

I. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES . . . . .	25
II. MATERIAL Y MÉTODOS . . . . .	26
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN . . . . .	28
IV. CONCLUSIONES . . . . .	31
V. AGRADECIMIENTOS . . . . .	32
VI. RESUMEN Y SUMMARY . . . . .	32
VII. BIBLIOGRAFÍA . . . . .	32

## EFFECTOS DE LA INDUCCION DE ANDROESTERILIDAD POR APLICACION DE AG<sub>3</sub> SOBRE LA PRODUCCION DE SEMILLA F<sub>1</sub>, EN GIRASOL (*Helianthus annuus* L.).

D. A. PEIRETTI<sup>1</sup>, H. CEBALLOS<sup>2</sup>, R. E. MACCHIAVELLI<sup>3</sup>, y M. FERNÁNDEZ<sup>4</sup>

### I. INTRODUCCION Y ANTECEDENTES

Los programas actuales de mejoramiento genético del girasol (*Helianthus annuus* L.), en la generalidad de los casos incluyen etapas de hibridación para el aprovechamiento de la heterosis, así como para la transferencia de resistencia o calidad.

La producción comercial de semilla híbrida F<sub>1</sub>, tal como lo describe E. Putt (1962) y utilizara en nuestro país A. Luciano et al. (1967), puede conseguirse mediante parcelas apareadas de líneas endocriadas altamente autoincompatibles. El sistema es esporofítico y según J. Semienchuk (1981), está influenciado por el ambiente, en consecuencia, el material cosechado es una mezcla de "semillas" híbridas y autofecundas.

Un medio que provee una fertilización cruzada completa, es la androesterilidad génica y citoplásmica con control nuclear. Sin embargo, su utilización insume tiempo, espacio y mano de obra debido a la necesidad de efectuar numerosas cruza, retrocruza y selecciones.

<sup>1</sup> Ingeniero Agrónomo, MS. Profesor Adjunto, Cátedra de Mejoramiento Vegetal, Fac. Cs. Agrop. (UNC).

<sup>2</sup> Ingeniero Agrónomo, Jefe de Trabajos Prácticos, Cátedra de Mejoramiento Vegetal, Fac. Cs. Agrop. (UNC).

<sup>3</sup> Ingeniero Agrónomo, Jefe de Trabajos Prácticos, Cátedra de Estadística y Biometría, Fac. Cs. Agrop. (UNC).

<sup>4</sup> Bióloga, Auxiliar Docente, Cátedra de Genética, Fac. Cs. Ex. Fís. y Nat. (UNC).

Recibido: 1<sup>o</sup> de Setiembre de 1983 - Aceptado: 2 de Noviembre de 1983.

Con el fin de lograr un método rápido, simple y menos costoso, W. Schuster en 1956, citado por W. Schuster (1969), propuso el uso del control químico de la gametogénesis en girasol; pulverizando sobre el follaje y "botón floral" con varias concentraciones de distintas fitohormonas. Así logró inhibir el desarrollo del androceo, facilitando la producción de "semilla híbrida". Sin embargo, estos tratamientos produjeron un efecto desfavorable sobre el follaje, morfología floral y tamaño y viabilidad de "semilla". Posteriormente el mismo autor (1961 y 1963) citado por G. Piquemal (1975), destacó que la aplicación de ácido giberélico (AG) resultó en una inhibición casi total de la formación de anteras, a la vez que incrementó la protoginia y la floración temprana; la producción de frutos fue reducida notablemente. N. Spirova (1965), confirmó los trabajos de Schuster, poniendo de relieve la importancia del momento de aplicación del agente químico.

A. Anascenko (1972), trabajando con variedades y líneas endocriadas, logró un 100 % de esterilidad del polen y una disminución del rendimiento no mayor del 15 %; aplicando 0,5 a 1,5 miligramos por planta de AG en solución acuosa a una concentración de 50 ppm, en el estado de "roseta" y manteniendo la temperatura constante de 22 °C. Comprobó la existencia de una respuesta diferencial al AG de variedades y líneas endocriadas.

Recientemente L. García Torres et al. (1979), obtuvieron entre 94 y 96 % de androesterilidad con una sola aplicación de AG<sub>3</sub> en una solución de 100 ppm, cuando la inflorescencia tenía entre 0,5 y 1,0 cm de diámetro. Asimismo, encontraron una gran sensibilidad y respuesta diversa entre líneas endocriadas.

