

III. CAPÍTULO 1

Obtención de Plantas Doblehaploides

Polci, Pablo; Conti, Verónica; Miranda, Rubén; Gear, Nicolás

1 Introducción

Comentarios generales sobre los haploides

Para referirnos al término haploide es necesario conocer previamente el origen de dicha denominación, y definir algunos conceptos básicos sobre el tema. Si consideramos *haploide* al individuo que posee un solo juego de cromosomas de la especie, no estaríamos incluyendo en esta clasificación a aquellos individuos derivados de especies poliploides, cuya constitución genética es igual a la de los gametos normales de dicha especie. Por ejemplo, un autopoliploide AAAA ($2n = 4x$) daría lugar a individuos "haploides" AA ($n = 2x$), que por tener dos juegos cromosómicos (AA) no podrían ser incluidos en la definición. Por lo tanto, una solución sería denominar como haploides a los individuos originados a partir de especies *diploides*, que posean un solo juego de cromosomas ($n = x$), llamando *polihaploides* a aquellos individuos con una composición cromosómica igual que la gamética normal de la especie, que tengan dos o más juegos cromosómicos ($n > x$). Otra posibilidad sería considerar el término haploide en un sentido más amplio, comprendiendo en éste a todos los individuos que posean una constitución cromosómica igual a la de los gametos normales de la especie ($n = 2n/2$). Llamariamos de esta manera *monoploides* y *polihaploides* a los individuos provenientes de plantas diploides ($2n = 2x$) y poliploides ($2n > 2x$) respectivamente. De aquí en adelante, a los fines prácticos y en concordancia con la segunda definición, nos referiremos al término *haploide* indistintamente del nivel de ploidía de la especie en cuestión, como a aquellos individuos que poseen la mitad del número cromosómico normal contenido en las células somáticas de la especie.

Identificación de Haploides

Varios procedimientos facilitan la búsqueda de haploides en muestras grandes en número de individuos. Algunos de ellos son:

- *Morfología*: las plantas haploides son, en general, más pequeñas que las diploides, tanto en sus partes vegetativas como florales. Esto se debe principalmente a la disminución en el tamaño de sus células. Es lógico pensar que el fenotipo más pequeño de las plantas puede ser una primera aproximación en la búsqueda de haploides. Si esta disminución de tamaño fuera notable en las semillas, sería muy fácil realizar una selección mecánica, aunque esto sucede en pocas especies.
- *Poliembrionía*: la presencia de poliembrionía facilita la detección de embriones haploides. No obstante, debe realizarse el control citológico correspondiente. El porcentaje de embriones gemelos observados varía con la especie y el genotipo.
- *Genes marcadores*: con este fin puede utilizarse cualquier par de alelos cuyos fenotipos dominante y recesivo sean fácilmente distinguibles. En la práctica, conviene utilizar marcadores que posean manifestaciones fenotípicas claras en semilla o en plántula y de esta manera hacer una selección más económica en tiempo y esfuerzo. Para identificar haploides en una variedad que se supone homocigota, se realizan cruzamientos con otra variedad que sea homocigota para el alelo alternativo. La mayor parte de la descendencia será heterocigota (diploide), con fenotipo dominante. Los individuos que aparezcan con el fenotipo recesivo serían haploides, obtenidos por partenogénesis o androgénesis, según sea el fenotipo recesivo materno o paterno, respectivamente.

Antecedentes

El valor de los haploides se conoce desde 1922, cuando se descubrió la producción espontánea de los mismos, siendo superior a cien el número de especies vegetales capaces de producirlos *in-vivo*. Sin embargo, la frecuencia con la cual se producen es muy baja, con valores que van de 0,001 a 0,01%.

Entre los casos de *haploidía espontánea* es común la poliembrionía, que, con una gran va-

riación entre los distintos genotipos, ocurre en una amplia gama de especies, géneros y familias. En estos casos es frecuente la aparición de haploides procedentes de una sinérgida del saco embrionario, puesto que se ha comprobado en muchas especies que las células antipodas degeneran antes de la fecundación.

En 1966, Guha y Maheshwari descubrieron que las anteras de *Datura innoxia* Mill. generaban plantas haploides al ser cultivadas *in-vitro*. Este proceso, confirmado posteriormente por Nitsch y Nitsch (1969) en tabaco, se ha utilizado para producir haploides en numerosas especies. En el caso de *Datura innoxia*, las frecuencias de inducción son casi del 100% y el rendimiento es de más de mil plántulas o callos por antera en condiciones óptimas (figura 1).

En estudios de androgénesis *in-vitro* se ha detectado especial facilidad para regenerar haploides a partir de anteras aisladas o de granos de polen en miembros de la familia de las solanáceas. También se han encontrado resultados sorprendentes en numerosos géneros de las crucíferas, gramíneas y ranunculáceas, aunque resulta común observar diferencias significativas, incluso dentro de un mismo género. No se ha logrado, sin embargo, el mismo éxito en especies arbóreas y arbustivas.

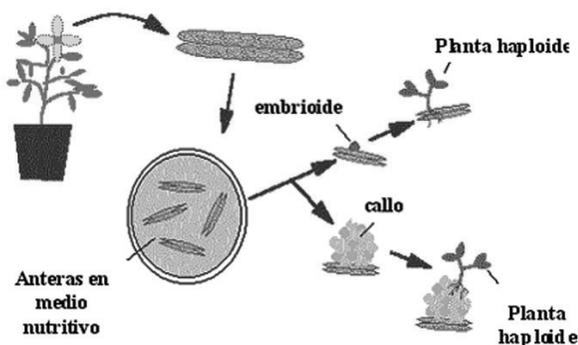


Figura 1. Obtención de plantas haploides por cultivo de anteras.

Importancia de los haploides y aplicaciones en el mejoramiento vegetal

Los métodos tradicionales para el mejoramiento vegetal han sido practicados por cientos de años. Actualmente se ha llegado a una etapa en donde estos métodos son insuficientes

para hacer frente a las demandas mundiales de producción. A pesar de que cada año se liberan al mercado numerosas variedades, estas no persisten demasiado. Los objetivos de mejoramiento a largo plazo no podrán ser alcanzados a menos que se genere mucha variabilidad genética que pueda ser utilizada con estos fines y que existan métodos que acorten el tiempo necesario para la obtención de variedades.

El advenimiento de las técnicas biotecnológicas y los avances en biología molecular han permitido el desarrollo de nuevas herramientas de gran utilidad en el mejoramiento vegetal. Entre éstas, la producción de haploides y doblehaploides son herramientas interesantes ya que permiten acortar el tiempo requerido para la obtención de nuevas variedades, siendo un buen complemento para los programas de mejora tradicionales. Al carecer de genotipos heterocigotas, las poblaciones doblehaploides (DH) necesarias para encontrar genotipos raros pueden ser mucho menos numerosas, especialmente en el caso de caracteres recesivos, ya que éstos no quedan enmascarados por los alelos dominantes. Las poblaciones DH, si se las compara con poblaciones segregantes, presentan mayor variación genética aditiva y ausencia de varianza genética debida a la dominancia. Es decir que cuando se utilizan poblaciones doblehaploides se eliminan las complejidades del estado heterocigota y se facilita enormemente el análisis genético. De esta manera pueden distinguirse las mutaciones recesivas de forma inmediata, haciendo que el proceso de selección sobre una población de haploides resulte más eficiente (figura 2).

