wheat H (high responding)			Durum wheat L (low responding)		
	No. of developed ovaries per spike	No. of embryos per spike	No. haploid plants per spike	No. of developed ovaries per spike	No. of embryos per spike	No. haploid plants per spike
Cherif	11.9 a	5.4 a	2.6 a	9.9 a	2.6 a	1.4 a
Forban	11.4 a	4.4 a	3.2 a	10.4 a	3.0 a	1.1 a
Sancho	13.1 a	4.9 a	3.2 a	7.4 a	1.8 a	1.3 a
Mixture	11.0 a	4.7 a	3.1 a	11.6 a	2.4 a	0.7 a
Average	11.8	4.9	3.0	9.8	2.4	1.1

Each value is the mean from seven spikes with 20 pollinated flowers for each one. Mean values followed by different superscript letters differ significantly at  $P = 0.05$  according to Fisher's least significant difference test.

Table 2.- Results from crosses of two durum wheat lines with four sources of frozen pearl millet pollen.

Pearl millet genotypes	Durum wheat H (high responding)			Durum wheat L (low responding)		
	No. of developed ovaries per spike	No. of embryos per spike	No. haploid plants per spike	No. of developed ovaries per spike	No. of embryos per spike	No. haploid plants per spike
PG1	13.4 a	5.1 a	4.0 a	14.7 a	2.7 a	1.8 a
PG2	15.0 a	3.9 a	0.9 b	17.2 a	0.7 b	0.3 b
PG4	15.8 a	4.6 a	0.2 b	15.4 a	1.3 ab	0.3 b
Mixture	13.9 a	4.2 a	1.7 b	18.3 a	2.2 a	0.7 b
Average	14.5	4.2	1.8	16.4	1.6	0.7

Each value is the mean from seven spikes with 20 pollinated flowers for each one. Mean values followed by different superscript letters differ significantly at P = 0.05 according to Fisher's least significant difference test.

**CAPÍTULO IV:**  
**DIFFERENCES AMONG AUXIN TREATMENTS ON HAPLOID**  
**PRODUCTION IN DURUM WHEAT × MAIZE CROSSES.**



**4.- Differences among auxin treatments on haploid production in durum wheat × maize crosses.** (Diferencias entre tratamientos con auxinas en la producción de haploides mediante cruzamientos de trigo duro × maíz).

Publicado como:

C. García-Llamas, A. Martín, J. Ballesteros. **Differences among auxin treatments on haploid production in durum wheat × maize crosses.** Plant Cell Rep 23:46–49 (2004).





## Resumen

Tres líneas dihaploides de trigo duro [*Triticum turgidum* ssp. *durum* (Desf.) Husn.] se cruzaron con maíz (*Zea mays* L.) y se evaluó el efecto de cinco tratamientos hormonales en la producción de cariósides, embriones y plantas haploides. Las auxinas aplicadas fueron: 100 mg/l de 2,4-dichlorophenoxyaceticacid (2,4-D), 5 mg/l o 50 mg/l de dicamba y dos mezclas 95/5 mg/l y 50/50 mg/l de 2,4-D más dicamba respectivamente. Las hormonas se añadieron al medio de cultivo de los tallos cortados. No se observaron diferencias entre los tratamientos que contenían dicamba pero la producción de cariósides, embriones y plantas haploides se incrementó significativamente con estos tratamientos. De media se obtuvieron 8.9 cariósides, 2.6 embriones y 1.3 plantas haploides por espiga con 100 mg/l 2,4-D, y 15.0 cariósides, 6.0 embriones y 3.0 plantas haploides por espiga con los tratamientos que contenían dicamba. Se propone la aplicación de dicamba solo, o mezclado 2,4-D, para incrementar la producción de plantas haploides de trigo duro mediante cruzamientos con maíz.

**Palabras clave:** *Triticum durum*- hibridación interespecífica-rescate de embriones-producción de haploides.



### **Abstract**

Three doubled haploid lines of durum wheat were crossed with maize (*Zea mays* L.), and five hormone treatments were applied to test their effect on the production of caryopses, embryos and haploid plants. The auxin treatments consisted of 100 mg/l 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 5 mg/l or 50 mg/l dicamba and two combination mixtures of 95/5 mg/l and 50/50 mg/l 2,4-D plus dicamba, respectively. Hormones were added to the culture medium of the detached tillers. Differences were not observed among the four hormone treatments that contained dicamba, nevertheless, these treatments significantly increased the production of caryopses, embryos and haploid plants. On average, 8.9 caryopses, 2.6 embryos and 1.3 haploid plants per spike were obtained following the treatment with 100 mg/l 2,4-D, and 15.0 caryopses, 6.0 embryos and 3.0 haploid plants per spike were obtained following the various treatments with dicamba. We propose the application of dicamba alone, or dicamba plus 2,4-D, as a means for improving the yield of haploid plants of durum wheat through crosses with maize.

**Keywords:** *Triticum durum* - Interspecific hybridization -Embryo rescue- Haploid production.



## **Introduction**

During the last 15 years the maize method has emerged as an efficient technique for producing haploid plants of wheat (Laurie and Reymondie, 1991). It has been found to be superior to both anther culture (Fedak et al., 1997; Kisana et al., 1993; Sadasivaiah et al., 1999) and the *Hordeum bulbosum* method (Laurie and Reymondie, 1991; O'Donoghue and Bennett, 1994b) mainly due to a lower dependence on wheat genotype and the absence of albinism.

In wheat × maize crosses wheat ovules are fertilized by alien pollen, with the frequency of fertilization by the alien pollen ranging from 10.7% to 66.6% (Laurie and Reymondie, 1991; O'Donoghue and Bennett, 1994a). Following fertilization, zygote induction takes place, and the chromosomes of the male parent are eliminated from the cells of the developing embryo (Laurie and Bennett, 1989). The viability of these zygotes is low, and most of them abort during the initial stages of development (Laurie and Bennett, 1988). The application of auxins, however, induces ovary enlargement and enhances the development of the haploid embryos to a stage that enables their culture onto nutrient media (Laurie and Reymondie, 1991).

There is a general consensus among researchers on both the need to apply auxins as a means of recovering haploid embryos and the advantage to applying them following pollination since they induce rapid vacuolization and hydrolyzation of the embryo sac which, in turn, restrains fertilization (Matzk, 1991). However, there are many variations among the hormone treatments applied, including type and concentration of auxin as well as method and time of hormone application (for a review, see Knox (Knox et al., 2000). Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) is the most widely used

hormone, followed by dicamba (3,6-dichloro-o-anisic acid). In bread wheat, both hormones have been shown to be equally effective (Matzk and Mahn, 1994), while in durum wheat (Knox et al., 2000) and triticale (Wedzony et al., 1998) the best results have been obtained with dicamba. The concentrations of hormones used in the various treatments have ranged from 3 mg/l to 1,000 mg/l (Almouslem et al., 1998; Matzk and Mahn, 1994), with 100 mg/l being one of the more commonly used concentrations. The hormone solutions have been applied to pollinated flowers in various ways— injection of the last internode with a syringe, direct placement inside the floret, immersion or spraying of the spikes, addition of the detached tiller to the culture medium —and all have been effective in sustaining embryo development. Consequently, the cheapest methods would seem to be the ones to use. Hormones have been applied one or several times up to the point of embryo rescue. As the best of our knowledge comparative studies have not been carried out but only one treatment seems to be sufficient to obtain adequate development of caryopses and embryos. In general, hormones have been applied 1 day after pollination, although Matzk and Mahn (Matzk and Mahn, 1994) obtained better results applying them once between 2 days and 4 days post-pollination.

