

# Capítulo 11

## Cultivo de anteras y mejoramiento de plantas

W. M. Roca\*

V. M. Núñez\*\*

K. Morman\*\*\*

---

\* Unidad de Investigación en Biotecnología (UIB), Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia.

\*\* Department of Agronomy and Plant Genetics, St. Paul, Minnesota, E. U.

\*\*\* ADO/USAID, Tehad, Africa Central.

## Introducción

Se ha previsto que las aplicaciones de la biotecnología al mejoramiento de las plantas darán lugar a productos revolucionarios. Los beneficios más inmediatos serán aplicaciones que perfeccionen las técnicas ya existentes y que proporcionen apoyo a los programas de mejoramiento que están actualmente en marcha.

Las metodologías disponibles para obtener cantidades considerables de haploides duplicados permitirán que el fitomejorador fije sistemas genéticos de gametos individuales, que sean reducidos y fáciles de evaluar en cualquier etapa del proceso de mejoramiento; se obtendrán así líneas homocigóticas sin pasar por el proceso de endogamia normal.

Los métodos más ampliamente usados para la creación de haploides y de haploides duplicados se valen de la hibridación interespecífica o intergenérica, y del cultivo de esporas (masculinas o femeninas). La Figura 11.1 muestra diversas vías para lograr la haploidía y su relación con la alternancia de generaciones gametofíticas y esporofíticas en las plantas superiores. Los granos de polen de la papa silvestre (*Solanum phureja*), p. ej., contienen sólo un núcleo generativo causado por una gametogénesis anormal; después de la hibridación interespecífica, con *S. tuberosum* como hembra, la fertilización doble no logra producirse, pero la célula del huevo de *S. tuberosum* es inducida a formar embriones partenogénicamente (Figura 11.1), y por ello éstos serán haploides (Rowe, 1974). Esta vía puede seguirse también en otras especies poliploides.

Otro caso de inducción de haploides mediante hibridación interespecífica ocurre en la cebada (Kasha y Kao, 1970); después de polinizar a *Hordeum vulgare* con *H. bulbosum* silvestre, ocurre un desarrollo anormal de embriones que conduce a la eliminación de los cromosomas de *H. bulbosum* (Figura 11.1); es necesario cultivar in vitro los embriones para producir plantas haploides. Esta vía también se presenta en otras especies de *Hordeum* y en *Triticum* spp. (Baenzinger et al., 1984).

Las células gametofíticas (microsporas o megasporas) se pueden inducir, en el cultivo, a abandonar su curso ontogenético normal para seguir una vía esporofítica que conduzca a la formación de esporofitos haploides. El proceso se llama androgénesis cuando las microsporas originan embriones y plantas (Figura 11.1), y ginogénesis cuando tiene lugar en el cultivo de óvulos y de ovarios (Bossoutrot y Hosemans, 1985). La androgénesis, obtenida mediante el cultivo de anteras, es la técnica más ampliamente usada para la inducción de haploides y ha demostrado tener gran importancia para el fitomejoramiento.

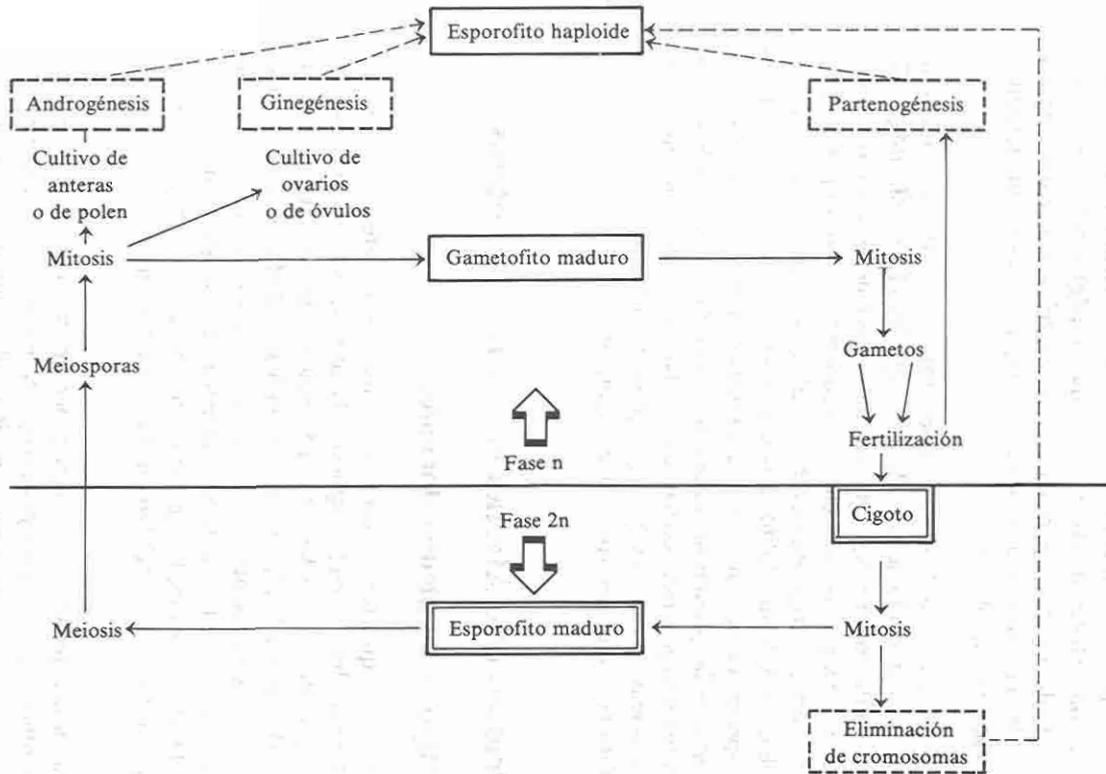


Figura 11.1. Diversas rutas hacia la obtención de la haploidía en plantas superiores, y su relación con la alternación de generaciones gametofíticas y esporofíticas. (Los principales métodos para la obtención de heterofitos haploides emplean técnicas in vitro, como la androgénesis y la ginegénesis; otros procesos recurren a la partenogénesis y a la eliminación de cromosomas después de la hibridación interespecífica o intergenérica.)

## Cultivo de Anteras

Mediante esta técnica, las anteras inmaduras que contienen polen en una etapa específica de desarrollo se colocan en medios donde el polen inmaduro se divide para formar embriones o callo. Trasferidos éstos a medios de regeneración, se forman plantas. En la mayoría de los casos se producen plantas haploides estériles, pero en algunas especies ocurre una duplicación espontánea de los cromosomas en las etapas de desarrollo del callo y de regeneración de la planta.

Desde que Guha y Maheshwari lo descubrieron en 1964, el cultivo de anteras se ha extendido a más de 150 especies (Dunwell, 1986). Sin embargo, los intentos de integrar esta técnica con el mejoramiento práctico se limitan a unos poquísimos cultivos económicamente importantes, a saber, arroz, cebada, trigo, papa, tabaco, colza oleaginosa, y maíz (Wenzel et al., 1985; Hu y Yang, 1986). Las limitaciones técnicas que afectan a muchas especies, como la renuencia a la regeneración de plantas y los bajos rendimientos de las plantas haploides, han ocasionado el lento desarrollo del mejoramiento genético mediante el cultivo de anteras. En consecuencia, las condiciones que llevan a la haploidía en las plantas cultivadas importantes necesitan desarrollarse o mejorarse.