La producción de haploides es una alternativa biotecnológica de gran importancia y ha resultado exitosa en varios cultivos, entre ellos cebada, arroz, maíz y trigo.

Un sistema de producción de DH debe cumplir con tres requisitos básicos para su utilización en programas de mejoramiento:

1. Debe producir líneas DH eficientemente a partir de todos los genotipos.
2. Los DH obtenidos deben ser normales y estables.
3. Éstos deberían representar una muestra al azar del conjunto de gametos parentales.

Entre las aplicaciones más importantes de los doblehaploides en el mejoramiento vegetal podemos citar:

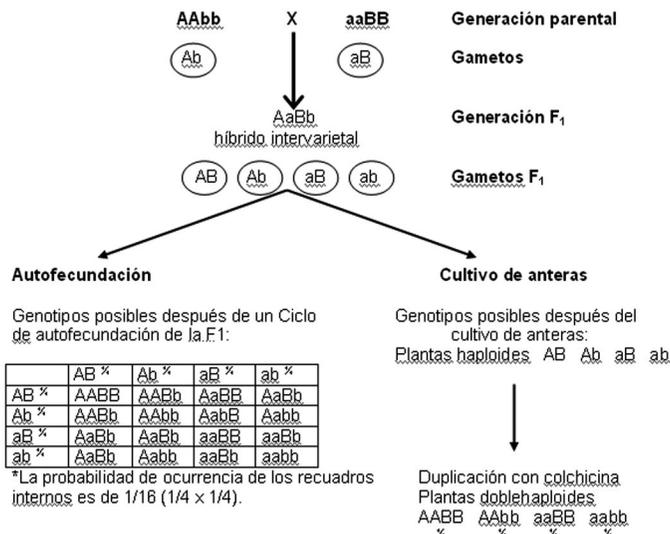


Figura 2. Ventaja del uso de haploides en el mejoramiento cuando los cultivares parentales difieren, teóricamente, en dos pares de genes. Si el genotipo buscado es, por ejemplo el doble recesivo aabb, por autofecundación convencional se tiene una probabilidad de 1/16 de encontrarlo. Si se induce haploidía, el mismo genotipo tendrá una probabilidad de ocurrencia de 1/4 porque no se producirán los genotipos heterocigotas.

1. Acortamiento de los programas de mejora: el desarrollo de nuevos cultivares por los métodos tradicionales actuales comprende tres etapas fundamentales: a) generación de variabilidad genética, ya sea por medio de hibridaciones sexuales intra e interespecífica, por inducción de mutaciones, o por transformación genética; b) recuperación de progenies homocigotas a través de generaciones repetidas de autofecundación o retrocruzamiento, seleccionando a favor de los caracteres de interés; c) evaluación del comportamiento de los nuevos materiales en ensayos comparativos a campo. Estos pasos son básicos en un programa de mejora, pudiendo existir otras etapas en función del modo reproductivo de la especie. Así por ejemplo, el tiempo requerido para la obtención de un nuevo cultivar de trigo de ciclo invernal es de aproximadamente diez años, a través del mejoramiento tradicional (figura 3). La biotecnología se presenta como una alternativa atractiva, no sólo para reducir el tiempo de obtención de los genotipos deseados, sino también para lograr una economía de mano de obra y espacio en el campo experimental.

- En las plantas *autógamas*, con los métodos convencionales de mejoramiento, la homocigosis práctica se logra recién luego de seis a ocho generaciones de autofecundación. Mientras que con una técnica de producción de haploides seguida de duplicación cromosómica, es posible llegar a homocigosis completa en solo una generación.
- En las plantas *alógamas*, la producción de homocigotas resulta de gran importancia. Al trabajar con especies de polinización cruzada se favorece naturalmente la heterocigosis, y, de ser posible la autofecundación, la obtención de homocigotas se ve dificultada por la endogamia.
- En plantas *bulbosas, árboles frutales y forestales* la homocigosis juega un rol muy importante en el aceleramiento de los programas de mejora. Debido al prolongado tiempo requerido para alcanzar la fase adulta, el proceso de mejora resulta extremadamente largo, aún siendo posible la autopolinización.

2. Generación de poblaciones de mapeo: para el mapeo genético de plantas, diversos tipos de poblaciones pueden ser utilizadas. La selección del tipo de población a usar se realiza en función de los objetivos de la investigación y del tiempo y recursos disponibles. Las poblaciones de mapeo con el mayor contenido de información son aquellas obtenidas a partir del cruzamiento entre dos individuos homocigotos contrastantes. En las plantas F₁ obtenidas, el desequilibrio de ligamiento es máximo, y las poblaciones derivadas a partir de estas plantas F₁ procuran explorar este desequilibrio. Para especies de autofecundación o que toleran la autofecundación pueden utilizarse poblaciones F₂, F_n, RILs (*Recombinant Inbred Lines*), derivadas de retrocruzas y doblehaploides. Las poblaciones de doblehaploides representan la variabilidad genética entre los progenitores luego de ocurrida una sola meiosis (F₁), y son especialmente indicadas cuando se realizan estudios con QTL (*Quantitative Trait Locus*), ya

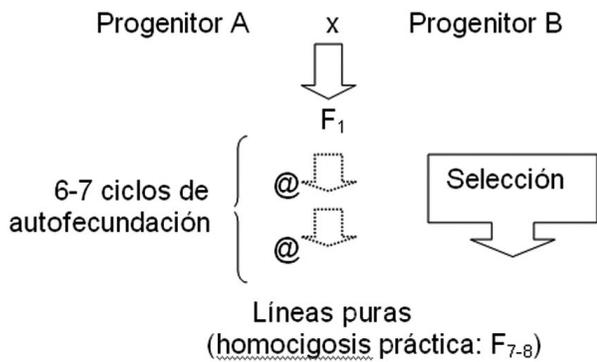


Figura 3. Representación esquemática de los pasos requeridos para la obtención de líneas puras en un programa de mejoramiento tradicional.

que al obtenerse genotipos 100% homocigotas se dispone de poblaciones estables o “inmortales” de mapeo, permitiendo analizar la misma población en diferentes años y localidades, debido a la constante disponibilidad de semilla.

3. Estudio de especies poliploides: la inducción de haploides en plantas poliploides facilita el trabajo de investigación y mejora, ya que permite manejar niveles de ploidía menores para los estudios de herencia y la combinación de caracteres de interés.

4. Fusión de protoplastos: al fusionar dos protoplastos haploides se origina uno diploide que puede duplicarse y llevar a la obtención de un híbrido interespecífico o intergenérico, siendo esto una ventaja importante cuando se trabaja en hibridación somática.

