UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA ORIENTAL DEL URUGUAY
Facultad de Agronomía
Montevideo
Uruguay

INTRODUCCION DE UN GEN DE MACHOESTERILIDAD EN LA VARIEDAD DE GIRASOL ESTANZUELA 60 Y PRUEBA DE GAMETOCIDAS

Alfredo Bruno

Tesis presentada a la Facultad de Agronomía como requisito para obtener el grado de Ingeniero Agrónomo

Mayo, 1971

AGRADECIMIENTOS

Al Ing. Agr. Cayo M. Tavella, por la conducción del presente trabajo.

Al Ing. Agr. Carlos Rava, por sus consejos para la confección de la tesis.

A los señores Eduardo Mendoza, Leonidas Vergara, Rufino Hernández y Carlos Long, por su invalorable ayuda en los trabajos de campo y de laboratorio.

Al Centro de Investigaciones Agrícolas "Alberto Boerger", por los materiales que permitieron la realización del trabajo.

CONTENIDO

Página

I. INTRODUCCION 1

II. REVISION BIBLIOGRAFICA

A) Heterosis y machoesterilidad 2

B) Gametocidas 13

III. MATERIALES Y METODOS

A) Machoesterilidad y color 16

1) Variedades 17

2) Técnica de cruzamiento 17

3) Técnica de autofecundación 18

4) Trabajos realizados en cada generación

Primera generación 18

Segunda generación 19

Tercera generación 19

Cuarta generación 19

B) Prueba de gametocidas 20

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

A) Incorporación de machoesterilidad 22

B) Prueba de gametocidas 23

V. CONCLUSIONES 24

VI. RESUMEN 25

VII. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA 26

I. INTRODUCCION

La explotación de la heterosis mediante el uso comercial de F_1 de cruzamientos entre variedades o líneas endocriadas es un medio corriente para aumentar la productividad en muchos cultivos donde la producción de semilla híbrida en gran escala es factible.

La existencia de heterosis en girasol ha sido ampliamente demostrada.

El descubrimiento de un tipo de machoesterilidad genética en Francia hace posible encarar la producción de semilla híbrida F_1 en esta especie. La necesidad de obtener poblaciones uniformes para facilitar la cosecha es otra razón a tener en cuenta para encarar la obtención de híbridos. Las variedades comerciales son desuniformes en altura y madurez, particularmente Estanzuela 60, y parece difícil obtener un buen grado de uniformidad sin cierto grado de consanguinidad. Está probado que ella acarrea reducciones del rendimiento del girasol y se ha medido en Canadá esta reducción por sucesivas generaciones de autofecundación, dando respectivamente 64, 53, 48 y 39 % del material original (17).

El uso de semilla F_1 podría permitir alcanzar altos rendimientos y al mismo tiempo un alto grado de uniformidad, especialmente en el caso de híbridos entre líneas endocriadas.

En el presente trabajo se relatan los pasos dados para introducir el gen de machoesterilidad y su correspondiente marcador ligado sobre el mismo cromosoma, en la variedad comercial Estanzuela 60.

Se incluye también un trabajo realizado para hallar la forma de emascu-

Obtuvo los siguientes valores medios, para rendimiento en grano y porcentaje de aceite, lo que destaca la conveniencia de usar el vigor híbrido en el girasol.

	Rendimiento k/há	% aceite
Líneas endocriadas	1.427	30,15
Cruzamientos	2.828	33,27

VULPE (41), en Rumania, también encontró un alto grado de heterosis en cruzamientos F_1. Encontró incrementos de 30-35 % para rendimiento de semilla, 35-40 % para rendimiento de aceite y 7-8 % para contenido de aceite, respecto de la variedad comercial VNIIMK 8931.

VRÂNCEANU (39) obtuvo heterosis para rendimiento de semilla y, además, para contenido de aceite. El mejor híbrido tuvo 63,5 % de aceite.

En Francia, las estaciones experimentales de Clermont-Ferrand y Montpellier, del I.N.R.A. (13), (14), (15), han trabajado con híbridos.

En Clermont-Ferrand obtuvieron dos tipos de híbridos. Los "productivos", que rinden más aceite por hectárea que las variedades comerciales, y los "cortos", que rinden menos, pero son más precoces, de menor altura y resistentes al vuelco. Entre los híbridos del primer grupo, el mejor alcanzó un rendimiento de 4.200 k/há (134 % del testigo), pero es pobre en aceite.

En Montpellier, la media del tenor de aceite de una serie de híbridos entre líneas de VNIIMK 6540 y Nain-Noir es 46,3 %, frente a 45,6 % del testigo

Peredovik. Seis híbridos tuvieron un tenor de 48 %. Esperan obtener hacia 1972 un híbrido con un rendimiento de aceite por hectárea superior, de 20 a 30 %, respecto al testigo Peredovik.

Como un medio para producir semilla híbrida comercial se usó en Canadá y U.S.A. la autoincompatibilidad, antes del descrubrimiento de la machoesterilidad genética, pero ese método no aseguraba un alto porcentaje de cruzamientos híbridos todos los años.

LUCIANO, KINMAN y SMITH (20) establecen que el porcentaje de plantas híbridas obtenidas en bloques de cruzamientos dependerá de laautoincompatibilidad de la línea que se comporta como genitor femenino, de la producción de polen del genitor masculino, de la proximidad en el tiempo de la floración de ambos y de la población de insectos. Si la línea hembra no es altamente autoincompatible, el porcentaje de plantas híbridas del mismo cruzamiento varía año a año. Por esta razón, concluyeron que la máxima utilización de heterosis en girasol será retrasada hasta que se conozca mejor la herencia de la autoincompatibilidad, o hasta que se descubra y utilice la machoesterilidad genético-citoplasmática.

En los últimos años, la búsqueda de machoesterilidad ha sido uno de los capítulos principales en la investigación sobre girasol.

