

Maíces argentinos tetraploides obtenidos por tratamiento con calor

POR EL

PROFESOR TITULAR ING. AGR. JOSE M. ANDRES

Director del Instituto

Y EL

JEFE DE LA SECCIÓN CITOLOGÍA ING. AGR. FULGENCIO SAURA

Desde que el estudio cariológico de numerosas especies vegetales demostró que alrededor de un 50 % de ellas, y con frecuencia las más útiles al hombre, son formas poliploides más o menos diferenciadas genéticamente en el curso de la evolución de las especies diploides originarias, ha habido un permanente interés por inducir artificialmente estos cambios cromosómicos.

Es así que con la esperanza de obtener nuevas formas de valor de las especies cultivadas y de sus híbridos, o con el propósito de obtener material favorable para investigaciones citogenéticas y cariosistemáticas sobre las relaciones, el origen y la evolución de las especies, se ha realizado una activa búsqueda de métodos que permitan producir poliploides a voluntad.

Esa búsqueda ha sido fructuosa y tomando así en consideración solamente los trabajos experimentales hechos con plantas superiores, que son los que nos interesan desde el punto de vista fitotécnico, se han descubierto varios métodos de los cuales los más importantes son los que se enumeran a continuación, en orden cronológico.

- 1° Despuntado y desbrote.
- 2° Tratamiento con altas temperaturas.
- 3° Tratamiento con colchicina u otros productos químicos.

El primer método se debe originalmente a Winkler quien injertando *Solanum lycopersicum* en *S. nigrum* obtuvo yemas tetraploides originadas en el lugar del injerto. Posteriormente Jörgensen y Crane (1927) y Jörgensen (1928) demostraron que para obtener poliploides con este método no era necesario el injerto, bastando sólo con despuntar y desbrotar plantas jóvenes en pleno desarrollo, permitiendo luego únicamente el crecimiento de las yemas adventicias en la región del callo originado por aquel tratamiento. En esta forma, obtuvieron más o menos regularmente, un 6 % de brotes tetraploides.

El segundo método se debe a Randolph (1932) y consiste en la aplicación de temperaturas elevadas a la cigota durante la primera división. Igual que en el método anterior, las células tetraploides se originan al no formarse por efectos del tratamiento, la membrana celular que separa los dos núcleos resultantes de una división.

El tercer método comprende el empleo de diversos productos químicos de los cuales la colchicina, utilizada con estos fines por primera vez por Blakeslee y Avery (1937), ha demostrado ser muy superior a todos los demás. Este alcaloide actúa inhibiendo la formación de las fibras del huso durante la división celular y ha sido el agente más proficuo en la obtención experimental de poliploides en razón de la sencillez de su empleo, efectividad y aplicación general a todas las especies vegetales hasta ahora probadas.

Material y métodos

Con la finalidad de obtener tetraploides en las variedades argentinas de maíces, se iniciaron trabajos en el año 1940, empleándose separadamente la colchicina y el método de las altas temperaturas de Randolph. Los resultados obtenidos con la colchicina serán motivo de otra comunicación por lo cual no se considerarán aquí.

El método de Randolph empleado en este trabajo, fué utilizado originalmente por su autor en la obtención de tetraploides en maíces norteamericanos, habiendo sido aplicado después por otros investigadores en varias especies. Así Peto (1936) e independientemente Müntzing y otros el mismo año, obtuvieron tetraploides en cebada; Atwood (1936) en *Melilotus alba*; Dorsey (1936) en trigo y centeno; Lutkov (1938) en lino y Cooper (1939) en alfalfa.

En el Instituto de Genética de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de Buenos Aires, donde este trabajo se ha efectuado, los primeros ensayos con el método de Randolph fueron iniciados por F. F. González bajo la dirección de uno de los autores. González en 1941 obtuvo tetra-

ploides en la variedad cultivada de maíz Colorado Cuarentón Klein (1). También en este Instituto, Tomé en 1942, (inédito) obtuvo con el mismo método una planta tetraploide fértil en alfalfa.