5. Variación gametoclinal: la androgénesis *in-vitro* provee un excelente sistema para analizar, a nivel esporofítico, la variación debida a recombinación y segregación meiótica. Las variantes gametoclonales expresan el carácter recesivo en la R₀, a diferencia de las somaclonales, que requieren de autofecundación y análisis de progenie. Algunos logros de esta técnica:

- Frutos de tomate con mayor contenido de sólidos.
- Plantas enanas de arroz con granos más largos y con elevados niveles de proteínas de reserva y más macolladoras.
- Plantas de *Datura innoxia* con contenidos más elevados de alcaloides en las hojas.
- Plantas de tabaco con mayor resistencia

a bajas temperaturas.

- Plantas de *Brassica napus* con mayor contenido de aceite del ácido erúrico en las hojas. Este aceite se usa como lubricante en la industria.

6. Mutagenesis: si se aplica mutagenesis a un sistema de haploides, se obtienen mutantes sólidos, lográndose la homocigosis del mutado rápidamente luego de la duplicación con colchicina. Entre los agentes mutagénicos más frecuentemente utilizados se encuentra la N-metil-N-nitrosurea (20 mM), los rayos γ (0,5 krad) y el etil metil sulfonato.

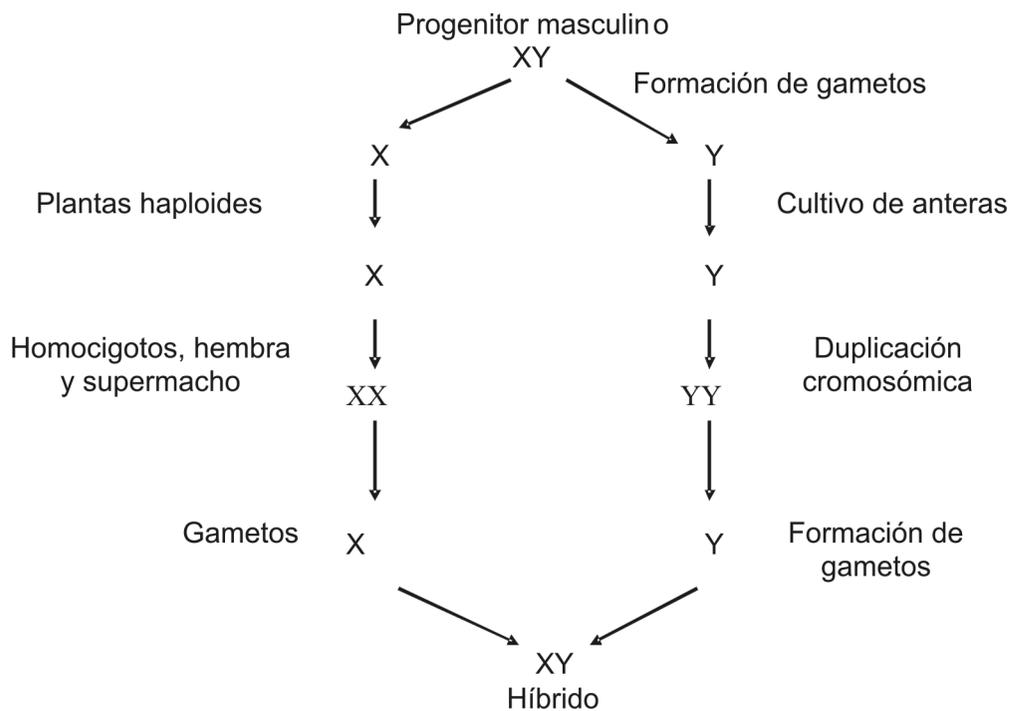
7. Transformación genética: rige el mismo principio que para mutagenesis. La transformación de haploides permite la obtención del transgén en homocigosis luego de la duplicación con colchicina. Puede realizarse con PEG (polietilenglicol), microinyección o utilizando *Agrobacterium tumefaciens*.

8. Producción de plantas homogaméticas: *Asparagus officinalis* es una especie cultivada, dioica, en la cual las plantas femeninas son XX y las masculinas son XY. De esta manera, para obtener una población de plantas deben cruzarse ambos tipos, lo que dará una progenie constituida por 50% de plantas XX y 50% de plantas XY. Sin embargo, desde el punto de vista del productor, es deseable la obtención de una población constituida solamente por plantas XY, que tienen un menor contenido de fibra y son, por lo tanto, preferidas por los consumidores. Para solucionar este problema y obtener 100% de plantas masculinas se ideó un sistema que consiste en el cultivo de anteras y diploidización de plantas YY, llamadas supermachos. La ventaja de estas plantas es que, al ser cruzadas con plantas XX darán 100% de plantas XY, como se muestra en el esquema 1.

Con este sistema, en 1990 fue liberada una variedad llamada Andrea (un híbrido obtenido como se mencionara anteriormente). Andrea es una variedad muy homogénea, de alto rendimiento y de excelente calidad.

Obtención de Haploides

Como se mencionara anteriormente, las plantas haploides aparecen en muy baja frecuencia en la naturaleza, siendo necesaria la



Esquema 1.

posterior ocurrencia de duplicación cromosómica para la obtención de semillas. Por ello, la producción artificial de haploides resulta siempre más efectiva.

- Origen de los haploides

I. Ginogénesis: desarrollo de un gameto femenino no fecundado. Se logra por:

1. Castración y aislamiento de las flores. Por este tratamiento se han obtenido haploides de *Triticum monococcum*.
2. Polinización retrasada: la castración de las flores y la posterior polinización en el límite de la madurez receptiva del estigma permiten obtener hasta un 30% de haploides en trigo.
3. Presencia de dos células espermáticas con diferente velocidad de desarrollo: el mecanismo involucrado en la generación de haploides estaría basado en la falta de fertilización de la oosfera durante la doble fertilización.
4. Polinización con polen inviable: a) utilizando polen extraño (típico de cruzamientos interespecíficos), incapaz de fe-

cundar a la especie en cuestión, puede servir de estímulo para inducir haploidía, como sucede en el cruzamiento entre *Solanum tuberosum* x *S. phureja* (papa silvestre). El polen de la papa silvestre contiene sólo un núcleo generativo, producto de una gametogénesis anormal, por lo cual la fertilización doble no logra producirse, pero se forman embriones haploides por partenogénesis; b) utilizando polen previamente irradiado.

5. Cultivo de ovarios: puede ser eficaz para obtener haploides a partir de cruzamientos interespecíficos.

II. Androgénesis: desarrollo de un gameto masculino. Se logra por:

1. Cultivo de anteras: se ha inducido haploidía en mono y dicotiledóneas, siendo más fácil en las últimas. Es una técnica simple que, dependiendo del genotipo y de las condiciones de cultivo permite obtener elevados números de plantas en tiempos relativamente cortos. Ha sido más difícil en los cereales, no obstante se obtuvieron haploides de arroz, trigo,

cebada con diferentes grados de dificultad.

