

Tecnología de Dobles Haploides en el mejoramiento de maíz: Teoría y Práctica

Editores

B.M. Prasanna, Vijay Chaikam y George Mahuku



CIMMYT^{INTL}

Centro Internacional de
Mejoramiento de Maíz y Trigo

Tecnología de

Dobles haploides

en el mejoramiento de maíz:
Teoría y práctica

Editores

B.M. Prasanna, Vijay Chaikam y George Mahuku

Aprovechamos este espacio para dar las gracias al Ing. Leocadio Martínez, asistente de investigación en la estación experimental del CIMMYT en Agua Fría, por haber revisado la parte técnica de la traducción al español de este manual.

El Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) (www.cimmyt.org) es un organismo internacional, sin fines de lucro, que se dedica a la investigación científica y la capacitación relacionada con el maíz y el trigo. La labor del Centro está encaminada a reducir la pobreza y el hambre de manera sustentable, elevando la productividad del maíz y el trigo en el mundo en desarrollo. El CIMMYT conserva en su banco de germoplasma la colección más grande de maíz y trigo del mundo, y se le conoce por haber iniciado la Revolución Verde, que salvó la vida de millones de personas en Asia y por lo cual se otorgó el Premio Nobel de la Paz al Dr. Norman Borlaug, científico del CIMMYT. El CIMMYT es miembro del Consorcio del CGIAR y recibe fondos de gobiernos nacionales, fundaciones, bancos de desarrollo y otras instituciones de los sectores público y privado.

© **Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) 2013.** Todos los derechos reservados. Las designaciones empleadas en la presentación de los materiales incluidos en esta publicación de ninguna manera expresan la opinión del CIMMYT o de sus patrocinadores respecto al estado legal de cualquier país, territorio, ciudad o zona, o de las autoridades de éstos, o respecto a la delimitación de sus fronteras. Las opiniones expresadas en esta publicación son responsabilidad de los autores y no necesariamente reflejan aquellas del CIMMYT o de sus colaboradores. El CIMMYT autoriza el uso razonable de este material, siempre y cuando se cite la fuente.

Cita correcta: B.M. Prasanna, Vijay Chaikam y George Mahuku (editores). 2013. *Tecnología de dobles haploides en el mejoramiento de maíz: Teoría y práctica*. México, D.F.: CIMMYT.

Resumen: Este manual está destinado principalmente a los mejoradores de maíz de los sistemas nacionales de investigación agrícola y de compañías semilleras pequeñas y medianas en los países en desarrollo que quieran saber más y utilizar la tecnología de dobles haploides (DH) en programas de mejoramiento. Es una compilación e integración de conocimientos acumulados gracias a la contribución de varios genetistas y mejoradores de maíz, así como de protocolos que ha generado (en colaboración con la Universidad de Hohenheim, Alemania) y utiliza el Programa Global de Maíz del CIMMYT en el desarrollo de líneas DH, sobre todo en México. La primera parte del manual contiene una descripción general de la utilidad y las aplicaciones de la tecnología DH en el mejoramiento de maíz. Los siguientes capítulos tratan sobre inducción de haploides maternos *in vivo*, detección de granos haploides utilizando marcadores de antocianina, duplicación cromosómica de haploides, semilla DH de plantas que han sido tratadas con colchicina, integración de marcadores moleculares en el programa de mejoramiento con DH, DH en el mejoramiento de maíz comercial y, por último, acceso a inductores de haploíδια tropicalizados y servicio de DH, con recuperación de gastos, para los colaboradores del CIMMYT.

ISBN: 978-607-8263-06-6

Descriptor AGROVOC: *Zea mays*; fitomejoramiento; características agronómicas; marcadores moleculares; selección; propiedad intelectual; derechos de propiedad intelectual

Códigos de categoría AGRIS: F30 Mejoramiento de plantas

Clasificación decimal Dewey: 633.150575

Impreso en México.

Agradecimientos

Los autores de este manual expresan su sincero agradecimiento a todas las personas, instituciones y donadores que nos brindaron su gran apoyo, por las contribuciones que hicieron al trabajo de investigación sobre haploides dobles (DH) que el CIMMYT realizó en los cinco años pasados. Esta obra no habría sido posible sin ellos. Un reconocimiento especial para:

- El Prof. Dr. Albrecht E. Melchinger, el Dr. Wolfgang Schipprack y el equipo de HD de la Universidad de Hohenheim (Alemania), incluidas las estudiantes de doctorado Vanessa Prigge y Aida Kebede, por su gran apoyo al CIMMYT en la transferencia de la tecnología DH y por optimizar varios de los pasos del programa de producción de DH;
- La Dra. Marianne Bänziger por sus ideas, visión y apoyo, que hicieron posible la colaboración del CIMMYT con la Universidad de Hohenheim;
- El Dr. José Luis Araus, quien coordinó las primeras actividades de dicha colaboración entre las dos instituciones;
- La Dra. Natalia Palacios, Luis Galicia y Miguel Bojorges Cortés por su valiosa ayuda con los procesos de duplicación utilizando colchicina y por la capacitación en el manejo seguro de esta sustancia;
- Nuestros colegas del CIMMYT (en especial a los Dres. Gary Atlin, Daniel Jeffers y Kevin Pixley) por sus importantes aportaciones para fortalecer el programa de DH;
- Al equipo de DH del CIMMYT-México, por su profesionalismo y buena disposición para trabajar: Leocadio Martínez Hernández, Luis Antonio López Rodríguez, Juana Roldán Valencia, Ana Mely Islas Montes, Gustavo Alberto Martínez Rodríguez, Zaira Ivette Mata Carrillo, Belem Adriana Cervantes Hernández, Juan Antonio Díaz Ríos, César Muñoz Galindo, Reymundo Blancas, Pablo Ostría, Jabel Bahena Torrez, Miguel Ángel Díaz, Marta Cano, Germán Bastián De León, Blanca Flor Pineda González, Dany Fajardo Romero, Edith Hernández Márquez, Francisco Hernández Fajardo, Emiliano Reyes Espinoza, Leonardo Juárez Agustín, Ignacio Morales Guzmán, Faustino López Hernández, Eduardo Fernández Cruz, Yesenia López Vázquez, Marcela Santos Hernández, Verónica Román Álvarez y Belén Paredes Hernández.
- Los superintendentes de la estación experimental Agua Fría, Raymundo López y Ciro Sánchez, por el manejo tan eficiente de la logística en el campo, factor importante que permitió cumplir con los objetivos del programa de producción de líneas DH;
- Los científicos visitantes Alba Lucía Arcos (Colombia), Thanh Duc Nguyen, Hung Huu Nguyen y Ha Thai (Vietnam), por sus útiles comentarios y opiniones que permitieron perfeccionar algunos aspectos del desarrollo de líneas DH;
- Las Unidades de Propiedad Intelectual y Asuntos Jurídicos, en especial a Rodrigo Sara y la Dra. Carolina Roa, por su valiosa asesoría en los procesos relacionados con los asuntos de propiedad intelectual;
- Todos los organismos donadores que tan generosamente han contribuido a la investigación de DH en el CIMMYT, en especial a la Fundación Bill & Melinda Gates, al CGIAR (por conducto del CRP MAÍZ), la SAGARPA, la Fundación Howard G. Buffet, USAID y Vilmorin, mediante varios proyectos, entre ellos, DTMA y MasAgro-IMIC; y
- El equipo de Comunicaciones Corporativas por la traducción al español y el formateo del manual.

Índice

Capítulo		Autores	Página
1	Tecnología de dobles haploides (DH) en el mejoramiento de maíz: Descripción general	B.M. Prasanna	1
2	Inducción <i>in vivo</i> de haploidía en progenitores maternos de maíz	Vijay Chaikam	9
3	Diseño e implementación de un esquema de inducción de haploidía con efecto materno	Vijay Chaikam, George Mahuku y B.M. Prasanna	14
4	Detección de haploides maternos utilizando marcadores de antocianina	Vijay Chaikam y B.M. Prasanna	20
5	Duplicación de cromosomas de haploides maternos	Vijay Chaikam y George Mahuku	24
6	Manejo de supuestas plántulas DH: Del laboratorio al campo	George Mahuku	31
7	Integración de selección asistida por marcadores en el sistema de mejoramiento de DH para acelerar el desarrollo y la distribución de líneas progenitoras y variedades superiores	R. Babu, Sudha K. Nair, B.S. Vivek, Félix San Vicente y B.M. Prasanna	40
8	DH en el mejoramiento de maíz comercial: Selecciones fenotípicas	Daniel Jeffers y George Mahuku	47
9	Acceso a líneas inductores de haploidía tropicalizadas y servicio de DH a los colaboradores del CIMMYT	B.M. Prasanna, Vijay Chaikam, George Mahuku y Rodrigo Sara	50

1. Tecnología de dobles haploides en el mejoramiento de maíz: Descripción general

B.M. Prasanna

Introducción

Un “doble haploide” (DH) es un genotipo que se forma cuando las células (n) de un haploide experimentan un proceso, espontáneo o inducido artificialmente, de duplicación cromosómica. Chase (1947, 1951, 1952, 1969) fue el primero en estudiar los monoploides de maíz (sinónimo de haploides, en el caso del maíz) y utilizar líneas DH en el mejoramiento. La tecnología DH acorta el ciclo de mejoramiento de manera considerable porque hace posible un rápido desarrollo de líneas totalmente homocigotas (en 2 ó 3 generaciones), en comparación con el proceso convencional de desarrollo de líneas endogámicas que tarda por lo menos 6 u 8 generaciones para obtener líneas con ~99% de homocigosis (Forster y Thomas, 2005; Geiger y Gordillo, 2009; Chang y Coe, 2009).

En un principio, Chase se basó en la inducción y la duplicación espontánea de haploides, que, por su baja frecuencia, no resultaron muy aptas para aplicarse con fines comerciales. Los fundamentos de la inducción de haploides *in vivo* asistida por inductores de haploidía se establecieron cuando Coe (1959) describió “una línea de maíz con alta frecuencia de haploidía” de 2.3%, a la cual denominó “Stock 6”. Este material genético sirvió como base de una serie de inductores con tasas de inducción más elevadas (HIR = número de granos con embriones haploides divididos entre todos los granos incluidos en el estudio) que fueron desarrollados gracias a los esfuerzos subsiguientes de genetistas de maíz en todo el mundo.