En 1942 se prosiguieron los trabajos con maíz continuándose con las variedades Colorado Klein y Amarillo Canario Klein, para completar así la poliploidía en las tres variedades más típicas y difundidas del país.

El material tratado de ambas variedades fué semilla original proveniente del semillero de su creador Ing. Agr. Enrique Klein.

La técnica empleada es esencialmente la misma utilizada por Randolph.

El calor fué aplicado a las espigas por medio de una almohadilla eléctrica provista de un reóstato para el control de la temperatura. Esta almohadilla fué colocada sobre un soporte especial y se recubrió con una manta de fieltro y amianto, con algodón en ambos extremos, para conservar la temperatura. Un termómetro sensible cuyo bulbo se introdujo en la espiga aplicándolo contra los granos embrionarios, completaba el sistema. Se trabajó simultáneamente con tres aparatos de este tipo manteniéndose las temperaturas deseadas con oscilaciones no mayores de 0,5° C.

Para cada espiga se efectuó un único tratamiento a las 36 horas de ser polinizada. En estas polinizaciones se utilizó siempre polen de otra planta de la misma variedad, con el fin de evitar en lo posible la endocria y con ella la pérdida consiguiente del vigor y fertilidad en los posibles poliploides derivados.

Las polinizaciones se efectuaron de manera que los tratamientos coincidieran con las horas más frescas del día, pues según Randolph, el brusco cambio de temperatura a que se somete los proembriones, favorece la consecución de los resultados que se procuran.

Los tratamientos, realizados durante el mes de febrero de 1942, fueron los siguientes:

Variedad	Tratamiento		Nº de espigas tratadas	Nº de espigas logradas
	temperatura	tiempo		
Colorado Klein	47 °	45'	10	7
» »	45 °	45'	16	15
Amarillo Canario K.	47 °	45'	13	8
» » »	45 °	45'	18	12

(1) GONZÁLEZ F. F. *Producción experimental de tetraploides por medio de altas temperaturas*. Tesis, Facultad de Agronomía y Veterinaria de Buenos Aires (inédita).

Los efectos del tratamiento pueden verse en la figura N° 2. En ella se aprecia que las espigas provenientes de plantas testigos (no tratadas) fueron de mejor desarrollo y mejor granadas. Tanto en la variedad Colorado Klein como en la Amarillo Canario Klein, se observaron en ambos tratamientos (47 y 45°) algunas espigas pequeñas, mal granadas y con granos defectuosos (sin germen, reventados, etc.).

En noviembre de 1942 se prosiguió con el análisis morfológico con el objeto de descubrir las plantas poliploides que pudiera haber en el material tratado. Este análisis se hizo teniendo en cuenta primero el tamaño de los estomas y células epidérmicas y luego el tamaño del polen, grosor de los estigmas y aspecto de la panoja. Como el material era muy abundante, se eligieron las 11 espigas más afectadas de ambos tratamientos de la variedad Colorado Klein y se sembraron en invernáculo. Estas 11 espigas dieron 2024 gramos en total, de los cuales se obtuvieron 1750 plántulas cuyos estomas fueron medidos al microscopio con un ocular micrométrico 18x y un objetivo 10x. Se eligieron así 350 plántulas cuyos estomas parecían mayores que los del testigo diploide, las cuales fueron trasplantadas a campo y dieron finalmente cuatro plantas tetraploides. Las 11 espigas restantes de la variedad Colorado Klein y las espigas del Amarillo Canario Klein, fueron sembradas directamente a campo para abreviar tareas, haciéndose a la floración el análisis de los estomas y granos de polen en las más promisoras únicamente, juzgando por el aspecto de la planta.

En estos dos lotes se obtuvo una planta tetraploide en cada uno, ambas del tratamiento a 45° C. Aquí es posible, que a pesar de los cuidados culturales prodigados, se hayan perdido algunas plántulas de interés, por los inconvenientes propios de la siembra y cultivo en las condiciones de campo.