## Condiciones que Afectan el Cultivo de Anteras

### Genotipo de las plantas donantes

El genotipo es quizás el factor más importante que afecta el cultivo de anteras. La variabilidad en la respuesta al cultivo de anteras se ha hallado entre especies y dentro de ellas, y se ha demostrado la heredabilidad de esta respuesta (Wenzel y Uhrig, 1981). Dicha 'capacidad para el cultivo de anteras' es particularmente evidente en cultivares de arroz de los tipos Japonica e Indica, de los cuales el primero es más sensible que el último (Cuadro 11.1); asimismo, los genotipos invernales de *B. napus* dan una respuesta más fuerte a ese cultivo que los tipos de primavera (Keller et al., 1987).

Además de la capacidad genotípica general para el cultivo de anteras, se han determinado, en la cebada y en el trigo, rasgos heredados independientemente respecto a componentes específicos de la androgénesis, como la inducción de callo y la regeneración de plantitas (Wenzel et al., 1985; Lazar et al., 1984). Se demostró que ambos rasgos eran altamente heredables, lo que sugería la posibilidad de obtener una ganancia rápida en la selección.

Cuadro 11.1. Frecuencia de inducción del callo y de regeneración de plantas verdes en los cultivos de anteras de varias especies cultivadas.

Genotipo donante	Anteras en placa (no.)	Inducción de callo (%)	Regeneración de plantas verdes (%)
<b>Colza<sup>a</sup></b>			
de primavera (prim.)	—	—	101
de invierno (inv.)	—	—	217
prim. x prim. (F <sub>1</sub> )	—	—	40
inv. x inv. (F <sub>1</sub> )	—	—	125
prim. x inv. (F <sub>1</sub> )	—	—	346
cv. Towe	240	—	160
cv. KWS 24/72	48,222	—	0.1
<b>Papa<sup>a</sup> (2n)</b>			
H78.01/27	3,765	—	68
H81.1001/4	2,107	—	2
<b>Trigo de marzo<sup>a</sup></b>			
Atys 2	7,970	—	0.2
Orofen	8,691	—	0.02
<b>Arroz<sup>b</sup></b>			
A (F <sub>2</sub> )	3,700	54	2.6
B (F <sub>2</sub> )	3,100	53	7.9
C (F <sub>2</sub> )	1,700	27	2.5

a. FUENTE: Wenzel et al., 1985 y Keller et al., 1987.

b. FUENTE: CIAT, 1986a. A, B, C = líneas F<sub>2</sub> de cruzamientos triples.

## Albinismo

Otro factor importante, especialmente en los cereales, es la ocurrencia de plantas albinas procedentes de polen. Estas plantas representan hasta el 100% de algunas variedades de arroz; a menudo, pero no siempre, las variedades de arroz intensamente albinas se caracterizan también por una alta regeneración de la planta total (verdes más albinas). Sin embargo, esta correlación no vale para los híbridos; en un conjunto de 22 genotipos híbridos de arroz de generación F<sub>1</sub>, la relación albina/verde en las plantas varió de sólo 0.7 hasta 11.0, y una relación promedio de 4.1 se obtuvo 'plaqueando' 1200 anteras por cada genotipo<sup>1</sup>. Aunque no se ha comprendido plenamente el fenómeno, hay pruebas de que el albinismo está relacionado con la supresión del ADN de los plástidos (Day y Ellis, 1984) y con deficiencias del ARN ribosomal de los plástidos (Chen, 1986a). El Cuadro 11.1 indica que se puede esperar una respuesta altamente variable, en algunos cultivos, a la inducción del callo y a la regeneración de plantas verdes.

1. Núñez, V. M. Comunicación personal.

En el arroz, una fuerte inducción de callo no se correlaciona necesariamente con tasas altas de regeneración de plantas verdes; por consiguiente, la evaluación del germoplasma por su respuesta al cultivo de anteras debe considerar la inducción del callo y la regeneración de plantas verdes partiendo del número total de anteras plaqueadas.

Con frecuencia, la regeneración de plantas en los híbridos  $F_1$  es mayor que el promedio de los valores del progenitor respecto a ese factor en las variedades progenitoras, y además muestra heterosis. En consecuencia, usar plantas híbridas como donantes de anteras se considera un método práctico para aumentar el número de plantas productoras de polen. Estas relaciones se han demostrado en el arroz (Cuadro 11.2) y el trigo (Quyang, 1986).

Cuadro 11.2. Respuesta dada al cultivo de anteras por algunas variedades de arroz y por sus híbridos  $F_1$  obtenidos de cruzamientos simples y triples.

Progenitores e híbridos	Anteras plaqueadas (no.)	Inducción de callo (%)	Regeneración de plantas verdes (%)
IR 5 (♀)	318	6	0.0
Tox 1010-45-1.1 (♂)	478	24	50.0
$F_1$ (1/2)	1200	33	56.0
IR 43 (♀)	287	19	7.6
IAC 25 (♂)	257	35	0.0
$F_1$ (3/4)	1095	35	19.2
IAC 164 (♀)	257	6	0.0
Monolaya (♂)	362	16	3.5
$F_1$ (5/13/6)	1354	52	11.5

FUENTE: Núñez et al., 1987.

## Fisiología de las plantas donantes

El fotoperíodo, la intensidad de la luz, la temperatura y la nutrición mineral de las plantas donantes influye en el rendimiento de los embriones procedentes de microesporas y de las plantitas. La ocurrencia de dos granos de polen morfológica y funcionalmente diferenciados en las anteras maduras —un fenómeno hallado originalmente en el tabaco y confirmado luego en el trigo, la cebada y el arroz— se ha relacionado con la formación in vitro de plantas haploides a partir de polen inmaduro (Haberle-Bors, 1985). Atendiendo a este dimorfismo del polen, sólo el polen que carece de la mayoría de sus elementos estructurales, que da tinción suave, y que es

pequeño, será idóneo para iniciar una ruta de desarrollo embriogénico. Se cree que la frecuencia de dichos granos de polen (granos P) está predeterminada, antes del cultivo *in vitro*, es decir, al comienzo de la floración, por el estado de desarrollo de las plantas donantes. Después de la inducción, el desarrollo y la maduración de los granos P pueden ser afectados por el genotipo y las condiciones del cultivo (Haberle-Bors, 1985). Por consiguiente, el control de las condiciones de crecimiento de las plantas donantes —como el estrés de N, otros estreses nutricionales y ambientales, o los tratamientos que conducen a la feminidad y a la esterilidad (p. ej., los gametocidas)— pueden modificar la respuesta de genotipos recalcitrantes. Este nuevo enfoque depende de la identificación del dimorfismo del polen en las especies de interés.