Since 2000 investigations aimed at improving the production of doubled haploid (DH) plants of durum wheat by the maize method have been carried out at the Institute of Sustainable Agriculture in Córdoba, Spain. Many variables affect this process and, therefore, it is necessary to identify the most significant. We use a detached tillers culture (Inagaki et al., 1997) because of its two important advantages—(1) optimum control of environmental growing conditions during pollination and embryo development; (2) the low cost of hormone application. An additional

advantage is the possibility to produce haploid plants over a wide period of time. In a previous investigation we observed that the relative humidity in the growth chamber, throughout the culture period of the detached tillers, notably affects the production of caryopses, embryos and haploid plants (Ballesteros et al., 2003). Differences in the capacity of the embryos to germinate, which is associated with the genotype of the pollinator, have also been observed, which suggests that it is desirable to use pollinators previously selected by an aptitude to produce haploid plants (García-Llamas et al., 2004; Vinesh-Verma et al., 1999). In the investigation reported here, the influence of hormone treatment on the production of caryopses, embryos and haploid plants in durum wheat × maize crosses was tested.

## **Materials and methods**

### *Plant materials*

Three DH lines of durum wheat [*Triticum turgidum* ssp. *durum* (Desf.) Husn.], previously selected for a high, intermediate and low response to the wheat × maize crosses, respectively, were pollinated with a bulk of fresh pollen from three commercial maize (*Zea mays* L.) hybrids: Forban, Sancho and Cherif (provided by the Semillas Verneuille, Córdoba, Spain). One hundred plants of each durum wheat lines were grown in greenhouse from October to December 2002. The temperature in the greenhouse was maintained (by heating or cooling) between 7°C and 25°C, and light was supplemented to maintain a 13/11-h (light/dark) photoperiod. Maize genotypes were seeded weekly for 2 months, simultaneously with the wheat sowing, and grown in the greenhouse under the same conditions as the durum wheat lines.



### *Crosses and culture of detached tillers*

A maximum of two spikes per wheat plant were manually emasculated. The basal and top spikelets, as well as the middle florets of each spikelet, were removed leaving ten spikelets and 20 emasculated flowers per spike. Tillers with emasculated spikes were cut off 1 day or 2 days before anthesis, sprayed with insecticide and fungicide solutions and placed in a solution containing 40 g/l sucrose, 100 mg/l silver nitrate and 8 ml/l sulphurous acid (Inagaki et al., 1997). Groups of 25–30 tillers were covered with a perforated polyethylene bag and transferred to a growth chamber maintained at a 21/16°C (light/dark) temperature regime and a 14/10-h (light/dark) photoperiod. At the approximate time of anthesis, florets were pollinated with a mixture of fresh maize pollen.

### *Auxin treatments and embryo rescue*

Two days after pollination, the cut tillers were transferred to the same medium supplemented with hormone(s) for 48 h. They were then placed back in the medium without hormone(s) where they remained until embryo rescue. The hormone treatments were: 100 mg/l 2,4-D, 5 mg/l or 50 mg/l dicamba, 95 mg/l 2,4-D plus 5 mg/l dicamba and 50 mg/l 2,4-D plus 50 mg/l dicamba. The embryos were rescued between 15 days and 17 days after pollination and cultured as described by Ballesteros et al. (2003).

### *Statistical analysis*

The number of caryopses, embryos and haploid plants per spike were counted. For each trait, analysis of variance and Fisher's least

significant difference (LSD) comparison of means were calculated using SPSS statistical software.

## **Results**

The treatments with dicamba, alone or in combination with 2,4-D, produced more caryopses, embryos and haploid plants than the control treatment (100 mg/l 2,4-D) with the three lines of wheat (Table 1). In contrast, significant differences were not observed between the four treatments containing dicamba. On average, 8.9 caryopses, 2.6 embryos and 1.3 haploid plants per spike were obtained following treatment with 100 mg/l of 2,4-D, and 15.0 caryopses, 6.0 embryos and 3.0 haploid plants per spike were obtained with the dicamba treatments.

Important differences in the evaluated traits were also observed among the wheat DH lines. These differences were similar with all five hormone treatments, and therefore any interaction between hormone treatment and lines of wheat was not apparent. Line 1A, selected for its high response to the wheat × maize crosses, produced more caryopses and embryos than line 3A, which had been selected for its intermediate response; both lines produced a comparable number of haploid plants. Lines 1A and 3A produced more caryopses, embryos and haploid plants than line 3B, which had been selected for its low response.

## Discussion

In wheat × maize crosses the fertilization frequencies are high (Laurie and Reymondie, 1991; O'Donoghue and Bennett, 1994a). Therefore, the keys to improving this technique—apart from general recommendations for obtaining adequate rates of fertilization, like using healthy wheat plants, pollination around anthesis, using viable pollen of selected genotypes—seem to be focus on the later development of caryopses and embryos. In the investigation reported here fertilization rates were not directly assessed, but the high frequency of rescued embryos (Table 1) indicates that these rates were indeed elevated. Both caryopse and embryo development were dependent on the wheat line used and the hormone treatment.

The influence of wheat genotype on the production of caryopses and embryos has been extensively observed (Almouslem et al., 1998; David et al., 1999; Inagaki et al., 1998; Knox et al., 2000; O'Donoghue and Bennett, 1994a). However, we concluded that in all three wheat lines the four treatments that contained dicamba, either alone or mixed with 2,4-D, were better than the control treatment with respect to a higher and more stable production of both caryopses and embryos given that the frequencies of germination of embryos to haploid plants were similar (on average approximately 50%). These results agree with those reported by Knox et al. (2000), who found that dicamba was superior to 2,4-D in producing haploid plants in durum wheat × maize crosses.

Hormone concentration did not affect the results. In bread wheat, the optimal range of 2,4-D and dicamba has been determined to be 50–100 mg/l (Matzk and Mahn, 1994), but 100 mg/l dicamba has been considered to be

excessive in combination with the protocol described here. Although this concentration produced more caryopses and embryos than 100 mg/l 2,4-D, the embryos obtained were malformed and few germinated (15% with dicamba vs. 50% with 2,4-D). For this reason, with the intention of combining the high production of caryopses obtained with dicamba and the best quality of embryo germination obtained with 2,4-D, we tested lower dicamba concentrations and mixtures of dicamba plus 2,4-D. This objective was achieved with the four treatments that contained dicamba. In conclusion, a wide range of dicamba concentrations, alone or mixed with 2,4-D, can be used to successfully produce haploid plants of durum wheat by the maize method.

**Acknowledgements** The research was supported by grant RTA02-078-C4-3 from INIA of the Spanish Ministry of Science and Technology.



**Table 1** Mean numbers of caryopses, embryos and haploid plants produced in the three durum wheat lines following different auxin treatments

Wheat genotypes	Evaluated traits	Auxin treatment				
		100 mg/l 2,4-D	50 mg/l dicamba	5 mg/l dicamba	95 mg/l 2,4D + 5 mg/l dicamba	50 mg/l 2,4D + 50 mg/l dicamba
	Pollinated spikes	16	15	16	15	16
1A	Caryopses per spike	10.2 b	19.8 a	19.5 a	19.5 a	18.8 a
	Embryos per spike	3.1 b	7.5 a	8.6 a	8.6 a	7.4 a
	Haploid plants per spike	1.5 b	3.1 a	3.1 a	3.5 a	3.1 a
	Pollinated spikes	15	15	17	16	15
3A	Caryopses per spike	10.5 a	14.8 a	13.6 a	14.5 a	14.5 a
	Embryos per spike	3.3 b	6.5 a	5.8 a	5.8 a	7.0 a
	Haploid plants per spike	1.9 b	4.5 a	3.2 ab	3.7 ab	4.7 a
	Pollinated spikes	10	13	13	8	13
3B	Caryopses per spike	3.9 c	7.8 a	11.1 a	10.7 ab	10.6 a
	Embryos per spike	0.6b	2.2 a	3.2 a	1.8 ab	3.3 a
	Haploid plants per spike	0.2 a	0.8 a	0.7 a	1.0 a	1.1 a
	Pollinated spikes	41	43	46	39	44
General average	Caryopses per spike	8.9 b	14.5 a	15.0 a	15.7 a	14.9 a
	Embryos per spike	2.6 b	5.6 a	6.3 a	6.0 a	6.1 a
	Haploid plants per spike	1.3 b	2.9 a	2.7 a	3.1 a	3.1 a

Values in the same rows marked with distinct letter differ significantly at  $P=0.05$



**CAPÍTULO V:**

**PRODUCCIÓN DE DIHAPLOIDES DE TRIGO DURO Y  
HARINERO PARA UN PROGRAMA COMERCIAL DE MEJORA.**





## INTRODUCCIÓN

Entre las técnicas existentes para producir plantas haploides de trigo duro; cultivo de anteras y microsporas y cruzamientos interespecíficos, el método del maíz es hoy en día el más adecuado. Por un lado, los cruzamientos trigo por maíz presentan menor dependencia del genotipo trigo y tasas más altas de producción de embriones que los cruzamientos con *Hordeum bulbosum* (O'Donoghue and Bennett, 1994b). Por otro lado, el cultivo de microsporas de trigos duros es todavía económicamente inviable, pues muestra una fuerte dependencia del genotipo de trigo y una elevada producción plantas albinas (Dogramaci-Altuntepe et al., 2001; J'Aiti et al., 1999).