En cuanto a la proporción de plantas tetraploides obtenidas, ésta puede ser calculada en el material de la variedad Colorado Klein que se sembró en invernáculo, donde hubo un control que puede estimarse perfecto. En este caso, del tratamiento a 45°C., se obtuvieron tres plantas tetraploides sobre 1390 plántulas analizadas, es decir, 0,22 % y del tratamiento a 47°C., se obtuvo una sobre 360, es decir 0,28 %. Ambos valores representan los porcentajes de tetraploides obtenidos de las espigas más afectadas por los tratamientos de la variedad antes indicada.

Descripción de los tetraploides obtenidos

Las seis plantas tetraploides obtenidas dieron estomas, granos de polen y estigmas mayores que los de las plantas diploides de las va-

riedades tratadas, como puede verse en las figuras números 4, 5 y 6.

Las medidas de los estomas y granos de polen, como así también la fertilidad de estos últimos, determinada con carmín acético y lugol, resultaron prácticamente iguales en las seis plantas tetraploides obtenidas, por lo cual en el cuadro siguiente se da su promedio para mayor sencillez comparado con las plantas diploides de las variedades utilizadas.

ESTOMAS, POLEN Y FERTILIDAD DE MAICES DIPLOIDES
Y DE SUS TETRAPLOIDES DERIVADOS

	Testigo 2x	Tetraploide derivado
Largo de los estomas en micrones.....	50 ± 0,7	64 ± 1,7
Diámetro medio del polen en micrones	111 ± 1,1	128 ± 1,5
Fertilidad del polen en %	95 ± 1,1	89 ± 2,3

Como se observa en el cuadro anterior y lo mismo en las microfotografías de la figura N° 5, la fertilidad del polen en las plantas tetraploides resultó casi igual o muy poco inferior al de las plantas de las variedades testigo. Lamentablemente en los maíces tetraploides no parece haber buena correlación entre la fertilidad del polen y la productividad en grano que es lo interesante desde el punto de vista práctico. En efecto, esto puede verse en la figura N° 3 que muestra las cinco espigas obtenidas de igual número de plantas tetraploides de la variedad Colorado Klein. Se observa allí un elevado porcentaje de esterilidad, a pesar de que fueron polinizadas tres días consecutivos, para asegurar una mejor fecundación.

Ahora es necesario puntualizar que el aspecto y fertilidad de estas espigas ha sido algo afectado por ser hijas de la generación tratada, habiendo sufrido en consecuencia los efectos del tratamiento aplicado a los granos que les dieron origen. La siguiente generación, obtenida de las semillas anteriores, dió plantas más lozanas y con mejores espigas como se aprecia en las figuras 7 y 9.

Las plantas de las razas tetraploides obtenidas tienen una altura similar a la de las plantas diploides de las variedades originales. Poseen además de las diferencias ya anotadas en tamaño de granos de polen, estomas y estigmas, otras características morfológicas comunes en los autopoliploides que Müntzing (1936) resume en su importante trabajo. Estas son:

1. — Plantas de tallo más grueso, característica que se observa ya

en el estado de plántula. No obstante ello, los tallos son más quebradizos que en los testigos diploides.

2. — Las hojas son aproximadamente un 40 % más gruesas que en las plantas diploides. Además son de color verde más oscuro y proporcionalmente más anchas, de manera que el índice foliar $\frac{\text{ancho}}{\text{largo}}$ resulta apreciablemente mayor.
3. — Las panojas son más grandes y producen polen abundante. Tienen espiguillas y anteras más grandes que en las plantas diploides, como lo muestran las figuras 10 y 11.
4. — Las espigas son más cortas y gruesas, con filas irregulares e imperfectamente granadas.
5. — Los granos son más grandes y redondeados.