A. Seetharam et al. (1976) y L. Konstantinova (1980), estudiaron en granos de polen, las consecuencias citológicas de la aplicación de AG en girasol, describiendo numerosas alteraciones en las células del tapete, así como una reducción en el porcentaje de meiocitos. En muchos casos la meiosis fue seguida de citocinesis, lo que determinó la formación de cenócitos.

En el presente trabajo se planteó como objetivo, la evaluación de los efectos de la aplicación de AG<sub>3</sub> en la producción de "semillas" híbridas F1.

## II. MATERIAL Y METODOS

### a) *Descripción del material*

A fin de determinar la existencia o no de respuesta diferencial a dosis, por parte del material genético, se utilizó una población variable genéticamente y dos líneas endocriadas. La población fue la variedad Impira

INTA, y las líneas endocriadas fueron "B Mf 76-2", "R Mf 76-63" y "KLM 250", obtenidas en la Estación Experimental Agropecuaria Manfredi (INTA). La última se utilizó como marcador genético, por ser portadora de la característica "color antocianico del epicótilo de la plántula", determinada por simple gen dominante.

Se utilizaron las siguientes dosis de AG<sub>3</sub> en solución acuosa: I) 75, II) 100, y III) 125 ppm.

b) *Mancio del material.*

La siembra del material se realizó en octubre de 1981, en el área experimental de la Facultad de Ciencias Agropecuarias (UNC), de acuerdo a un diseño en bloques completos al azar, con arreglo factorial a tres niveles para cada factor, es decir que cada bloque contuvo nueve parcelas. Cada tratamiento se repitió tres veces.

Las parcelas estuvieron constituidas por un surco de cinco plantas, de las cuales sólo fueron tratadas y analizadas las tres centrales, actuando las no tratadas como testigo. Cada tres parcelas se intercaló un surco con plantas portadoras del marcador genético. La distancia entre plantas fue de 0,4 m y la separación entre surcos de 0,7 m.

Cuando el capítulo alcanzó 1,5 a 2,0 cm de diámetro y el involucro era claramente visible (estado de "estrella"), se aplicaron entre las brácteas con una jeringa, 2,0 cm<sup>3</sup> de la solución de AG<sub>3</sub>. Al alcanzar un diámetro de 8 a 10 cm, los capítulos con su cara inferior todavía tapizada por las brácteas del involucro, fueron cubiertos con una bolsa de papel poroso, a fin de facilitar la recolección del polen, y preservar la polinización no controlada.

Una vez producida la apertura del involucro y completada la aparición de las flores liguladas (momento en que comienza a derramarse el polen), a fin de determinar el porcentaje de viabilidad mediante la tinción por el colorante de Alexander, de cada planta se tomaron tres muestras de polen en el lapso de tres semanas.

Al fin del período de floración se observó altura de plantas, forma y tamaño de capítulos y frutos, con el fin de analizar algunas modificaciones que pudieran inducirse en las plantas tratadas.

A la madurez, los capítulos se cosecharon individualmente. Para cada caso, se determinó el porcentaje de frutos vanos, la proporción de "semillas" normales que eran capaces de originar plántulas viables, y el porcentaje de "semilla híbrida" obtenida por polinización manual a través de la cantidad de plántulas que presentaron color antocianico de epicótilo.

Debido a que los resultados se expresan en porcentajes (considerando al testigo como 100 % en todos los casos), los mismos han sido transformados mediante la función "arco seno", a fin de satisfacer el supuesto de normalidad, necesario para el análisis de la varianza.

### III. RESULTADOS Y DISCUSION

#### a) Cantidad y viabilidad del polen.

En los tratamientos cuya dosis fue de 125 ppm, las anteras se mostraron finas y delgadas, con agrietamientos y vacías o con muy pocos granos de polen. El análisis de la varianza, que se presenta en el Cuadro N° 1, demuestra la ausencia de una interacción significativa entre los factores considerados. Las respectivas pruebas, F de Snedecor y de Tukey que se exponen en el Cuadro N° 2, ponen de manifiesto diferencias altamente significativas (P menor que 0,01), entre todos los niveles del factor dosis.