En el año 2000, comenzamos a producir plantas dihaploides de trigo duro, mediante el método del maíz, para el Programa Nacional de Mejora de Trigo Duro. El objetivo era doble: por un lado producir plantas dihaploides para este programa de mejora. Por otro lado, intentar mejorar el método, pues los rendimientos obtenidos por otros investigadores eran bajos y muy variables. Entre las variantes que presenta esta técnica elegimos el cultivos de tallos cortados (Inagaki et al., 1997), pues permite un buen control de las condiciones ambientales durante la polinización y el desarrollo posterior de los embriones y se reducen los costes de aplicación de las hormonas.

En los capítulos anteriores se abordaron tres factores que nos permitieron mejorar esta técnica: la humedad relativa de las cámaras durante el cultivo de los tallos cortados, el genotipo del polinizador y el tratamiento hormonal aplicado. El objetivo de este ensayo fue evaluar el protocolo desarrollado. Para ello se produjeron plantas dihaploides de trigo duro y harinero para el programa comercial de mejora de la empresa Agrovegetal y

se calcularon los rendimientos, los costes y el tiempo requerido para producir plantas dihaploides de trigo en nuestras condiciones.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Genotipos y condiciones de cultivo**

Quince líneas F<sub>3</sub> de trigo duro y 10 líneas F<sub>3</sub> de trigo harinero se seleccionaron por su aspecto agronómico por la empresa Agrovegetal. Dentro de cada línea se seleccionaron 5 espigas que mostraron el perfil de proteínas de almacenamiento buscado y una elevada resistencia en plántula a *Septoria tritici* (Rob. ex Desm.). De cada espiga seleccionada se sembraron dos granos individualizados en macetas de 1000 cm<sup>3</sup> de capacidad. La siembra se realizó el día 16 de septiembre de 2002. El sustrato que se utilizó fue una mezcla al 50% de turba y arena. Las plantas se colocaron en un jaulón con malla antipájaros hasta comienzos de octubre, que se trasladaron a un invernadero con control de temperatura e iluminación artificial. Las condiciones del invernadero fueron: T<sub>max</sub> < 25°C, T<sub>min</sub> > 7°C y suplemento de la luz natural para completar 13 horas de iluminación. Las plantas se fertilizaron y regaron para que tuvieran un buen desarrollo y semanalmente se trataron con fungicidas e insecticidas para mantenerlas libres de plagas y enfermedades.



Figura 22.- Habítaculo en invernadero para el maíz.

Como polinizador se empleó una mezcla de polen de tres híbridos comerciales de maíz: Cherif, Sancho y Forban, proporcionados por la empresa Semillas Vernuille, que en ensayos previos se comportaron como buenos polinizadores. El maíz se sembró escalonadamente durante dos meses para asegurar la disponibilidad de polen fresco. Semanalmente se sembraron tres macetas de 25 dm<sup>3</sup> de capacidad, una por genotipo, comenzando el día 26 de agosto. En cada maceta se sembraron 5 granos del genotipo correspondiente. El sustrato y las prácticas culturales fueron similares a las del trigo. Inicialmente el maíz se cultivó en un jaulón con malla antipájaros. A partir de octubre se cultivó en un habitáculo de plástico construido dentro del invernadero, con  $T_{max} < 25^{\circ}\text{C}$ ,  $T_{min} > 13^{\circ}\text{C}$  y suplemento de la luz natural para completar 13 horas de iluminación (Figura 22).

## **Cruzamientos**

De cada planta se cruzaron una o dos espigas y de cada espiga se castraron manualmente 20 flores. La castración se realizó uno o dos días antes de la antesis para evitar autofecundaciones. Aproximadamente el día de antesis, los tallos con las espigas castradas se cortaron por debajo de la segunda hoja y se introdujeron en botes con medio líquido. En cada bote se pusieron 200 cm<sup>3</sup> de medio y un máximo de 25 espigas. El medio era una solución acuosa con 40g/l de sacarosa, 8ml/l de ácido sulfuroso y 100mg/l de nitrato de plata (Inagaki et al., 1997). Una vez en el bote, las espigas se trataron con una mezcla de insecticida y fungicida, se encapucharon con bolsas de polipropileno microperforado y se colocaron en una cámara de cultivo con temperaturas de 21°C con luz y 19 °C en oscuridad, 16 horas de iluminación y humedad relativa en torno a 55%-65% con luz y oscuridad respectivamente.

Se polinizó con polen fresco de maíz entre 5 minutos y una hora después de su recolección. Cada mañana temprano se sacudió el maíz para eliminar el polen del día anterior, de color amarillo oscuro. Entre las 10-11h de cada día se recogió el polen fresco que tenía un color amarillo intenso. Tras tamizarlo, para eliminar los restos de anteras, se polinizaron las flores de trigo. Todas las flores de una espiga se polinizaron el mismo día. La polinización se realizó cuando las flores de las espiguillas centrales tenían los estigmas plumosos y las glumas ligeramente separadas. El polen se aplicó con una pinza separando ligeramente las glumas y dejándolo caer los estigmas.

### **Aplicación de auxinas.**

Al día siguiente de la polinización las espigas se pasaron a un recipiente que contenía el medio líquido descrito anteriormente con 95 mg/l de 2,4-D más 5 mg/l de dicamba. Las espigas permanecieron en estas condiciones durante 48 horas y después se colocaron de nuevo en el medio líquido sin hormona. En estas condiciones permanecieron hasta el día del recate de embriones.

### **Rescate de embriones**

De 15 a 17 días tras la polinización se llevó a cabo el rescate de los embriones. Las espigas se separaron de los tallos cortándolas por la base y se esterilizaron durante 5 minutos en lejía comercial al 20%. Después se lavaron con agua corriente, se extrajeron los granos y se depositaron en una gasa con la que se formó una especie de bolsita etiquetada. Posteriormente los granos se esterilizaron en la cámara de flujo sumergiendo las bolsitas 5 minutos en etanol al 70% y 10 minutos en lejía comercial al 20%. Por último, para eliminar los restos de la lejía, se enjuagaron 4 veces con agua destilada estéril.

Los embriones se extrajeron en una cámara de flujo laminar bajo una lupa ( $\times 7$ ) con la ayuda de lancetas. Una vez extraídos se colocaron en placas de Petri de 90 mm de diámetro sobre un medio de cultivo sólido. En cada placa se colocaron de 4 a 5 embriones de la misma espiga con el escutelo en contacto con el medio y el coleoptilo hacia arriba (Figuras 13 a 16).

El medio de cultivo de los embriones fue el MS (Murashige and Skoog, 1962) diluido a la mitad, más 30 g/l de sacarosa y 10 g/l de Agargel. El pH del medio se ajustó a 5.7. El medio se autoclavó y se vertió en las placas en condiciones de esterilidad, a razón de 25 cm<sup>3</sup> por placa.

Los embriones se cultivaron en una cámara oscura a 10°C durante una semana tras la cual se pasaron a otra cámara climatizada con 16 horas de luz y régimen térmico 22°C con luz y 19 °C con oscuridad.