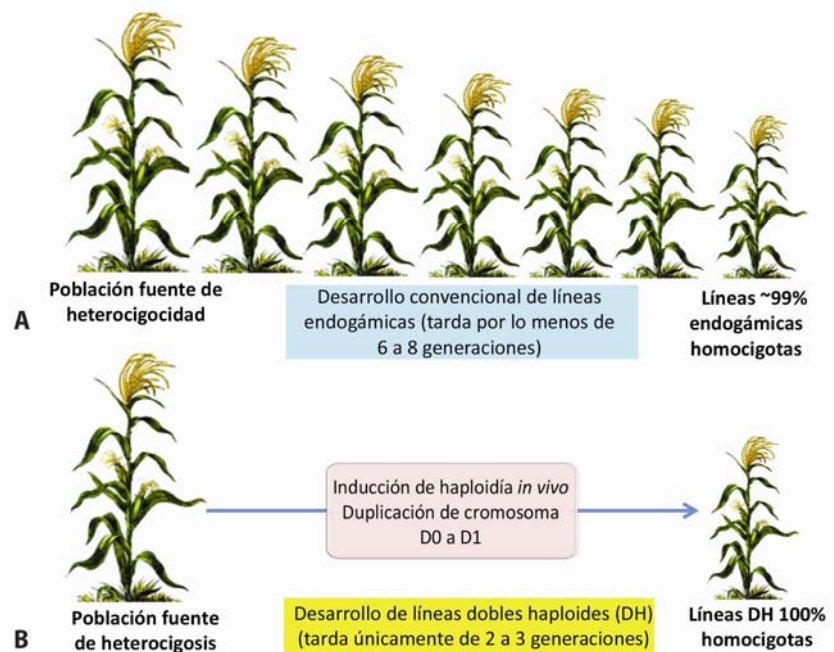


Figura 1. Número de generaciones requerido para obtener pureza genética (homocigosis) por medio de (A) endogamia convencional; (B) tecnología de dobles haploides.

Aunque varias instituciones han generado líneas DH de maíz con métodos ya sea *in vitro* o *in vivo*, los primeros han tenido poco éxito por la falta de respuesta de muchos genotipos de maíz y porque, además, es necesario contar con un buen laboratorio y personal bien capacitado. En cambio, generar líneas DH de maíz utilizando inducción de haploidía *in vivo* resulta relativamente más sencillo, gracias a los esfuerzos de algunos genetistas de maíz que identificaron “materiales genéticos inductores de haploidía” (Coe, 1959; Coe y Sarkar, 1964), y que además incorporaron un marcador de color a base de antocianina en la configuración genética de los inductores, a fin de facilitar la identificación de haploides, tanto en la semilla como en la etapa de plántula (Nanda y Chase, 1966; Greenblatt y Bock, 1967; Chase, 1969) y que produjeron nuevos inductores de haploidía con HIR más alta.

La tecnología DH en el mejoramiento de maíz, basada en la inducción de haploidía *in vivo*, es reconocida a nivel mundial como un importante medio para aumentar la eficiencia del mejoramiento. En los últimos 10 a 15 años, la tecnología fue adoptada por varios programas fitotécnicos comerciales de maíz de Europa (Schmidt, 2003), Norteamérica (Seitz, 2005) y, más recientemente, China (Chen et al., 2009), casi en seguida de que aparecieron las líneas inductoras de haploidía para ambientes templados (Prigge y Melchinger, 2011). Sin embargo, algunas instituciones dedicadas al mejoramiento de maíz del sector público, así como pequeñas y medianas empresas semilleras (PyMES) en los países productores de maíz tropical en América Latina, África subsahariana y Asia, aún no tienen acceso a esta tecnología (Prasanna et al., 2010; Kebede et al., 2011). Esto se debe a diversos factores, como la falta de conocimiento sobre la tecnología DH, la falta de acceso a inductores de haploidía tropicalizados o por no saber cómo integrarla de manera eficaz en los programas de mejoramiento. Por tanto, este manual tiene como propósito servir de guía teórico-práctico en el uso de la tecnología DH en el mejoramiento del maíz.

¿Por qué utilizar DH en el mejoramiento del maíz?

La tecnología DH ofrece una serie de ventajas en la genética y el mejoramiento del maíz (Röber et al., 2005; Geiger, 2009; Geiger y Gordillo, 2009); a continuación se mencionan algunas de las más importantes:

- (1) Acorta de manera considerable el ciclo de mejoramiento al permitir obtener líneas completamente homocigotas en dos generaciones;
- (2) Simplifica la logística (Geiger y Gordillo, 2009), por ejemplo, se necesitan menos tiempo, mano de obra y recursos económicos para generar líneas nuevas de mejoramiento; tanto el tiempo como los recursos que se ahorran podrían destinarse a la implementación de procesos de selección más eficaces y la rápida liberación de variedades elite;
- (3) Permite lograr una mayor eficiencia y precisión en la selección (Röber et al., 2005; Geiger y Gordillo, 2009), sobre todo cuando se le utiliza junto con marcadores moleculares y viveros sembrados todo el año;
- (4) Acelera la creación de productos porque permite conjuntar en forma piramidal los alelos favorables de caracteres poligénicos que influyen en la productividad y en la resistencia del maíz al estrés, caracteres que resultan difíciles y lentos de combinar en germoplasma adaptado utilizando las prácticas fitotécnicas convencionales;
- (5) Cumple perfectamente los requisitos de DUS (siglas en inglés de distinción, uniformidad y estabilidad) necesarios para la protección de variedades vegetales, por la total homocigosis y homogeneidad de las líneas parentales DH (Geiger y Gordillo, 2009);
- (6) Reduce las actividades de mantenimiento de las líneas (Röber et al., 2005);
- (7) Si se le combina con marcadores moleculares, facilita el acceso al germoplasma presente en las líneas parentales, ya sea femeninas o masculinas, de los híbridos (Heckenberger et al., 2005); y
- (8) Ofrece la oportunidad de realizar estudios de la asociación entre marcadores y caracteres, introgresión de genes con la ayuda de marcadores (Forster y Thomas, 2005), genómica funcional, citogenética molecular e ingeniería genética (Forster et al., 2007; Wijnker et al., 2007).

Desarrollo de DH mediante inducción *in vivo* de haploidía en un progenitor materno

Inducción de haploidía

Los inductores de haploidía son cepas genéticas especializadas que, cuando se les cruza con una planta diploide (normal) de maíz, producen granos en una mazorca con segregación de granos diploides ($2n$) y una cierta fracción de granos haploides (n), a causa de la fertilización anómala. Los granos con un embrión haploide tienen un endospermo triploide regular ($3n$) y, por tanto, su capacidad de germinación es similar a la de los granos que tienen un embrión diploide (Coe y Sarkar, 1964).

El programa de inducción *in vivo* de haploidía en progenitores maternos actualmente depende de la presencia de un marcador de color a base de antocianina denominado *R1-Navajo* (*R1-nj*), que se expresa en la aleurona (capa externa del endospermo del maíz) y en el embrión (escutelo) del inductor de haploidía, a diferencia de las poblaciones fuente, que no suelen tener coloración de antocianina ni en el embrión ni el endospermo. Por

tanto, *R1-nj* como marcador de color dominante ayuda a diferenciar los granos monoploides o haploides (*n*) (sin expresión de antocianina de color morado o rojo en el escutelo, pero con la típica coloración de la corona en el endospermo) de los granos diploides (*2n*) (con expresión de antocianina tanto en el endospermo como en el escutelo) (Nanda y Chase, 1966; Greenblatt y Bock, 1967; Chase, 1969). Los granos normales sin coloración son resultado ya sea de autofecundación o contaminación externa. Sin embargo, cabe señalar que la expresión del marcador de color *R1-nj* puede variar de manera significativa, dependiendo de la composición genética del genotipo fuente (en el cual es necesario inducir los haploides hembra), la composición genética del inductor de haploidía, y de los factores medioambientales (Chase, 1952; Röber et al., 2005; Kebede et al., 2011; Prigge et al., 2011).

Inductores de haploidía de clima templado: A través de los años se han obtenido muchas líneas inductoras de haploidía con una alta tasa de inducción (HIR) y para uso comercial, con Stock 6 como base, entre las cuales se pueden mencionar: (1) **KMS** (Korichnevsky Marker Saratovsky) y **ZMS**, ambas derivadas de Stock 6 (Tyrnov y Zavalishina 1984, citadas en Chebotar y Chalyk, 1996); (2) **WS14**, que se generó a partir de una cruce entre líneas W23ig y Stock 6 (Lashermes y Beckert, 1988); (3) **KEMS** (Krasnador Embryo Marker Synthetic), derivado de una cruce (Shatskaya et al., 1994); (4); **MHI** (Inductor de haploidía de Moldavia), derivado de la cruce KMS × ZMS (Eder y Chalyk, 2002); (5) **RWS** (Inductor ruso KEMS + WS14), descendiente de la cruce KEMS × WS14 (Röber et al., 2005); (6) **UH400**, generada en la Universidad de Hohenheim a partir de KEMS (citada en Chang y Coe, 2009); (7) **PK6** (Barret et al., 2008); (8) **HZ11**, derivada de Stock 6 (Zhang et al., 2008); (9) **CAUHOI**, derivada en la Universidad Agraria de China de la cruce entre Stock 6 y la población Beijing con alto contenido de aceite (Li et al., 2009), y (10) **PHI** (Inductor de haploidía Procera), derivado de la cruce entre MHI y Stock 6 (Rotarencu et al., 2010).

Los inductores templados UH400, RWS, y RWS × UH400 se utilizaron con buenos resultados en la inducción de haploidía y la creación de líneas DH del germoplasma fuente tropical y subtropical del CIMMYT, desde 2007 hasta 2011, pese a que no están bien adaptados a las condiciones en tierras tropicales bajas (Prigge et al., 2011). Sin embargo, la producción eficiente y a gran escala de líneas DH en las zonas tropicales productoras de maíz, con inductores templados, podría verse seriamente afectada dado el poco vigor, la escasa producción de polen, la escasa formación de semilla y el alto grado de susceptibilidad a las enfermedades tropicales de maíz de estos inductores.