CUADRO N° 1: COMPENDIO DE CUADRADOS MEDIOS

Fuente de Variación	Grados de Libertad	CUADRADOS MEDIOS			
		Inviab. Polen	Frut. Vacíos	Semill. Viable	Semill. Híbrida
Bloques . .	2	4.46ns	151.87ns	242.58ns	3.80ns
Dosis . . .	2	7425.09**	4715.88**	1302.87ns	3833.50**
Variedades .	2	186.16ns	28.42ns	329.87ns	31.30ns
Interacción .	4	13.14ns	29.82ns	172.42ns	36.05ns
Residual . .	16	13.04ns	24.82ns	145.24ns	17.13ns

ns = diferencias no significativas.

\*\* = significancia a los niveles P 0,05 y P 0,01, respectivamente.

CUADRO N° 2: PRUEBA DE TUKEY

	Inviabilidad Polen	Frutos Vacíos	Semilla Viable	Semilla Híbrida
75 ppm**	5.43	3.75°	99.24°	16.85°
125 ppm	45.02	19.01°	99.91°	19.93°
100 ppm**	89.32	68.79	81.40°	75.92°

ns = diferencias no significativas

°, \*\* = significancia a los niveles P 0,45 y P 0,01, respectivamente.

En el Gráfico N° 1 se presenta el porcentaje de inviabilidad en función de la dosis aplicada, para los distintos materiales genéticos. Se observa un neto efecto lineal de las dosis sobre la no viabilidad del polen, lo cual es coincidente con los resultados publicados por A. Seetharam et al. (1975), excepto en que este autor establece que la relación lineal no se mantiene con concentraciones de AG superiores a 90 ppm. Asimismo, es dable apreciar que las líneas endocriadas se mostraron más susceptibles a la acción del gametocida que la variedad de mayor grado de heterocigosidad.

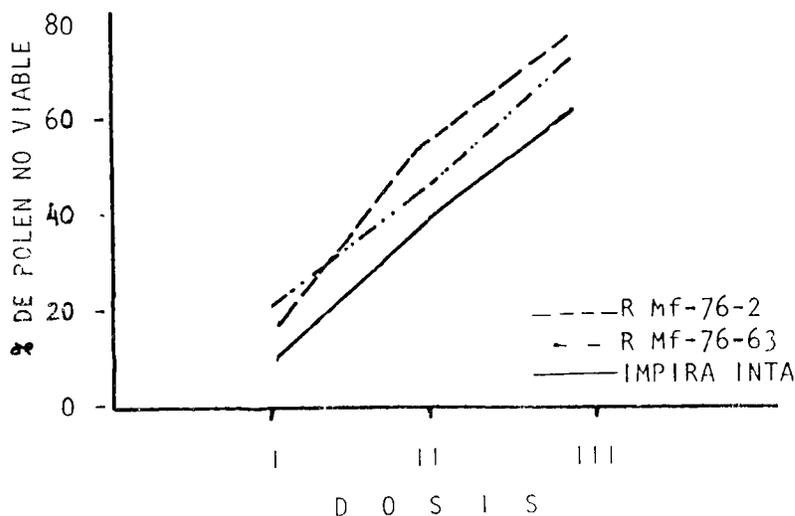


GRÁFICO N° 1

#### b) Producción de frutos vacíos.

La producción de frutos vacíos o "vanos" fue notablemente incrementada en los tratamientos de 100 y 125 ppm, cuyos capítulos fueron polinizados manualmente. Como en el caso anterior, las pruebas efectuadas indican diferencias altamente significativas ( $P$  menor que 0,01) entre todos los niveles del factor dosis y la ausencia de interacción. Se realizó el cálculo del coeficiente de correlación lineal entre porcentajes de polen no viables y porcentajes de frutos vacíos, siendo su valor de  $r = 0,9667$ .

Los resultados presentados permiten sustentar que la acción del gametocida tiene un efecto nocivo sobre la morfogénesis del fruto, lo cual concuerda con las conclusiones publicadas por W. Schuster (1969), quien aplicando AG en otras concentraciones, logro un promedio de formación de "semillas" de 39 % frente a 90 % de las plantas no tratadas.

c) *Producción de "semillas" que dan plántulas viables.*

El porcentaje de "semillas" con capacidad de originar plántulas de vigor normal, no mostró diferencias significativas entre las dosis (P mayor que 0,05), como así tampoco, una respuesta diferencial que indique una interacción dosis-material genético.

d) *Porcentaje de "semilla" híbrida.*

La mayoría de los autores citados, entre ellos W. Schuster, M. Spirova y A. Anascenko, en sus respectivas publicaciones hacen referencia al mayor o menor porcentaje de producción de frutos como una medida de éxito en el uso de gametocidas. Sin embargo, resultó de mayor aplicación cuantificar el porcentaje de descendientes obtenidos por polinización cruzada, si se tiene en cuenta que la producción de polen estéril se induce parcialmente, como se indica en el Cuadro N° 3, en donde el 89,32 % de inviabilidad de polen corresponde al máximo logrado.