El trasplante a maceta se realizó cuando las plantas tenían 2-3 hojas, aproximadamente un mes después de colocar los embriones a la luz. Lo más importante de esta operación era mantener un nivel alto de humedad alrededor de las plantas trasplantadas, durante 3-4 días. Para ello se colocaron botes de plástico o cristal invertidos sobre las plantas (Figura 19). El cultivo se realizó en invernadero y tanto el sustrato como las condiciones de cultivo fueron las ya descritas para las plantas de trigo parentales.

### **Tratamiento con colchicina**

Cuando las plantas tenían al menos dos tallos, uno de ellos encañado, fueron tratadas con colchicina. Para ello usamos el método del vial invertido (Jensen, 1977). Los viales de 6 mm de diametro interior y 0.3 cm<sup>3</sup> de capacidad se rellenaron con una solución de colchicina al 0.1% más dimetil sulfóxido al 0.25%. A cada planta haploide se le cortó el tallo encañado unos 3cm por encima del primer nudo y se le colocó el vial invertido en contacto con el tocón del tallo cortado (Figura 20). La colchicina se aplicó en días soleados con temperaturas entre 20-25°C, pues previamente habíamos comprobado que bajo estas condiciones se acelera la

absorción de la colchicina, aproximadamente en 2 horas, y se obtiene un elevado número de plantas duplicadas.

### **Recolección de granos dihaploides**

Cuando las plantas haploides espigaron se observaron algunos sectores duplicados en las espigas. Las flores de estos sectores tenían anteras con polen y la mayoría de estas flores produjeron granos (Figura 21). Cuando las plantas se secaron se recolectaron las espigas, se desgranaron y los granos dihaploides de cada planta se almacenaron en sobres independientes debidamente identificados.

### **Análisis de datos**

La espiga fue la unidad experimental en este ensayo. A cada espiga se le contó el número de granos, de embriones y el número de plantas haploides y dihaploides obtenidas. Para cada carácter se aplicó el análisis de la varianza y cuando aparecieron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ), se compararon las medias mediante la prueba MDS (Mínima Diferencia Significativa). Estos análisis se realizaron con el paquete estadístico SPSS.



## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN.**

En la mayoría de los trabajos realizados con la técnica del maíz se han observado diferencias significativas entre los genotipos de trigo en las producciones de embriones y plantas haploides (Almouslem et al., 1998; Bitsch et al., 1998; David et al., 1999; Inagaki and Hash, 1998; O'Donoghue and Bennett, 1994a; Saïdi et al., 1998; Suenaga et al., 1997). En este trabajo se corroboró esta generalidad (Tablas 8 y 9) pero hay que destacar que se obtuvieron producciones de plantas haploides (1.5-4.5 haploides por espiga con trigo duro y 2.5-8.1 con trigo harinero) que son netamente superiores a las obtenidas por otros investigadores. (Almouslem et al., 1998; Amrani et al., 1993; Cherkaoui et al., 2000; David et al., 1999; Inagaki and Hash, 1998; Inagaki et al., 1998; Knox et al., 2000; Riera-Lizarazu and Mujeeb-Kazi, 1993; Riera-Lizarazu et al., 1992; Saïdi et al., 1998; Savaskan et al., 1997). Puesto que hemos utilizado genotipos distintos es imposible sacar conclusiones de estas comparaciones. Sin embargo, las producciones que se obtuvieron con los peores genotipos son superiores a las obtenidas por la mayoría de los investigadores con sus mejores genotipos (Tabla 7), lo que sugiere que las modificaciones que se han introducido en el protocolo, sobre todo el control de la humedad relativa de las cámaras de cultivo y el tratamiento hormonal, lo han mejorado sustancialmente.

En este ensayo se observó también una diferencia clara entre los trigos duros y harineros en la producción media de plantas haploides (3.5 por

espiga en trigo duro frente a 5.7 en trigo harinero) y dihaploides (2.6 por espiga en trigo duro frente a 3.7 en trigo harinero). La superioridad del trigo harinero se debió a una mejor calidad de los embriones para desarrollarse a plantas haploides pues las producciones medias de embriones (6.1 por espiga en trigo duro y 6.6 en trigo harinero) y las tasas medias de duplicación cromosómica (74.3% para los trigos duros y 68,4% para los harineros) fueron similares.

La mayoría de los investigadores aplican la colchicina sumergiendo las raíces de las plantas en una solución de colchicina (Tabla 7). En este trabajo se empleó el método del vial invertido (Jensen, 1977) (Figura 20) y se obtuvieron tasas de duplicación cromosómica iguales o superiores a las de otros investigadores. Por lo tanto, dado que el método del vial consume menos mano de obra y es más barato, parece aconsejable su uso.

Además de los rendimientos obtenidos, dos factores muy importantes de un protocolo para producir plantas dihaploides son los costes de producción y la duración del proceso.

Los costes de producción se han calculado teniendo en cuenta los rendimientos y gastos que se han tenido en personal, materiales e instalaciones (Tabla 10). El resultado ha sido de 5,20 €por planta dihaploide de trigo harinero y 6,53 €por planta dihaploide de trigo duro.

Con estos costes es inviable económicamente producir plantas dihaploides de la generación  $F_1$ , pues en cualquier programa de mejora de trigo se manejan más de 50 cruzamientos. Para recuperar gran parte de la variabilidad que se genera se deberían producir entre 1000-2000 dihaploides de cada  $F_1$ , lo que encarecería el programa en más de 500.000 euros.

Seleccionar plantas individuales  $F_2$  y producir dihaploides en su descendencia carece de sentido, pues la respuesta a la selección que cabe esperar es muy baja. Proponemos, por lo tanto, seleccionar las 100 mejores familias  $F_3$  del programa de mejora y producir dihaploides en su descendencia (Figura 23). Dentro de estas familias se seleccionarían las 5 mejores espigas y de cada una de ellas se producirían 4 plantas dihaploides. En total se producirían 2000 dihaploides y el coste sería de 10.400 € si son de trigo harinero y 13.000 € si son de trigo duro.

El tiempo empleado desde la siembra de los parentales hasta la obtención de los granos dihaploides fue de 9-10 meses. Con esta duración, el calendario que hemos empleado en este ensayo es el que proponemos para nuestras condiciones (Tabla 11). De acuerdo con el mismo las líneas de trigo  $F_3$  que se seleccionen en campo (junio) pueden ser evaluadas durante el verano para calidad y resistencia en plántula a enfermedades. El grano  $F_4$  de las líneas seleccionadas se sembraría en otoño, los cruzamientos con maíz se harían en noviembre-diciembre y los granos dihaploides se recogerían en junio del año siguiente. Si es posible, se multiplicarían los granos dihaploides durante el verano y en noviembre-diciembre se sembrarían los ensayos de rendimiento. De esta forma el ciclo, desde la siembra de parentales a los ensayos de rendimiento de los dihaploides, sería de un año.

**Agradecimientos:** Este trabajo ha sido financiado con cargo al proyecto AGL 2000-0286-P4-03, de la Dirección General de Investigación (DGI) del Ministerio de Ciencia y Tecnología (MCYT).

Tabla 8. Producción de dihaploides de trigo blando, Noviembre 2002-Junio2003.