Inductores de haploidía tropicalizados: Desde 2007, el Programa Global de Maíz del CIMMYT, en colaboración con la Universidad de Hohenheim, Alemania, ha trabajado intensamente en la optimización de la tecnología DH, sobre todo para las zonas tropicales y subtropicales productoras de maíz. Se han generado líneas inductoras de haploidía tropicalizadas (LIHT; con una HIR de 8 a 10%) gracias a esta asociación colaborativa (Prigge et al., 2011). La evaluación realizada de la primera generación de LIHT en dos ambientes (Agua Fría y Tlaltzapán, México) durante dos ciclos, arrojó una HIR promedio de 9 a 14%. Fue creado un inductor de haploidía e híbrido de cruce simple (con una tasa de inducción aceptable) utilizando un subgrupo de LIHT. Estos inductores de haploidía tropicalizados están ahora a disposición de las instituciones que se interesen en utilizarlos con fines de investigación o comerciales bajo ciertos términos y condiciones: <http://repository.cimmyt.org/xmlui/bitstream/handle/10883/1369/97395.pdf?sequence=1>. Con la liberación de estas líneas se espera aumentar de forma considerable la eficiencia de la producción de líneas DH, incrementar la formación de semilla y las tasas de inducción, así como reducir los costos de mantener las líneas inductoras y de producir semilla.

Vía para el desarrollo de DH y planes para perfeccionar los procedimientos

Debe tenerse en cuenta que el desarrollo eficiente de materiales DH depende no solo del acceso a inductores de haploidía tropicalizados con alta HIR, sino también de varios otros pasos importantes en la línea de producción. Los principales pasos para generar líneas DH son: (1) cruce de poblaciones fuente (normalmente un híbrido generado utilizando las líneas deseadas o líneas F₂ derivadas de la autopolinización del híbrido) como progenitor hembra con polen del inductor de haploidía; (2) identificación de granos haploides (en la etapa en que la semilla se seca) utilizando marcadores de color a base de antocianina; (3) germinación de las semillas

haploides; (4) aplicación segura y eficaz de colchicina, o cualquier otro agente duplicador de cromosomas, a las plántulas haploides; (5) manejo agronómico apropiado de las plántulas D0 y derivación de semilla D1 (DH) de plantas D0 autofecundadas; y (6) selección y utilización de líneas DH en los programas de mejoramiento. Los siguientes capítulos del manual contienen información teórico-práctica de cada uno de estos pasos. A continuación mencionamos algunos pasos importantes que están siendo perfeccionados mediante investigaciones que actualmente se están realizando en diferentes instituciones del mundo.

Identificación de haploides: Aunque el esquema de identificación de haploides utilizando el marcador *R1-nj* es, en general, bastante eficaz, no está exento de algunas fallas. La presencia de genes dominantes inhibidores de la antocianina (como *C1-I*, *C2-Idf* e *In1-D*) en la población fuente o en el genoma donador (Coe, 1994) o los efectos de las dosis aplicadas a veces pueden ser la causa de que este esquema resulte ineficaz. Actualmente se realiza una evaluación del germoplasma elite del CIMMYT para determinar hasta qué punto funciona el marcador de color en la semilla y permite hacer una detección eficiente de la semilla haploide. Por ahora, parece ser que la expresión de color de *R1-nj* se inhibe en solo el 8% de las cruas entre inductores de haploidía y diversas poblaciones fuente.

Se encontró que el uso de inductores de haploidía con los genes de antocianina *B1 (Booster1)* y *Pl1 (Purple1)* que producen pigmentación púrpura independiente de la luz solar en el tejido de la planta (coleóptilo y raíz), es apropiado en aquellos casos en que no es posible clasificar los haploides en la etapa de secado de la semilla (Rotarencó et al., 2010). En este caso, un coleóptilo o una raíz con pigmentación en la etapa inicial del desarrollo indica que existe diploidía, en tanto que las plántulas sin pigmentación pueden clasificarse como haploides (Geiger y Gordillo, 2009; Rotarencó et al., 2010). Aunque el CIMMYT tiene unas cuantas poblaciones retrocruzadas en las que se combina el marcador de coloración de la raíz con el gene *R1-nj*, es necesario establecer la HIR, la estabilidad agronómica y la utilidad de este esquema alternativo de marcadores en la producción de DH.

Para evitar posibles errores en la clasificación de haploides a causa de la escasa expresión del marcador de color a base de antocianina en semilla seca, Rotarencó et al. (2007) propusieron que la identificación de haploides se hiciera basándose en el contenido de aceite en el grano, cuya determinación se puede automatizar utilizando técnicas de la resonancia nuclear magnética (RSM). Li et al. (2009) crearon CAUHOI, que es un inductor derivado de Stock 6 con una HIR de ~2% y alto contenido de aceite (78 g kg^{-1}) en el grano, que permite identificar haploides, basándose tanto en la ausencia de coloración del escutelo conferida por *R1-nj*, como en el bajo contenido de aceite en los embriones. Aunque este novedoso método parece promisorio, es necesario estudiar más a fondo su confiabilidad y aplicabilidad en la producción de alto rendimiento de DH en composiciones genéticas tropicales. Jones et al. (2012) evaluaron la utilidad de la espectroscopia del infrarrojo cercano para diferenciar los granos haploides de los granos híbridos de maíz después de realizar la inducción de haploidía en progenitores maternos.

Duplicación cromosómica: Varias instituciones, entre ellas el CIMMYT, utilizan actualmente colchicina como agente duplicador de cromosomas (o inhibidor mitótico) en la producción de DH, ya que la duplicación espontánea de cromosomas ocurre a una tasa muy baja (Chase, 1969; Deimling et al., 1997). Sin embargo, el tratamiento con colchicina no siempre es eficaz y puede producir la diploidización sectorial de las inflorescencias masculinas y/o femeninas. Aun más importante es el hecho de que la colchicina es altamente cancerígena, por lo que debe aplicarse con mucho cuidado y eliminarse de manera segura. Se ha informado que herbicidas como Pronamid, APM, trifluralín y orizalín son inhibidores mitóticos eficaces (Häntzchel y Weber, 2010), menos costosos y menos tóxicos que la colchicina, y su manejo y eliminación son más sencillos. Varias empresas comerciales de mejoramiento aplican productos patentados de duplicación artificial de cromosomas, que son menos tóxicos y más seguros que la colchicina (Geiger y Gordillo, 2009).

Manejo agronómico: Para poder generar líneas DH, resulta crucial dar un manejo agronómico óptimo a las plántulas D0 tratadas con colchicina, primero en el invernadero y después en el campo, tal como se describe en el Capítulo 5 de este manual. La optimización del régimen de riego, la aplicación de fertilizante y la mecanización de las operaciones (si fuera posible), así como un buen manejo de malezas, enfermedades y

plagas, son factores determinantes para disminuir el estrés ambiental que afecta a las plantas D0 y obtener mejores resultados en la producción de líneas DH. Además de un manejo agronómico apropiado, se requiere que sean óptimas las condiciones edafológicas y climáticas del sitio donde se llevan a cabo las actividades para obtener esas líneas.

Mecanismos que sustentan la inducción de haploidía en progenitores maternos

Como se explica en el Capítulo 2, se han hecho varios estudios desde la década de 1960 (revisados por Edir y Chalyk, 2002; Geiger y Gordillo, 2009) dirigidos a entender el mecanismo o los mecanismos biológicos que sustentan la inducción *in vivo* de haploidía en progenitores maternos. Si bien es cierto que se han encontrado algunos indicios significativos, aún no se entienden del todo los mecanismos exactos que controlan la inducción de haploidía en progenitores maternos. Sin embargo, esto no ha impedido la derivación en gran escala de líneas DH y la utilización de líneas progenitoras DH en la generación y utilización de variedades de maíz comerciales, sobre todo por parte de los principales programas de mejoramiento de maíz comercial.

Los análisis genéticos de la inducción de haploidía en progenitores maternos han revelado que esta característica está controlada de forma poligénica (Lashermes y Beckert, 1988; Deimling et al., 1997; Röber et al, 2005). El mapeo de *loci* de caracteres cuantitativos (QTL, siglas en inglés) dirigido a identificar la capacidad de inducción de haploidía *in vivo* indican que este carácter es controlado por uno o unos cuantos QTL mayores y varios QTL modificadores y/o de efecto pequeño. Un QTL mayor en el cromosoma 1 (*qhir1*, en bin 1.04) explicó hasta 66% de la variación genética de la capacidad de inducción de haploidía en tres poblaciones que contenían un progenitor no inductor y un QTL que mejora la HIR (Prigge et al. 2012). Es posible que la identificación y validación de los marcadores útiles para los mejoradores de este QTL mayor y la introgresión asistida por marcadores del alelo favorable pudieran acelerar la generación de inductores de haploidía tropicalizados y mejorados con alta HIR y adaptación local.

Tecnología DH y marcadores moleculares, una potente combinación

Esta tecnología ofrece una manera más rápida de obtener líneas completamente homocigotas y, por ello, puede ahorrar una gran cantidad de tiempo y recursos cuando se implementan estudios genéticos y/o proyectos de mejoramiento molecular, como por ejemplo:

1. Elaboración de mapas genéticos (Chang y Coe, 2009; Forster et al., 2007), que es una de las aplicaciones más comunes de las poblaciones DH en muchas especies cultivadas;
2. Identificación de asociaciones marcador-carácter utilizando poblaciones DH apropiadas (con progenitores de poblaciones fuente cuyos fenotipos muestran un contraste significativo), que además conduzcan a la utilización de marcadores en la selección asistida por marcadores (SAM);
3. Genotipado de alta densidad de las líneas DH para seleccionar líneas progenitoras con genotipos (o haplotipos) complementarios que se utilizarán en la generación de híbridos que serán sometidos a más experimentación;
4. Combinación de la tecnología *seed-chipping* (que consiste en analizar cada una de las semillas antes de sembrarlas y sembrar solo aquellas con potencial de producción) en la



Figura 2. Esquema que ilustra cómo aumentar la eficiencia y los avances genéticos del mejoramiento de maíz utilizando una combinación de tecnologías y estrategias modernas.

selección asistida por marcadores de líneas DH para caracteres heredados de manera relativamente simple (por ejemplo, enriquecimiento con provitamina A), usando marcadores confiables de genes o alelos cuya contribución a la variación fenotípica es alta, lo cual podría ser más rápido, económico y eficaz que el fenotipado de las líneas DH;

5. La utilidad potencial de las líneas DH en la implementación de la selección del genoma completo (es decir, selección genómica o SG; Meuwissen et al., 2001; Jannink et al., 2010) para mejorar caracteres poligénicos complejos con baja heredabilidad (por ejemplo, rendimiento de grano y tolerancia al estrés abiótico) o cuando N (tamaño de la población) es pequeño (Bernardo y Yu, 2007; Lorenzana y Bernardo, 2009; Mayor y Bernardo, 2009); y
6. Potencial complementario de la tecnología DH y SAM para derivar líneas DH a partir de cruza de dos progenitores, cuando el objetivo es obtener líneas genéticamente similares a cualquiera de los progenitores de la cruce (Smith et al., 2008), o para identificar recombinantes en loci específicos o en loci a un lado de éstos. Probablemente la aplicación más frecuente de este método es cuando se usan protocolos de conversión de líneas DH en lugar de las retrocruzas convencionales, que son más lentas (Forster y Thomas, 2005).