## **Desarrollo del polen**

Las pequeñas diferencias en el desarrollo del polen darían lugar a cambios notables en la producción de plantas derivadas de polen (Dunwell, 1986). La mejor respuesta se obtuvo cuando las anteras se cultivaron en una etapa del desarrollo del polen comprendida entre la microespora tardía y el polen temprano (Figura 11.2); como indica la figura, el punto de divergencia hacia una vía androgénica está marcado por la ocurrencia de una división mitótica ecuacional de las microesporas.

Para controlar la androgénesis, es crucial la caracterización citológica y bioquímica de las etapas muy tempranas de la evolución de los granos de polen, a saber: la microesporogénesis, la ocurrencia de la división igual de las microesporas, la formación proembrionica, y el desarrollo de los embriones.

## **Pretratamiento de las anteras**

El tratamiento de las anteras con temperatura baja o alta, con choque osmótico, o con otros estímulos tiende a aumentar la producción de plantitas de polen. El tratamiento de las anteras, o de las panículas, de arroz con 35 °C durante 10 a 15 minutos, seguido por un período de 8 días a 10 °C, aumenta la respuesta al cultivo de anteras; un efecto similar, no obstante, se obtiene con un tratamiento de 10 °C durante 8 días solamente. El tratamiento de frío se ha relacionado con una disminución en el albinismo de los cereales, así como con la estimulación de la división mitótica ecuacional (Figura 11.2) de las microesporas androgénicas (Ouyang, 1986).

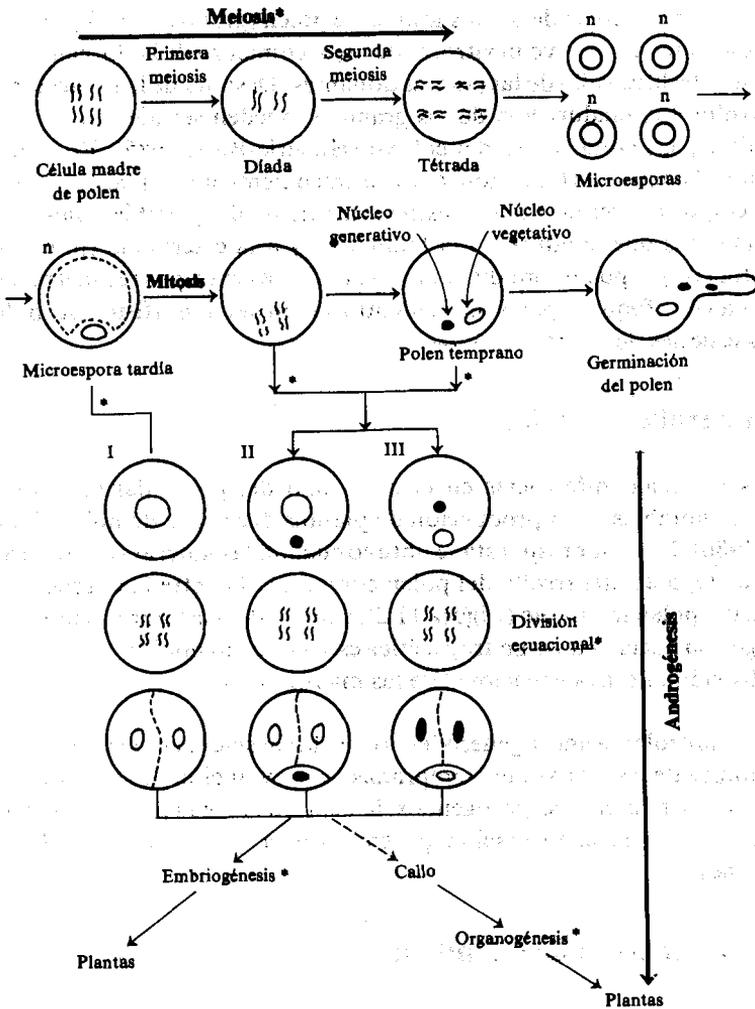


Figura 11.2. Principales eventos citológicos ocurridos en la microesporogénesis y en la androgénesis. Los mecanismos de control del proceso se encuentran en diferentes sitios marcados con (\*): a) en la meiosis, para lograr la determinación de los granos de polen embriogénicos; b) entre las etapas de la última microspora y el polen temprano, para obtener la etapa apropiada de polen que responda al cultivo in vitro; c) cuando ocurren divisiones mitóticas en las microsporas, para lograr la iniciación de proembriones; y d) durante la regeneración de la planta a través de la organogénesis o la embriogénesis. I, II y III son las posibles vías que, según la especie de que se trate, pueden tomar la microspora tardía o el polen temprano para llegar a la vía embriogénica o a la organogénica.

## Medio de cultivo

La técnica del cultivo de anteras en medio líquido desarrollada por investigadores chinos (Chen et al., 1979) elevó enormemente el rendimiento de las plantas androgénicas. Hay una correlación entre el medio de inducción de callo y la tasa de regeneración de plantas en el arroz (Cuadro 11.3); un porcentaje mayor de regeneración—con respecto al número de anteras plaqueadas—se puede obtener de los callos si éstos se inducen en un medio líquido y no en un medio semisólido. La adición de extracto de papa al medio de inducción aumentó la producción de plantas de polen cuando ese medio era líquido; además, el tipo del agente gelatinizador del medio de regeneración influyó en el rendimiento de las plantitas verdes. En el Capítulo 4 se discuten los agentes gelatinizadores.

Cuadro 11.3. Respuesta del cultivo de anteras del híbrido de arroz F<sub>1</sub> (IR5/Bbt 50// Colombia 1/Tox 1011) a dos medios de cultivo: líquido y agar.

Medio de regeneración <sup>a</sup>	Medio de inducción de callo	Anteras plaqueadas (no.)	Inducción de callo (%)	Regeneración de plantas verdes (%)
Medio 1	Líquido	880	19	11.4
	Agar (0.7%)	824	15	4.1
Medio 2	Líquido	712	35	16.0
	Agar (0.7%)	584	28	4.6

- a. Medio 1: MS + 1.1 mg/l de tiamina + 1 mg/l de ANA + 2 mg/l de cinetina + sacarosa al 3%.  
Medio 2: 1000 mg/l de KNO<sub>3</sub> + 100 mg/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 200 mg/l de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 35 mg/l de KCl + 1.1 mg/l de tiamina + 10<sup>-4</sup> M Fe-EDTA (MS) + 1 mg/l de ANA + 3 mg/l de cinetina + sacarosa al 3% + extracto de papa al 20%.

FUENTE: Martínez et al., 1985.

Otros componentes de los medios de cultivo, p. ej. la sacarosa y los reguladores del crecimiento, también desempeñan un papel en la androgénesis. Las condiciones osmóticas que requieren las microesporas para experimentar una división sostenida deben tenerse en cuenta. En general, se requieren niveles más altos de sacarosa para la inducción del callo y más bajos para la regeneración de las plantas. La inducción del embrión y del callo requieren generalmente, en el cultivo de anteras, una mayor concentración de auxina que la regeneración de plantas.