Cruzamiento	Línea	Espigas polinizadas	Granos / espiga	Embriones/ espiga	Haploides /espiga	Dihaploides/ espiga	Total Dihaploides
PVN//CAR422/ANA/3/BAV92/4/SERI/RAYON	3	15	19.7	9.1a	8.1a	6.0a	90
PASTOR/WBLL1	14	11	19.5	8.1ab	5.8bc	3.9bc	55
PASTOR*2/OPATA/4/PSN/BOW//SITTA/3/RDWG	25	13	18.9	7.3abc	6.0bc	4.4abc	57
PASTOR*2/OPATA/4/PSN/BOW//SITTA/3/RDWG	29	15	18.3	6.9bcd	6.3ab	4.7ab	71
RABE/6/WRM/4/FN/3*TH//K58/2*N/3/AUS-6869/5/PELOTAS-AR	54	8	19.2	5.9cd	4.0cd	2.4cd	19
TC870344/GUI//TEMPORALERA 87/AGR/3/SERI/RAYON	72	18	19.7	6cd	5.8bc	1.9d	34
TC870344/GUI//TEMPORALERA 87/AGR/3/SERI/RAYON	77	17	18.5	6.6bcd	5.8bc	3.7bc	63
PFAU/MILAN//KA/NAC	83	16	19.1	5.3d	4.7bc	3.9bc	63
PFAU/MILAN//KA/NAC	90	10	18.9	3.0e	2.5d	1.7d	17
PASTOR/BAV92//SERI/RAYON	95	13	18.1	6.7bcd	5.7bc	4.7ab	61
<b>VALORES MEDIOS Y TOTALES</b>	-	<b>136</b>	<b>19.0</b>	<b>6.6</b>	<b>5.7</b>	<b>3.9</b>	<b>530</b>
<b>P (Análisis de la varianza)</b>	-	-	<b>0.9000</b>	<b>0.0000</b>	<b>0.0004</b>	<b>0.0000</b>	-

Los valores de la misma columna seguidos de distinta letra difieren significativamente ( $P < 0.05$ ) de acuerdo con el Test MDS

Tabla 9. Producción de dihaploides de trigo duro. Noviembre 2002-Junio2003.

Cruzamiento	Línea	Espigas polinizadas	Granos/ espiga	Embriones/ espiga	Haploides/ espiga	Dihaploides/ espiga	Total Dihaploides
HUI/YAV79//DON87/3/SOOTY_9/RASCON_37	5	17	13.3ef	5.2def	3.5	2.7	46
HUI/YAV79//SHAG_10/3/SN TURK MI83-84 375/NIGRIS_5//TANTLO_1	31	16	16.5bcd	6.7bcd	4.5	3.5	56
HUI/YAV79//SHAG_10/3/SN TURK MI83-84 375/NIGRIS_5//TANTLO_1	32	13	10.5g	3.6f	1.5	1.0	13
HUI/YAV79//SHAG_10/3/DIPPER_1/TISOMA_2	35	19	17.2bc	5.4cdef	2.5	1.7	32
BICHENA_1/GRO_2/3/ALTAR84/SRN2//2*HAI-OU_1	54	17	11.5fg	4.1ef	2.7	2.2	38
CIT71/DIPPER_1//ARIZA_2/5/CHEN/ALTAR84/3/HUI/POC//BUB/RUFO/4/FNFOOT	55	17	19.1a	9.1a	4.5	3.1	53
MUSK_3/RASCON_33/6/PLATA_8/4/GARZA/AFN//CRA/3/GTA/5/RASCON	60	18	18.4ab	7.3abc	4.1	2.9	52
POD_11/YAZI_1/3/PLATA_1/SNM//PLATA_9	64	18	18.5ab	5.3cdef	3.7	2.7	49
POD_11/YAZI_1/3/BOOMER_18/LOTUS_4	70	18	18.2ab	5.2def	3.8	3.0	54
RASCON_21/3/MQUE/ALO//FOJA/4/KUCUK	74	17	16.9bc	6.7bcd	3.5	2.6	44
RASCON_21/3/MQUE/ALO//FOJA/4/KUCUK	77	17	15.3cde	6.2bcde	3.9	3.2	54
RASCON_21/3/MQUE/ALO//FOJA/4/KUCUK	78	15	17.7abc	7.9ab	4.0	3.0	45
RASCON_21/3/MQUE/ALO//FOJA/4/KUCUK	79	17	17.3bc	7.7ab	3.5	3.0	51
RASCON_21/3/MQUE/ALO//FOJA/4/KUCUK	80	14	17.6abc	6.1bcde	3.1	1.7	24
TILO_1/LOTUS_4/3/HUI/YAV79//SHAG_10	91	19	14.5de	4.8def	3.7	2.6	50
<b>VALORES MEDIOS Y TOTALES</b>		<b>252</b>	<b>16.3</b>	<b>6.1</b>	<b>3.5</b>	<b>2.6</b>	<b>660</b>
<b>P (Análisis de la varianza)</b>	-	-	<b>0.0000</b>	<b>0.0000</b>	<b>0.1931</b>	<b>0.1638</b>	-

Los valores de la misma columna seguidos de distinta letra difieren significativamente (P<0.05) de acuerdo con el Test MDS

Tabla 10: Presupuesto para la obtención de plantas dihaploides de trigo.

**RENDIMIENTOS MANO DE OBRA**

- Castración	30 Espigas	7 h
- Polinización	100 Espigas	7 h
- Rescate de embriones	15 Espigas	7 h
- Transplante de haploides	200 Plantas	7 h
- Tratamiento con colchicina	200 Plantas	7 h
- Trilla	200 Plantas	7 h
- Preparación de medios líquidos	1000 Plantas	7 h
- Preparación de medios sólidos	1000 Plantas	14 h

## PRODUCCIONES OBTENIDAS CON LA TÉCNICA DEL MAÍZ

	<u>Trigo harinero</u>	<u>Trigo duro</u>
Embriones por espiga	6,60	6,10
Haploides por espiga	5,70	3,50
DH por espiga	3,90	2,60

## RENDIMIENTO Y COSTE DE LA MANO DE OBRA PARA PRODUCIR 100 PLANTAS DIHAPLOIDES (DH) DE TRIGO DURO.

<u>Actividad</u>	<u>Horas</u>
- Siembra de los parentales	1,20
- Castración	8,97
- Polinización	2,80
- Rescate de embriones	18,00
- Transplante de haploides	4,70
- Tratamiento con colchicina	4,50
- Trilla	3,45
- Preparación de medios líquidos	1,40
- Preparación de medios sólidos	0,70
Horas totales	45.72
Coste/ hora de un Técnico de Investigación y Laboratorio	10,88€
<b>Coste de mano obra/100DH</b>	<b>497,43€</b>

**COSTES DE LOS MATERIALES Y PRODUCTOS PARA PRODUCIR  
100 PLANTAS DIHAPLOIDES DE TRIGO DURO**

**MATERIALES PARA EL CULTIVO DE PLANTAS**

<u>Material</u>	<u>Costes en €</u>
- Macetas	3,00
- Turba (70%) + Arena (30%) + Abono	25,00
- Tratamientos fitosanitarios	1,50
<b>Subtotal materiales</b>	<b>26,50 €</b>

**MATERIALES Y PRODUCTOS PARA LA PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS  
SÓLIDOS**

<u>Materiales y productos</u>	<u>Costes en €</u>
- Placas de Petri	50,40
- Sacarosa (40g/l)	0,45
- Agargel (10g/l)	3,42
- MS/2	1,28
	55,55 + 16% IVA
<b>Subtotal medios sólidos</b>	<b>64,40 €</b>



MATERIALES Y PRODUCTOS PARA LA PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS  
LÍQUIDOS

<u>Productos</u>	<u>Costes en €</u>
- Sacarosa (40g/l)	0,48
- Nitrato de plata (100 mg/l)	0,46
- Ácido sulfuroso (8ml/l)	0,64
	1,54+ 16% IVA
<b>Subtotal medios Líquidos</b>	<b>1,80 €</b>

PRODUCTOS PARA REALIZAR EL TRATAMIENTO HORMONAL Y CON  
COLCHICINA

<u>Productos</u>	<u>Costes en €</u>
- Dicamba (5mg/l)	0,30
- 2,4-D (95mg/l)	0,001
- Sacarosa (40g/l)	0,10
- Ácido sulfuroso (8ml/l)	0,13
- Colchicina (0,1%)	4,50
	5,03+ 16% IVA
<b>Subtotal hormonas y colchicina</b>	<b>5,82 €</b>

**COSTE TOTAL DE LOS MATERIALES Y PRODUCTOS PARA  
PRODUCIR 100 PLANTAS DIHAPLOIDES DE TRIGO DURO**

Materiales para el cultivo de plantas	26,50
Materiales y productos para la preparación de los medios sólidos	64,40
Materiales y productos para la preparación de los medios líquidos	1,80
Productos para realizar el tratamiento hormonal y con colchicina	5,82
<b>Subtotal materiales y productos</b>	<b>98,52 €</b>