2. Cultivo de microsporas: en 1974 Nitsch indujo la regeneración de plantas haploides de *Nicotiana tabacum* y *Datura innoxia* a partir de cultivos en suspensión de microsporas, previo choque térmico a baja temperatura de las flores. Este método tiene la ventaja de producir haploides masivamente (más de 7000 plantas por botón floral en tabaco), y de permitir la aplicación de diferentes tratamientos a las microsporas como transformación o mutagénesis para luego obtener plantas por embriogénesis partiendo de una única célula inicial. Para conseguir diferenciar plantas a partir de microsporas es necesario quebrar el mecanismo responsable de la asimetría en la primera mitosis del polen.
3. Técnica de gametofito indeterminado (*ig*): en 1969 J L Kermicle desarrolló una técnica en maíz basada en la ocurrencia de una mutación espontánea, encontrada en la línea W23. El gen *ig* provoca una disrupción en el desarrollo del gametofito femenino, generando, luego del proceso de polinización, que los núcleos espermáticos ocasionalmente se desarrollen androgenéticamente. El desarrollo embrionario de los núcleos espermáticos en el citoplasma materno resulta en la formación de haploides androgenéticos, o haploides paternos.

III. A partir de alguna célula haploide del saco embrionario distinta del gameto femenino (sinérgidas o antípodas).

IV. Cruzamientos interespecíficos o intergenéricos con eliminación cromosómica: se produce la fertilización de manera de que se forme un cigoto diploide, que a lo largo de las sucesivas divisiones mitóticas, va perdiendo el genoma del individuo que aportó el gameto masculino, como sucede en los cruzamientos entre *Hordeum vulgare* y *H. bulbosum*.

V. Interacción núcleo-citoplasma: utilizando líneas de sustitución y restauración nuclear se encontró que los individuos con citoplasma de *Aegilops caudata* y núcleo de *Triticum aestivum* o *Triticale* mostraban una frecuencia de

haploidía del 3,1% y del 52,9% respectivamente. Esto se debe a que ciertas interacciones entre un citoplasma y un núcleo extraño inducen haploidía.

VI. Semigamia: el núcleo del gameto masculino penetra en la ovocélula pero sin fusionarse con el núcleo femenino. Ambos núcleos comienzan a dividirse independientemente, produciendo un individuo haploide con tejidos de origen materno y paterno.

- Métodos más utilizados para la obtención de plantas haploides

Entre los métodos disponibles actualmente para la obtención de doblehaploides, los más utilizados son la hibridación interespecífica e intergenérica, la androgénesis, y recientemente la ginogénesis en maíz.

I. Cultivo de Anteras: consiste en el cultivo de anteras inmaduras en un medio de inducción donde las microsporas competentes originarán callos, que serán luego transferidos a un medio apropiado para la regeneración de plantas (figura 1). En algunas especies de dicotiledóneas el número de plantas obtenidas por cada cien anteras cultivadas es muy elevado. En cambio, en las gramíneas la técnica no ha sido tan exitosa. Sin embargo, los progresos en los métodos de cultivo *in-vitro* durante las últimas décadas han permitido obtener buenos resultados con gramíneas (figura 4), aún en aquellas consideradas recalcitrantes. La capacidad de respuesta al cultivo de anteras, denominada capacidad androgénica, puede ser evaluada a través de la producción de callos y de plantas verdes, y su eficiencia es altamente dependiente de:

1. El genotipo: es quizás el factor más importante que afecta al cultivo de anteras. En la naturaleza, la haploidía es controlada por el gen *hap*, llamado gen inhibidor de la haploidía. Existe suficiente evidencia que sugiere que la androgénesis *in-vitro* también está bajo control génico, y que este carácter puede ser transferido desde clones con alta respuesta a otros no respondedores. Se ha hallado variabilidad en la respuesta entre especies y aún dentro de ellas. En cebada y trigo los caracteres inducción de callos y regeneración de plantas son altamente hereda-

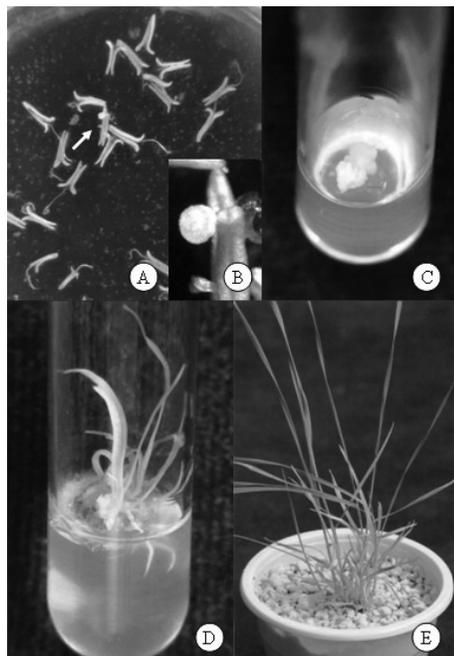


Figura 4. Producción de callos y plantas a partir del cultivo de anteras de *Triticum aestivum*. (A) Callo blanco y compacto sobre una antera (flecha). (B) Detalle del callo señalado en (A). (C) Callo transferido a medio de cultivo para regenerar planta. (D) Plántula de trigo regenerada a partir de callo, con sistema radicular en formación. (E) Planta haploide completa finalizando la etapa de rusticación, creciendo sobre sustrato inerte (Perlita).

bles, y se ha sugerido que ambos caracteres estarían controlados por muchos genes. Por lo tanto, el mejoramiento de la capacidad androgénica no parece difícil, siendo la identificación de genotipos con gran capacidad de respuesta un paso indispensable para su incorporación en los bloques de cruzamiento.

2. El % de albinismo: la ocurrencia de plantas albinas representa un serio problema para la aplicación del cultivo de anteras en programas de mejoramiento de cereales. La incidencia depende, no sólo de la especie, sino también de la variedad, citándose valores de 50, 70 y 100% para tres variedades diferentes de arroz. Bernard (1980) ha sugerido que las altas temperaturas incrementan la diferencia entre la velocidad de replicación del

material nuclear y el de las organelas, resultando en un desarrollo retardado o incompleto de los plástidos, lo cual conduciría a la producción de fenotipos albinos. De acuerdo a este autor, el desarrollo de un sistema fotosintético funcional es promovido por el tratamiento con bajas temperaturas, aunque no siempre un pretratamiento con frío reduce incidencia de albinismo.

3. Las condiciones de crecimiento de las plantas donantes: la edad y las condiciones ambientales en que crecen las plantas afectan considerablemente la capacidad androgénica de las mismas. Los factores ambientales más críticos son el fotoperíodo, la intensidad de luz, la temperatura, la nutrición y la concentración de CO_2 . Estos factores incidirían en la capacidad de producir las divisiones celulares morfogénicas que conducen al desarrollo de embrioides y la regeneración de plantas. Este último paso es crítico dentro de todo el proceso, es altamente dependiente de la calidad del callo, y está asociado fuertemente a toda la historia previa del cultivo. En general, se ha informado que la utilización de anteras de las primeras floraciones favorece la respuesta androgénica, mientras que las colectadas al final de la estación muestran una menor respuesta al cultivo, generando una menor cantidad de embrioides. En *Brassica napus*, el crecimiento de las plantas a bajas temperaturas mejora la producción de embrioides obtenidos a partir de anteras.
4. El estado de desarrollo de las microsporas: en la fase gametofítica de las plantas, que comienza luego de la meiosis, las microsporas sufren inicialmente una división mitótica asimétrica que da origen a dos células de distintos tamaños: la generativa (más pequeña y con un núcleo altamente condensado) y la vegetativa (más grande y con un núcleo difuso). En las gramíneas, el núcleo generativo se divide nuevamente originando dos núcleos espermáticos. Uno generará el endosperma triploide al fusionarse con