Perspectivas a futuro

Es indudable que la tecnología DH constituye un medio útil y valioso de modernizar las operaciones de mejoramiento de maíz utilizando una logística simplificada y una inversión mucho menor de recursos para derivar líneas completamente homocigotas destinadas a la generación de híbridos. La implementación de la tecnología DH requiere que los programas de mejoramiento cuenten con nuevas capacidades, tanto para producir líneas DH como para integrarlas de manera eficiente en el proceso de mejoramiento. En primer lugar, los principales pasos de la producción de líneas DH (inducción de haploidía, identificación de haploides, duplicación cromosómica y recuperación de líneas DH) requieren la implementación de prácticas eficaces (y seguras), así como dar una capacitación apropiada al personal científico-técnico. En segundo lugar, las plantas haploides de maíz derivadas mediante inducción *in vivo* y duplicación cromosómica suelen ser débiles y vulnerables a estreses ambientales, como el calor excesivo, las plagas de insectos y las enfermedades. En tercer lugar, el potencial que tiene esta tecnología para aumentar los avances genéticos y la eficiencia del mejoramiento y, finalmente, acelerar el desarrollo de híbridos elite, solo podrá realizarse si se le combina de manera eficaz con la selección asistida por marcadores y la siembra de viveros todo el año. Por tanto, para que las instituciones de países tropicales o subtropicales productores de maíz puedan implementar de manera eficaz la generación de líneas DH, tendrán que considerar detenidamente todos estos factores.

Con el apoyo financiero de la Fundación Bill & Melinda Gates, el CIMMYT pronto establecerá instalaciones centralizadas dedicadas a la generación de maíz DH para África subsahariana. La idea es atender principalmente la demanda de DH de instituciones de investigación públicas (sin fines de lucro) que forman parte de las redes de mejoramiento que coordinan el CIMMYT y el Instituto Internacional de Agricultura Tropical (IITA), así como proveer (durante cierto tiempo), a bajo costo, un servicio de tecnología DH a empresas semilleras pequeñas y medianas de esa región. Asimismo, el CIMMYT planea poner en operación un centro de servicio DH en América Latina, y, posteriormente, uno similar en Asia, por conducto del Consorcio Internacional de Mejoramiento de Maíz.

Referencias

- Barret P, Brinkmann M, Beckert M (2008) A major locus expressed in the male gametophyte with incomplete penetrance is responsible for *in situ* gynogenesis in maize. *Theor. Appl. Genet.* 117: 581–594.
- Bernardo R, Yu J (2007) Prospects for genomewide selection for quantitative traits in maize. *Crop Sci.* 47: 1082–1090.
- Chang MT, Coe EH (2009) Doubled haploids. In: AL Kriz, BA Larkins (eds) *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol. 63. Molecular Genetic Approaches to Maize Improvement. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 127–142.
- Chase SS (1947) Techniques for isolating monoploid maize plants. *J. Bot.* 34: 582.
- Chase SS (1951) Production of homozygous diploids of maize from monoploids. *Agron. J.* 44: 263–267.

- Chase SS (1952) Monoploids in maize. Iowa State College Press, Ames, Iowa, pp. 389–399.
- Chase SS (1969) Monoploids and monoploid-derivatives in maize (*Zea mays* L.). *The Botanical Reviews* 35: 117–167.
- Chebotař OD, Chalyk ST (1996) The use of maternal haploids for genetic analysis of the number of kernel rows per ear in maize. *Hereditas* 124: 173–178.
- Chen S, Li L, Li H (2009) Maize doubled haploid breeding [in Chinese]. China Agricultural University Press, Beijing.
- Coe EH (1959) A line of maize with high haploid frequency. *Am. Naturalist* 93: 381–382.
- Coe EH (1994) Anthocyanin genetics. In: M Freeling, V Walbot (eds) The maize handbook. Springer-Verlag, New York, pp. 279–281.
- Coe EH, Sarkar KR (1964) The detection of haploids in maize. *J. Heredity* 55: 231–233.
- Deimling S, Röber FK, Geiger HH (1997) Methodology and genetics of *in vivo* haploid induction in maize [en alemán]. *Vortr Pflanzenz üchtg* 38: 203–224.
- Eder J, Chalyk ST (2002) *In vivo* haploid induction in maize. *Theor. Appl. Genet.* 104: 703–708.
- Forster BP, Heberle-Bors E, Kasha KJ, Touraev A (2007) The resurgence of haploids in higher plants. *Trends in Plant Sci.* 12: 368–375.
- Forster BP, Thomas WTB (2005) Doubled haploids in genetics and plant breeding. *Plant Breed Rev.* 25: 57–88.
- Geiger HH (2009) Doubled haploids. In: JL Bennetzen, S Hake (eds.) Maize handbook – volume II: genetics and genomics. Springer Science and Business Media, New York, pp. 641–657.
- Geiger HH, Gordillo GA (2009) Doubled haploids in hybrid maize breeding. *Maydica* 54: 485–499.
- Greenblatt IM, Bock M (1967) A commercially desirable procedure for detection of monoploids in maize. *J. Hered.* 58: 9–13.
- Häntzschel KR, Weber G (2010) Blockage of mitosis in maize root tips using colchicine-alternatives. *Protoplasma* 241: 99–104.
- Heckenberger M, Bohn M, Melchinger AE (2005) Identification of essentially derived varieties obtained from biparental crosses of homozygous lines: I. Simple sequence repeat data from maize inbreds. *Crop Sci.* 45: 1120–1131.
- Jannink J-L, Lorenz AJ, Iwata H (2010) Genomic selection in plant breeding: from theory to practice. *Briefings in Functional Genomics* 9: 166–177.
- Jones RW, Reinot T, Frei UK, Tseng Y, Lubberstedt T, McClelland JF (2012) Selection of haploid maize kernels from hybrid kernels for plant breeding using near-infrared spectroscopy and SIMCA analysis. *Applied Spectroscopy* 66:447–450.
- Kebede AZ, Dhillon, B.S., Schipprack, W., Araus, J.L., Banziger, M., Semagan, K., Alvarado, G., and Melchinger AE (2011) Effect of source germplasm and season on the *in vivo* haploid induction rate in tropical maize. *Euphytica* 180: 219–226.
- Lashermes P, Beckert M (1988) Genetic control of maternal haploidy in maize (*Zea mays* L.) and selection of haploid inducing lines. *Theor. Appl. Genet.* 76: 404–410.
- Li L, Xu X, Jin W, Chen S (2009) Morphological and molecular evidences for DNA introgression in haploid induction via a high oil inducer CAUHOI in maize. *Planta* 230: 367–376.
- Lorenzana RE, Bernardo R (2009) Accuracy of genetic value predictions for marker-based selection in biparental plant populations. *Theor. Appl. Genet.* 120: 151–161.
- Mayor PJ, Bernardo R (2009) Genomewide selection and marker-assisted recurrent selection in doubled haploid versus F2 populations. *Crop Sci.* 49: 1719–1725.
- Meuwissen THE, Hayes BJ, Goddard ME (2001) Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. *Genetics* 157: 1819–1829.
- Nanda DK, Chase SS (1966) An embryo marker for detecting monoploids of maize (*Zea mays* L.). *Crop Sci* 6: 213–215.
- Prasanna BM, Pixley K, Warburton ML, Xie CX (2010) Molecular marker-assisted breeding options for maize improvement in Asia. *Mol. Breed.* 26: 339–356.
- Prigge V, Melchinger AE (2011) Production of haploids and doubled haploids in maize. In: VM Loyola-Vargas, Ochoa-Alejo N (eds) Plant cell culture protocols, 3rd edition. Humana Press-Springer Verlag, Totowa, New Jersey.
- Prigge V, C Sanchez, BS Dhillon, W Schipprack, JL Araus, M Banziger, AE Melchinger (2011) Doubled haploids in tropical maize: I. Effects of inducers and source germplasm on *in vivo* haploid induction rates. *Crop Sci.* 51: 1498–1506.

- Prigge V, Xu XW, Li L, Babu R, Chen SJ, Atlin GN, Melchinger AE (2012) New insights into the genetics of *in vivo* induction of maternal haploids, the backbone of doubled haploid technology in maize. *Genetics* 111: 781–793.
- Röber FK, Gordillo GA, Geiger HH (2005) *In vivo* haploid induction in maize – performance of new inducers and significance of doubled haploid lines in hybrid breeding. *Maydica* 50: 275–283.
- Rotarencu VA, Kirtoca IH, Jacota AG (2007) Possibility to identify kernels with haploid embryo by oil content. *Maize Genet. Coop. Newslett.* 81: 11.
- Rotarencu VA, Dicu G, State D, Fuaia S (2010) New inducers of maternal haploids in maize. *Maize Genet. Coop. Newslett.* 84: 15.
- Schmidt W (2003) Hybrid maize breeding at KWS SAAT AG. En: Bericht über die Arbeitstagung der Vereinigung der Pflanzzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs, Gumpenstein, Österreich, 25–27 November, pp. 1–6.
- Seitz G (2005) The use of doubled haploids in corn breeding. In: Proc. 41st Annual Illinois Corn Breeders' School 2005. Urbana-Champaign, Illinois, pp. 1–7.
- Shatskaya OA, Zabirowa ER, Shcherbak VS, Chumak MV (1994) Mass induction of maternal haploids. *Maize Genetics Coop. Newslett.* 68: 51.
- Smith JSC, Hussain T, Jones ES, Graham G, Podlich D, Wall S, Williams M (2008) Use of doubled haploids in maize breeding: implications for intellectual property protection and genetic diversity in hybrid crops. *Mol. Breed.* 22: 51–59.
- Tyrnov VS, Zavalishina AN (1984) Inducing high frequency of matroclinal haploids in maize [in Russian]. *Dokl Akad. Nauk SSSR* 276: 735–738.
- Wijnker E, Vogelaar A, Dirks R, van Dun K, de Snoo B, van den Berg M, Lelivelt C, de Jong H, Chunting L (2007) Reverse breeding: reproduction of F1 hybrids by RNAi-induced asynaptic meiosis. *Chromosome Research* 15: 87–88.