**COSTE DE LAS INSTALACIONES NECESARIAS PARA LA  
PRODUCCIÓN DE 100 DH DE TRIGO DURO.**

<u>Instalaciones</u>	<u>Costes en €</u>
- Invernadero	37,60
- Cámara de cultivo de los embriones	8,00
- Cámara de cultivo de los tallos	8,00
- Cámara de flujo laminar	3,00
<b>Subtotal instalaciones</b>	<b>56,60 €</b>

**COSTES TOTALES PARA LA PRODUCCIÓN DE 100 PLANTAS  
DIHAPLOIDES DE TRIGO DURO**

- Mano de obra	497,43
- Materiales y productos	98,52
- Instalaciones	56,60
<b>Coste total 100/DH</b>	<b><u>652,55 €</u></b>
<b>Coste por planta dihaploide</b>	<b><u>6.53 €</u></b>

**RENDIMIENTOS Y COSTE DE LA MANO DE OBRA PARA PRODUCIR  
100 PLANTAS DIHAPLOIDES (DH) DE TRIGO HARINERO**

<u>Actividad</u>	<u>Horas</u>
- Siembra de los parentales	0,80
- Castración	5,98
- Polinización	1,87
- Rescate de embriones	16,63
- Transplante de haploides	2,90
- Tratamiento con colchicina	2,80
- Trilla	2,30
- Preparación de medios líquidos	1,29
- Preparación de medios sólidos	0,47
Horas totales	35,04
Coste/ hora de un Técnico de Investigación y Laboratorio	10,88€
<b>Coste de mano obra/100DH</b>	<b>381,23 €</b>

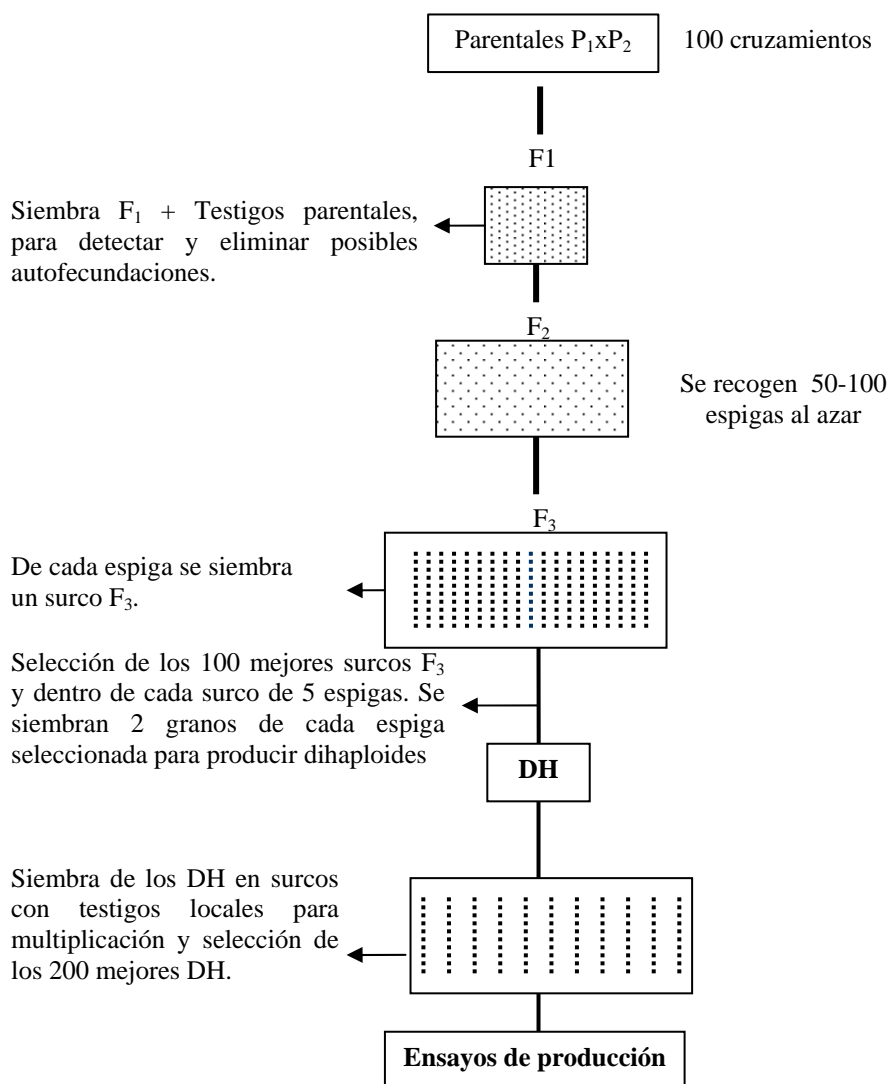
**COSTE DE LOS MATERIALES Y PRODUCTOS PARA PRODUCIR 100  
PLANTAS DIHAPLOIDES DE TRIGO HARINERO**

Materiales para el cultivo de plantas	17,66
Materiales y productos para la preparación de los medios sólidos	59,52
Materiales y productos para la preparación de los medios líquidos	1,20
Productos para realizar el tratamiento hormonal y con colchicina	3,60
<b>Subtotal materiales y productos</b>	<b>81,98 €</b>

**COSTES TOTALES PARA LA PRODUCCIÓN DE 100 PLANTAS  
DIHAPLOIDES DE TRIGO HARINERO**

- Coste de la mano de obra	381,23
- Coste de los materiales y productos	81,98
- Coste de las instalaciones	56,60
<b>Coste total 100/DH de trigo harinero</b>	<b><u>519,81 €100DH</u></b>
<b>Coste por planta dihaploide</b>	<b><u>5.20 €</u></b>

**Figura 23.-** Esquema del programa de mejora propuesto usando el método de dihaploidización.





**Tabla 11: CALENDARIO PROPUESTO PARA PRODUCIR TRIGOS DIHAPLOIDES EN ANDALUCÍA**

<b><u>Actividad</u></b>	<b><u>Fecha</u></b>
Siembra de los trigos parentales	Del 15 al 20 de Septiembre
Siembra del maíz (semanal)	Desde el 8 de Septiembre hasta el 20 de Octubre
Castración	Desde el 15 de Noviembre hasta el 20 de Diciembre
Rescate de los embriones haploides	Desde el 2 de Diciembre hasta el 3 de Enero
Transplante de placa de Petri a maceta	Desde el 2 de Enero hasta el 3 de Febrero
Tratamiento con colchicina	Desde el 15 de Febrero hasta el 20 de Marzo
Recogida del grano y trilla	Desde el 1 hasta el 10 de Junio





**CAPÍTULO VI**  
**CONCLUSIONES GENERALES.**



1.- El control de la humedad relativa de las cámaras de cultivo de los tallos cortados, manteniéndola a niveles medio-bajos, resulta fundamental para obtener una producción alta y estable de plantas haploides de trigo duro mediante el método del maíz

2.- La aplicación de dicamba, sólo o mezclado con 2,4-D, incrementa sustancialmente la producción de granos, y con ello de embriones y plantas haploides, en los cruzamientos trigo duro × maíz.

3.- Hay diferencias significativas entre los genotipos de trigo, tanto de duro como de harinero, en la producción de plantas haploides mediante el método del maíz. No obstante, con todos los genotipos se pueden obtener uno o más dihaploides por espiga.

4.- También hay diferencias entre polinizadores en la producción de plantas haploides por lo que, en un programa de producción de dihaploides, resulta aconsejable utilizar buenos polinizadores.

5.- El criterio para seleccionar los polinizadores debe ser la producción de plantas haploides, pues no hay diferencias entre ellos ni en la producción de granos ni en la producción de embriones haploides.

6.- Las mezclas de polen no son aconsejables excepto entre genotipos que previamente se hayan catalogado como buenos polinizadores.