Con respecto al análisis cariológico, éste se realizó en puntas de raicillas y células madres del polen. En el primer caso, de las seis espigas procedentes de plantas que parecían tetraploides por el mayor tamaño de sus estomas, granos de polen y estigmas, se tomaron algunas semillas y se pusieron en germinador. Las raicillas se fijaron en Craf, se incluyeron en parafina, fueron coloreadas con hematoxilina de Heidenhain y se montaron en bálsamo de Canadá. Los recuentos efectuados dieron 40 cromosomas en todos los casos, como puede verse en las microfotografías de la figura 8 en las que se muestran células en metafase somática de las variedades Colorado Klein y Amarillo Canario Klein tetraploides.

El estudio de los cromosomas en meiosis se efectuó en la segunda generación, en la que se dispuso de material abundante. Se utilizó el método de Belling del carmín acético previa fijación con Carnoy 1 y Carnoy 2.

A pesar de ser éste un método que da excelentes resultados en el maíz, no se obtuvieron aquí buenos preparados observándose un molesto teñido del citoplasma y relativamente poco coloreados los cromosomas. Este inconveniente había sido ya observado en los tetraploides de Randolph al preparar material para enseñanza, por lo cual parece general el hecho de que los maíces tetraploides no dan buenas preparaciones en frotis con carmín acético.

El inconveniente anotado nos impidió sacar microfotografías pero no desde luego el análisis microscópico. Los 40 cromosomas de estos maíces tetraploides se observaron agrupados en numerosos tetravalentes y pocos bivalentes, no llegando a contarse en ningún caso más de 15 grupos en lugar de los 20 que serían de esperar en una meiosis normal.

El número más frecuente de tetravalentes fué de 8 variando desde 5

a 10. En consecuencia, el número de bivalentes varió de 10 a 0 respectivamente. Estas cifras concuerdan con las que da Randolph (1935) aunque con mayor variabilidad en nuestro material.

En anafase I y metafase II se observó una distribución relativamente regular de los cromosomas, a pesar de la compleja sinapsis anotada, lo que explica la alta fertilidad ya vista en el análisis del polen. Fué fre-

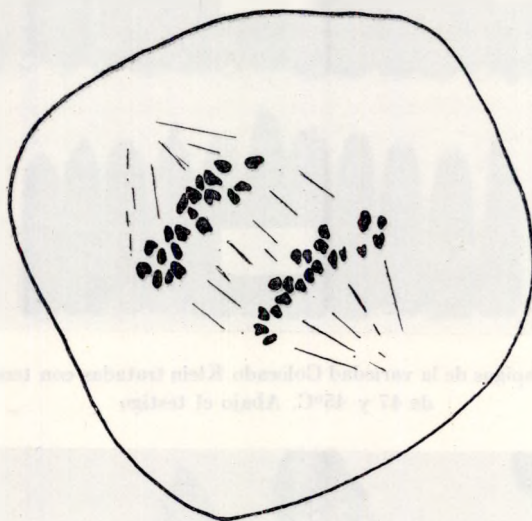


Fig. 1. — Anafase I en la variedad Colorado Klein tetraploide. A cada polo se dirigen regularmente 20 cromosomas. X 800

cuenta poder contar 20 cromosomas (diadas) en estos estados, como lo muestra la figura 1.

Se observó además en la segunda generación, un cierto número de espigas anormales y semiestériles. Una de estas últimas, analizada cariológicamente demostró poseer 11 pares de cromosomas en lugar de 10 que es el número normal para la especie.

Como los maíces tetraploides tienen hojas más gruesas y coriáceas que los maíces diploides, se hizo un ensayo de resistencia a la langosta para determinar si podrían tener alguna ventaja en este sentido. En las pruebas experimentales efectuadas, las langostas (*Dichroplus sp.* y *Chromacris miles*) comieron indistintamente ambos tipos de maíces, de-

