

# EMBRIOGÉNESIS GAMÉTICA PARA OBTENCIÓN DE HAPLOIDES EN ALCORNOQUE.

M<sup>a</sup> A. BUENO\*, A. GÓMEZ\*, M. BOSCAIU\*\*\*, J. A. MANZANERA\*\* & O. VICENTE\*\*\*

\* CIFOR-INIA. ÁREA DE SELVICULTURA Y MEJORA FORESTAL. APDO. 8111. 28080 MADRID.

\*\* ETSIM. DPTO. SILVOPASCICULTURA. U.P.M. CIUDAD UNIVERSITARIA S/N. 28040 MADRID.

\*\*\* VIENNA BIOCENTER. INST. OF MICROBIOLOGY AND GENETICS. UNIV. OF VIENNA. DR. BORHR-GASSE, 9 A-1030 VIENNA. (AUSTRIA).

## RESUMEN

Es la primera vez que se induce embriogénesis y se regeneran plantas haploides en alcornoque, combinando un tratamiento de ayuno en cultivo de anteras con un shock de calor a 33°C durante 5 días, seguido de cultivo a 25°C en un simple medio de agar sin reguladores de crecimiento. Las mismas condiciones, han sido óptimas para inducción embriogénica en cultivos de microsporas aisladas de varias especies modelo como tabaco y trigo. Estos resultados soportan la teoría de que el estrés, particularmente el ayuno de sacarosa, con un shock de calor o una combinación de ambos tratamientos, podría ser el mejor impulso responsable de la inhibición del desarrollo normal gametofítico de la microspora para la inducción de la ruta alternativa embriogénica. Un protocolo similar se puede utilizar para la producción de haploides y doble haploides en mejora de plantas, especialmente en especies como la mayoría de árboles forestales, que son recalcitrantes al cultivo de anteras.

P.C.: Cultivo de anteras, Alcornoque, Plantas haploides, Estrés.

## SUMMARY

Inducción of haploid embryos and regeneration of plantlets have been obtained for the first time, in cork oak (*Quercus suber* L.) by combining a starvation treatment in anther culture with a mild heat shock at 33°C for 5 days, followed by culture at 25°C in a simple agar medium without growth regulators. The same conditions had been shown previously to be optimal for embryogenic induction in isolated microspore cultures of several model species such as tobacco and wheat. These results support the notion that stress, particularly sucrose starvation, a heat shock or a combination of both treatments could be the major and general signal responsible for the inhibition of normal gametophytic development of the microspores and for the induction of the alternative embryogenic pathway. A similar approach may be used for the production of haploid and doubled haploids for plant breeding in other species that like most forest trees, are still recalcitrant in anther culture.

K.W.: Anther culture, Cork oak, Haploid plants, Stress.

## INTRODUCCIÓN

El potencial de las microsporas y del polen inmaduro para desviarse de su ruta gametofítica, y obtener plantas haploides vía embriogénesis es conocido desde que GUHA y

MAHESHWARI (1964-1966) observaron embriones en cultivo de anteras de *Datura innoxia*. Dada la importancia de plantas doble-haploides (producidas espontáneamente o por tratamiento con colchicina de los haploides) para mejora de plantas, se han realizado muchos esfuerzos para producir plantas derivadas de polen en otras especies.

La producción de homocigotos, plantas doble-haploides a partir de cultivo de anteras, puede ser especialmente útil en especies, tales como la mayoría de árboles forestales con largas generaciones y una fuerte depresión debido a la endogamia, que hace los métodos tradicionales de mejora impracticables. Desgraciadamente la mayoría de los métodos de cultivo "in vitro", en especies leñosas en general y en forestales en particular se han mostrado extremadamente recalcitrantes en cultivo de anteras. Con la excepción de *Hevea brasiliensis* (CHEN, 1982), *Aesculus hippocastanum* (RADOJEVIC, 1978), *Quercus petraea* (JÖRGENSEN, 1988) y *Populus spp.* e híbridos interespecíficos, en los cuales la inducción embriogénica y la regeneración de plantas parece ser relativamente factible (e.g. BALDURSSON *et al.*, 1993), sólo en unas pocas publicaciones han aparecido descritas la formación de embriones en cultivo de anteras de árboles forestales; ejemplos de regeneración con éxito de plantas a partir del polen son aún más escasas (BALDURSSON y AHUJA 1996, CHEN, 1986, VON ADERKAS y DAWKINS, 1993).

El establecimiento reciente de sistemas eficientes de embriogénesis en cultivos de microsporas aisladas de varias plantas modelo ha abierto la posibilidad de investigación a nivel molecular y celular del proceso de inducción embriogénica. Trabajos realizados en *Brassica*, tabaco, trigo, cebada y arroz, puntualizan que el efecto de las condiciones específicas de stress, particularmente de ayuno de sacarosa, así como el shock de calor o la combinación de ambos tratamientos, son el mayor y más probable estímulo responsable de la inhibición del desarrollo gametofítico y la inducción de la ruta alternativa esporofítica.