7.- Como parentales trigo para la producción de plantas dihaploides se aconseja utilizar plantas  $F_4$ , procedentes de las mejores familias  $F_3$  seleccionadas.



## BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad, F., and A. Comeau. 1990. Wheat × pearl millet hybridization: consequence and potential. *Euphytica* 50:181-190.
- Almousslem, A.B., P.P. Jauhar, T.S. Peterson, V.R. Bommineni, and M.B. Rao. 1998. Haploid durum wheat production via hybridization with maize. *Crop Sci* 38:1080-1087.
- Amrani, N., Sarrafi, A. and G. Alibert. 1993. Genetic variability for haploid production in crosses between tetraploid and hexaploid wheats with maize. *Plant Breeding* 110:123-128.
- Ballesteros, J., C. García-Llamas, M.C. Ramírez, and Martín. 2003. Low relative humidity increases haploid production in durum wheat maize crosses. *Plant Breeding* 122:276-278.
- Barclay, I.R. 1975. High frequencies of haploid production in wheat (*Triticum aestivum*) by chromosome elimination. *Nature* 256:410-411.
- Barnabás, B., É. Szakács, I. Karsai, and Z. Bed. 2001. In vitro androgenesis of wheat: from fundamentals to practical application. *Euphytica* 119:211-216.
- Bitsch, C., S. Groger, and T. Lelley. 1998. Effect of parental genotypes on haploid embryo and plantlet formation in wheat × maize crosses. *Euphytica* 103:319-323.
- Curtis, B.C. 2002. Wheat in the world, p. 1-17, *In* B. C. Curtis, et al., eds. *Bread Wheat. Improvement and production*. FAO, Rome, Italy.
- Cherkaoui, S., O. Lamsaouri, A. Chlyah, and H. Chlyah. 2000. Durum wheat × maize crosses for haploid wheat production: influence of parental genotypes and various experimental factors. *Plant Breeding* 119:26-31.
- David, J.L., J.C. Dusautoir, C. Raynauld, and P. Roumet. 1999. Heritable variation in the ability to produce haploid embryos via pollination with maize and embryo rescue in durum wheat. *Genome* 42:338-342.
- Dogramaci-Altuntepe, M., T.S. Peterson, and P.P. Jauhar. 2001. Anther culture-derived regenerants of durum wheat and their cytological characterization. *The Journal of Heredity* 192 (1): 56-64.

- Falk, D.E., and K.J. Kasha. 1981. Comparisons of the crossability of rye (*Secale cereale*) and *Hordeum bulbosum* onto wheat (*Triticum aestivum*). *Can. J. Cytol.* 23:81-88.
- Falk, D.E., and K.J. Kasha. 1983. Genetic studies of the crossability of hexaploid wheat with rye and *Hordeum bulbosum*. *Theor Appl Genet* 64:303-307.
- Fedak, G., M. Burvill, and H.D. Voldeng. 1997. A comparison of anther culture and maize pollination for haploid production in wheat. *Journal of Applied Genetics* 38:407-414.
- Gamborg, O.L., R.A. Miller, and K. Olima. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cell. *Experimental Cell Research* 50:151-158.
- García-Llamas, C., M.C. Ramírez, and J. Ballesteros. 2004. Effect of pollinator on haploid production in durum wheat crossed with maize and pearl millet. *Plant Breeding* 123:201-203.
- Gill, B.S., and B. Friebe. 2002. Cytogenetics, phylogeny and evolution of cultivated wheats., p. 71-88, *In* B. C. Curtis, et al., eds. *Bread Wheat. Improvement and production*. FAO, Rome, Italy.
- Hanna, W.W. 1990. Long-term storage of *Pennisetum glaucum* (L.) R. Br. pollen. *Theor Appl Genet* 79:605-608.
- Inagaki, M.N., and A. Mujeeb-Kazi. 1995. Comparison of polyhaploid production frequencies in crosses of hexaploid wheat with maize, pearl millet and sorghum. *Breed. Sci.* 45:157-161.
- Inagaki, M.N., and C.T. Hash. 1998. Production of Haploids in Bread Wheat, Durum-Wheat and Hexaploid Triticale Crossed with Pearl-Millet. *Plant Breeding* 117:485-487.
- Inagaki, M.N., T. Nagamine, and A. Mujeeb-Kazi. 1997. Use of Pollen Storage and Detached-tiller Culture in Wheat Polyhaploid Production through Wide Crosses. *Cereals Research Communications* 25:7-13.
- Inagaki, M.N., W.H. Pfeiffer, M. Mergoum, and A. Mujeeb-Kazi. 1998. Variation of crossability of durum wheat with maize. *Euphytica* 104:17-23.

- Inagaki, M.N., and A. Mujeeb-Kazi. 1998. Production of polyhaploids of hexaploid wheat using stored pearl millet pollen. *Euphytica* 100:253-259.
- J'Aiti, F., F.O. Benlhabib, H.C. Sharma, S. El Jaafari, and I. El Hadrami. 1999. Genotypic variation in anther culture and effect of ovary coculture in durum wheat. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 59:71-76.
- Jalani, B.S., and J.P. Moss. 1980. The site of action of the crossability genes ( $Kr_1$ ,  $Kr_2$ ) between *Triticum* and *Secale*. I. Pollen germination, pollen tube growth, and number of pollen tubes. *Euphytica* 29:571-579.
- Jensen, C.J. 1977. Monoploid production by chromosome elimination., p. 299-340, *In* J. Reinert and Y. P. S. Bajaj, eds. *Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Kasha, K.J., and K.N. Kao. 1970. High frequency haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Nature* 225:874-876.
- Kato, K., S. Tomo, S. Yamazaki, and K. Hayashi. 1990. Simplified culture method of detached ears and its application to vernalization in wheat. *Euphytica* 49:161-168.
- Kisana, N.S., K.K. Nkongolo, J.S. Quick, and D.L. Johnson. 1993. Production of doubled haploids by anther culture and wheat  $\times$  maize method in a wheat breeding programme. *Plant Breeding* 110:96-102.
- Knox, R.E., J.M. Clarke, and R.M. DePauw. 2000. Dicamba and growth condition effects on doubled haploid production in durum wheat crossed with maize. *Plant Breeding* 119:289-298.
- Lange, W., and B. Wojciechowska. 1976. The crossing of common wheat with cultivated rye. 1. Crossability, pollen grain germination and pollen tube growth. *Euphytica* 25:609-620.
- Lange, W., and G. Jochemsen. 1976. Karyotypes, nucleoli, and amphiplasty in hybrids between *Hordeum vulgare* L. and *H. bulbosum* L. *Genetica* 46:217-233.
- Laurie, D.A. 1989a. The frequency of fertilization in wheat  $\times$  pearl millet crosses. *Genome* 32:1063-1067.



- Laurie, D.A. 1989b. Factors affecting fertilization frequency in crosses of *Triticum aestivum* cv. 'Highbury' × *Zea mays* cv. 'Seneca 60'. *Plant Breeding* 103:133-140.
- Laurie, D.A., and M.D. Bennett. 1986. Wheat × maize hybridization. *Can. J. Genet Cytol* 28:313-316.
- Laurie, D.A., and M.D. Bennett. 1987. The effect of the crossability loci  $Kr_1$  and  $Kr_2$  on fertilization frequency in hexaploid wheat × maize crosses. *Theor Appl Genet* 73:403-409.
- Laurie, D.A., and M.D. Bennett. 1988a. The production of haploid wheat plants from wheat × maize crosses. *Theor Appl Genet* 76:393-397.
- Laurie, D.A., and M.D. Bennett. 1988b. Cytological evidence for fertilization in hexaploid wheat × sorghum crosses. *Plant Breeding* 100:73-82.
- Laurie, D.A., and M.D. Bennett. 1989. The timing of chromosome elimination in hexaploid wheat × maize crosses. *Genome* 32:953-961.
- Laurie, D.A., and S. Reymondie. 1991. High Frequencies of Fertilization and Haploid Seedling Production in Crosses Between Commercial Hexaploid Wheat Varieties and Maize. *Plant Breeding* 106:182-189.
- Lefebvre, D., and P. Devaux. 1996. Doubled haploids of wheat from wheat × maize crosses: genotypic influence, fertility and inheritance of the 1BL-1RS chromosome. *Theor Appl Genet* 93:1267-1273.
- Li, D.W., J.W. Qio, P. Ouyang, Q.X. Yao, L.D. Dawei, Q. Jiwen, O. Ping, and Y. Qingxiao. 1996. High frequencies of fertilization and embryo formation in hexaploid wheat × *Tripsacum dactyloides* crosses. *Theor Appl Genet* 92:1103-1107.
- Liu, W., M.Y. Zheng, E.A. Polle, and C.F. Konzak. 2002. Highly Efficient Doubled-Haploid Production in Wheat (*Triticum aestivum* L.) via Induced Microspore Embryogenesis. *Crop Sci* 42:686-692.
- Martín, A., J.B. Álvarez, L.M. Martín, F. Barro, and J. Ballesteros. 1999. The development of tritordeum: a novel cereal for food processing. *J Cereal Sci* 30:85-95.
- Matzk, F. 1991. A novel approach to differentiated embryos in the absence of endosperm. *Sex Plant Reprod* 4:8-94.