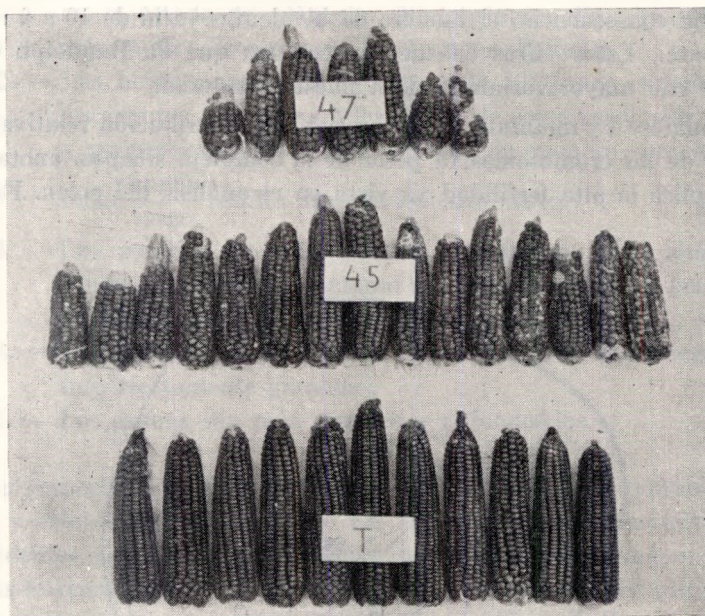


Fig. 2. — Espigas de la variedad Colorado Klein tratadas con temperaturas de 47 y 45°C. Abajo el testigo

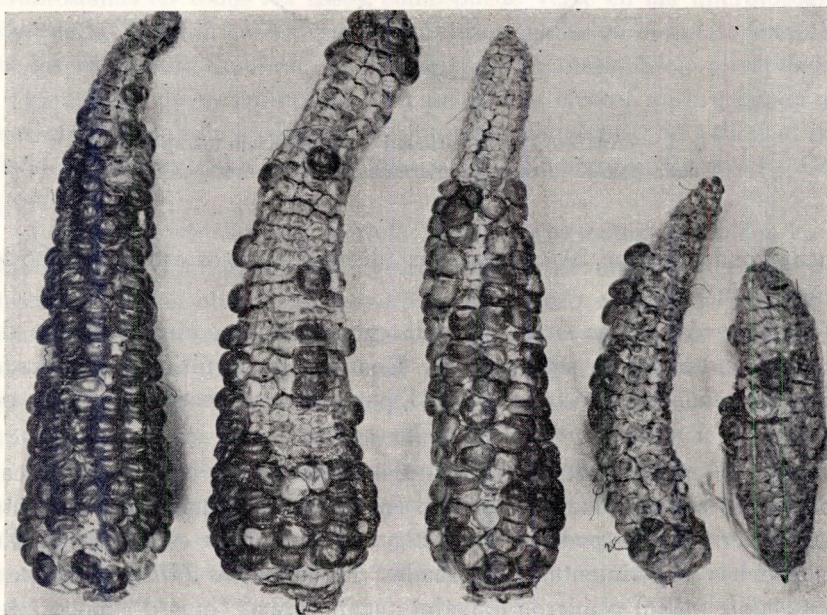


Fig. 3. — Espigas producidas por las 5 plantas de maíz Colorado Klein que resultaron totalmente tetraploides por efectos del tratamiento aplicado

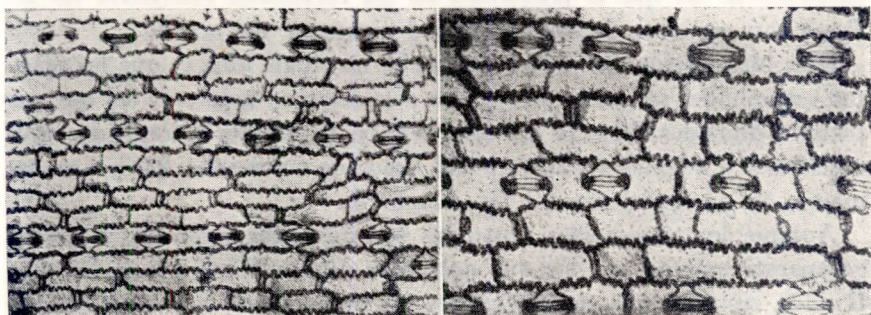


Fig. 4. — Células epidérmicas y estomas de una planta diploide a la izquierda y tetraploide a la derecha. x 90