## **El Cultivo de Anteras Aplicado al Fitomejoramiento**

El potencial que posee el cultivo de anteras surge de la constitución genética de las células del polen. Las células del polen de los híbridos  $F_1$  contienen la dotación genética de las plantas paternas y las recombinaciones esperadas según las proporciones mendelianas. Estas células son haploides y permiten por ello al mejorador seleccionar eficazmente los recombinantes deseables; además, una vez duplicadas esas células, se establecen rápidamente líneas homocigóticas. Alcanzar rápidamente la homocigosidad constituye una de las aplicaciones más importantes del cultivo de anteras en el desarrollo de variedades nuevas porque, gracias a él, el tiempo, el espacio y los costos necesarios para desarrollar las líneas 'verdaderamente mejoradas' disminuirían considerablemente. Las líneas homocigóticas ( $R_2$ ) manifestarán la variabilidad inherente a la generación  $F_2$ , añadiendo una ventaja: cada individuo habrá fijado su genotipo y no sufrirá segregación adicional.

Dado que en los haploides duplicados no hay dominancia —es decir, el fenotipo equivale al genotipo— la eficiencia de la selección aumenta cuando el mejoramiento se vale del cultivo de anteras. Si se consideran, p. ej., tres genes dominantes,  $1/8$  de la población de haploides duplicados se seleccionaría fenotípicamente y cada individuo daría origen a plantas 'verdaderamente mejoradas'; no se necesitaría entonces una evaluación adicional respecto a este carácter. Sin embargo, será necesario cultivar familias  $F_3$  partiendo de la población  $F_2$  para separar las plantas verdaderamente mejoradas ( $1/64$ ) de los individuos segregantes (Baenzinger et al., 1984).

En cultivos de polinización cruzada, altamente heterocigóticos, la haploidía es el camino para producir rápidamente líneas homocigóticas verdaderas que podrán utilizarse para la producción de cultivares híbridos  $F_1$ . Este uso de la haploidía puede dar excelentes resultados en plantas sexualmente propagadas, como el maíz, y asexualmente propagadas, como la yuca.

## **Variedades Obtenidas mediante el Cultivo de Anteras**

Como se indicó antes, la producción rápida de plantas homocigóticas diploides es la aplicación más importante del cultivo de anteras al fitomejoramiento. Este cultivo será, por tanto, más útil en aquellas especies que tengan ciclos de crecimiento largos o para aquellas condiciones en que los

cultivos de ciclo corto se desarrollen a la tasa de sólo un cultivo por año. Por ejemplo, mediante el cultivo de anteras se puede lograr la homocigocidad en arroz en 7 u 8 meses, mientras que se requieren de 4 a 6 años para obtenerla con técnicas tradicionales; y en el trigo invernal, el uso del cultivo de anteras ahorra de 3 a 4 años en el proceso de su mejoramiento (Figura 11.3).

El cultivo de anteras de tabaco es el sistema más avanzado para desarrollar haploides duplicados; se ha hecho, no obstante, considerable progreso con algunos cereales, como el trigo, la cebada y el arroz. En estos cuatro

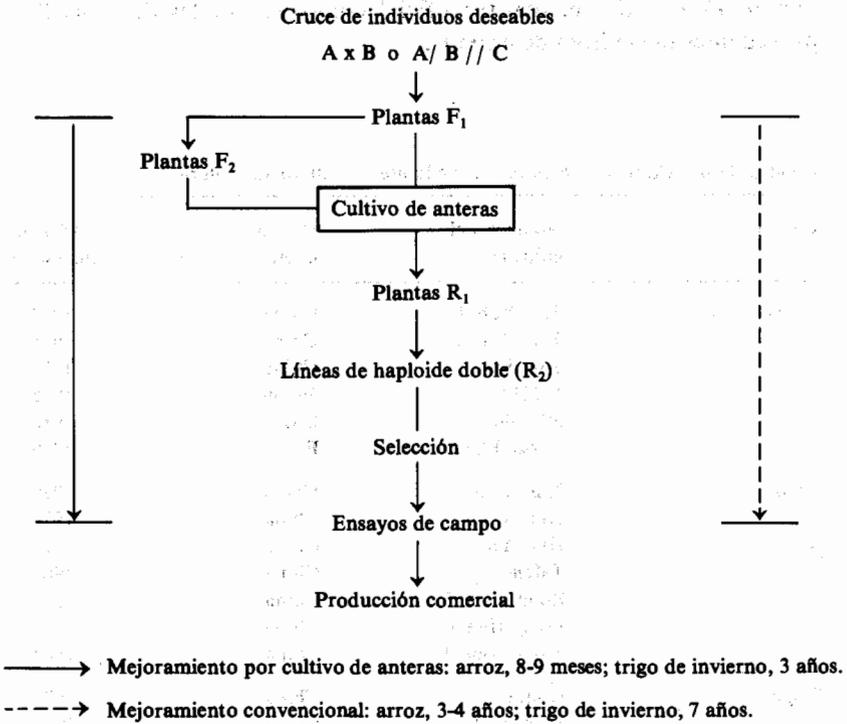


Figura 11.3. La integración del cultivo de anteras en un esquema de fitomejoramiento permite alcanzar la homocigocidad en un tiempo significativamente menor que mediante la endogamia convencional. El tiempo ahorrado empleando ese cultivo comprende desde la excisión de las anteras de las plantas F<sub>1</sub> hasta la producción de líneas homocigóticas (R<sub>2</sub>) para los ensayos.

FUENTE: CIAT, 1987; Petelino, 1987.

cultivos se han producido 14 cultivares mejorados por medio del cultivo de anteras, y otros cuatro en cuya genealogía interviene un haploide duplicado (Baenzinger et al., 1984; Hu y Yang, 1986; Bollon y Raquin, 1987). Es interesante que la gran mayoría de esos cultivares se haya producido en China (Cuadro 11.4).

Para producir la variedad de trigo Florin en Francia<sup>2</sup>, p. ej., se emplearon cerca de 50,000 anteras que fueron plaqueadas de un cruzamiento F<sub>1</sub> hecho en 1978; de ellas, el 0.13% se regeneró como plantas verdes (9 autodiploides y 55 haploides). De 41 haploides duplicados inducidos por la colchicina se seleccionaron 18 líneas R<sub>3</sub> en 1980, y después de cuatro años de pruebas de campo y de pruebas oficiales, se registraron, en 1985, dos líneas como variedades. Así pues, sólo pasaron siete años entre el cruzamiento F<sub>1</sub> inicial y el registro oficial como variedades de estas líneas procedentes del cultivo de anteras.

Cuadro 11.4. Cultivares mejorados mediante el cultivo de anteras.

Cultivo	Nombre del cultivar	País que libera	Año de liberación
Tabaco	Tan Yuh 1	China	1974
	Tan Yuh 2	China	1975
	Tan Yuh 3	China	1977
	F-211*	Japón	1975
	NC-744*	E.U.	1980
	L MAFC*	E.U.	1980
Arroz	Xin Xion	China	1975
	Hua Yu 1	China	1976
	Hua Yu 2	China	1976
	Tafene 1	China	1980
	Zong Hua 2	China	1980
	Zong Hua 8	China	1983
	Zong Hua 9	China	1983
Trigo	Huapei 1	China	1978
	Jinghua 1	China	1980
	Florin	Francia	1985
Maíz	Hua Yu 1	China	1985
	Several*	E.U.	1970

\* Cultivares con un haploide duplicado en su genealogía.