- Matzk, F., and A. Mahn. 1994. Improved techniques for haploid production in wheat using chromosome elimination. *Plant Breeding* 113:125-129.
- Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. *Physiologic Plantarum* 15:473-479.
- Nagamine, T., S. Kaneko, and T. Yamada. 1996. Improvement in "Maize method" for efficient and labor-saving wheat haploid production, p. 772-773, *In* R. Ishii and T. Horie, eds. 2nd Asian Crop Science Conference "Toward the improvement of food production under steep population increase and global environment change". Fukui Prefectural University, Fukui, Japan.
- O'Donoghue, L.S., and M.D. Bennett. 1994a. Durum wheat haploid production using maize wide-crossing. *Theor Appl Genet* 89:559-566.
- O'Donoghue, L.S., and M.D. Bennett. 1994b. Comparative responses of tetraploid wheats pollinated with *Zea mays* L. and *Hordeum bulbosum* L. *Theor Appl Genet* 87:673-680.
- Orlov, P., A., E.B. Mavrishcheva, and N. Palilova. 1993. Estimation of the response to anther culturing in 60 genotypes of different wheat species. *Plant Breeding* 111:339-342.
- Ouyang, J.W., H. Hu, C.C. Chuang, and C.C. Tseng. 1973. Induction of pollen plants from anther of *Triticum aestivum* L. cultured in vitro. *Scientia Sinica* 16:79-95.
- Riera-Lizarazu, O., and A. Mujeeb-Kazi. 1993. Polyhaploid production in the Triticeae: wheat  $\times$  *Tripsacum* crosses. *Crop Sci* 33:973-976.
- Riera-Lizarazu, O., A. Mujeeb-Kazi, and M.D.H.M. William. 1992. Maize (*Zea mays* L.) mediated polyhaploid production in some Triticeae using a detached tiller method. *J Genet Breed* 46:335-346.
- Sadasivaiah, R.S., B.R. Orshinsky, and G.C. Kozub. 1999. Production of wheat haploids using anther culture and wheat  $\times$  maize hybridization techniques. *Cereal Res. Comm.* 27:33-40.
- Saïdi, N., O. Chlyah, and H. Chlyah. 1998. Production of green haploid durum wheat plants by pollination of wheat with maize. *Can J Bot* 76:652-656.

- Sarrafi, N., N. Amrani, and G. Alibert. 1994. Haploid regeneration from tetraploid wheat using maize pollen. *Genome* 37:176-178.
- Savaskan, C., C. Ellerbrook, L.J. Fish, and J.W. Snape. 1997. Doubled haploid production in Turkish durum wheats using crosses with maize. *Plant Breeding* 116:299-301.
- Sharma, H.C., and B.S. Gill. 1983. Current status of wide hybridization in wheat. *Euphytica* 32:17-31.
- Sitch, L.A., and J.W. Snape. 1986. The influence of the *Hordeum bulbosum* and the wheat genotype on haploid Production in wheat (*Triticum aestivum*). *Z. Pflanzenzüchtg* 96:304-319.
- Sitch, L.A., and J.W. Snape. 1987. Factors affecting haploid production in wheat using the *Hordeum bulbosum* system. 1. Genotypic and environmental effects on pollen grain germination, pollen tube growth and the frequency of fertilization. *Euphytica* 36:483-496.
- Sitch, L.A., J.W. Snape, and S.J. Firman. 1985. Intrachromosomal mapping of crossability genes in wheat (*Triticum aestivum*). *Theor Appl Genet* 70:309-314.
- Snape, J.W. 1989. Doubled haploid breeding: theoretical basis and practical applications, p. 19-30, *In* A. Mujeeb-Kazi and L. A. Sitch, eds. *Review of Advances in Plant Biotechnology, 1985-88*. CIMMYT and IRRI, Mexico, D.F., Mexico, and Manila, Philipines.
- Snape, J.W., M.D. Bennett, and E. Simpson. 1980. Post-pollination events in crosses of hexaploid wheat with tetraploid *Hordeum bulbosum*. *Z. Pflanzenzüchtg* 85:200-204.
- Snape, J.W., V. Chapman, C.E. Blanchard, and T.E. Miller. 1979. The crossabilities of wheat varieties whith *Hordeum bulbosum*. *Heredity* 42:291-298.
- Suenaga, K., A.R. Morshedi, and N.L. Darvey. 1997. Haploid production of Australian wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars through wheat × maize (*Zea mays* L.) crosses. *Aust J Agr Res* 48:1207-1211.
- Suenaga, K., A.R. Morshedi, and N.L. Darvey. 1998. Evaluation of teosinte lines as pollen parents for wheat haploid production. *Cereal Res Comm.* 26:119-125.

- Suzuki, D.T., A.J.F. Griffiths, J.H. Miller, and R.C. Lewontin. 1992. *Introducción al análisis genético*. Cuarta ed. Interamericana-McGraw-Hill.
- Thomas, J., C. Qin, and N. Howes. 1997. Chromosome doubling of haploids of common wheat with caffeine. *Genome* 40:552-558.
- Turesson, S., A. Ljungberg, N. Johansson, K.-E. Karlsson, L.W. Suijs, and J.-P. Josset. 2000. Large-scale production of wheat and triticale double haploids through the use of a single-anther culture method. *Plant Breeding* 119:455-459.
- Ushiyama, T., T. Shimizu, and T. Kuwabara. 1991. High frequency of haploid production of wheat through intergeneric crosses with Teosinte. *Jpn J Genet* 41:353-357.
- Van Slageren, M.W. 1994. *Wild wheats: a monograph of Aegilops L. and Amblyopyrum (Jaub. and Spach) Eig (Poaceae)* ICARDA / Wageningen Agricultural University, Wageningen, Netherlands.
- Vinesh-Verma, V., N.S. Bains, G.S. Mangat, G.S. Nanda, S.S. Gosal, K. Singh. 1999. Maize Genotypes Show Striking Differences for Induction and Regeneration of Haploid Wheat Embryos in the Wheat  $\times$  Maize System. *Crop Science* 39:1722-1727.
- Wedzony, M., I. Marcinska, A. Ponitka, A. Slusarkiewicz-Jarzina, and A. Wozna. 1998. Production of doubled haploids in triticale ( $\times$  *Triticosecale* Wittm.) by means of crosses with maize (*Zea mays* L.) using picloram and dicamba. *Plant Breeding* 117:211-215.
- Zhang, J., B. Friebe, W.J. Raupp, S.A. Harrison, and B.S. Gill. 1996. Wheat embryogenesis and haploid production in wheat  $\times$  maize hybrids. *Euphytica* 90:315-324.
- Zheng, M.Y. 2003. Microspore culture in wheat (*Triticum aestivum*) – doubled haploid production via induced embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 73:213-230.
- Zillinsky, F.J. 1974. The development of triticale. *Advances in Agronomy* 26:315-348.