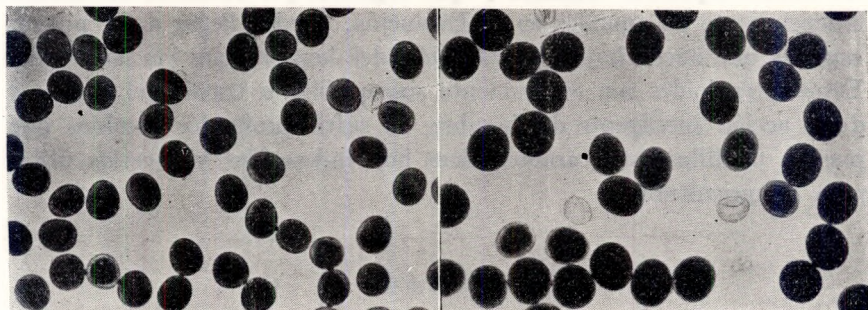


Fig. 5. — Granos de polen coloreados con carmín acético de una planta diploide a la izquierda y tetraploide a la derecha, x 50

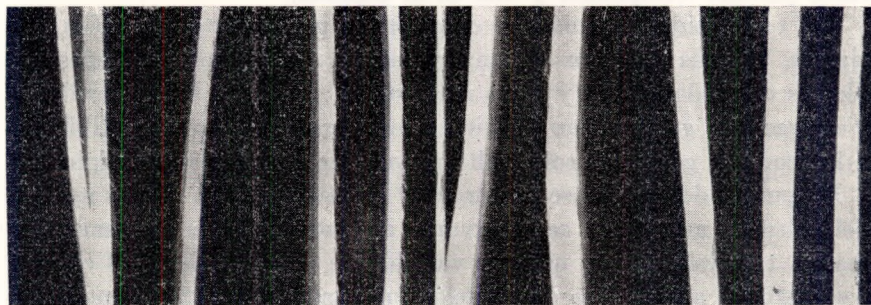


Fig. 6. — Estigmas de una planta diploide a la izquierda y tetraploide a la derecha. x 4,3

mostrándose así que la poliploidía en las variedades ensayadas no influyó para nada en la susceptibilidad al ataque del acridio.

Otra observación que se ha efectuado, no citada aún, es que las plantas tetraploides son más susceptibles a la sequía y golpes de sol que sus testigos diploides. Esto se ha observado en los maíces tetraploides aquí descritos y además en la variedad Colorado Cuarentón Klein y en los maíces 4x que poseemos del Dr. Randolph.

Aunque los tetraploides obtenidos son algo más vigorosos y fértiles comparativamente que los que poseemos del Dr. Randolph de Estados Unidos, resultan aún decididamente inferiores a las variedades diploides originarias, como puede concluirse de la descripción efectuada. No obstante, ello no autoriza a ser terminantemente escépticos sobre el posible valor futuro de estas razas citogenéticas así creadas. Debe considerarse, que los tetraploides ahora obtenidos que no se cruzan más con los maíces diploides comunes y que seguirán por lo tanto un camino independiente de aquellos en la Evolución, pueden llegar a ser nuevas especies que nacen bajo la protección del hombre que las ha creado. Estos tetraploides son seguramente susceptibles, a través del tiempo y de la acción inteligente del hombre, de sufrir profundos cambios que pueden modificar sus características hoy indeseables y hacerlos útiles para la agricultura.

RESUMEN

Se han efectuado tratamientos de proembriones de maíz con temperaturas de 45 y 47° C., durante 45 minutos, 36 horas después de la polinización, en las variedades argentinas Colorado Klein y Amarillo Canario Klein. En la primera de las variedades nombradas se obtuvieron cinco plantas tetraploides y una en la segunda.