De acuerdo con esta idea, nosotros hemos inducido embriones haploides en anteras de alcornoque sujetas a un tratamiento corto de shock de calor a 33°C, en un simple medio de agar sin reguladores de crecimiento y con la consiguiente regeneración de plantas de embriones derivados de polen, mientras que no se observó ninguna respuesta cuando las mismas anteras fueron cultivadas de una manera continuada a 25°C.

Con los datos que se disponen actualmente, esta es la primera vez que se han producido haploides en esta especie y también uno de los pocos ejemplos de éxito en el cultivo de anteras en especies forestales.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se colectaron ramas con amentos cada semana de Mayo, de dos árboles seleccionados localizados en el Monte del Pardo y en el Arboretum de la Universidad en Madrid. Las ramas fueron preservadas con algodón humedecido en papel de aluminio a 4°C durante una semana. Los amentos entre 0,5 y 1 cm de longitud fueron esterilizados en alcohol de 96% durante 30 segundos. Las anteras fueron aisladas en condiciones asépticas y utilizadas para iniciar el cultivo.

- *Cultivo de anteras para inducción embriogénica.* Las anteras fueron depositadas en placas Petri en un medio con macronutrientes (SOMMMER *et al.*, 1975), micronutrientes y cofactores (MURASHIGE y SKOOG, 1962), 3% de sacarosa y 1% de carbón activo, pH 5,6 en solidificado con 0,8% de agar. El medio fue previamente autoclavado a 1 atmósfera (121°C) durante 20 minutos. Las placas con anteras aisladas del mismo amento fueron cultivadas en oscuridad durante 2, 3, 5 o 7 días a 25, 33 o 37°C, en todas las combinaciones posibles (1-4

placas por tratamiento) y transferidas a 25°C. Aunque 2.700 anteras se cultivaron en estas condiciones, alrededor del 60% no pudieron ser analizadas por contaminación fúngica.

- *Propagación de cultivos embriogénicos y regeneración de plantas.* Después de 20 días a 25°C en la oscuridad, se formaron embriones en algunas de las anteras. Un mes más tarde los embriones fueron transferidos a placas individuales con el medio de inducción sin carbón activo y suplementado con 0.5 g l<sup>-1</sup> de glutamina (Gln). El crecimiento de los embriones y la embriogénesis secundaria se mantuvieron, subcultivándose mensualmente en el mismo medio.

Para la regeneración de plantas, un método establecido previamente para cultivos de embriones somáticos de *Q.suber* (BUENO *et al.*, 1992; MANZANERA *et al.*, 1993) fue utilizado. Embriones cotiledonares individuales fueron vernalizados durante 10 semanas a 4°C en la oscuridad y cultivados a 25°C con un fotoperíodo de 16 h luz/ 8 h oscuridad, hasta que se desarrolló el sistema radicular. Los embriones fueron finalmente transferidos a tubos con vermiculita estéril y medio Sommer suplementado con 0,5 mg l<sup>-1</sup> 6-benciladenina (BA) donde el desarrollo de yemas y la regeneración de plántulas se obtuvieron un mes más tarde.

- *Conteo de cromosomas.* El material embriogénico formado mediante cultivo de anteras o un clon de embrión somático previamente establecido fueron fijados en ácido acético glacial-etanol 1:3 y posteriormente pretratados durante 2-4 h en 2 mM hydroxiquinoleina. Las muestras se pasaron por agua destilada y se hidrolizaron durante 30 min. a temperatura ambiente en 5M CIH, incubándose durante 1-2 h en una solución Feulgen hasta que la tinción de la región meristemática fuera visible. Finalmente, se hizo el squash en la muestra depositándose una gota de acetocarmín en un porta para su observación al microscopio. Los cromosomas fueron observados en un microscopio con aceite de inmersión (100x).

- *Citómetro de flujo.* Para investigar el nivel de ploidía de los embriones, pequeñas piezas de material (30-50 mg) fueron introducidas en presencia de una solución que contiene DAPI. Después de la filtración a través de 40 µm de malla de nylon, la suspensión se utilizó en un citómetro (Partec, Münster, Germany) equipado con un filtro especial para la detección del complejo ADN-DAPI. Al menos 20.000 núcleos se midieron para cada muestra. Se tomó como control una muestra de embrión cigótico inmaduro de *Q.suber* (clon Qs<sub>2</sub>-57, BUENO *et al.*, 1992), que se comprobó mediante conteo cromosómico que era realmente diploide. Núcleos aislados de este clon teñidos de DAPI se pasaron a través del citómetro y el G1 pico de ADN (2C) se puso en el canal número 200.