los dos núcleos polares del saco embrionario, mientras que el segundo fertilizará a la óosfera produciendo el cigoto diploide, que constituirá el primer paso de la nueva fase esporofítica. Los embrioides haploides se originan *in-vitro* a partir de una de las vías que se enuncian a continuación. Cuando la primera división mitótica de la microspora es asimétrica, los haploides se originan por repetidas divisiones de la célula vegetativa, de la generativa o de ambas. En cambio, cuando la primera división mitótica es simétrica, ambas células resultantes contribuyen al desarrollo del haploide. Por lo tanto, una célula gamética masculina puede revertir su desarrollo gametofítico hacia el grano de polen y dar origen directamente a un nuevo individuo. En general, las microsporas que se encuentran en la primera división mitótica son las que mejor responden. Esto varía levemente con la especie vegetal, pero esta reversión no es posible luego de iniciada la deposición de almidón. El estadio más apropiado para los cereales es el de microspora uninucleada media y tardía.

5. Los pretratamientos: distintos tipos de estrés aplicados durante el estadio adecuado pueden enmascarar el programa gametofítico e inducir la expresión de genes específicos del desarrollo esporofítico. Si bien las bajas temperaturas son consideradas como el mejor pretratamiento, también otros pueden estimular la androgénesis, como el calor, el choque osmótico, la centrifugación de las anteras o hasta una incisión en la parte superior de la inflorescencia donante. También se citan la poda, la pulverización con etrel, la irradiación, la reducción en la presión atmosférica, la anaerobiosis, el tratamiento en una atmósfera saturada de agua y la aplicación de gametocidas. Las bajas temperaturas aplicadas sobre la planta madre, sobre las yemas florales jóvenes o sobre las anteras, generalmente estimulan la embriogénesis. El frío estimula la división mitótica simétrica de las microsporas. Esto se debe-

ría a una alteración en la orientación del huso que conduciría a una primera mitosis anormal del grano de polen. Por otra parte, se ha mencionado que las bajas temperaturas retardan el envejecimiento de la pared de la antera, lo cual aumentaría la supervivencia y la viabilidad del polen. En general, las temperaturas citadas varían entre 2 y 10 °C y la duración del tratamiento de 2 a 30 días. Es importante determinar la temperatura adecuada para cada especie vegetal, aún para variedades dentro de la misma especie. En algunas especies, tales como *Capsicum annun*, avena y algunos genotipos de trigo se ha logrado éxito con un choque con alta temperatura. Temperaturas de 30 – 35 °C durante los primeros 1 a 4 días del cultivo ayudaron a inducir la androgénesis en varias especies de género *Brassica*.

6. La composición del medio de cultivo: es otro de los factores importantes para el éxito en el cultivo de anteras. No existe una recomendación general y las variaciones dependen de la especie a cultivar.
 - a) Medios de inducción: dos tipos de estrés, osmótico y nutricional, han sido identificados como causas disparadoras de la inducción de embriogénesis en las microsporas de mono y dicotiledóneas. En tabaco, el cultivo de las anteras en un medio carente de sacarosa durante los primeros 6 días de la etapa de inducción permitió una máxima respuesta androgénica. Los carbohidratos cumplen dos roles fundamentales en los medios de inducción, ya que actúan como osmolito y como nutriente. Los agentes gelificantes representan otro aspecto importante en la evolución de los medios de inducción. Tradicionalmente se utilizó agar como gelificante de los medios de cultivo debido a su disponibilidad y bajo costo. Pero en 1973 se detectó una mejor respuesta androgénica en tabaco cuando las anteras fueron cultivadas en un medio solidificado con agar y suplementado con carbón activado. En medios líquidos la adición de Ficoll (polímero sintético de

sacarosa, inerte, no iónico y de alto peso molecular) incrementa la tensión superficial y la viscosidad del medio. De esta manera, las anteras y callos flotan sobre el medio líquido y se desarrollan en condiciones aeróbicas, permitiendo elevadas tasas de embriogénesis y de producción de plantas verdes. En cuanto a los reguladores de crecimiento, la mayoría de los cereales requiere de la presencia de auxinas y de citocininas en el medio de cultivo y las respuestas parecen depender de los niveles endógenos de tales reguladores. Por ejemplo, para lograr la inducción en trigo es indispensable el uso de 2,4-D en concentraciones de 1,5 a 2 mg/l. Existen otras sustancias que, adicionadas al medio de cultivo, ayudan en la estimulación de la androgénesis, como la glutamina y el inositol. También se citan otros compuestos inespecíficos como extracto de papa, de batata, de mandioca, de trigo germinado y de endospermas de arroz y de maíz. En ocasiones, si el medio es suplementado con leche de coco los granos de polen desarrollan directamente en embrioides.

- b) Medios de regeneración: la variedad de medios de regeneración citada es menor cuando se la compara con la de los medios de inducción. Los más utilizados son modificaciones derivadas del medio MS, con concentraciones de carbohidratos similares a las utilizadas en los medios de cultivo de tejidos tradicionales (30g/l de sacarosa), utilizando agar (0,6%) como gelificante, auxinas menos poderosas, y un balance hormonal a favor de las citocininas
7. Las condiciones de incubación: las características ideales de cultivo son específicas para cada especie, y aún para cada genotipo dentro de una misma especie. Estas afectan particularmente la tasa de absorción final de nutrientes y la regeneración de plantas verdes. La duración e intensidad lumínica, la temperatura y la orientación de las anteras sobre el medio de cultivo pueden tener un efecto considerable en algunas especies.

II. Cultivo de Microsporas: comprende la obtención de individuos haploides a partir de microsporas aisladas. Las espigas son pretratadas y las microsporas liberadas son colocadas en un medio de cultivo donde desarrollarán embriones haploides que serán luego transferidos a un medio de regeneración para originar plántulas (figura 5). Este sistema es considerado el de mayor potencial para la producción de doblehaploides, debido a que induce a las miles de microsporas que contiene una flor a dividirse y producir embriones. La ausencia de la pared de la antera podría mejorar la nutrición y eliminar las restricciones físicas para la androgénesis. El cultivo de microsporas tiene la ventaja de originar embriones de similar tamaño y etapa fisiológica debido a que pueden separarse las microsporas de tamaños semejantes por centrifugación diferencial. La optimización de los diferentes pasos críticos para el éxito de esta técnica puede llevar a la obtención de una alta cantidad de plantas verdes con menores costos y esfuerzos. Entre los fac-