Según GABELMAN (12) la machoesterilidad es una anormalidad heredada que puede eliminar el tedio de la castración manual en la producción de semilla híbrida, que se hereda normalmente como un gen recesivo simple.

Según este autor, la "machoesterilidad" puede resultar de: a) Esterilidad del polen; b) Esterilidad estaminal (estambres malformados, no funciona-

les o completamente ausentes); c) Polen-esterilidad funcional (una barrera mecánica evita la dehiscencia del polen viable normal, previniendo así la polinización).

VAN DER KLEY (38) describe la machoesterilidad genética como causada por uno o más alelos recesivos nucleares. La ventaja del uso de esta característica es que permite la producción de semilla híbrida a escala comercial en cultivos en los que antes no se podía obtener, debido al alto costo de la emasculación.

FRANKEL (11) en una conferencia dictada en el Centro de Investigaciones Agrícolas "Alberto Boerger" señaló que la eliminación de la autofecundación se logra mediante emasculación manual, emasculación química y machoesterilidad (genética y citoplasmática). Según él, este es el método que da resultados más interesantes; señaló que la machoesterilidad citoplasmática es ideal para especies florales, o plantas de las que se consume la parte vegetativa. En cambio, para cultivos de semilla es preferible la machoesterilidad genética, o la genética-citoplasmática.

El método habitual consiste en el uso de genes recesivos de machoesterilidad muy estrechamente ligados a genes marcadores.

Respecto a los genes marcadores ligados, UNRAU y WHITE (36) plantean la necesidad de que correspondan a un carácter ligado que se manifieste en la plántula, para hacer factible la eliminación de los individuos fértiles en esa etapa.

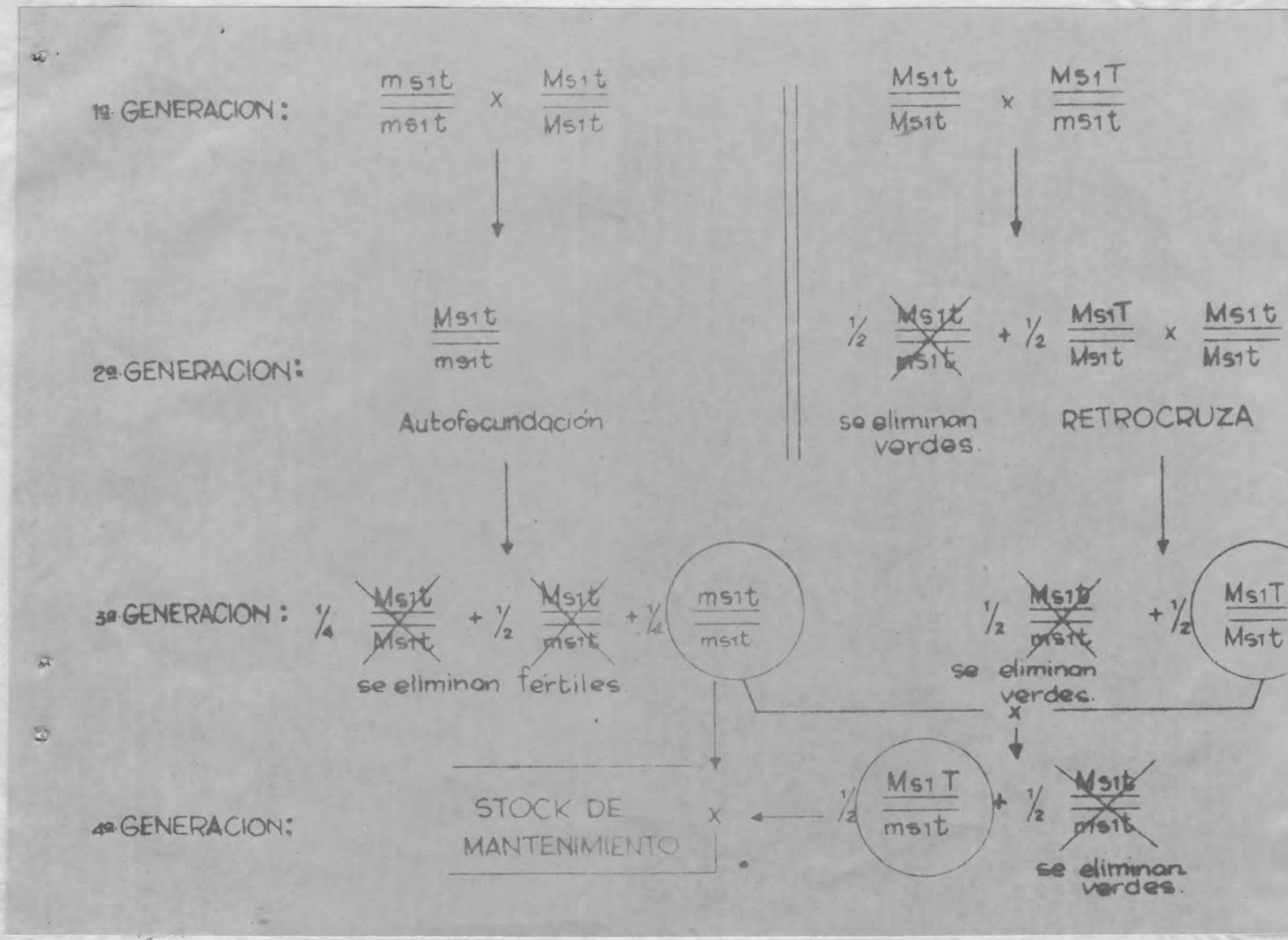
Distintos tipos de machoesterilidad genética han sido encontrados en los países donde está más desarrollada la investigación en girasol.