## RESULTADOS

- *Inducción de embriogénesis.* En una de las placas Petri pretratadas a 33°C durante 5 días se observaron embriones en 14 anteras, después de 20 días de cultivo a 25°C. A los embriones se les denominó AC1 a AC14. En todos los casos, los embriones crecían del interior de la antera rompiendo la pared que degeneraba. Las estructuras iniciales observadas eran translúcidas globulares, desarrollándose posteriormente embriones tipo corazón y torpedo, hasta que se observaron unos cotiledones bien formados.

- *Proliferación y regeneración de plantas.* Todos los embriones obtenidos del cultivo de anteras fueron transferidos a placas Petri conteniendo medio Sommer suplementado con Gln, donde los embriones fueron clonalmente propagados. Se indujo embriogénesis secundaria y nuevos embriones se desarrollaron en la superficie del embrión original. Los clones se han mantenidos durante 6 meses en esas condiciones, subcultivándose cada mes. Hasta ahora 6 plántulas se han obtenido de 3 de las anteras.

- *Determinación del nivel de ploidía por citómetro de flujo.* El número de cromosomas diploide de *Q.suber* es de  $2n=24$ . Esto fue confirmado en varias metafases de puntas de raíz de bellota recién germinada, tomada del árbol parental utilizado para iniciar el cultivo de anteras. Los núcleos preparados de uno de los cultivos de anteras (AC1) mostraba un pico G1 con más bajo contenido en ADN que el standard, apareciendo alrededor del canal 100 y un pico muy pequeño G2 en el canal 200, por tanto la muestra tenía una muy pequeña cantidad de células activas dividiéndose. Cuando el material de la misma muestra y el standard fueron preparados y medidos conjuntamente los dos picos G1 se observaron claramente. El pico del clon antera contenía exactamente la mitad del ADN del estandar diploide. Esto muestra que los embriones formados en la antera eran realmente haploides originados de polen, todo lo cual se confirmó en el conteo cromosómico. Todas las muestras fueron medidas confirmándose la haploidía. Sólo dos muestras fueron diploides. Tres muestras se perdieron por contaminación.

## DISCUSIÓN

El estrés, parece dar la señal que induce la vía esporofítica en vez de la gametofítica en plantas inferiores (BELL, 1992). En microsporas aisladas de tabaco, el ayuno de sacarosa es el camino más efectivo para bloquear irreversiblemente el desarrollo normal gametofítico e inducir la ruta alternativa esporofítica, finalizando en la formación de embriones haploides y plantas. En trigo, la inducción embriogénica óptima a partir de microsporas se consigue mediante ayuno de sacarosa y shock de calor, aplicados independientemente o en combinación, siendo también efectivos para inducción de embriones en otros sistemas experimentales. (TOURAEV *et al.*, 1996 a, b, c).

Asumiendo que tratamientos similares de stress podrían ser generalmente efectivos para inducción embriogénica, se intentó en anteras de *Quercus suber*, cultivadas en un medio de agar conteniendo una composición estandar de macro y microminerales y sin añadir reguladores de crecimiento. El carbón activo fue incluido en el medio, puesto que tiene un efecto beneficioso, como se muestra en el cultivo de anteras de otras especies (HEBERLE-BORS, 1980), por absorber sustancias inhibitorias producidas por la antera.

Aunque el medio de cultivo, también contenía el 3% de sacarosa, podría puntualizarse que en el cultivo de anteras siempre está envuelto el ayuno de la microspora dentro de la antera. El nivel de los carbohidratos conservados en la antera decrece rápidamente después de la escisión, durante las primeras horas del cultivo (PRAKASH y GILES, 1987) y la pared de la antera representa una barrera efectiva para la difusión de los nutrientes en el medio donde la microspora se está desarrollando. Sólo después de que el tejido de la pared de la antera degenera, la sacarosa y los otros nutrientes son accesibles a la microspora.

Un problema general encontrado en el cultivo de anteras, sobre todo cuando la embriogénesis no es directa sino que procede de la fase callo, es la determinación del origen de los embriones. El citómetro de flujo es un método sensible y rápido para determinar el contenido del ADN nuclear. En el experimento en la mayoría de las muestras se establece un pico G1 haploide, con la mitad del contenido de ADN del pico G1 del control diploide, todo lo cual confirma el origen desde el polen. Dos de las muestras, sin embargo, eran diploides, por tanto la embriogénesis somática podría haberse inducido del tejido esporofítico de la antera. Otra alternativa es que estas dos muestras puedan ser, de hecho, homocigóticas, doble-haploides originadas por diploidización espontanea de la microspora. Nosotros aceptamos esta teoría como más probable, porque el embrión somático no puede inducirse sin tratamiento hormonal. Por otra parte la diploidización espontánea es frecuente en cultivo de anteras de

otras especies por ejemplo en trigo (LÖSCHENBERGER y HEBERLE-BORS, 1992) y *Populus* (BALDURSSON *et al.*, 1993).