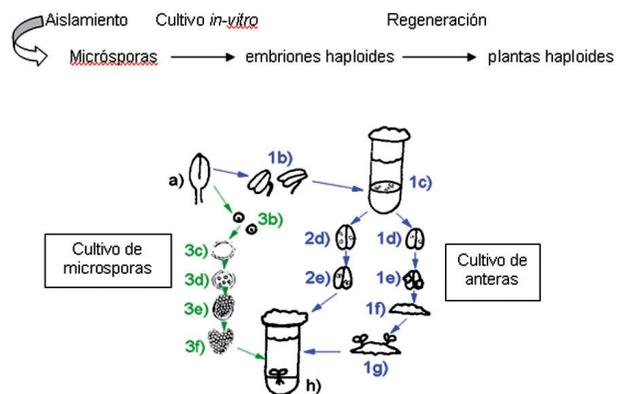


Figura 5. El diagrama muestra las diferentes etapas del cultivo de anteras y de microsporas aisladas. Para el cultivo de anteras, las etapas requeridas a partir de anteras hasta la obtención de las plantas haploides pueden describirse como sigue: a) yema floral previo a la antesis, 1b) anteras, 1c) anteras en cultivo, 1d) y 1e) proliferación de las anteras, 1f) callo haploide, 1g) diferenciación de callo, h) planta haploide. Para el cultivo de microsporas aisladas: a) yema floral previo a la antesis, 3b) microsporas aisladas de una antera, 3c) cultivo de microsporas, 3d) estado multinucleado, 3e) y 3f) embrión en desarrollo.

tores determinantes de la eficiencia del método podemos citar:

1. Genotipo: se han citado cultivares de cebada con una alta respuesta al cultivo de microsporas, en contraste con otros menos respondedores.
2. Albinismo: al igual que en el cultivo de anteras, el número de plantas albinas depende del genotipo, y también se ve influido por la densidad de cultivo de las microsporas.
3. Condiciones de crecimiento de la planta donadora: el mantenimiento de las plantas en condiciones controladas de fotoperíodo y temperatura es esencial y debe ser ajustado en función de la especie. Se han citado excelentes resultados en cebada cuando las plantas son cultivadas en ambientes libres de patógenos, con alta humedad relativa (60-80%), fotoperíodo de 16 hs de luz, y adecuado régimen de fertilización y riego. Cuando las plantas crecen estresadas, ya sea por riego excesivo, sequía, enfermedades, o la aplicación de algún plaguicida, la respuesta al cultivo de microsporas es menor.
4. Estadio de las microsporas: como se citara anteriormente para el cultivo de anteras, es imprescindible el chequeo del estadio correcto de las microsporas para que conserven su capacidad androgénica.
5. Pretratamientos: los más utilizados consisten en el uso de frío, estrés osmótico, presencia o ausencia de determinados nutrientes, etc. Se ha demostrado que los nutrientes disponibles para las microsporas durante el pretratamiento constituyen un factor decisivo que determina la calidad de los embriones originados.
6. Densidad de cultivo de las microsporas: la densidad de las microsporas en cultivo afecta el desarrollo de las mismas y el número de microsporas que entrarán en división. Existe una concentración mínima para el desarrollo de las microsporas, y una densidad óptima para una mayor regeneración. Las condiciones más favorables deben ser ajustadas en cada caso

y para cada genotipo en particular.

7. Medio de inducción: se han estudiado diferentes concentraciones de azúcares, distintas fuentes de nitrógeno orgánico, y la adición de diferentes de auxinas al medio. En general se sugiere la sustitución de sacarosa por maltosa como fuente de carbohidratos, la disminución de la concentración de nitrato de amonio, el agregado de glutamina, y el empleo de APA (ácido fenil acético) como auxina para favorecer la inducción.
8. Medio de regeneración: la composición del medio de regeneración puede afectar el vigor y supervivencia de las plántulas. Kasha et al. (2001), trabajando con cebada, encontraron en este método una manera eficiente de producción de DH, con una mejor respuesta y una menor dependencia del genotipo que en el caso del cultivo de anteras. A esto se le suma la ventaja de contar con una elevada cantidad de microsporas haploides en un estado fisiológico uniforme, que constituyen excelentes blancos para la mutagénesis, la selección y la transformación.

III. Hibridación Interespecífica e Intergenética: en este caso los haploides se originan a través de la eliminación del genoma del polinizador. El sistema de hibridación de trigo x *Hordeum bulbosum*, inicialmente descubierto y empleado con éxito en cebada, ha sido considerado superior al cultivo de anteras por tres razones:

1. La producción de haploides es más fácil.
2. El tiempo requerido para la regeneración de plantas es menor.
3. La eficiencia en la regeneración de plantas parece ser mayor. La gran limitante de este sistema lo constituye el hecho de que la mayoría de los cultivares de trigo no pueden cruzarse con *H. bulbosum* debido a la presencia de los genes de incompatibilidad, *Kr1* y *Kr2*, y al desconocimiento del estado de estos genes en los genotipos de trigo y de *H. bulbosum* involucrados en los cruzamientos, debido a que los genotipos se seleccionan en base a criterios agronómicos y no a un sistema de compatibilidad de cruzamien-

tos con *H. bulbosum*. Para sortear estos inconvenientes, se ha sugerido como alternativa realizar los cruzamientos de trigo utilizando maíz como polinizador (figura 6). Luego de la fertilización del óvulo de trigo por el polen de maíz, durante las primeras mitosis del cigoto, los cromosomas del maíz son eliminados. Esto se debe a una incompatibilidad entre los cinetocoros de estos cromosomas y las fibras de los husos acromáticos que hace que en las primeras anafases los cromosomas de maíz vayan quedando

rezagados en el citoplasma, donde finalmente son degradados. El resultado de este proceso es un embrión haploide de trigo. Seguidamente, los embriones inmaduros deben ser rescatados en un medio de cultivo apropiado. A través de las cruza con maíz se han obtenido haploides de trigo de cultivares tanto compatibles como incompatibles con *H. bulbosum*, lo cual sugiere que el sistema de incompatibilidad no afecta al método de trigo x maíz, por lo que sería menos dependiente del genotipo.