2. De Buyser, J. Comunicación personal.

## **Investigación en Cultivo de Anteras en el CIAT**

### **Cultivo de anteras de arroz**

A excepción del trabajo hecho en China (Zhenhua et al., 1987) donde algunas variedades derivadas del cultivo de anteras fueron liberadas (Cuadro 11.4) y de las investigaciones colaborativas entre el IRRI y Corea para desarrollar líneas tolerantes al frío (Zapata et al., 1986), no se han hecho muchos esfuerzos para desarrollar técnicas de cultivo de anteras en una gran diversidad de germoplasma de arroz, ni para producir un gran número de líneas autodiploides con el fin de emplearlas en una estrategia convencional de mejoramiento.

El trabajo hecho inicialmente, entre 1980 y 1981, con el cultivo de anteras de arroz en el CIAT se centró en el desarrollo de metodologías (CIAT, 1980; Narváez, 1981). Luego, los esfuerzos colaborativos entre el Programa de Arroz y la Unidad de Investigación en Biotecnología del CIAT se dedicaron al desarrollo de una metodología para la producción en gran escala de plantas derivadas del cultivo de anteras (Núñez, 1984; Martínez et al., 1985; CIAT, 1986a; CIAT, 1986b). El cultivo de anteras de arroz se enfrenta a dos limitaciones principales: la respuesta al cultivo depende del genotipo, y el número de plantas regeneradas procedentes del polen es bajo; por ello se ha prestado atención a la selección de introducciones de germoplasma que respondan al cultivo de anteras (CIAT, 1987).

Como se indicó anteriormente, es típica la gran variabilidad de las accesiones de germoplasma de arroz; no obstante, los híbridos presentan, en general, heterosis en la respuesta al cultivo de anteras. Así, p. ej., mientras la inducción de callo de 24 variedades fluctuó entre 0% y 35%, y la regeneración entre 0% y 7.6% (Martínez et al., 1985), los híbridos  $F_1$  obtenidos con algunas de estas variedades tenían de 30% a 40% de inducción y una regeneración de plantas de 11.5% a 56% (Cuadro 11.2). Usando híbridos  $F_2$  de los genotipos de arroz con mejor respuesta al cultivo de anteras, se puede obtener hasta un 8% en la regeneración de plantas verdes (Cuadro 11.1).

El número de granos de polen capaces de responder al cultivo de anteras depende también de la condición de los medios de cultivo. Dejar flotar las anteras en un medio líquido, p. ej., resultó mejor que colocarlas en un medio semisólido; en aquél, mucho más granos individuales de polen iniciaron la mitosis para formar callos pequeños (Cuadro 11.3).

Se obtiene mejor inducción de callo en el medio de papa: no sólo se produjeron en él más callos, sino que el efecto se extendió hasta la regeneración de plantas, que fue alta en este medio de regeneración (Cuadro 11.3). Mejores frecuencias de regeneración se obtuvieron en el medio Murashige y Skoog (1962) complementado con ácido naftalenacético y cinetina (Martínez et al., 1985).

Con el propósito de aumentar la eficiencia del cultivo, se modificaron ligeramente las técnicas de esterilización superficial, el plaqueado de las anteras, el tamaño de la inducción, y las matrices de regeneración (CIAT, 1987).

A pesar de que se necesita un mayor esfuerzo para mejorar el cultivo de anteras de arroz, esta técnica ofrece algunas ventajas importantes:

- a. La técnica puede restringirse a los híbridos  $F_1$  o  $F_2$  cuya genealogía contiene genotipos que responden al cultivo de anteras. Esta condición puede comprobarse haciendo una preevaluación del germoplasma por su respuesta al cultivo de anteras. La clasificación de variedades según esa respuesta permitirá calcular el número de anteras necesarias para obtener un híbrido  $F_1$  dado.
- b. Alrededor de un 50% de las plantas de arroz regeneradas son haploides duplicados (autodiploides) lo que excluye el uso de la duplicación artificial de cromosomas.
- c. Los estudios de progenie sobre híbridos  $F_1$  regenerados de polen señalan que la mayoría de las plantas regeneradas son uniformes y estables; esto significa que la mayor parte de las plantas de arroz diploides, obtenidas por cultivo de anteras, son homocigotos que provienen de microesporas haploides mediante la duplicación espontánea de los cromosomas (Chen, 1986b).

No hay informes sobre la ocurrencia de gametos sin reducir en arroz, ni sobre la endoreduplicación mitótica de cromosomas de microespora; por ello se puede suponer que la autodiploidización del arroz ocurre durante la fase de regeneración de callos *in vitro*. La presencia de otros niveles de ploidía entre las plantas regeneradas, es decir, plantas haploides, triploides, tetraploides y aneuploides, apoyan esa presunción.

Consideradas estas ventajas, se elaboró en el CIAT un protocolo práctico para el mejoramiento de arroz mediante el cultivo de anteras (Figura 11.4). El proceso empieza con 100 plantas  $F_1$  obtenidas por cruzamiento que producirán 100 líneas  $R_2$  homocigóticas en 7 u 8 meses; en 5 meses más, las líneas  $R_3$  estarán listas para ser evaluadas en diversas áreas