2. Inducción *in vivo* de haploidía en progenitores maternos de maíz

Vijay Chaikam

Inducción de haploidía *in vivo* versus *in vitro*

Los haploides de maíz se pueden obtener mediante procedimientos *in vitro* (androgénesis) o *in vivo*. La androgénesis se refiere al desarrollo de plantas haploides a partir de polen inmaduro, ya sea por cultivo de anteras o cultivo de microsporas. En los sistemas de cultivo de anteras, las microsporas en el interior de la antera son inducidas para que, al producirse la androgénesis, formen estructuras parecidas a los embriones, derivadas de las microsporas. En el cultivo de polen, las microsporas se aíslan de las anteras y se cultivan en un medio para producir estructuras semejantes a un embrión. Estas estructuras se pueden regenerar ya sea directamente para formar plantas haploides, o indirectamente por medio de la formación de callos regenerables. Dado que las microsporas se producen en abundancia en las anteras de las plantas, es relativamente fácil obtenerlas y manipularlas en medios de cultivo. Aunque los protocolos de la androgénesis están bien establecidos y se utilizan de rutina en algunas especies cultivadas, no han resultado eficientes para obtener haploides y haploides dobles de maíz. Se ha descubierto que la androgénesis en el maíz depende mucho del genotipo; la mayoría de los genotipos de maíz son recalcitrantes y no manifiestan ninguna respuesta en medios de cultivo (Brettell et al., 1981; Genovesi y Collins, 1982; Miao et al., 1981; Spitzkó et al., 2006). Incluso en los genotipos que responden a la androgénesis, este proceso es altamente influenciado por numerosas condiciones, como la etapa de la antera, la planta donadora y el pre-tratamiento de la antera (Wan et al., 1991; Chu et al., 1975; Ku et al., 1978; Genovesi y Collins, 1982; Miao et al., 1978; Spitzkó et al., 2006). Por consiguiente, los métodos *in vitro* para generar DH no son de uso muy común en el maíz.

En cambio, la inducción *in vivo* de haploidía ha tenido mucho éxito en el maíz y ahora es ampliamente utilizada por varios programas de mejoramiento con fines comerciales (como se indica en el Capítulo 1). Se ha informado que los haploides se producen de manera natural en las parcelas de maíz a una frecuencia de cerca del 0.1% (Chase, 1951). Sin embargo, una frecuencia como esta no puede ser explotada de manera eficiente en el proceso para generar grandes volúmenes de DH. El descubrimiento de Stock 6 (Coe, 1959) y la posterior derivación de una serie de inductores de haploidía en progenitores maternos de maíz, descrito en secciones anteriores de este manual, revolucionaron la aplicación de la tecnología DH en el mejoramiento de este cereal, ya que este método depende mucho menos de los genotipos donadores (germoplasma fuente) de los cuales se derivan las líneas DH.

Haploides maternos versus haploides paternos

La inducción de haploides paternos (androgénicos) se basa en un gene mutante, *ig1* (*gametofito indeterminado*), que puede aumentar la frecuencia de haploides en su progenie (Kermicle, 1969, 1971; Lin, 1981). Los mutantes homocigotos *ig1* muestran varias anomalías embriológicas, como por ejemplo, óvulos sin núcleo. Después de fusionarse con uno de los dos espermatozoides del progenitor, dicho óvulo puede convertirse en un embrión haploide portador del citoplasma de la madre y los cromosomas del padre únicamente. En ciertas composiciones genéticas, la tasa de inducción de haploidía oscila entre 1 y 2% (Kermicle, 1994).

Para producir haploides paternos se utiliza el inductor (con *ig1*) como progenitor femenino y el donador (germoplasma fuente) como progenitor masculino. Por consiguiente, los haploides paternos contienen el citoplasma del inductor y los cromosomas de la planta donadora. Con este sistema, hay baja frecuencia de haploides y cambios en la constitución del citoplasma del genotipo donador, lo cual hace que no resulte muy atractivo para derivar líneas endogámicas destinadas al mejoramiento. Sin embargo, la cepa genética *ig1/ig1* puede ser útil para convertir una línea endogámica en su forma que presenta androesterilidad citoplásmica. Las plantas DH que se obtienen con este método son isogénicas con respecto al progenitor masculino, salvo que portan androesterilidad citoplásmica. Se han generado líneas inductoras con varios inductores

citoplasmáticos de androesterilidad citoplasmática (AEC) que se pueden utilizar para transferir nuevas líneas de mejoramiento a citoplasma AEC (Pollacsek, 1992; Schneerman et al., 2000).

Para producir haploides maternos, el inductor de haploidía se utiliza como progenitor masculino en las cruces de inducción, y el germoplasma fuente o donador como progenitor femenino. Los haploides maternos portan tanto el citoplasma como los cromosomas del donador. Existen actualmente muchas líneas inductoras de haploidía de uso comercial y con tasas de inducción de haploidía (HIR) más altas, las cuales se describen con detalle en el Capítulo 1 del presente manual.

Para generar inductores de haploidía mejorados y adaptados a las condiciones del trópico, en el CIMMYT se generaron poblaciones segregantes a partir de cruces entre inductores templados (RWS, UH400 y RWS x RWK- con una HIR de 8–10%) y tres líneas de maíz tropical generadas por el CIMMYT (CML494, CML451 y CL02450). Se aplicó un esquema de mejoramiento basado en el pedigrí, con selección masal de caracteres altamente heredables en plantas F2 individuales y selección en familias para obtener una buena tasa de inducción de haploidía (HIR) y otras características agronómicas deseables en generaciones autopolinizadas y retrocruzadas avanzadas (Prigge et al., 2011). Las líneas inductoras adaptadas al trópico desarrolladas de esta forma mostraron, en condiciones tropicales, una combinación de alta HIR (entre 6 y 13%) con una producción de polen mejorada, mayor resistencia a enfermedades y mayor vigor de planta en comparación con las inductoras templadas.

Mecanismo de la inducción *in vivo* de haploidía en progenitores maternos

Aún no se entiende claramente cuál es la secuencia exacta de los eventos que intervienen en la inducción de haploidía en un progenitor materno. Se han propuesto varias hipótesis para explicar la inducción *in vivo* de haploidía en este progenitor. Sin embargo, como la inducción de haploidía ocurre cuando se utiliza una línea inductora como progenitor polinizador, han surgido otras hipótesis que proponen que la doble fecundación regular es distorsionada después de que se realiza la fecundación con el polen de una línea inductora de haploidía. En una doble fecundación normal, uno de los dos núcleos espermáticos del grano de polen fecunda el óvulo y se forma un cigoto diploide, en tanto que el otro fecunda los dos núcleos polares de la célula central del gametofito femenino, el cual finalmente se convierte en un endospermo triploide. Se propuso que el polen de los inductores de haploidía provoca una distorsión en la doble fecundación, de manera tal, que uno de los núcleos espermáticos se fusiona con la célula central, pero sin que el otro núcleo espermático se fusione con el óvulo. Sin embargo, la célula central, una vez fecundada y dividida, estimula el óvulo haploide no fertilizado y se crea un embrión haploide (Chase, 1969). Esa única fecundación podría ser resultado de algún defecto morfológico de los granos de polen o de que en el grano de polen existe un solo esperma normal. Pogna y Marzetti (1977) germinaron *in vitro* granos de polen de inductores y no inductores y observaron que los granos de los inductores con gran frecuencia presentaban dos tubos polínicos. Por ende, propusieron que dicha anomalía en el crecimiento del tubo polínico podría estar relacionada con la capacidad de inducir haploidía.

Bylich y Chalyk (1996) observaron que cerca de 6.3% de los granos de polen presentaban dos núcleos espermáticos morfológicamente diferentes en la línea inductora de haploidía ZMS. Sugirieron que las diferencias morfológicas pudieron haber surgido porque los dos núcleos espermáticos se desarrollaron a distintas velocidades, lo cual pudo haber generado dos espermias, solo uno de los cuales estaba listo para la fecundación. Asimismo, se observó una alta frecuencia de heterofecundación con Stock 6 (Sarkar y Coe 1966, 1971). Por su parte, Rotarenko y Eder (2003) observaron algo similar en la línea inductora MHI. Esto sugiere que la heterofecundación, que normalmente ocurre a causa de una fecundación tardía, está relacionada con el mecanismo de la inducción de haploidía, así como con la HIR. Sin embargo, Mahendru y Sarkar (2000) no encontraron diferencias entre los dos espermias en el polen de una línea inductora de haploidía. Swapna y Sarkar (2011) tampoco encontraron defectos en el crecimiento del tubo polínico ni observaron fecundación tardía. Por esta razón, propusieron que la atenuación del núcleo espermático, que ocurre después de que éste sale de la célula sinérgica para entrar en el saco embrionario, podría ser lo que causa la inducción de haploidía.

Chalyk et al. (2003) detectaron entre 10 y 15% de microsporocitos aneuploides en las líneas inductoras MHI y M471H. Estos autores propusieron que es probable que en los inductores de haploidía ocurra una división anormal de los cromosomas durante la formación de los microsporocitos, lo cual puede llevar al desarrollo de espermatozoides aneuploides. Los gametos aneuploides pueden interrumpir la doble fecundación y estimular el óvulo para que se convierta en embrión sin haber sido fecundado.

En contraste con lo anterior, algunos investigadores (Wedzony et al., 2002) indicaron que es posible que durante la inducción de haploidía en un progenitor materno, se llegue a realizar una fecundación normal, pero que durante las divisiones celulares subsecuentes, los cromosomas inductores se degeneran y son eliminados de las células primordiales. Fischer (2004) empleó marcadores microsatelitales para verificar si los haploides inducidos por RWS se originaron únicamente de un progenitor materno y encontró que alrededor del 1.4% de los genotipos tenían uno o (raramente) varios segmentos cromosómicos inductores. Por lo general, estos segmentos habían remplazado a los segmentos homólogos de efecto materno. Li et al. (2009) y Zhang et al. (2008) demostraron que los segmentos cromosómicos del progenitor inductor se integran al genoma de los haploides y dobles haploides, lo cual sugiere que los cromosomas del progenitor inductor son eliminados después de la fecundación.

Pese a toda esta información, todavía no se ha dilucidado de forma definitiva el mecanismo de la inducción de haploidía. Sin embargo, seguramente tiene que ver con algunas anomalías de reproducción; también es posible que diferentes inductores ocasionen diferentes anomalías de reproducción que propician la formación de haploides maternos.