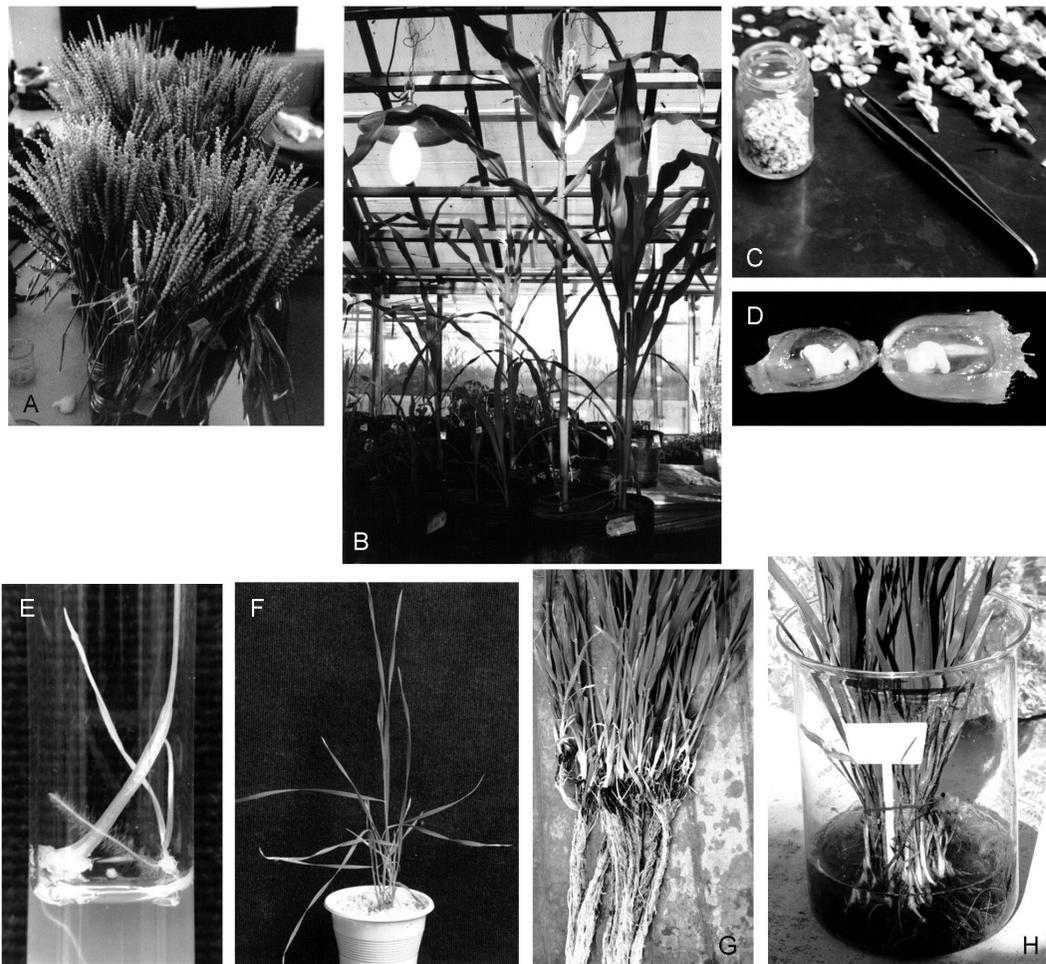


Figura 6. Producción de haploides de *Triticum aestivum* por cruzamientos de trigo x maíz (*Zea mays*). (A) Espigas de trigo cortadas en el campo y castradas en el laboratorio. (B) Plantas de maíz (donantes de polen) crecidas en invernáculo. (C) Desgrane de espigas para realizar la desinfección de los granos y posterior rescate de embriones. (D) Grano con dos embriones haploides (poliembriónía). (E) Embriones inmaduros rescatados y creciendo *in-vitro*. (F) Planta rusticada. (G) y (H) Plantas con 3-5 macollos con sus raíces sumergidas en solución de colchicina para la duplicación cromosómica. I. Plantas tratadas con colchicina y llevadas a macetas con tierra en cámara de crecimiento

IV. Ginogénesis *in vivo* en maíz: el empleo de líneas con elevada frecuencia de haploides como polinizadores motivó al desarrollo de la tecnología para la obtención de haploides maternos *in-vivo*. Este hallazgo abrió nuevas posibilidades para el empleo de polinizadores seleccionados en función de su capacidad de incrementar las frecuencias de haploides. Líneas inductoras fueron desarrolladas a partir del germoplasma de Stock 6 de “elevada haploidía”. El mecanismo involucrado en la generación de haploides estaría basado en la falta de fertilización de la oosfera durante la doble fertilización. En relación a este fenómeno se ha planteado la hipótesis en que se asume que las líneas inductoras de haploidía presentan dos células espermáticas con diferente velocidad de desarrollo (figura 7).

El método de generación de haploides maternos *in-vivo* involucra los siguientes pasos:

1. Generación del cruzamiento del cual se desean obtener líneas homocigotos (Generación parental).
2. Fecundación de la F1 con polen proveniente del inductor de haploidía.
3. Identificación de granos haploides.

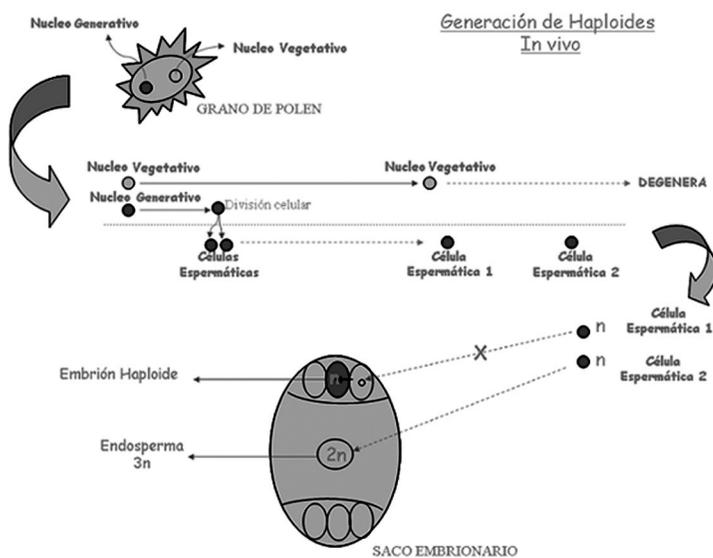


Figura 7. Generación de haploides *in-vivo* a través de fecundación incompleta. La célula espermática se une a los núcleos polares dando como resultado la formación del endosperma (3n). La otra célula no logra fecundar a la oosfera produciendo un embrión haploide (n)

4. Duplicación de los individuos haploides.
5. Autofecundación de las plantas haploides duplicadas.

La identificación de los granos haploides se realiza mediante el empleo de genes marcadores de color en embrión y endosperma, siendo el alelo rojo navajo ó *Navajo crown (R-nj)* el más frecuente. Aquellos cariopses con un embrión haploide (*r-nj*), resultantes de la falta de fecundación de la oosfera, pueden distinguirse claramente debido a la falta de expresión del marcador antociánico dominante *R-nj* en el embrión. Es decir que la expresión específica del gen *R-nj* en el endosperma (*Navajo crown*) y en el embrión permite de manera rápida y precisa identificar aquellos granos con la potencialidad de producir plantas haploides (figura 8).

Duplicación cromosómica

Después de la duplicación cromosómica, ya sea espontánea o inducida, se logra la homocigosis y se restaura la fertilidad. La planta haploide, sin duplicar, es estéril por lo que no podría producir semillas. Entre las técnicas que han sido utilizadas para la duplicación de haploides cabe mencionar:

1. La duplicación espontánea durante la etapa de callo o de rescate de embriones.
2. La regeneración de plantas doblehaploides a partir de callos de médula de plantas haploides de tabaco.
3. Sustancias químicas: aunque se conocen casos utilizando agentes químicos tales como acenafteno, hidrato de cloral, sulfanilamida, etc., la mayor eficacia se ha logrado con la colchicina y el óxido nitroso. La aplicación del óxido nitroso bajo presión (2-6 atmósferas) resulta de especial interés por su fácil penetración en los tejidos y la rápida desaparición de los mismos cuando cesa la presión. Puede utilizarse en flores recién polinizadas. La ventaja que presenta este tratamiento es que, al poder ser aplica-