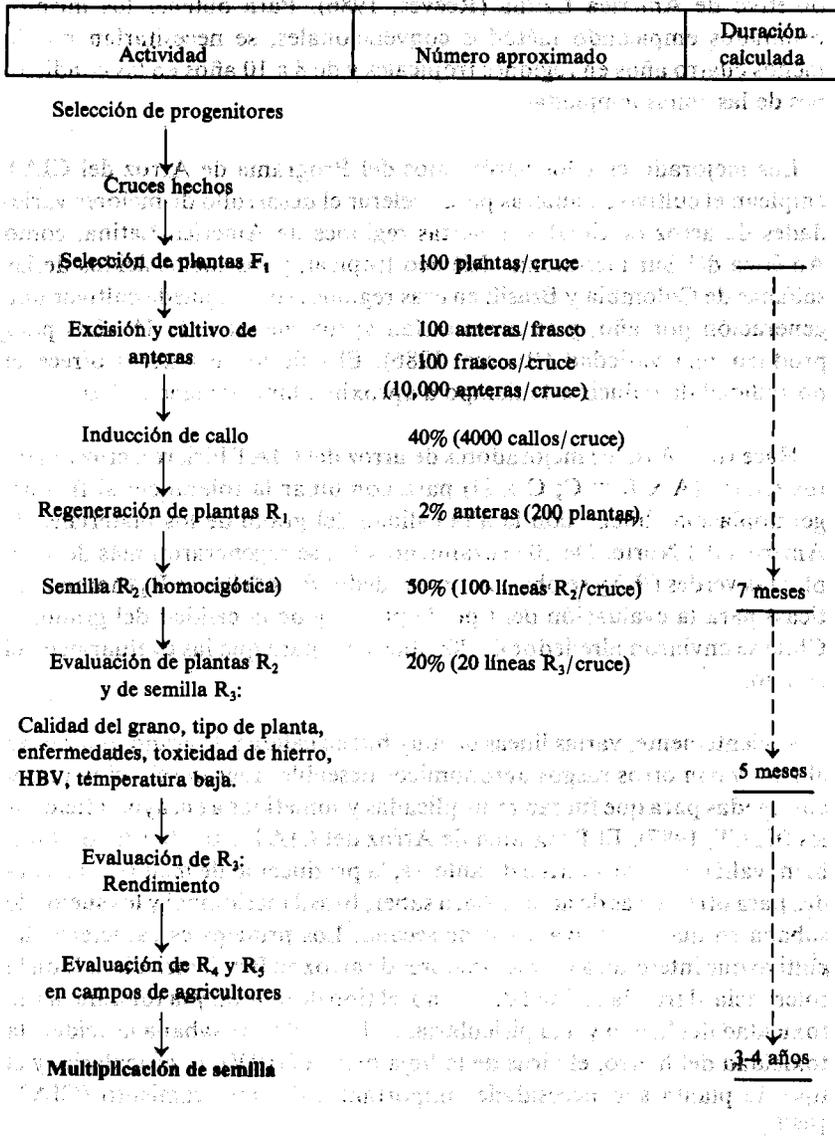


Figura 11.4. Procedimiento general del mejoramiento del arroz mediante el cultivo de anteras. En un año, las líneas homocigóticas (R<sub>3</sub>) están listas para ser ensayadas en las áreas de interés. Por la duplicación espontánea de los cromosomas, por lo menos un 50% de las plantas regeneradas se tornan homocigóticas; además, un 90% de las progenies de haploide doble son homogéneas y estables.

FUENTES: CIAT, 1984; Reeves, 1986; CIAT, 1987; CIAT, 1988.

objetivo de América Latina (Reeves, 1986). Para obtener los mismos resultados empleando métodos convencionales, se necesitarían por lo menos cuatro años en regiones tropicales y de 8 a 10 años en las condiciones de las zonas templadas.

Los mejoradores y los agrónomos del Programa de Arroz del CIAT emplean el cultivo de anteras para acelerar el desarrollo de mejores variedades de arroz destinadas a ciertas regiones de América Latina, como América del Sur meridional, México tropical, y los suelos ácidos de las sabanas de Colombia y Brasil; en esas regiones sólo se puede cultivar una generación por año, y se necesitarían aproximadamente 15 años para producir una variedad (Reeves, 1986). El cultivo de anteras ofrece la posibilidad de reducir este tiempo a aproximadamente cinco años.

Hace tres años, los mejoradores de arroz del CIAT hicieron cruzamientos triples ( $A \times B = C$ ;  $C \times D$ ) para combinar la tolerancia al frío del germoplasma chileno con la alta calidad del grano de los materiales de América del Norte. De 10 cruzamientos  $F_2$ , se regeneraron más de 1200 plantas verdes ( $R_1$ ) y se obtuvieron alrededor de 900 líneas  $R_2$  (homocigóticas) para la evaluación del tipo de planta y de la calidad del grano. A Chile se enviaron alrededor de 200 líneas  $R_3$  para que las evaluaran en el campo.

Recientemente, varias líneas de muy buena calidad de grano, tolerantes al frío, y con otros rasgos agronómicos deseables fueron seleccionadas y entregadas para que fueran multiplicadas y sometidas a ensayos adicionales (CIAT, 1987). El Programa de Arroz del CIAT está abordando también, valiéndose del cultivo de anteras, la producción de mejores variedades para otras áreas de actuación, a saber, Brasil meridional y los suelos de sabana en que se cultiva arroz de secano. Los principales caracteres del cultivo que interesan a los mejoradores de arroz en Brasil meridional son la tolerancia al frío, la calidad del grano, el tipo de planta, y la tolerancia a la toxicidad del hierro y a la piricularia; en los suelos de sabana la acidez, la toxicidad del hierro, el virus de la hoja blanca (HBV), la piricularia, y el tipo de planta son necesidades importantes del mejoramiento (CIAT, 1987).

### **Cultivo de anteras de yuca**

Se ha iniciado una investigación en que colaboran el Programa de Yuca y la Unidad de Investigación en Biotecnología del CIAT, con el fin de desarrollar métodos para la producción de haploides/dihaploides en yuca.

La yuca es una especie halopoliploide altamente heterocigótica ( $2n = 4x = 36$ ), y por ello sufre de una fuerte depresión endogámica causada por la autofecundación. Es casi imposible, por tanto, lograr en este cultivo la homocigosidad por autofecundación continua.

La producción de haploides o dihaploides de yuca mediante el cultivo de anteras o de microesporas permitiría alcanzar la homocigosidad rápidamente. Las líneas de yuca homocigóticas o hemicigóticas serían altamente deseables para obtener los siguientes resultados:

- a. La expresión de alelos recesivos nocivos que podrían quedar ocultos en un fondo genético siempre heterocigótico.
- b. La expresión de alelos disfuncionales recesivos que controlan la cianogénesis; se cree que la falta del glucósido cianogénico linamarina está controlada por alelos recesivos, cuya expresión no ocurre normalmente debido a la heterocigosidad de la yuca.
- c. El uso de células de yuca haploides o dihaploides para tratamientos mutagénicos, con mutágenos físicos o químicos, que cambiarían la expresión de rasgos simples tales como la cianogénesis, la calidad proteínica, el contenido de vitamina A, y otros.
- d. La identificación de marcadores moleculares genéticos para levantar mapas de genes.
- e. La expresión del vigor híbrido de la semilla híbrida  $F_1$  de la yuca mediante el cruzamiento de líneas homocigóticas derivadas del cultivo de anteras.

Tres enfoques de la haploidía de la yuca están en estudio: la androgénesis, la ginogénesis, y los cruzamientos interespecíficos e intergenéricos (Figura 11.1). Tanto el efecto genotípico como las condiciones del medio de cultivo o del pretratamiento serán objeto de estudio. La yuca es todavía un cultivo inexplorado en este aspecto, y requiere por eso una investigación exhaustiva sobre la biología de la flor y del polen, y sobre la reacción de las microesporas a diversos componentes del medio de cultivo y a otros tratamientos físicos o mecánicos de las plantas donantes y de las anteras.

## **Haploides Duplicados del Cultivo de Anteras**

### **Estabilidad genética**

La mayoría de los haploides duplicados producen progenies homogéneas y se pueden usar, por tanto, para fines de mejoramiento. Líneas

estables, homocigóticas y diploides se obtienen mediante la duplicación de los cromosomas de células haploides. Se han hecho, sin embargo, observaciones sobre la inestabilidad de plantas derivadas de polen; dicha variabilidad se ha llamado 'variación gametoclinal' (Evans y Sharp, 1986). Además de la variabilidad observada en el nivel de ploidía de las plantas regeneradas de arroz, de trigo (Hu, 1986), y de papa (Wenzel, 1979), se ha hallado segregación en 10% a 12% de las plantas derivadas de polen; este resultado se ha atribuido a fenómenos mutacionales o a anormalidades cromosómicas estructurales, especialmente cuando los haploides duplicados se han regenerado de híbridos  $F_1$  más que de híbridos  $F_2$  (De Buyser y Henry, 1986). Se acepta que alrededor de 90% de las plantas regeneradas de arroz son genéticamente homocigóticas debido a la duplicación espontánea de los cromosomas de las células haploides; las plantas homocigóticas demuestran estabilidad total a medida que aumentan las generaciones (Chen, 1986b).