LECLERCQ (17) describe un tipo de machoesterilidad descubierto en Francia en 1962 por Lenoble, quien encontró en Armavir 9345, variedad de plántula verde, una planta estéril. La polinizó con una planta fértil de la variedad Nain-Noir, de plántula roja. La F_1 resultó enteramente roja y machofértil, como su progenitor masculino. La variedad Nain-Noir posee el gen dominante T que determina la presencia, en la capa subepidérmica de la cáscara, de un pigmento violeta antociánico. También se manifiesta el pigmento en el hipocotilo, y en otras partes de la planta. El fenotipo "plántula roja" corresponde a los genotipos TT y Tt. El fenotipo "verde" es tt (homocigota recesivo).

El alelo ms_1 determina la machoesterilidad y es recesivo frente a Ms_1, que da plantas fértiles. ms_1 está estrechamente ligado a t, y Ms_1 a T. La tasa de recombinación para estos caracteres es de 0,85 %, con una desviación típica de $\pm$ 0,40 %.

El polen de plantas machoestériles presenta una estructura distinta del polen normal y no se colorea al carmín acético.

La introducción a un material interesante de los caracteres machoesterilidad y color ligado se realiza siguiendo el siguiente esquema:



Como se puede apreciar, se siguen dos caminos paralelos, uno para cada carácter. La última etapa la constituye el cruzamiento de los materiales obtenidos por ambos caminos.

El material machoestéril se mantiene por un cruzamiento hermana-hermano continuado: verde machoestéril (ms_1 ms_1 tt) por rojo machofértil doble heterocigota (Ms_1 ms_1 Tt), que segrega en la generación siguiente en la misma proporción.

Para la obtención de un híbrido F_1, se siembra el producto del cruzamiento hermana-hermano y se eliminan las plantas rojas (fértiles). En surcos alternados se siembra la línea o variedad normal y se dejan polinizar libremente. A la madurez, se cosecha la semilla híbrida en los surcos de plantas machoestériles.

En Montpellier (15) disponen de ocho fuentes distintas de machoesterilidad, en las cuales se registran fluctuaciones muy grandes en las segregaciones, de un año a otro.

El cruzamiento de una planta machoestéril por una hermana homocigota produce generalmente menos del 50 % de plantas estériles. Además señalan fluctuaciones de la tasa de machoesterilidad según la fecha de floración. Parecería que las plantas de floración tardía son menos frecuentemente machoestériles.

PUTT (27), en 1964, informó sobre la aparición de líneas de girasol con más del 95 % de granos de polen muertos. A estas líneas las llamó pseudomachoestériles, sembradas a campo, junto con líneas normales machofértiles, dieron semilla que es casi 100 % híbrida.

Además, tienen la ventaja de que producen suficiente cantidad de polen normal como para dar semilla cuando se siembran en aislación. Así se puede mantener el "stock" de semilla machoestéril sin un contraparte fértil.

KINMAN y PUTT (16) describen varios tipos de machoesterilidad:

a) Machoesterilidad de Morden - Controlada por un gen simple recesivo, ms_1.

b) Machoesterilidad de Bloomington - Encontrada en una especie ornamental y controlada por dos genes recesivos, ms_2 y ms_3. Se produce la machoesterilidad cuando ambos recesivos están en condición homocigota.

c) Bloomington x Morden - Las proporciones en las progenies sugieren un efecto de epistasis de uno o de ambos genes de Bloomington con el de Morden.

d) HA 55 - Hay evidencias de que para la expresión de la machoesterilidad en esta fuente se requiere un gen dominante y dos (o posiblemente tres) genes recesivos.

e) Peredovik-21 - Para su expresión se requieren dos genes homocigotas recesivos y un gen dominante.

f) Otras fuentes - También se encontraron plantas machoestériles en descendencias de Peredovik 23-1-1, Smena 3-02-4 y VNIIMK 1646. La primera fue similar al tipo Bloomington y las otras dos al tipo Morden.

Estos autores sugieren, de acuerdo a algunos resultados obtenidos, que algunos individuos homocigotas para el gen ms_1 no producen machoesterilidad en algunos citoplasmas. Esto puede ser atribuído a influencias citoplasmáticas o ambientales.

Concluyen que los cruzamientos de las cuatro principales fuentes de machoesterilidad (Morden, Bloomington, HA 55 y Peredovik-21) producen progenie F_1 normal fértil. Por lo tanto, la expresión del fenotipo machoestéril es

condicionada por, al menos, un gen diferente en cada fuente. Parece que las tres primeras fuentes de machoesterilidad mencionadas tienen en común, como mínimo, un "locus" (y probablemente "loci" adicionales).

PUTT y HEISER (29) informan sobre trabajos realizados con plantas machoestériles de los tipos Morden y Bloomington y también sobre machoesterilidad parcial. Todas las plantas descendientes de cruzamientos del Bloomington machoestéril por líneas fértiles dieron plantas que no produjeron polen, o si produjeron algo, éste no se tiñó en presencia del carmín acético. La proporción en la descendencia fue de nueve fértiles, siete estériles. La población total en las progenies segregantes F_2, F_3 y F_4 de los cruzamientos por Morden se ajustó perfectamente a la relación tres fértiles, una estéril.

Las líneas CM 30 y CM 90 originadas en la variedad Mennonite son parcialmente machoestériles. La primera produce 75 % de polen normal y la segunda 32 %.

Concluyen que la machoesterilidad de Morden está controlada por un gen recesivo simple. Esto concuerda con LECLERCQ (17) y con KINMAN y PUTT (16).

El control genético de la machoesterilidad de Bloomington es más complejo. Ninguno de los dos genes presentes en el tipo Bloomington está presente en el tipo Morden.

Establecen que no es posible el uso de estos tipos de esterilidad masculina, mientras no se encuentre un carácter marcador ligado estrechamente, que permita eliminar al estado de plántula los individuos fértiles.

El carácter machoesterilidad parcial es similar al que PUTT (27) llama

pseudo-machoesterilidad. Esta característica ofrece la ventaja de que las líneas pseudo-machoestériles, sembradas a campo junto con líneas normales, producen pequeñas cantidades de polen y posibilita la producción de semilla con un alto porcentaje de híbridos.