Los tetraploides obtenidos se caracterizan por sus estomas, polen, estigmas, panojas y granos de mayor tamaño que en las variedades diploides originales; tallos y hojas más gruesas; polen de buena fertilidad y espigas más gruesas pero deficientemente granadas. La susceptibilidad a la sequía y golpes de sol resultó mayor que en los testigos diploides.

En puntas de raicillas se contaron 40 cromosomas. En células madres del polen en metafase I se observaron asociaciones de cromosomas formando tetravalentes en número variable de 5 a 10, siendo 8 el más frecuente. En anafase I la distribución fué regular yendo 20 cromosomas a cada polo.

SUMMARY

Treatments have been made of proembryos of corn with temperatures of 45 and 47° C., during 45 minutes, 36 hours after the pollination has taken place, in the Argentine varieties *Colorado Klein* and *Amarillo Canario Klein*. In the first mentioned variety there were five tetraploid plants obtained, and one in the second.

The obtained tetraploids are characterized by their stomata, pollen stigmata, tassels, and grains of greater size as in the original diploid varieties; thicker stalks and leaves; pollen of good fertility and thicker ears but defficiently grained. The susceptibility to drought and violent sun was greater than in the diploid controls.

At the root tips, 40 chromosomes were counted. Associations of chromosomes were observed in the mother cells of the pollen in *metaphase I*, forming *quadrivalent* in a varying number of six to ten, being eigth the most frequent. In *anaphase I*, the distribution has been regular, 20 chromosomes going to each pole.

RESUMO

Efetuaram-se tratamentos de proembriões de milho com temperaturas de 45° e 47° C., durante 45 minutos, 36 horas depois da polinização, nas variedades argentinas «Colorado Klein» e «Amarillo Canario Klein». Na primeira das variedades nomeadas obtuveram-se cinco plantas tetraploides e uma na segunda.

Os tetraploides obtidos caraterizam-se pelos seus estomas, pólen, estigmas, maçarocas e grãos de maior tamanho que nas variedades diploides originaes; caules e fôlhas mais grassas; pólen de boa fertilidade; e espigas mais grossas, porém deficientemente graúdas. A suscetibilidade á seca e golpes de sol resultou maior que nos «testigos» diploides.

Em pontas de radículas contaram-se 40 cromosomas. Em células mães do pólen em metafase I observaram-se associações de cromosomas formando tetravalentes em número variavel de 5 a 10, sendo 8 o número mais frequente. Em anafase I a distribuição foi regular, indo 20 cromosomas a cada polo.

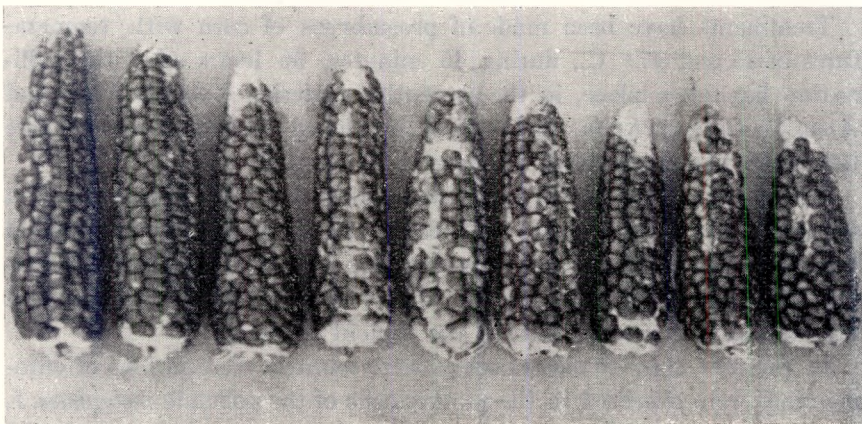


Fig. 7. — Parte de las espigas obtenidas en la segunda generación de la variedad Colorado Klein tetraploide