CUADRO N° 3: TABLA GENERAL DE MEDIAS

	DIFERENCIAS ENTRE MEDIAS		
	Dosis I-III	Dosis I-I	Dosis II-III
Viabilidad Polen	57.45**	28.69**	28.77**
Frutos Vacíos	44.86**	14.68**	30.18**
Semilla Híbrida	36.75**	2.13ns	34.63**

Datos en porcentajes no transformados por la función "arco seno".

Al efectuar cruzamiento manuales, utilizando polen portador del gen marcador (color antocianico), se establecieron diferencias altamente significativas (P menor que 0,01) de la dosis superior respecto a las inferiores, no existiendo diferencias significativas entre estas últimas. Al igual que en los casos anteriores, no se manifestó una interacción significativa entre los factores en estudio. Es decir que bajo las circunstancias en las cuales el presente trabajo fue conducido, los mejores resultados se obtienen con la dosis de 125 ppm con un porcentaje de "semilla" híbrida producida de 75,92 % (Cuadro N° 3), sin que se detecten diferencias estadísticamente significativas respecto del porcentaje de "semilla" viable.

e) *Modificaciones de las plantas tratadas.*

Hacia el final del período de cruzamiento, se observó una elongación anormal de las plantas, en forma bastante desuniforme para todas las dosis usadas. Si bien los capítulos tratados desarrollaron más rápidamente que los del control, su tamaño en general fue menor y su madurez más tardía y despareja, a medida que se aumentaban las dosis aplicadas.

Asimismo, hubo alargamiento de las piezas florales no reproductivas, tales como brácteas y lígulas. La población Impira INTA presentó hipertrofia a nivel del receptáculo, con agrandamientos muy marcados en algunas zonas.

Los efectos sobre la morfología del fruto, consistieron principalmente en una reducción de su tamaño, lo que fue muy marcado en aquellas cosechados sobre líneas endocriadas, mostrando relación directa con la dosis aplicada. Finalmente, se observó que algunos frutos no desarrollaron completamente, dando lugar a los frutos vanos.

#### IV. CONCLUSIONES

En las condiciones experimentales en que el presente trabajo se condujo, los resultados obtenidos permiten concluir lo siguiente.

- 1) La máxima producción de "semiila" híbrida F1 se obtiene aplicando la dosis de 125 ppm de AG, sin que se detecten diferencias significativas a nivel estadístico para la producción de frutos con capacidad de originar plántulas de vigor normal.
- 2) El efecto de las distintas concentraciones aplicadas es aditivo respecto al grado de heterocigosidad del material. Así las líneas endocriadas tratadas, son más susceptibles a la acción del AG que la población de constitución genética variable.
- 3) La androesterilidad no se induce totalmente, y por lo tanto una correcta evaluación experimental del uso de esta técnica consiste en cuantificar, más que la producción de frutos, el porcentaje de ellos obtenidos por polinización cruzada.
- 4) El gametocida tiene un efecto nocivo sobre la morfogénesis del fruto, así como en el normal desarrollo de otras partes de la planta, evidenciando su incidencia en la disminución de los rendimientos a medida que se aumentan las concentraciones de las dosis aplicadas.

- 5) Se confirman los resultados de otros autores, respecto a la factibilidad del uso del AG como agente inductor de androesterilidad en girasol, bajo condiciones experimentales sin que por ello se deba descartar su utilización a nivel masivo.

#### V. AGRADECIMIENTOS

Los autores desean manifestar su reconocimiento al Dr. G. S. Ryan y al Ing. Agr. C. M. Areco, ambos técnicos de la EEA Manfredi (INTA) por provocer gentilmente las semillas de las líneas y variedad de girasol utilizadas en este estudio, así como la información referida a su genealogía, Asimismo agradecen a la Srta. Bibiana Rosa por la traducción de las publicaciones escritas en alemán.