VRÂNCEANU y STOENESCU (40) no encontraron datos concluyentes que aseguren la existencia de machoesterilidad citoplasmática. Consideran que el método más sencillo y efectivo para producir semilla híbrida es, por el momento, el basado en el uso de machoesterilidad genética condicionada monogénicamente, que provee una proporción constante de 50 % de plantas estériles (ms). Las plantas fértiles (Ms) pueden ser descartadas fácilmente utilizando el estrecho ligamiento con el gen T, que determina la presencia de antocianina.

Sobre esta base, obtuvieron híbridos con un alto grado de heterosis. Estos híbridos superaron a la media parental en 58-74 %, en producción de semilla.

Los mismos autores presentan un esquema de introducción de machoesterilidad y color ligado al material de partida similar al propuesto por Leclercq y seguido en el presente trabajo.

En Rusia, ANASHCHENKO (1) trabajó con cruzamientos de 31 líneas machoestériles seleccionadas de la variedad VNIIMK 8931. Las descendencias de 28 de esas 31 líneas dieron segregación monofactorial para esterilidad. En las tres restantes la herencia fue más compleja.

Teniendo en cuenta los resultados de los cruzamientos de líneas de VNIIMK 8931 con una línea heterocigota para machoesterilidad, el mismo autor (2) establece en otro informe que la machoesterilidad es genética y que por lo me-

nos dos genes están involucrados.

El informe del I.N.R.A. (13) describe el proceso fisiológico de la macho esterilidad. En el girasol normal machofértil, los granos de polen, después del estado de tetrada, quedan incluidos en un gel intercelular coloreable al carmín acético. Después, el gel desaparece y los granos quedan libres en el interior de la antera. En el curso del segundo estadio aparecen en cada grano las dos células reproductivas en forma de filamentos más largos que el diámetro del propio grano y, en consecuencia, recurvados sobre ellos mismos.

En los machoestériles, todo parece normal al estado de tetrada. En el primer estadio del polen (gel intercelular) la ornamentación equinulada de la exina no se forma. En el segundo estadio (granos de polen libres en la antera) el citoplasma y las células desaparecen.

En consecuencia, la presencia del gen ms_1 al estado homocigota impide la formación de: la exina equinulada, en primer término, y luego, de las dos células reproductivas.

Finalmente, LECLERCQ (18) informa acerca de la puesta en evidencia de esterilidad masculina citoplasmática a partir de un cruzamiento interespecífico Helianthus petiolaris x Helianthus annuus.

De la observación de las descendencias del cruzamiento, concluye que la coexistencia de un citoplasma de Helianthus petiolaris con un genotipo de Helianthus annuus hace aparecer una esterilidad masculina. El citoplasma de Helianthus petiolaris sería de tipo S (esterilizante) y el de Helianthus annuus de tipo F (fertilizante). La evolución divergente de las dos especies ha podido provocar una diferencia citoplasmática, como ha provocado diferen-

cias cromosómicas.

El uso comercial de la machoesterilidad citoplasmática no será posible mientras no se encuentren genes recuperadores de la fertilidad. Estos genes de restauración se deberían encontrar en el genotipo de Helianthus petiolaris. En su búsqueda están trabajando investigadores de diversos países del mundo.

B) Gametocidas.

En diversos países han sido ensayados numerosos productos químicos, en busca de acción gametocida.

El Sodio 2,3-dicloroisobutirato, cuyo nombre comercial es FW 450, es el compuesto químico que ha sido más usado hasta la fecha como gametocida selectivo. EATON (8) descubrió su efecto gametocida en algodón. Pulverizó plantas una semana antes de la floración, con una solución al 1,2 %, y esas plantas no produjeron polen. Recomienda, para evitar la fitotoxicidad del producto, hacer dos aplicaciones con dosis más bajas, que causan efecto similar.

Según PATE y DUNCAN (23), el FW 450 en dosis de k 1,14 por hectárea presenta toxicidad selectiva contra el gameto masculino. En este nivel se logró un alto grado de autoesterilidad con una reducción poco importante en el rendimiento. Dosis más altas causaron esterilidad de los órganos masculinos pero también de los femeninos.

MENDEZ (21), MENDEZ (22) y BOCANEGRA, MENDEZ y HUANQUI (4) informan sobre trabajos en algodón con FW 450. Pulverizando con soluciones al 1 %, 90-100 % de las flores contenían una alta proporción de polen estéril.

AVTAR y SEHGAL (3) y RICHMOND (30) también citan la existencia de efecto

gametocida del FW 450 en algodón, pero su aplicación es acompañada por una reducción significativa del número de cápsulas, número de semillas y porcentaje de germinación.

WIT (42) ensayó cinco productos químicos (hidrazina maleica, Sodio 2,3-dicloroisobutirato y ácidos triiodobenzoicos, ∝-naftalenoacético y 2,4-diclorofenoxiacético) en cinco especies vegetales distintas (trébol rojo, trébol blanco, raigrás perenne, remolacha y nabo). Usó concentraciones de 0,5 a 0,9 %, un poco antes de la floración. El sodio 2,3-dicloroisobutirato fue el tratamiento más efectivo. Produjo un moderado a muy alto grado de machoesterilidad en tres cultivos (tréboles rojo y blanco y remolacha). No hubo respuesta en los dos restantes. En remolacha el tratamiento no afectó la esterilidad femenina. En cambio, en los tréboles la selectividad fue menos manifiesta.

Concluye este autor que si bien este método no da 100 % de efectividad, puede permitir al fitotecnista testar, por un camino económico, un gran número de líneas por su capacidad combinatoria.

En la Argentina se probó el efecto gametocida del FW 450 en girasol.

LUCIANO (19) obtuvo resultados alentadores el primer año que ensayó el producto, obteniendo machoesterilidad casi completa con dosis de 50-70 mg por planta. En el segundo año, los resultados fueron contradictorios. Hubo diferencias entre líneas y distintas reacciones según el tamaño de la planta.