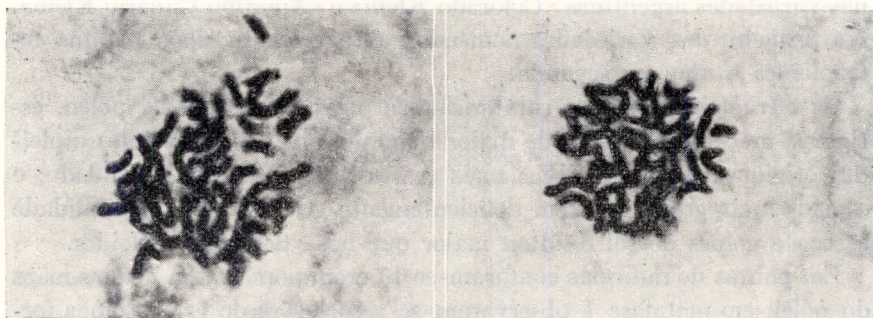


Fig. 8. — Metafasas somáticas mostrando 40 cromosomas en las variedades Colorado Klein a la izquierda y Amarillo Canario Klein a la derecha. x 1700



Fig. 9. — Plantas de maíz Colorado Klein tetraploide en floración.

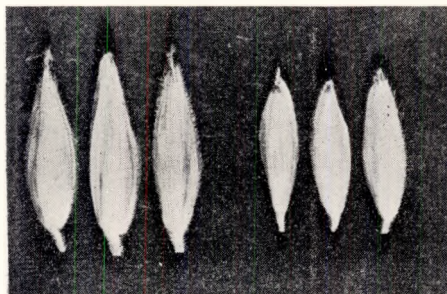


Fig. 10. — Espiguillas de plantas tetraploides a la izquierda y diploides a la derecha

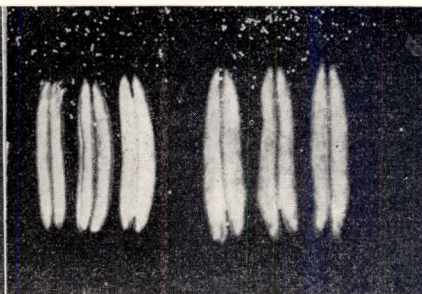


Fig. 11. — Anteras y polen de plantas diploides a la izquierda y tetraploides a la derecha

LITERATURA CITADA

ATWOOD S., 1936. *Tetraploid and aneuploid «Melilotus alba» resulting from heat treatment.* Amer. Jour. Bot. 23: 674-677.

BLAKESLEE A. F. AND A. G. AVERY, 1937. *Methods of inducing doubling of chromosomes in plants by treatment with colchicine.* Jour. of Her. 28: 392-411.

COOPER D. C., 1939. *Artificial induction of polyploidy in alfalfa.* Amer. Jour. Bot. 26: 65-67.

DORSEY E., 1936. *Induced polyploidy in wheat and rye.* Jour. of Her. 27: 154-160.

JÖRGENSEN C. A. AND M. B. CRANE, 1927. *Formation and morphology of «Solanum» chimaeras.* Jour. Gen. 18: 247-273.

JÖRGENSEN C. A., 1928. *The experimental formation of heteroploid plants in the genus «Solanum».* Jour. Gen. 19: 133-211.

LUTKOV A. N., 1938. *Tetraploidy in «Linum» induced by high temperature treatment of the zygote.* C. R. Acad. Sc. U.R.S.S. 19: 87-90.

MÜNTZING A., TOMETONP A. AND MUND PETERSON, 1936. *Tetraploidy barley produced by heat treatment.* Hereditas 22: 401-406.

MÜNTZING A., 1936. *The evolutionary significance of autopolyploidy.* Hereditas 21: 263-278.

PETO F. H., 1936. *Heat induced tetraploid in barley.* Can. Jour. Res. 14: 445-447.

RANDOLPH L. F., 1932. *Some effects of the high temperature on polyploidy and other variations in maize.* Proc. Nat. Acad. Sci. 18: 222-229.

RANDOLPH L. F., 1935. *Cytogenetics of tetraploid maize.* Jour. Agr. Res. 50: 591-605.