La segregación ocurrida en las plantas de arroz  $R_2$  afectó la fertilidad, la morfología (altura de la planta, densidad de espigas, forma del grano), y la morfología y la fertilidad juntas. Dicha segregación estaba relacionada con los siguientes fenómenos: a) la variación en el número y la estructura cromosómicos (euploidía, aneuploidía, quimeras, híbridos estructurales y heteroploidía); b) el origen de las plantas, es decir, microesporas que no son haploides; estas plantas serían entonces heterocigóticas; c) las mutaciones genéticas, que pueden ocurrir antes o después de la duplicación espontánea de las células haploides (Chen, 1986a); en el segundo caso, las mutaciones serían heterocigóticas y, en consecuencia, segregarían en la  $R_2$ .

El nivel en que debe realizarse la androgénesis dependerá del sistema de mejoramiento y de los objetivos de éste. Por lo tanto, si la variabilidad introducida del material progenitor en la generación  $F_1$  es alta, el número de plantas de haploides duplicados que deben probarse será también alto. Si el cultivo de anteras se lleva a cabo en plantas donantes  $F_2$  ó  $F_3$ , el mejorador tendría que usar menos plantas  $R_2$  en esas pruebas, en razón de que al usar plantas  $F_1$  como donantes, sólo hay una oportunidad para la recombinación. El cultivo de anteras aplicado a líneas más avanzadas ( $F_3$  ó  $F_6$ ) o a variedades establecidas permitiría la expresión de la heterocigosidad residual. La liberación de esta variabilidad debe distinguirse de la variación gametoclinal generada por el cultivo de tejidos.

## **Desempeño agronómico**

No se halló diferencia entre los haploides duplicados de cebada y las líneas homocigóticas desarrolladas por los métodos del pedigrí y de la

descendencia de una sola semilla (SSD, en inglés) respecto al rendimiento, a la altura de la planta, y a la fecha de la floración inicial. Los menores rendimientos de las líneas dihaploides de tabaco, que Arcia et al. (1978) consideraron como efecto de una pérdida de heterocigosidad residual, se han atribuido a mutaciones ocasionales que ocurren durante el cultivo de anteras (Baenzinger, 1984). En el trigo, el rendimiento de 12 líneas de haploides duplicados superó el rendimiento promedio de los testigos, y el de cuatro de ellas fue mejor que el del mejor testigo (De Buyser y Henry, 1986).

Los mejoradores de arroz del CIAT han evaluado el rendimiento de líneas  $R_2$  y de líneas segregantes tradicionales (CIAT, 1988). Ninguna diferencia significativa se halló entre el rendimiento de las líneas  $R_2$  y el de las líneas  $F_3$  y  $F_4$  de las cuales se obtuvieron esas líneas  $R_2$ . De modo similar, el rendimiento de 111 líneas obtenidas por el cultivo de anteras ( $R_2$ ) no fue significativamente diferente del de las nueve variedades usadas como donantes de las anteras.

Estos resultados indican que el cultivo de anteras no reduce el rendimiento; en consecuencia, es posible obtener líneas de haploides duplicados de alto rendimiento. El valor de los haploides dobles en mejoramiento dependerá, en grado considerable, de la potencialidad genética del cruzamiento inicial y, en menor grado, de la técnica del cultivo de anteras; por consiguiente, la elección de las plantas progenitoras para hacer los cruza- mientos es crítica para el comportamiento de los haploides duplicados.

## **El Futuro del Cultivo de Anteras**

El cultivo de anteras seguirá considerándose el método potencialmente más eficaz y accesible para crear plantas haploides. Si se quiere desarrollar aún más el cultivo de anteras como una técnica usual de mejoramiento, es necesario abordar dos serias limitaciones que tiene cuando se aplica a cultivos como el trigo, el arroz y la papa: su fuerte dependencia genotípica, y el escaso número de plantas regeneradas. Se espera que las técnicas moleculares modernas proporcionen valiosa información sobre la genética de los caracteres relacionados con la respuesta al cultivo de anteras, y faciliten así el desarrollo de nuevas estrategias. Urge, además, lograr que el cultivo de anteras sea accesible a otras especies cultivadas importantes como la yuca y el maíz. También se debe prestar atención a estudios comparativos del comportamiento tanto de líneas derivadas del cultivo de anteras como de líneas convencionales.

Aunque el logro de homocigosidad rápida seguirá siendo la ventaja principal del cultivo de anteras, la homogeneidad y la estabilidad de los haploides duplicados permitirán a los mejoradores hacer selecciones más efectivas, especialmente respecto a caracteres que experimentan intensamente el influjo del ambiente o la dominancia genética.

Otras ventajas del cultivo de anteras en el mejoramiento de cultivos son éstas:

- a. La obtención de haploides duplicados a partir de híbridos  $F_1$  puede ser útil para desarrollar variedades en forma fija en una estación central, con el fin de distribuirlas en ambientes ecológicos muy diversos y de ensayarlas en ellos.
- b. El cultivo de anteras puede ser una fuente útil de variación gametoclonal para el mejoramiento intravarietal.
- c. La producción de líneas homocigóticas en especies altamente heterocigóticas, con el propósito de producir líneas puras de diferente genotipo y de facilitar así el uso de la heterosis de la semilla híbrida  $F_1$  en cultivos como la yuca y la papa. En maíz, los haploides duplicados de plantas  $F_1$  o  $F_2$  permitirían fijar la capacidad de combinación dentro de las familias y, por tanto, se podrían evaluar más cruzamientos.
- d. Permitir la expresión e identificación de alelos recesivos.
- e. Las microesporas o células haploides se pueden usar para la inducción de mutantes y para la selección de caracteres esporofíticos; los mutantes se estabilizarían mediante duplicación cromosomal y se seleccionarían según el fenotipo observado.
- f. La introgresión de genes de tipos de germoplasma distantes mediante el restablecimiento de la fertilidad de los haploides duplicados obtenidos de cruzamientos amplios de la  $F_1$ .
- g. Permitir la rápida introducción de caracteres citoplasmáticos (e.g., cytoplasmic male sterility, CMS) en un fondo genético homocigótico; obtener también la purificación de líneas de restauración de la esterilidad masculina.
- h. Emplear las microesporas y las células haploides como receptores para la transferencia de genes mediante la microinyección, el cocultivo, o la electroporación.
- i. Crear y acrecentar reservas citogenéticas y citoplasmáticas de los principales cultivos.