DAVREUX (6) informa que ensayaron el Sodio 2,3-dicloroisobutirato desde 1958, con resultados variables. Los resultados son muy influenciados por los

siguientes factores: a) Epoca de siembra; b) Desarrollo de las plantas; c) La fitotoxicidad varía con las variedades; y d) Homogeneidad de desarrollo de las plantas.

La dosis de producto químico debe llegar a los botones florales antes de la diferenciación del polen en las anteras. Como esto ocurre en el girasol generalmente 20-30 días antes de la antesis, sería éste el momento de aplicación del producto.

Recomienda para girasol dosis de 1,2-2 k por hectárea (30-50 miligramos por planta, en una población de 40.000 plantas por hectárea), en 600-800 lt de agua por hectárea (15-20 cc por planta). Se debe mojar bien toda la superficie foliar. También recomienda repartir la dosis total en tres aplicaciones espaciadas cada seis-siete días, para evitar daños a las plantas por la fitotoxicidad del producto.

Las giberelinas y el ácido giberélico también tienen efecto gametocida.

En Montpellier (15) ensayaron giberelina en distintas dosis (0, 5, 10, 20 y 40 partes por millón) y en líneas procedentes de distintas variedades. La dosis de 40 partes por millón es fitotóxica. El porcentaje de plantas machoestériles aumenta en la medida que aumentan las dosis, pero se aprecian grandes diferencias varietales.

SCHUSTER (32) obtuvo casi 100 % de inhibición de la formación de anteras en girasol con pulverizaciones de 0,5 miligramos de ácido giberélico, antes de la floración.

Según BRAUER (5), el herbicida Dalapon produjo esterilidad masculina en tomate, algodón, guisante y maíz. Dosis altas causaron daños a los órganos

femeninos y dosis bajas resultaron en una machoesterilidad parcial o temporaria.

En algodón, TER-AVANESJAN y SEMENOVA (34) encontraron que el Dalapon es efectivo para evitar la formación de polen.

SCHUSTER (31) ensayó varios productos químicos en girasol, entre ellos el 2,4-D. Las dosis usadas produjeron reducción de la cantidad de polen producido, pero afectaron seriamente las plantas.

TYSDAL y GARL (35) trabajaron en alfalfa con distintas concentraciones de alcohol y distintos tiempos de inmersión de las flores.

Dosis de 66,5 % de alcohol durante 30 segundos mata la flor, durante 10 segundos la daña y durante 1 o 5 segundos no produce emasculación. La dosis de 47,5 % no es suficiente para emascular.

Dosis de 57 % durante 10 segundos fue la que dio resultados más satisfactorios, ya que no daña la planta y provoca emasculación.

III. MATERIALES Y METODOS

A) Machoesterilidad y color.

El presente trabajo fue realizado entre junio de 1969 y octubre de 1970 en el Centro de Investigaciones Agrícolas "Alberto Boerger". Abarcó los trabajos correspondientes a las generaciones segunda, tercera y cuarta del esquema de introducción de machoesterilidad genética y color de plántula ligado.

El material machoestéril fue introducido por el Ing. Agr. C. Lázaro, quien además realizó la primera generación de cruzamientos por Estanzuela 60.

1) Variedades. Se partió de la variedad comercial Estanzuela 60, muy cultivada en nuestro país. Es de fertilidad normal y plántula de color verde (carente de pigmento antociánico).

El otro material que se utilizó es un "stock" francés, proveniente de la variedad soviética Armavir 9345, enviado a La Estanzuela por P. Leclercq, de la Estación Experimental de Clermont-Ferrand, Francia. Este material contiene aproximadamente 50 % de plantas machoestériles "verdes" y 50 % de plantas machofértiles "rojas".

2) Técnica de cruzamiento. Los cruzamientos se hicieron a mano, sin previa emasculación de las flores.

Para la recolección del polen, los capítulos, en la etapa de apertura del botón floral, se cubrieron con bolsas de papel manteca, para evitar la contaminación con polen extraño. A los tres o cuatro días el polen fue recolectado de las bolsas y llevado a cápsulas de Petri. La polinización de las plantas se realizó frotando suavemente la inflorescencia con un trozo de algodón conteniendo polen, poniendo a éste en contacto con la superficie receptiva de los estigmas.

Esta operación se repitió dos o tres veces para cada capítulo, dado que las flores se abren progresivamente desde el centro hacia la periferia, en "arcos radiados", a razón de una a cuatro hileras por día [PUTT (25)].

Luego de realizado cada cruzamiento, se cubrieron nuevamente los capítulos con bolsas de papel. El método usado fue sugerido por ETCHECOPAR (9),

ETCHECOPAR y SIVORI (10) y PUTT (26). Según ETCHECOPAR (9) y PUTT (26), el polen conserva su viabilidad hasta los 10-14 días de recolectado, en condiciones de trabajo. Llevando el polen a heladera a 4°C, se comprobó que la viabilidad alcanza hasta un mes. Esto permitió realizar cruzamientos donde la diferencia entre las fechas de floración de los genitores masculino y femenino eran mayores de dos semanas.

3) Técnica de autofecundación. La cantidad de semilla viable obtenida por la autofecundación del girasol es variable, pero normalmente escasa, dependiendo del grado de autoincompatibilidad del material genético. Para obviar este problema se realizaron cruzamientos "SIB", que equivalen en este caso particular a las autofecundaciones, pero permiten obtener mayor cantidad de semilla.

El trabajo de introducción se basó en el esquema sugerido por LECLERCQ en (17), expuesto en la página 7.

4) Trabajos realizados en cada generación.

Primera generación. Los trabajos de introducción de machoesterilidad genética y color ligado comenzaron en 1967.