La genética y el análisis de la inducción de haploidía de efecto materno utilizando marcadores moleculares

Estudios sobre generaciones segregantes derivadas de cruces entre progenitores inductores y no inductores han revelado que existe variación continua de los caracteres asociados con la inducción de haploidía, lo cual indica que el carácter inductor de haploidía *in vivo* está bajo control poligénico (Lashermes y Beckert, 1988; Deimling et al., 1997; Röber et al., 2005, Prigge et al., 2011). Lashermes y Beckert (1988) infirieron que el carácter inductor de haploidía de la línea inductora Stock 6 es un carácter dominante con determinación nuclear y que está controlado por unos cuantos genes mayores.

Deimling et al. (1997) y Röber (1999) emplearon marcadores de polimorfismos en la longitud de fragmentos por restricción (RFLP) e identificaron dos QTL (en los cromosomas 1 y 2) que son responsables de la inducción de haploidía en una población F3 en que figuraban Stock 6 y W23ig como progenitores. Juntos, estos QTL explicaron 17.9% de la varianza fenotípica y 40.7% de la varianza genotípica en las tasas de inducción de haploidía. El alelo positivo del QTL en el cromosoma 1 era el dominante y provenía de Stock 6, en tanto que el alelo positivo del QTL en el cromosoma 2 era aditivo y provenía de W23ig.

En otro estudio, Barret et al. (2008) encontraron una distorsión segregante en una población que había sido generada a partir de una cruce entre una línea no inductora y una inductora (PK6). Este análisis reveló un locus mayor en el cromosoma 1 que abarcaba 11.6 cM en bin 1.04 y que confiere inducción de haploidía. Un mapeo fino basado en el análisis de sintenia con cromosomas de arroz permitió identificar dos marcadores en sitios de secuencia etiquetada (SSE) que están estrechamente ligados al locus de inducción (4.5 y 4.9 cM, respectivamente). Esta región, una vez finamente mapeada, contenía 28 supuestos genes expresados.

Prigge et al. (2012) elaboraron un mapa comparativo de QTL que incluía cuatro poblaciones de mapeo segregantes, que fueron generadas mediante el cruzamiento de la línea inductora de haploidía UH400 con dos líneas endogámicas templadas (CAUHOI, 1680) y dos tropicales (CML395, CML495). En tres de estas poblaciones se identificó un QTL mayor de inducción de haploidía en el cromosoma 1 (bin 1.04) que explicaba hasta 66% de la varianza genética. Los *loci* en bin 1.04 mostraron distorsión en la segregación comparados con el alelo UH400 en estas tres poblaciones. En otra población segregante, en la que había dos líneas inductoras como progenitores (CAUHOI × UH400), se identificaron siete QTL en cinco cromosomas; uno de los QTL en el

cromosoma 9 aportaron 20% en las tres generaciones de esta cruce. Este resultado sugirió realizar el apilamiento de QTL mayores en el cromosoma 1, y que los QTL menores podrían utilizarse para mejorar aun más la capacidad de inducción.

Germoplasma fuente para inducir haploidía

La elección de germoplasma o de donadores fuente de inducción de haploidía depende de los objetivos de los programas de mejoramiento. Normalmente, los mejoradores inducen haploidía en las poblaciones F1 o F2. Se calculó que un DH derivado de F2 contenía casi 50% más de los mejores recombinantes que una población derivada de F1 (Gallais, 1990). Sin embargo, hay poca diferencia en la frecuencia de los mejores recombinantes entre las poblaciones derivadas de F2 y F3. Esto implica que es mejor utilizar el método de DH en poblaciones F2 cuando hay vinculación entre los genes (Gallais, 1990; Bernardo, 2009).

En el maíz, la alta carga mutacional de alelos deletéreos recesivos dificulta la explotación del potencial genético de razas criollas alógamas en el mejoramiento de híbridos. Como solución a este problema, se propuso la tecnología DH como un método efectivo para eliminar los recesivos deletéreos de un complejo genético (Gallais, 1990, Wilde et al., 2010). Pese a que las líneas derivadas de razas criollas no se usan directamente como progenitores en los programas de mejoramiento de híbridos debido a las grandes diferencias que existen entre éstas y las líneas endogámicas elite cuando se trata del comportamiento de caracteres agrónomicamente importantes, es posible que sean recursos genéticos valiosos para las actividades de retrocruzamientos o pre-mejoramiento asistido por marcadores (Wilde et al., 2010). Si se les compara con las líneas endogámicas elite, las líneas DH derivadas de razas criollas están mucho más cercanas al equilibrio Hardy-Weinberg, lo cual permite detectar y elaborar mapas de QTL con gran precisión y resolución. Por esta razón, las líneas DH derivadas de razas criollas son ideales para realizar estudios de la asociación marcador-carácter (Wilde et al., 2010).

Referencias

- Barret P, Brinkmann M, Beckert M (2008) A major locus expressed in the male gametophyte with incomplete penetrance is responsible for *in situ* gynogenesis in maize. *Theor. Appl. Genet.* 117: 581–594.
- Bernardo R (2009) Should maize doubled haploids be induced among F1 or F2 plants? *Theor. Appl. Genet.* 119: 255–262.
- Brettell RIS, Thomas E, Wernicke W (1981) Production of haploid maize plants by anther culture. *Maydica* 26: 101–111.
- Bylich VG, Chalyk ST (1996) Existence of pollen grains with a pair of morphologically different sperm nuclei as a possible cause of the haploid-inducing capacity in ZMS line. *Maize. Genet. Coop. Newslett.* 70: 33.
- Chalyk S, Baumann A, Daniel G, Eder J (2003) Aneuploidy as a possible cause of haploid-induction in maize. *Maize Genet. Coop. Newslett.* 77: 29.
- Chase SS (1951) Production of homozygous diploids of maize from monoploids. *Agron. J.* 44: 263–267.
- Chase SS (1969) Monoploids and monoploid-derivatives of maize (*Zea mays* L.). *Bot. Rev.* 35: 117–167.
- Chu CC, Wang CC, Sun C, Shu KC, Yin CY, Chu FY (1975) Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Sci. Sinica* 18: 659–668.
- Coe EH (1959) A line of maize with high haploid frequency. *Am. Naturalist* 93: 381–382.
- Deimling S, Röber FK, Geiger HH (1997) Methodik und Genetik der in-vivo-Haploideninduktion bei Mais. *Vortr. Pflanzenzüchtung* 38: 203–224.
- Fischer E (2004) Molekulargenetische Untersuchungen zum Vorkommen paternaler DNA-Übertragung bei der in-vivo-Haploideninduktion bei Mais (*Zea mays* L.). PhD dissertation, University of Hohenheim. Grauer Verlag, Stuttgart, Germany.
- Gallais A (1990) Quantitative genetics of doubled haploid populations and application to the theory of line development. *Genetics* 124: 199–206.
- Genovesi AD, Collins GB (1982) *In vitro* production of haploid plants of corn via anther culture. *Crop Sci.* 22: 1137–1144.
- Kermicle JL (1969) Androgenesis conditioned by a mutation in maize. *Science* 166: 1422–1424.
- Kermicle JL (1971) Pleiotropic effects on seed development of the *indeterminate gametophyte* gene in maize. *Am. J. Bot.* 58: 1–7.

- Kermicle JL (1994) *Indeterminate gametophyte (ig)*: biology and use. En: M Freeling, V Walbot (eds) The maize handbook, New York. Springer-Verlag, pp. 388–393.
- Ku MG, Cheng WC, Kuo LC, Kuan, YL, An HP, Huang CH (1978) Induction factors and morpho-cytological characteristics of pollen derived plants in maize (*Zea mays*). En: Proc. Symp. Plant Tissue Culture May 25-30, 1978, Beijing, China, pp. 35–42. Science Press, Beijing, China.
- Lashermes P, Beckert M (1988) Genetic control of maternal haploidy in maize (*Zea mays* L.) and selection of haploid inducing lines. *Theor. Appl. Genet.* 76: 404–410.
- Li L, Xu X, Jin W, Chen S (2009) Morphological and molecular evidences for DNA introgression in haploid induction via a high oil inducer CAUHOI in maize. *Planta* 230: 367–376.
- Lin BY (1981) Megagametogenetic alterations associated with the *indeterminate gametophyte (ig)* mutation in maize. *Rev. Bras. Biol.* 41: 557–563.
- Mahendru A, Sarkar KR (2000) Cytological analysis of the pollen of haploidy inducer lines in maize (*Zea mays* L.) *Indian J. Genet. Plant Breed.* 60: 37–43.
- Miao SH, Kuo CS, Kwei YL, Sun AT, Lu WL, Wang YY (1981) Induction of pollen plants of maize and observations on their progeny. En: Proc. Symp. Plant Tissue Culture, date, Beijing, China, pp. 23–24. Science Press, Beijing, China.
- Pogna NE, Marzetti A (1977) Frequency of two tubes in *in vitro* germinated pollen grains. *Maize Genet. Coop. Newslett.* 51: 44.
- Pollacsek M (1992) Management of the *ig* gene for haploid induction in maize. *Agronomie* 12: 247–251.
- Prigge VC, Sanchez BS, Dhillon W, Schipprack, Aarus JL, Banziger M, Melchinger AE (2011) Doubled haploids in tropical maize: I. Effects of inducers and source germplasm on *in vivo* haploid induction rates. *Crop Sci.* 51: 1498–1506.
- Prigge V, Xu X, Li L, Babu R, Chen S, Atlin GN, Melchinger AE (2012) New insights into the genetics of *in vivo* induction of maternal haploids, the backbone of doubled haploid technology in maize. *Genetics* 190: 781–793.
- Röber FK (1999) Fortpflanzungsbiologische und genetische Untersuchungen mit RFLP-Markern zur *in-vivo* Haploideninduktion bei Mais. Ph.D. dissertation, University of Hohenheim, Stuttgart, Germany.
- Röber FK, Gordillo GA, Geiger HH (2005) *In vivo* haploid induction in maize – performance of new inducers and significance of doubled haploid lines in hybrid breeding. *Maydica* 50: 275–283.
- Rotarencu VA, Eder J (2003) Possible effect of heterofertilization on the induction of maternal haploids in maize. *Maize Genet. Coop. Newslett.* 77: 30.
- Sarkar KR, Coe EH Jr (1966) A genetic analysis of the origin of maternal haploids in maize. *Genetics* 54: 453–464.
- Sarkar KR, Coe EH Jr (1971) Analysis of events leading to heterofertilization in maize. *J. Hered.* 62: 118–120.
- Schneerman MC, Charbonneau M, Weber DF (2000) A survey of *ig* containing materials. *Maize Genet. Coop. Newslett.* 74:92–93.
- Spitkó T, Sági L, Pintér J, Marton LC, Barnabás B (2006) Haploid regeneration aptitude maize (*Zea mays* L.) lines of various origin and of their hybrids. *Maydica* 51: 537–542
- Swapna M, Sarkar KR (2011) Anomalous fertilization in haploidy inducer lines in maize (*Zea mays* L.). *Maydica* 56: 221–225
- Wan Y, Duncan DR, Rayburn AL, Petolino JF, Widholm JM (1991) The use of antimicrotubule herbicides for the production of doubled haploid plants from anther-derived maize callus. *Theor. Appl. Genet.* 81: 205–211.
- Wedzony M, Röber FK, Geiger HH (2002) Chromosome elimination observed in selfed progenies of maize inducer line RWS. En: XVIIth International Congress on Sex Plant Reports Maria Curie-Sklodowska University Press, Lublin, p. 173.
- Wilde K, Burger H, Prigge V, Presterl T, Schmidt W, Ouzunova M, Geiger HH (2010) Testcross performance of doubled-haploid lines developed from European flint maize landraces. *Plant Breeding* 129: 181–185.
- Zhang Z, Qiu F, Liu Y, Ma K, Li Z, Xu S (2008) Chromosome elimination and *in vivo* haploid production induced by Stock 6-derived inducer line in maize (*Zea mays* L.). *Plant Cell Rep.* 27: 1851–1860.