En muchas especies, el cultivo de anteras es un sistema de aplicación práctica para la producción de doble haploides en mejora genética. Sin embargo, la información obtenida del sistema modelo para microsporas puede ayudar a establecer condiciones eficientes para inducción embriogénica en especies que todavía permanecen recalcitrantes al cultivo de anteras.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALDURSSON, S.; KROGSTRUP, P.; NORGAARD, J.V. & ANDERSEN, S.B. (1993). Microspore embryogenesis in anther culture of three species of *Populus* and regeneration of dihaploid plants of *Populus trichocarpa*. *Can. J. For. Res.* 23: 1821-1825.

BALDURSSON S & AHUJA R,M (1996). Haploidy in forest trees. *In In Vitro Haploid Production in Higher Plants* (S.M Jain, S.K. Sopory and R.E. Veilleux eds), Vol. 3, pp 295-334. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

BELL, P.R. (1992). Apospory and apogamy: implications for understanding the plant life cycle. *Int. J. Plant Sci.* 153: 123-136.

BUENO, M.A.; ASTORGA, R. & MANZANERA, J.A. (1992). Plant regeneration through somatic embryogenesis in *Quercus suber*. *Physiol. Plant.* 85: 30-34.

CHEN Z. H.; QUIAN C. F.; CEN M.; XU, X. E. & XIAO Y.L. (1982). Recent advan in anther culture of *Hevea brasiliensis* Muell- Arg. *Theor. Appl. Genet.* 62:103-108.

CHEN, Z. (1986). Induction of androgenesis in woody plants. *In Haploids of higher plants in vitro* (H. Han & Y. Hongyuang, eds), pp. 42-66. China Academic Publishers, Beijing and Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.

GUHA, S. & MAHESHWARI, S.C. (1964). In vitro production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature* 204: 497.

GUHA, S. & MAHESHWARI, S.C. (1966). Cell division and differentiation of embryos in the pollen grains of *Datura* in vitro. *Nature* 212: 97-98.

HEBERLE-BORS, E. (1980). Interaction of activated charcoal and iron chelates in anther cultures of *Nicotiana* and *Atropa belladonna*. *Z. Pflanzenphysiol.* 99: 339-347.

HEBERLE-BORS, E.; STÖGER, E.; TOURAEV, A.; ZARSKY, V. & VICENTE, O. (1996). In vitro pollen cultures: progress and perspectives. *In Pollen biotechnology. Gene expression and allergen characterization*, (S.S. Mohapatra & R.B. Knox, eds), pp 85-109. Chapman and Hall, New York.

JÖRGENSEN J. (1988). Embryogenesis in *Quercus petraea* and *Fagus sylvatica*. *J. Plant Physiol.* 132:638-640.

LÖSCHENBERGER, F. & HEBERLE-BORS, E. (1992). Anther culture responsiveness of austrian winter wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Die Bodenkultur* 43: 115-122.

MANZANERA, J.A.; ASTORGA, R. & BUENO, M.A. (1993). Somatic embryo induction and germination in *Quercus suber* L. *Silvae Genet.* 42: 90-93.

MURASHIGE, T. & SKOOG, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.

PRAKASH, J. & GILES, K.L. (1987). Induction and growth of androgenic haploids. *Int. Rev. Cytol.* 107: 273-292.

RADOJEVIC, L. (1978). In vitro induction of androgenic plantlets in *Aesculus hippocastanum*. *Protoplast* 96: 369-374.

SOMMER, H.E.; BROWN, C.L. & KORMANIK, P.P. (1975). Differentiation of plantlets in longleaf pine (*Pinus palustris* Mill.) tissue cultured in vitro. *Bot. Gaz.* 136: 196-200.

TOURAEV, A.; ILHAM, A.; VICENTE, O. & HEBERLE-BORS, E. (1996a). Stress-induced microspore embryogenesis in tobacco: an optimized system for molecular studies. *Plant Cell Rep.* 15: 561-565.

TOURAEV, A.; INDRIANTO, A.; WRATSCHKO, I.; VICENTE, O. & HEBERLE-BORS, E. (1996b). Efficient microspore embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) induced by starvation at high temperatures. *Sex. Plant Reprod.* (in press).

TOURAEV, A.; PFOSSER, M.; VICENTE, O. & HEBERLE-BORS, E. (1996c). Stress as the major signal controlling the developmental fate of tobacco microspores: towards a unified model of induction of microspore/pollen embryogenesis. *Planta* (in press).

VON ADERKAS, P. & DAWKINS, M.D. (1993). Haploid embryogenesis in trees. *Micropropagation of woody plants* (M.R. Ahuja, ed.), pp. 57-65. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. ISBN 0-7923-1807-2.