Para la introducción de machoesterilidad se empezó con un cruzamiento entre plantas de Estanzuela 60 (Ms_1-tt) como padres y plantas machoestériles del "stock" francés (ms_1 ms_1 tt) como madres.

Paralelamente, para introducir el gen marcador se partió del cruzamiento entre plantas fértiles de color púrpura Ms_1 ms_1 Tt como padres y plantas de Estanzuela 60 como madres.

Segunda generación. En junio de 1969 se sembró en invernáculo la semilla F_1 de los cruzamientos realizados en la primera generación. También fueron sembrados unos surcos de Estanzuela 60, que fué utilizado como genitor recurrente, para retrocruzar las F_1 del cruzamiento para color.

En setiembre se realizaron los "sibs" entre plantas Ms_1 ms_1 tt.

En la descendencia del cruzamiento para color se eliminaron las plantas verdes y las rojas se retrocruzaron por Estanzuela 60.

Tercera generación. Los trabajos correspondientes a la tercera generación se realizaron a campo en 1969-70. Se sembró una parcela con semilla proveniente de los "sibs" del invernáculo, donde posteriormente se eliminaron las plantas fértiles (75 %). En otra parcela, sembrada con semilla proveniente de las retrocruzas de la generación anterior, se eliminaron las plantas verdes (50 %).

Las plantas estériles de la primera parcela se cruzaron con las rojas de la segunda en febrero de 1970.

Cuarta generación. La semilla descendiente de este cruzamiento se sembró en invernáculo en mayo de 1970 y en una parcela contigua, semilla de la tercera generación que segregaba en la proporción tres fértiles : una estéril. Se procedió de igual manera que en la generación anterior, eliminando por un lado los individuos fértiles y por el otro los verdes.

Los cruzamientos se realizaron en agosto de 1970. En octubre se cosechó la semilla de ese cruzamiento, ms_1 ms_1 tt x Ms_1 ms_1 Tt, que constituye la base de un proceso de cruzamientos continuados para mantener el stock de Estan-

zuela 60 machoestéril.

B) Prueba de gametocidas.

1) En diciembre de 1969 se sembró una parcela con la variedad Estanzuela 60, de la que se obtuvieron aproximadamente 220 plantas, en el campo experimental del Centro de Investigaciones Agrícolas "Alberto Boerger".

2) Los agentes investigados en el presente trabajo fueron los siguientes: Dalapon, 2-4 D amina, alcohol y agua caliente. Los nombres comerciales de los tres primeros productos son: Gramevin Shell (85 % de Dalapon), 2-4 D Amina Shell (50 % de 2-4 D) y Alcohol Rectificado Ancap (95 % de alcohol etílico).

3) Se usaron los siguientes tratamientos:

- Alcohol etílico 57 % (60 % de alcohol rectificado al 95 %), durante los tiempos de 2, 5, 10, 15 y 20 segundos. La aplicación se hizo por inmersión del botón floral en un recipiente conteniendo el producto. Se cronometró el tiempo de cada aplicación.

Cada uno de los tratamientos se aplicó a ocho plantas, al estado de botón floral.

- Agua destilada a 64°C durante cinco minutos, a 55°C durante cinco minutos y a 48°C durante cinco y diez minutos. Se trataron tres plantas por cada uno de los tratamientos. La aplicación se hizo también por inmersión.

- Dalapon, en dosis de 0,0425, 0,085, 0,170, 0,425 y 0,850 g por plan

ta. El producto se aplicó disuelto en agua, mediante pulverizaciones, a razón de 500 cc de agua por planta. Se trataron diez plantas con cada una de las dosis.

- 2-4 D, en dosis de 0,005, 0,0125, 0,025 y 0,05 cc por planta. La aplicación fue similar a la de Dalapon y también se trataron diez plantas por cada dosis.

Las pulverizaciones se hicieron con máquinas de mochila, al estado de botón floral, cubriendo cuidadosamente toda la superficie foliar.

Para la realización de este trabajo no se pudo contar con varios productos químicos que han sido ensayados en otros países y que se citan en la literatura consultada, debido a su costo extremadamente alto. Ellos son: sodio 2-3 dicloroisobutirato, ácidos dicloroisobutílico, isopropiónico, alfa-naftilacético y giberélico, e hidrazina maleica.

Se hizo una prueba para comparar la viabilidad del polen normal con el polen de las plantas en las que se indujo esterilidad, poniéndolos en contacto con dos colorantes: carmín acético y lactofenol con fucsina ácida [DIAZ (7)].

Como complemento de esa prueba, se hizo un estudio de germinación de los granos de polen en diversos medios de cultivo: agua destilada

1 g de glucosa + 20 cc de agua

3 g de glucosa + 20 cc de agua

500 ppm $Ca(NO_3)_2$ + 200 ppm $MgSO_4$ + 100 ppm H_3BO_3 + 15 % de sacarosa.

Estos medios de cultivo fueron usados por PAWLOWSKI (24).

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

A) Incorporación de machoesterilidad.

El resultado del proceso de introducción fue la obtención de 338 semillas cuya composición teórica es 50 % de verdes machoestériles (ms_1 ms_1 tt) y 50 % de rojos fértiles (Ms_1 ms_1 Tt).

A partir de este material, por cruzamientos sucesivos entre estas dos líneas hermanas, se puede mantener e incrementar este stock.

Como el proceso de introducción insume considerable tiempo y trabajo, no se justifica incorporarle machoesterilidad a todos los materiales disponibles y luego determinarles la capacidad combinatoria.

El proceso lógico sería determinar la capacidad combinatoria de todos los materiales, usando un método rápido y práctico de emasculación. Se incorporaría entonces la machoesterilidad genética a líneas o variedades que por su capacidad combinatoria permitan la obtención de híbridos F_1 rendidores.