3. Diseño e implementación de un esquema de inducción de haploidía con efecto materno

Vijay Chaikam, George Mahuku y B.M. Prasanna

Para lograr producir un número óptimo de líneas dobles haploides (DH) derivadas de una población fuente, el primer paso crítico consiste en producir suficiente semilla haploide a partir de las cruas de inducción. Esto depende de tres factores importantes: (1) la tasa de inducción de haploidía (HIR) y la capacidad de producción de polen del inductor que se utilice; (2) el número total de cruas de inducción que se logren; y (3) la ausencia de inhibidores de color a base de antocianina en la población fuente. El diseño del vivero de inducción afecta también la eficiencia de las polinizaciones y el número de cruas de inducción que se logran. Es necesario considerar a fondo estos factores antes de sembrar el vivero de inducción.

Selección de líneas inductoras que se utilizarán para inducir haploidía

La elección de líneas inductoras para los viveros de inducción de haploidía debe basarse en factores como la HIR, la producción de polen, la altura de la planta, el vigor y el comportamiento *per se* del inductor, su comportamiento durante la floración, su resistencia a enfermedades y plagas, y la facilidad con que se mantiene el inductor en el ambiente al que se destina. Si la tecnología DH va a utilizarse en gran escala con fines comerciales, deberán elegirse inductores de haploidía con alta HIR para el vivero de inducción. Como se mencionó en el Capítulo 1, se han desarrollado varias líneas con una HIR promedio de más de 6%. Sin embargo, la mayoría de estas líneas inductoras están adaptadas a ambientes templados. El CIMMYT ha estado utilizando las líneas inductoras templadas UH400, RWS y sus híbridos para la inducción de haploidía en ambientes tropicales y subtropicales de México. La HIR de estos inductores templados se mantiene a niveles similares (~8 a 10%) en los ambientes tropicales y subtropicales. Sin embargo, estas líneas inductoras templadas y sus híbridos muestran características agronómicas deficientes y son vulnerables a enfermedades en los ambientes tropicales. No obstante, es posible obtener polen para la inducción de haploidía si se utilizan numerosas aplicaciones de fungicidas e insecticidas, nutrición foliar y otras prácticas agronómicas óptimas. Las líneas inductoras templadas y sus híbridos tienen muy poca altura, lo cual hace que sea casi imposible utilizarlas en bloques de aislamiento con polinización libre y que, en consecuencia, la polinización tenga que hacerse en forma manual y a costo elevado. Su floración sumamente temprana y el breve periodo de dispersión de polen hacen que sea necesario escalonar estas líneas varias veces, para que su floración coincida con la del germoplasma fuente tropical. La producción de semilla y el mantenimiento de inductores templados representan también un problema en las condiciones del trópico, ya que producen mazorcas muy pequeñas que son susceptibles a la pudrición. Los inductores templados tienen un comportamiento relativamente mejor en los viveros de inducción de otoño-invierno que en los viveros de verano en los ambientes tropicales de México.

En cambio, las líneas inductoras de haploidía tropicalizadas (LIHT) generadas en el CIMMYT-México, en colaboración con la Universidad de Hohenheim, muestran mejores características agronómicas en lo que se refiere a la floración y la producción de polen en ambientes tropicales, y al mismo tiempo mantienen una HIR de 8 a 12%. Las LIHT también tienen mejor resistencia a las enfermedades y plagas del trópico, lo cual hace que el manejo agronómico sea menos costoso en esos ambientes. Los híbridos de inductores tropicales son más altos que los híbridos inductores templados, y por ello se pueden utilizar en viveros de aislamiento con polinización libre. La producción de semilla y el manejo de la línea son también comparativamente sencillos con las LIHT en los ambientes tropicales.



Figura 1. Líneas inductoras templadas y tropicales en la estación experimental del CIMMYT en El Batán, México.

Número de cruas de inducción

El número de cruas de inducción que se hacen de cada población fuente depende del número de semillas haploides que haya que producir de cada una, lo cual a su vez depende del número específico de líneas DH que sea necesario generar. En el CIMMYT nuestra meta es producir 200 líneas DH de cada población fuente. A una tasa de 10% de aciertos en la duplicación cromosómica, necesitamos al menos 2,000 semillas haploides para obtener 200 líneas DH. A una tasa de inducción de 8% y 200 granos por mazorca, necesitamos lograr 125 cruas para obtener 2,000 haploides. Sembramos por lo menos 150 plantas para tener un margen de pérdida debido a plantas que no germinan o que mueren después de que germinan.

Polinización manual versus polinización libre en el vivero de inducción de haploidía

Las cruas de inducción pueden realizarse en un vivero de aislamiento utilizando polinización libre o en un vivero utilizando polinización manual. La decisión de emplear uno u otro método depende de varios factores.

Se puede elegir un vivero de aislamiento con polinización libre si:

- Es posible sembrar el vivero de inducción por lo menos un mes antes de que se realice la siembra de maíz en las áreas adyacentes;
- No hay más de 15 ó 20 días entre las fechas de la emisión de estigmas de las poblaciones fuente;
- Se cuenta con más de 50 poblaciones fuente; y
- Se dispone de un inductor o de un híbrido inductor de mayor altura que alcanza por lo menos la altura de las mazorcas de las plantas de la población fuente.

Es preferible hacer polinizaciones manuales en un vivero de inducción si:

- Son pocas las poblaciones que se someterán al proceso de inducción;
- No se dispone de información sobre el momento de floración de las poblaciones fuente;
- Las poblaciones fuente tienen un amplio rango de madurez;
- No es posible aislar las poblaciones sembrándolas antes de las demás; y
- Los inductores que se utilizan son de muy poca altura en comparación con las poblaciones fuente.

Diseño del vivero de inducción

Un buen diseño del vivero de inducción es importante para efectuar las polinizaciones de manera eficiente y para lograr buenos resultados en la inducción de haploidía. Se puede utilizar el mismo diseño de campo para el vivero de inducción con aislamiento utilizando polinización libre y el vivero de inducción con polinización manual. Es necesario contar con información sobre el momento de floración de la población fuente (días a la emisión de estigmas) y de los inductores (días a la antesis) para diseñar el vivero. Todas las poblaciones fuente con un tiempo similar de emisión de estigmas pueden agruparse y sembrarse en la misma área del vivero para facilitar el manejo de las polinizaciones.

En el vivero de DH del CIMMYT en la estación experimental Agua Fría, las semillas de las poblaciones fuente se siembran en surcos de 4.5 m de largo, con espacios de 25 cm. Cada surco tiene 19 plantas. El espacio entre surcos se mantiene a 75 cm. Las líneas inductoras se siembran en hileras largas. En las Figuras 2 y 3 aparece el típico diseño de un vivero de inducción. Como las líneas inductoras tropicales y templadas florecen mucho antes que el germoplasma fuente tropical, se puede adelantar la siembra de las poblaciones fuente. Todas las poblaciones fuente con fechas de emisión de estigmas de temprana a intermedia se pueden sembrar desde el comienzo hasta la parte central del vivero. Otras poblaciones con fechas de emisión de estigmas de intermedia a tardía se pueden colocar desde el centro hasta el final del vivero. Se siembran ocho surcos de cada población fuente. Después de cada cuatro surcos de poblaciones fuente, se dejan dos hileras largas (resaltadas en amarillo en la Figura 3) para las plantas inductoras. Asimismo, se dejan dos hileras horizontales en la parte delantera y dos hileras horizontales en la parte posterior (resaltadas en amarillo en la Figura 3) del vivero de inducción para sembrar los inductores. La siembra de inductores tiene que ser escalonada a intervalos de una semana, dependiendo de la variabilidad en las fechas de la emisión de estigmas de las poblaciones fuente. La primera siembra de inductores se hace una semana después de sembrar la población fuente en las primeras filas verticales largas. La segunda siembra de inductores se hace 14 días después de sembrar la población fuente en las segundas filas verticales largas. La tercera siembra de inductores se hace en las dos filas frontales, 21 días después de sembrar la población fuente. La cuarta siembra de inductores se hace en una o dos filas horizontales al final del vivero de inducción, 28 días después de sembrar las poblaciones fuente. De ser necesario, se puede hacer una quinta siembra de inductores en la segunda fila horizontal larga una semana después. Con este diseño, es posible acomodar 150 poblaciones fuente por hectárea, más el número necesario de plantas inductoras.



Figura 2. Vivero de inducción de haploidía en la estación experimental Agua Fría del CIMMYT, México.

días después. Para el control de malezas en post-emergencia se recomienda aplicar un herbicida desecante a los 40 o 50 días (Gramocil o Paraquat son muy efectivos).