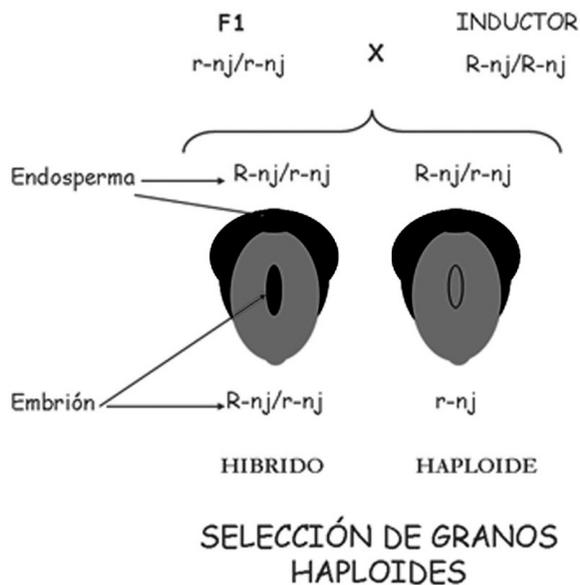


Figura 8. Marcadores de color en embrión y endosperma que permiten la selección de granos haploides

do durante la primera división mitótica del óvulo fecundado, se ve reducida la aparición de quimeras. Por otro lado, los residuos de este agente resultan menos tóxicos para la planta que otros que se aplican en forma líquida, aunque la frecuencia de aneuploides puede ser muy elevada. La acción de la colchicina fue descubierta en 1937 y desde entonces ha pasado a ser prácticamente el agente diploidizante más importante. Esta droga actúa impidiendo el autoensamblaje de la tubulina, inhibiendo así la formación de los microtúbulos del huso y, en consecuencia, la segregación anafásica de las cromátides. Afecta por lo tanto sólo a las células que se encuentran en división. Puede aplicarse a plántulas, plantas adultas, semillas, microsporas y anteras. El tratamiento puede realizarse utilizando una solución acuosa donde se sumergen las raíces, dejando fuera la parte aérea. También se puede hacer llegar la solución al interior de la planta utilizando una jeringa con la dosis deseada (microinyección), o por absorción de la solu-

ción a través de los tallitos decapitados, sobre los que se vierte. Otra forma es tratar los callos con colchicina antes de trasladarlos al medio de regeneración. Este último método permite la obtención de gran número de doblehaploides, pero presenta la desventaja de que la mayoría de las plantas así obtenidas son mosaicos cromosómicos. Otra alternativa, para microsporas y anteras, es la adición del agente duplicador directamente en el medio de inducción, antes de la primer mitosis. La diploidización en este momento requiere menos tiempo y esfuerzo y ha sido utilizada en programas de mejoramiento de trigo, maíz, *Tritordeum* y arroz. El problema de la suplementación del medio de inducción con colchicina es que reduce la embriogénesis en trigo, si bien en *Oryza sativa* y *Brassica* la puede incrementar. La duración del tratamiento y la concentración de la solución varían para cada especie.

Cualquiera sea el método con que se duplique la planta, un macollo o sólo una yema floral, lo importante es lograr que las semillas que éstas produzcan sean viables.

Consideraciones finales

La elección de los progenitores y la selección son etapas decisivas en un programa de mejoramiento que avanzará luego, generación tras generación, hacia una homocigosis que permita entrar en las etapas de evaluación. Ganar tiempo en estos casos puede significar una reducción de costos muy importante y una más temprana entrada en el mercado de la nueva variedad. En el caso de una especie autógama, como el trigo, es posible ganar generaciones haciendo dos cosechas en un año, especialmente en aquellos cultivares de corto ciclo vegetativo. Esto, sin embargo, dificulta la observación de algunas características agronómicas importantes, que no pueden ser observadas en los genotipos en esas condiciones, atentando contra una selección eficiente. Para los trigos de tipo invernacional y facultativos, con ligeros requerimientos de vernalización, esta ganancia de generaciones no es posible o es compleja. La producción de individuos

doblehaploides que puedan participar anticipadamente en la etapa de evaluación agronómica se plantea como una solución promisoriosa a este problema, reduciendo los tiempos y presupuestos.

Muchos interrogantes quedan aún sin resolver, limitando la aplicación extensiva de esta tecnología a algunos modernos programas de mejoramiento vegetal. Algunas preguntas a las que debemos encontrar respuestas son:

En que generación segregante se aplica el método de doblehaploides?

¿Cuál es el número de individuos doblehaploides derivados de un cruzamiento, representativo de la variabilidad gamética creada en la cruce, que permita un aprovechamiento integral, comparable al logrado con el método convencional de selección a campo?

¿Cómo superar la escasa cantidad de semilla producida?

¿Es una técnica alternativa, o complementaria del mejoramiento tradicional?

¿La eficiencia en la producción de doblehaploides, justifica su alto costo dentro de un plan de mejora?

De acuerdo a Mujeb-Kazi (1998), las generaciones segregantes adecuadas para producir doblehaploides son la F2 y F3. Si eligiéramos individuos F3, que ya cuentan con un año de selección a campo durante la F2 -generación que ha mostrado la mayor varianza genética entre los dos padres- estaríamos evitando producir un gran número de plantas doblehaploides que no serán agronómicamente promisorias. No obstante, debemos considerar que serían necesarios varios cientos de individuos DH para que el proceso tenga posibilidades de éxito agronómico.

En general, la producción de doblehaploides resulta en un gasto excesivo en comparación a los métodos tradicionales de mejoramiento, por lo cual en la mayoría de los programas sólo genotipos élite son sometidos a este sistema. Si bien el costo de producción de los DH depende directamente del método elegido y la eficiencia lograda, la aplicación de esta metodología al mejoramiento vegetal se vislumbra más bien como una herramienta complementaria al mejoramiento tradicional, y que de ningún modo intentaría reemplazarlo.

Lecturas Recomendadas

- Atanassov, A.; Zagorska, P.; Boyadjiev, P.; Djilianov, D. 1995. *In vitro* production of haploid plants. World Journal of Microbiology & Biotechnology, vol. 11, 400-408.
- Bhojwani, S.S., Razdan, M.K. 1996. Haploid Production. En: Plant Tissue Culture: Theory and Practice, Capítulo 7. S.S. Bhojwani y M.K. Razdan (eds.) Elsevier, Amsterdam. pp.167-213.
- Coe E. H. Jr., Neuffer M. G., Hoisington D. A. 1988. The Genetics of Corn. En: Corn and corn Improvement 3ra Edición. (Sprague C. F., Dudley J. W. eds) pg 81-258. A.S.A., C.S.S.A., S.S.S.A, Madison Winsconsin, pp 81-258.
- Lacadena, J.R. 1988. Variaciones cromosómicas numericas. En: Genética, Capítulo 15. Lacadena, J.R. (ed.) A.G.E.S.A., Madrid. pp. 683-719.
- Snape, J., Simpson, E., Parker, B., Friedt, W., Foroughi-Wher, B. 1986. Criteria for the selection and use of doubled haploid systems in cereal breeding programmes. En: Genetic manipulation in plant breeding. Proc. Int. Symp. Eucarpia W. Horn, C. Jensen, W. Odenbach, O. Schieder (eds). W. De Gruyter, Berlin. pp. 217-229.