## Referencias

- Arcia, M. A.; Wernsman, E. A. y Burk, L. G. 1978. Performance of anther derived dihaploids and their conventionally inbred parents or lines, in  $F_1$  hybrid, in  $F_2$  generations. *Crop Science* 18:413-418.
- Baenzinger, P. S.; Kudirka, D. T.; Schaeffer, G. W. y Lazar, M. D. 1984. The significance of doubled haploid variation. En: Gustafson, J. P. (ed.). *Gene manipulation in plant improvement. Memorias de un simposio, Universidad de Missouri. Plenum Press, Nueva York.* p. 385-414.
- Bollon, H. y Raquin, C. 1987. Haplomethods: A tool for crop improvement. En: Horisberg, M. (ed.). *Nestlé research news. Lausanne, Suiza.* p. 81-91.
- Bossoutrot, D. y Hosemans, D. 1985. Gynogenesis in *Beta vulgaris* L.: From in vitro culture of unpollinated ovules to the production of doubled haploid plants in soil. *Plant Cell Reports* 4:300-303.
- Chen, Y. 1986a. Anther and pollen culture of rice. En: Hu, H. y Yang, H. (eds.). *Haploids of higher plants in vitro. China Acad. Publishing, Beijing.* p. 3-25.
- . 1986b. The inheritance of rice pollen plant and its application in crop improvement. En: Hu, H. y Yang, H. (eds.). *Haploids of higher plants in vitro. China Acad. Publishing, Beijing.* p. 118-136.
- ; Tian, W. Z.; Zhang G. H.; Lu, D. Y. 1979. The study of rice anther and pollen culture in liquid. *Acta Genet. Sin.* 6:5.
- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1980. Genetic Resources Unit. Tissue culture section. En: CIAT: Annual report 1980. Cali, Colombia. p. 54-57.
- . 1984. El cultivo de anteras: un camino más corto para obtener variedades mejoradas. *Arroz en las Américas (CIAT, Colombia)* 5:1-5.
- . 1986a. Rice improvement. En: CIAT: Rice Program annual report 1985. Cali, Colombia. p. 49-67.
- . 1986b. Rice. En: CIAT. Biotechnology Research Unit: Annual report 1985. Cali, Colombia. p. 63-64.
- . 1987a. CIAT report 1987. Cali, Colombia. p. 20-22.
- . 1987b. Varietal improvement. En: CIAT: Rice Program annual report 1986. Cali, Colombia. p. 1-13.
- . 1988. Activities in non-conventional breeding methods. En: CIAT: Rice Program annual report 1987. Cali, Colombia. p. 136-147.
- Day, A. y Ellis, T. H. N. 1984. Chloroplast DNA deletions associated with wheat plants regenerated from pollen: Possible basis for maternal inheritance of chloroplasts. *Cell* 39:359-368.

- De Buysier, J. y Henry, Y. 1986. Wheat: production of haploids, performance of doubled haploids, and yield trials. En: Bajaj, Y. P. S. (ed.). *Biotechnology in agriculture and forestry*; 2: Crops. Springer-Verlag, Berlín. p. 73-88.
- Dunwell, J. M. 1986. Pollen, ovule and embryo culture as tools in plant breeding. En: Withers, L. A. y Anderson, P. G. (eds.). *Plant tissue culture and its agricultural applications*. University of Nottingham, P. Butterworths, Londres. p. 375-404.
- Evans, D. A. y Sharp, W. R. 1986. Somaclonal and gametoclonal variation. En: Evans, D.; Sharp, W. y Ammirato, P. V. (eds.). *Handbook of plant cell culture*; 4: Techniques and applications. MacMillan Publishing, Nueva York. p. 97-132.
- Haberle-Bors, E. 1985. *In vitro* haploid formation from pollen: A critical review. *Theor. Appl. Genet.* 71:361-374.
- Hu, H. 1986. Variability and gamete expression in pollen-derived plants in wheat. En: Hu, H. y Yang, H. (eds.). *Haploids of higher plants in vitro*. China Acad. Publishing, Beijing. p. 67-78.
- y Yang, H. (eds.). 1986. *Haploids of higher plants in vitro*. China Acad. Publishing, Beijing. 221 p.
- Kasha, K. J. y Kao, K. N. 1970. High frequency haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Nature* 225:874-876.
- Keller, W. A.; Arnison, P. G. y Cardy, B. J. 1987. Haploids from gametophytic cells: Prospects. En: Green, C. E.; Somers, D. A.; Hackett, W. P. y Biesboer, D. D. (eds.). *Plant tissue and cell culture: Proceedings of an international symposium*. University of Minnesota, Alan R. Liss, Nueva York. p. 223-241.
- Lazar, M. D.; Baenzinger, P. S. y Schaeffer, G. W. 1984. Combining abilities and heritability of callus formation and plantlet regeneration in wheat (*Triticum aestivum* L.) anther cultures. *Theor. Appl. Genet.* 68:131-134.
- Martínez, C. P.; Núñez, V. M. y Roca, W. M. 1985. Importancia del cultivo de anteras en el mejoramiento del arroz. *Arroz (Colombia)* 34:12-17.
- Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- Narváez, J. 1981. Cultivo de tejidos de arroz (*Oryza sativa* L.). Introducción de callo y regeneración de plantas. Tesis. Universidad Nacional de Colombia, Palmira. 95 p.
- Núñez, V. M. 1984. Obtención de líneas homocigotas de arroz (*Oryza sativa* L.) tolerantes a la toxicidad de aluminio utilizando el cultivo de anteras. Tesis. Universidad Nacional de Colombia, Palmira.

- ; Martínez, C. P.; Narváez, J. y Roca, W. M. 1987. Obtención de líneas homocigotas de arroz (*Oryza sativa* L.) tolerantes a la toxicidad de aluminio utilizando el cultivo de anteras. *Siall* 4:47-54.
- Ouyang, J. 1986. Induction of pollen plants in *Triticum aestivum*. En: Hu, H. y Yang, H. (eds.). Haploids of higher plants *in vitro*. China Acad. Publishing, Beijing. p. 26-41.
- Petelino, J. 1987. Biotechnology to improve wheat and corn. *Gen. Engineering News*: 24.
- Reeves, J. W. 1986. New rice varieties in half the time. *Span* 29:32-33.
- Rowe, P. R. 1974. Parthenogenesis following interspecific hybridization. En: Kasha, K. (ed.). Haploids and higher plants. *Memorias de un simposio*. University of Guelph, Guelph, Canadá. p. 43-52.
- Wenzel, G. 1979. Recent progress in microspore culture of crop plants. En: Fourth John Innes Symposium on Haploids. *Memorias*. p. 185-196.
- ; Foroughi-Wehr, B.; Friedt, W. y Kohler, F. 1985. Anther culture in crop plants. En: *Biotechnology in international agricultural research. Memorias de un simposio internacional*. International Rice Research Institute (IRRI), Manila. p. 65-73.
- y Uhrig, H. 1981. Breeding for nematode and virus resistance in potato via anther culture. *Theor. Appl. Genet.* 59:333-340.
- Zapata, F. J.; Aldemita, R. R.; Novero, A. H.; Torriz, L. B.; Magaling, L. B.; Mazaredo, A. M.; Visperas, R. M.; Lim, M. S. y Moon, H. P. 1986. IRR I-Korea collaborative project for the development of cold-tolerant lines through anther culture. *IRRI Research Paper Series no. 118*. International Rice Research Institute (IRRI), Manila. 7 p.
- Zhenhua, A.; Jansen, L. y Tyonggiang, G. 1987. Rice anther culture breeding in Shanghai Academy of Agricultural Science. En: Annual meeting of the Rockefeller Foundation Program on rice biotechnology. International Rice Research Institute (IRRI), Manila. (Resumen analítico).