En el presente trabajo se recuperó un 56,25 % del genotipo de la variedad original Estanzuela 60. Este porcentaje es bajo. Para aumentarlo, se guardó parte de la semilla Ms_1 Ms_1 Tt de la tercera generación para efectuar otras retrocruzas por el genitor recurrente Estanzuela 60, en los procesos para incorporación de color y machoesterilidad, y continuar con ese trabajo paralelamente con la multiplicación del "stock" actual.

Con una generación más de retrocruza en cada proceso, se recuperaría un 78,125 %. La porción del genotipo original que es conveniente recuperar depende de las características agronómicas, sanitarias y de calidad de ambos progenitores. En nuestro caso, donde la línea machoestéril es muy pobre agronómicamente, parece conveniente realizar alguna otra retrocruza sobre Estanzuela 60.

B) Prueba de gametocidas.

De las ocho plantas tratadas con alcohol 57 % durante 15 segundos, cuatro no produjeron polen y las restantes, reducida cantidad. Los porcentajes estimados respecto a la producción normal de polen en la variedad Estanzuela 60 son los siguientes:

Planta No.	% estimado
1	15
2	0
3	0
4	15
5	0
6	30
7	5
8	0

Este fue el único tratamiento eficaz para inducir esterilidad masculina, lo que coincide con lo expuesto por TYSDAL y GARL (35) para alfalfa.

Los demás tratamientos no fueron eficaces, ya sea por dañar seriamente las plantas o por ser ineficaces para inhibir la producción de polén.

Alcohol 57 % durante 20 segundos y agua destilada a 64°C durante cinco minutos produjeron quemado de los botones florales. Los tratamientos restantes no dañaron las plantas, pero tampoco evitaron la producción de polen.

Esta prueba debe repetirse con el tratamiento que fue eficaz (alcohol 57 %), ajustando el rango de tiempo de inmersión alrededor de los 15 segundos.

Es conveniente incluir productos tales como el sodio 2,3-dicloroisobutirato y la giberelina, que han sido usados con eficacia en otros países y eliminar los productos que no dieron resultados en esta prueba.

El polen de las plantas en las que se logró inducir esterilidad no se tiñó con ninguno de los dos colorantes usados en la primera prueba de viabilidad. Esto demuestra que esos granos no eran funcionales.

En cambio el polen normal se coloreó.

La otra prueba de viabilidad fue inefectiva, ya que no se logró la germinación del polen estéril, pero tampoco del normal.

V. CONCLUSIONES

1) Es factible en pocas generaciones (cuatro como mínimo) incorporar los genes de machoesterilidad y color ligado a materiales genéticos interesantes.

2) La obtención de Estanzuela 60 machoestéril permitirá testar su capacidad combinatoria con líneas y variedades de diversos orígenes y la producción comercial de híbridos F_1 en cruzamientos con los materiales con los que haya manifestado mayor capacidad combinatoria.

3) La inmersión de los botones florales de girasol en alcohol etílico al 57 % durante 15 segundos es el único tratamiento eficaz de todos los ensayados, para inducir esterilidad masculina, siendo además, inocuo para las plantas.

VI. RESUMEN

Se realizaron entre junio de 1969 y octubre de 1970 los trabajos de cruzamientos y retrocruzas correspondientes a las generaciones segunda, tercera y cuarta del esquema propuesto por Leclercq para incorporación de machoesterilidad genética y color ligado. Se partió de la variedad Estanzuela 60 y de un "Stock" machoestéril proveniente de la variedad soviética Armavir 9345.

Como resultado de estos trabajos se obtuvieron 338 semillas, cuya composición teórica es 50 % ms_1 ms_1 tt (verdes estériles) y 50 % Ms_1 ms_1 Tt (rojos fértiles). A partir de esta población, se incrementará este stock por cruzamientos sucesivos hermana-hermano.

Paralelamente se realizó una prueba para determinar la acción gametocida de los siguientes productos químicos: agua caliente, alcohol etílico, Dalapon y 2-4 D. El único tratamiento eficaz e inocuo fue alcohol al 57 % durante 15 segundos.

VII. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

1. ANASHCHENKO, A.V. Genetics of male sterility in the sunflower. I. The inheritance of the male sterility character in crosses of closely allied plants and the identification of factors determining male sterility. Genetika, Moskva 5(2):12-21. 1969. Original no consultado; compendiado en Plant Breeding Abstracts 39(4):7327. 1969.

2. -------- Genetics of male sterility in the sunflower. II. A proof of the double control of the male sterility in the sunflower. Genetika, Moskva 5(3):13-18. 1969. Original no consultado; compendiado en Plant Breeding Abstracts 39(4):7328. 1969.

3. AVTAR, S. y SEHGAL, S.L. Evaluation of gametocide FW 450 for interspecific hybridization. Indian Cott. Gr. Rev. 17:92-95. 1963.

4. BOCANEGRA, S.; MENDEZ, D. y HUANQUI, R. Ensayos en frijol y algodón con gametocidas. Bol. trim. exp. agropec., Progr. Coop. Exp. Agropec., Lima; 7(4):12-17. 1958.

5. BRAUER, H.O. Machoesterilidad inducida por Dalapon. Agric. téc. México No. 9:6-8. 1959-60.

6. DAVREUX, M. Trabajos realizados en la Estación Experimental Agropecuaria Pergamino. Carta enviada al Centro de Investigaciones Agrícolas "Alberto Boerger". Pergamino, diciembre de 1968.

7. DIAZ, A. Informe del curso realizado en Svalöf, Suecia. Fertilidad del polen. Facultad de Agronomía, Est. Exp. de Paysandú. Boletín Informativo 3(10):12-13. 1966.

8. EATON, F.M. Selective gametocide opens way to hybrid cotton. Science 126:1174-1175. 1957.

9. ETCHECOPAR, J.A. El mejoramiento del girasol en la Argentina. Rev. Arg. de Agron. 14(1):43-49. 1947.

10. -------- y SIVORI, E. Notas sobre el mejoramiento del girasol. Rev. Arg. de Agron. 8(3):252-260. 1941.