#### VI. RESUMEN

Se determinaron los efectos de la inducción de androesterilidad en girasol (*Helianthus annuus* L.), por la aplicación de  $GA_3$  sobre los siguientes aspectos: Cantidad y viabilidad del polen producido, producción de frutos vanos, porcentaje de semillas normales que dan plántulas viables, porcentaje de semillas híbridas por polinización manual, y modificaciones de las plantas tratadas.

A la población Impira INTA y las líneas endocriadas "B Mf 76-2" y "R Mf 76-63", se le aplicaron 75, 100, y 125 ppm de solución acuosa  $GA_3$  en una sola oportunidad. El material se condujo en un diseño en bloques completos al azar, con arreglo factorial.

Los mejores resultados se obtuvieron con dosis de 125 ppm, mediante la cual se logró una media de 75,92 % de "semilla" híbrida. Se observó una mayor sensibilidad de las líneas endocriadas a la fitohormona usada.

#### SUMMARY

EFFECTS OF MALE STERILITY INDUCTION BY MEANS OF APPLYING  $GA_3$  OVER THE F1 SEEDS PRODUCTION, IN SUNFLOWER (*Helianthus annuus* L.)

Effects of male sterility induction in sunflower (*Helianthus annuus* L.) by means of applying  $GA_3$  were determined over the following aspects: amount and viability of produced pollen, production of empty fruits, percentage of normal seeds which develop viable seedlings, percentage of hybrid seeds produced by manual pollination, and morphological modifications in treated plants.

Impira INTA population and inbreed lines "B Mf 76-2" and "R Mf 76-63" were treated once with  $GA_3$  solution at concentration of 75, 100, and 125 ppm. The material was conducted in a  $3 \times 3$  factorial experiment with randomized complete block design.

The best results were found at 125 ppm with a mean of 75,92 % of hybrid seeds. A higher sensitivity of the inbreed lines to the hormone was observed.

#### VII. BIBLIOGRAFIA

- ANASCENKO, A. V. 1972 Methods for developing hybrid sunflower involving chemical castration. Proc. 5th sunflower Conf. C. Clemon. France.: 229-230.
- GARCIA TORRES, L.; J. DOMINGUEZ GIMENEZ y J. FERNANDEZ MARTINEZ. 1979. Androesterilidad y esterilidad femenina inducida en girasol con ácido giberélico. Anales de Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias, Producción Vegetal (Oleaginosas). Córdoba, España 9: 147-169.

- KONSTANTINOVA, L. N. 1980. Cytological disturbances in anther development following gametocide-induced male sterility in sunflower (*Helianthus annuus* L.). Plant Growth Regulator Abstracts (1982) 8 (12): Abst. 1986.
- LUCIANO, A y M. DAUREX. 1967. Producción de girasol en la Argentina. Publicación Técnica 37. INTA, EERA Pergamino, Argentina.
- PIQUEMAL, G. 1975. How to produce hybrid sunflower seeds by inducing male sterility with gibberelic acid?. Proc 4th Int. Sunflower Conf. Memphis, Tennessee. USA.: 127-135.
- PUTT, E. D. 1962. The value of hybrids and synthetics in sunflower seed production. Can. J. Plant. Sc. 42: 488-500.
- SCHUSTER, W. 1969. Beobachtungen über männliche Sterilität bei der Sonnenblume (*H. annuus*), ausgelöst durch genetische, physiologische und induzierte chemische Faktoren. Theoretical and Applied Genetics 39(6): 261-273.
- SEETHARAM, A. and P. KUSUM KUMARI, 1975. Induction of male sterility in sunflower. The Indian J. Genet. and Pl. Breed 35(1): 136-138.
- SEETHARAM, A. and P. KUSUMA KUMARI, 1976. Histological studies on cytoplasmic and GA-induced male sterility lines of sunflower. The Indian J. Genet. and Pl Breed. 36(3): 342-344.
- SEMIENCHUK, J. 1981. Aspectos de mejoramiento en girasol: Híbridos comerciales. Actas de las jornadas de genética aplicada del Nordeste Argentino, Corrientes, Pp. 121-133.
- SPIROVA, M. 1965. Experiments on artificial induction of male sterility in sunflower. Naucini Trodove Viss Selkstop 1: 145-157, in Pl. Breed. Absr. 36(3): 4738.