11. FRANKEL, R. Machoesterilidad y su aplicación práctica. Conferencia dictada en el Centro de Investigaciones Agrícolas "Alberto Boerger". 1969.

12. GABELMAN, W.H. Male sterility in vegetable breeding. Brookhaven Symposia in Biology No. 9. Genetics in Plant Breeding:113-122. 1956.

13. INSTITUTE NATIONALE DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE. Amélioration du Tournesol. Rapport d'activité pour la période 1964-67:01-020. Station d'Amélioration des Plantes Clermont Ferrand.

14. INSTITUTE NATIONALE DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE. Tournesol. Rapport d'activité pour la période 1960-63:61-67. Station d'Amélioration des Plantes Clermont Ferrand.

15. INSTITUTE NATIONALE DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE. Rapport d'Activité pour les Années 1967 et 1968. Station d'Amélioration des Plantes de Montpellier. pp. 103-113.

16. KINMAN, M.L. y PUTT, E.D. Sources and preliminary results of inheritance of male sterility in sunflowers. Proceed. of the Second International Sunflower Conference, Morden, Manitoba, Canada Department of Agriculture, Research Branch, 1966.

17. LECLERCQ, P. Une stérilité mâle utilisable pour la production d'hybrides simples de tournesol. Ann. Amélior. Plantes 16(2):135-144. 1966.

18. -------- Une stérilité mâle citoplasmique chez le tournesol. Ann. Amélior. Plantes 19(2):99-106. 1969.

19. LUCIANO, A. Trabajos de mejoramiento del cultivo del girasol. I.D.I.A. No. 225:24-34. 1966.

20. --------; KINMAN, M.L. y SMITH, J.D. Heritability of self incompatibility in the sunflower (Helianthus annuus L.). Crop Sci. 5(6):529-532. 1965.

21. MENDEZ, E.D. Ensayos preliminares con los gametocidas selectivos en el algodón Tangüis. Reunión de la Sociedad Latinoamericana de Fitotecnia 4a., Stgo., Chile, 1958.

22. -------- Resultados del mejoramiento del algodonero, campaña 1957-58. Lima, Perú, Estac. exp. agríc. "La Molina". Informe mensual. 33(380):1-9. 1959.

23. PATE, J.B. y DUNCAN, E.N. Evaluation of Na 2,3-dichloroisobutyrate as a selective male gametocide in cotton. Agron. J. 52:506-510. 1960.

24. PAWLOWSKI, S.H. Low temperature storage of sunflower pollen. Proceed. of the Second International Sunflower Conference, Morden, Manitoba, Canada Department of Agriculture, Research Branch, 1966.

25. PUTT, E.D. Observations on morfological characters and flowering process in the sunflower (Helianthus annuus L.). Sci. Agric. 21(4):167-179. 1940.

26. -------- Investigations of breeding technique for the sunflower. Sci. Agric. 21(11):689-702. 1941.

27. -------- Better hybrid sunflowers may result from sterility. Crop & Soils 16(7):18. 1964.

28. PUTT, E.D. Heterosis, combining ability, and predicted synthetics from a diallel cross in sunflowers (Helianthus annuus L.). Can. J. of Pl. Sci. 46:59-67. 1966.

29. -------- y HEISER, C.B. Male sterility and partial male sterility in sunflowers. Crop Sci. 6:165-168. 1966.

30. RICHMOND, T.R. Effects of sodium 2,3-dichloroisobutyrate on six characteristics of American upland cotton. Crop Sci. 2:58-60. 1962.

31. SCHUSTER, W. Investigations on the effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and ∝-naphthylacetic acid (NES) on the flower and the seeds of the sunflower and the after-effects in subsequent generations. Zutcher 26:78-83. 1956.

32. -------- Artificial induction of male sterility in sunflowers (Helianthus annuus L.). Z. Acker-u. Pfl. Bau. 116:341-350. 1963. (En alemán). Original no consultado; compendiado en Pl. Br. Abs. 33(4):4928. 1963.

33. -------- Inbreeding and heterosis in sunflower (Helianthus annuus L.). Wilhelm Schnutz Verlag, Giessen 1964:135. (En alemán). Original no consultado; compendiado en Pl. Br. Abs. 37(1):1207. 1967.

34. TER-AVANESJAN, D.V. y SEMENOVA, I.V. A chemical method of obtaining male sterility in cotton. Hlopkovodstvo (cotton Growing) 1963(2):31-34. (En ruso). Original no consultado; compendiado en Pl. Br. Abs. 34(2):2591. 1964.

35. TYSDAL, H.M. y CARL, J.R. A new method for alfalfa emasculation. J. Amer. Soc. Agron. 32:405-407. 1940.

36. UNRAU, J. y WHITE, W.J. The yield and other characters of inbred lines and single crosses of sunflowers. Sci. Agric. 24(11):516-525. 1944.

37. VALDIVIA, V. y PUTT, E.D. Métodos de mejoramiento en maravilla. Santiago, Chile, Dirección de Agricultura y Pesca, Boletín Técnico No. 7. 14 p. 1961.

38. VAN DER KLEY, F.K. Male sterility and its importance in breeding heterosis varieties. Euphytica 3:117-124. 1954.

39. VRÂNCEANU, V. Investigaciones sobre métodos de obtención de heterosis en girasol. Analele I.C.C.P.T., Fundulea, (serie C):33:301-310. 1965.

40. -------- y STOENESCU, G. Girasol machoestéril y perspectivas de su utilización en la producción de semilla híbrida. Analele I.C.C.P.T., Fundulea, (serie C) 35:559-571. 1969.

41. VULPE, V.V. Estudios sobre híbridos de girasol desarrollados sobre la base de machoesterilidad y restauración de la fertilidad. Analele I.C.C.P.T., Fundulea, (serie C) 34:391-399. 1967.

42. WIT, F. Chemically induced male sterility, a new tool in plant breeding? Euphytica 9(1):1-9. 1960.