En el vivero de inducción, es necesario poner especial atención a las plantas ya que pueden ser frágiles y vulnerables a las enfermedades y los insectos. Si este fuera el caso, las plantas inductoras se deben rociar con fungicida e insecticida. El tizón foliar causado por *Helminthosporium turcicum* y *Bipolaris maydis*, la roya (*Puccinia polysora*), el complejo de la mancha de asfalto y las pudriciones de mazorca son enfermedades comunes que afectan el maíz en los ambientes tropicales de México. Estas enfermedades se pueden controlar de manera eficaz con la aplicación de Tilt (Propiconazole-0.5L/ha) a intervalos de 15 días.

Asimismo, las larvas del gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*) pueden ocasionar daños en el vivero de inducción, dependiendo de las condiciones locales. Esto se puede controlar con el insecticida Palgus (Spinetoram) durante la etapa del establecimiento de las plántulas, y con Lorsban 3G (Clorpirifos etil) en las etapas posteriores de crecimiento de las plantas. También se puede aplicar Karate Zeon (Lambda Cyalotrina) de amplio espectro para el control de otras plagas, además del gusano cogollero. Cuando hay infestaciones severas de esta plaga, se aplica una mezcla de Lorsban, Karate Zeon y Palgus. El complejo del achaparramiento del maíz, presente en regiones subtropicales y tropicales de México y Centro América, se puede prevenir con un buen tratamiento de semilla a base de Gaucho (i.e., Imidacloprid) y una adecuada combinación de insecticidas sistémicos y de contacto para el control de vectores. Durante el desarrollo de la mazorca, la plaga *Spodoptera litura* puede causar mucho daño, por lo cual es necesario controlarla de manera eficaz.

Polinización en el vivero de inducción

En la polinización, tanto manual como abierta, el desespigue (es decir, la acción de retirar la espiga de las plantas de las poblaciones fuente) se hace inmediatamente después de que aparecen las espigas, para reducir al mínimo la contaminación. En un vivero de aislamiento y polinización libre, los jilotes no se deben cubrir con glassines. La polinización libre puede facilitarse dispersando el polen con la ayuda de un ventilador manual.

En un vivero de inducción con polinización manual, los jilotes sí se cubren con glassines, antes de que comience la emisión de estigmas. Los vástagos se pueden cortar por la punta, con mucho cuidado, un día antes de hacer la polinización manual para que haya un crecimiento uniforme de estigmas y facilitar la polinización. Se recolecta una mezcla de polen de 10-20 plantas del inductor y se deposita inmediatamente en los estigmas. De ser necesario, se recomienda polinizar los estigmas hasta dos veces en dos días consecutivos, para obtener mazorcas con juegos completos de semilla en buen estado. Durante el desarrollo y el secado de las mazorcas, es necesario protegerlas apropiadamente para evitar que las aves las dañen.

Manejo de las mazorcas cosechadas

Las mazorcas de cada una de las poblaciones fuente de un vivero de inducción se pueden cosechar en forma independiente de las otras poblaciones fuente, una vez que todas las mazorcas de la población en cuestión hayan alcanzado la maduración fisiológica. Esto evita la pérdida de mazorcas por daños de patógenos y plagas. Todas las mazorcas de una misma población deben cosecharse y colocarse en una o dos arpillas grandes, con una etiqueta que indique claramente su contenido. Las mazorcas cosechadas se sumergen brevemente en un tratamiento de insecticida con Deltametrina (125 ml/200 litros de agua) para controlar las plagas de almacenamiento (gorgojos); a continuación se ponen al sol, dos o tres días, hasta que estén completamente secas. Ya secas, se desgranar y la semilla se pone en bolsas especiales para este propósito y luego se guardan en la cámara fría hasta que se haga la selección.

Nota: El hecho de que a lo largo de este manual mencionemos ciertas marcas de productos químicos (fertilizantes, fungicidas y pesticidas) no significa que el CIMMYT promueva su venta. Sabemos que existen productos similares o quizá mejores en el mercado que sirven para el mismo propósito.

Evaluación de la HIR de los inductores de haploidía

Para evaluar la HIR de las líneas inductoras de haploidía, se necesitan probadores adecuados que permitan hacer una identificación inequívoca de haploides en la etapa temprana del establecimiento de plántulas o de la formación del grano. Los probadores de uso más común poseen genes recesivos como *liguleless* y *glossy*. Cuando los granos derivados de la cruce entre *liguleless* × el inductor o entre *glossy* × el inductor germinan, únicamente las plántulas haploides muestran el fenotipo de *glossy* o de *liguleless*. Estos ensayos se pueden realizar en plántulas (en la etapa de tercera o cuarta hoja) en un invernadero.

También se puede utilizar el sistema de marcadores a base de antocianina *R1-nj* para evaluar la HIR en las líneas inductoras en que está presente *R1-nj*. Para que este sistema funcione, habrá que identificar probadores que no poseen genes inhibidores y que expresan *R1-nj* muy bien en diferentes ambientes. Los inductores se cruzan con esos probadores a fin de determinar la HIR, tomando como base la expresión de *R1-nj*.

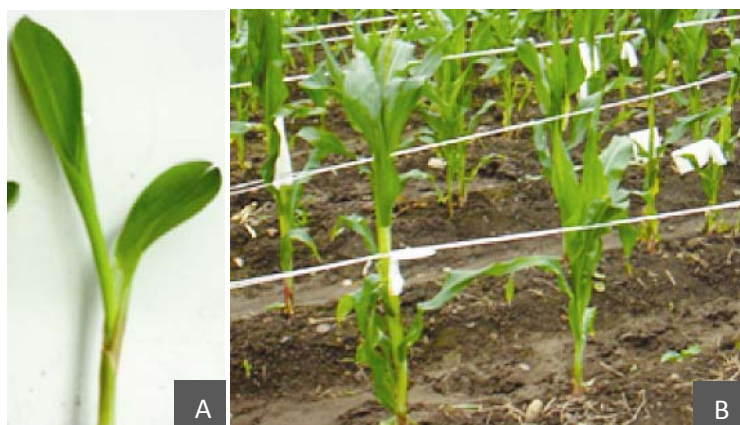


Figura 4. El fenotipo *liguleless* en las etapas (A) de plántula y (B) de planta adulta. El fenotipo *liguleless* se caracteriza por la ausencia de la lígula y la aurícula, y por sus hojas erectas.

Mantenimiento de los inductores de haploidía

Se recomienda establecer un sistema de selección y ensayo continuo para mantener las altas tasas de inducción, ya que los factores genéticos que controlan la inducción de haploidía sufren alteración por segregación y la naturaleza selecciona en su contra. En el mejoramiento encaminado a dar mantenimiento a las líneas inductoras, se debe poner el mayor énfasis en conservar la alta tasa de inducción de haploidía y en mantener el sistema de marcadores a base de antocianina. Asimismo, se debe dar importancia a las características de la producción de polen y de vigor de las plantas. Se recomienda el apareamiento entre hermanos en lugar de la autofecundación para mantener el vigor del inductor.

En las plantas inductoras de las parcelas de multiplicación de semilla se califican varios caracteres agronómicos y fenotípicos (por ejemplo, capacidad de producción de polen, altura de planta, vigor, expresión del color púrpura en el tallo, resistencia a enfermedades y caracteres de la mazorca). Se seleccionan y se etiquetan las plantas con el mejor comportamiento *per se*. Se recolecta y se mezcla el polen de las plantas que se seleccionan en un surco; luego la mezcla de polen se utiliza para hacer apareamiento entre hermanos (dentro del mismo surco) y para hacer cruces de prueba con un probador recesivo apto para que se le evalúe la HIR. Todas las mazorcas cosechadas de un surco se desgranar y se guardan por separado.

Las semillas de la cruce de prueba de cada surco de la parcela de multiplicación de inductores se siembran por separado en un invernadero. Las plántulas son evaluadas en las etapas de tercera y cuarta hoja para detectar el carácter recesivo y se evalúa la HIR. Se identifican los surcos de los inductores con alta HIR, y en las semillas de cada mazorca de ese surco se califican la intensidad y la expresión apropiada del color púrpura en el embrión y en el endospermo. Se seleccionan las mazorcas de las plantas con las mejores calificaciones agronómicas y con buena expresión del marcador de color en el embrión y el endospermo. Estas son las mazorcas que se utilizan para mantener las existencias de inductores.

4. Detección de haploides maternos utilizando marcadores de antocianina

Vijay Chaikam y B.M. Prasanna

Introducción

Algunas de las características que distinguen a las plantas haploides de las plantas diploides son sus hojas erectas, poco vigor y esterilidad, pero éstas solo se observan cuando las plantas haploides han crecido lo suficiente. El poder distinguir las semillas haploides de las diploides tiene muchas ventajas, como por ejemplo, ahorro de los costos de la duplicación cromosómica artificial, así como de espacio y mano de obra en el campo y el invernadero. Por tanto, la identificación de semillas haploides es un paso crítico para adaptar la tecnología DH de manera que se pueda utilizar a escala comercial. En la década de 1960, se identificó un ingenioso y práctico sistema marcador de fenotipos, basado en la coloración de antocianinas, que permite distinguir los haploides de los diploides en la fase de semilla (Nanda y Chase, 1966; Greenblatt y Bock, 1967). La integración de marcadores de antocianina en las líneas inductoras facilitó la identificación de haploides no solo a nivel de semilla, sino también en diferentes etapas del crecimiento de la planta.

Identificación de granos haploides mediante un sistema basado en el marcador *R1-nj*

Actualmente, es muy común utilizar el *R1-nj* (*R1-Navajo*), alelo variante y dominante del locus *R1*, para identificar los granos haploides. *R1-nj*, en combinación con otros genes dominantes que participan en la ruta de la síntesis de la antocianina (*A1*, *A2*, *Bz1*, *Bz2*, *C1* y *C2*), produce una pigmentación intensa en la aleurona (tejido del endospermo) en la región de la corona (parte superior) del grano (Coe, 1994). Además, condiciona la pigmentación púrpura del escutelo (tejido del embrión). A este fenotipo se le conoce como fenotipo de grano Navajo.

Las líneas inductoras de haploidía de uso común hoy en día integran el alelo *R1-nj* junto con otros genes que son necesarios para la biosíntesis de la antocianina. La mayoría del germoplasma de maíz que utilizan los programas de mejoramiento no contiene el alelo *R1-nj* ni los genes responsables de la biosíntesis de la antocianina que confieren pigmentación púrpura o roja a los granos y el tejido vegetal. Cuando una línea inductora se cruza (como progenitor masculino) con el germoplasma fuente (progenitor femenino), sin que estén presentes los marcadores de color a base de antocianina, es de esperarse que todos los granos híbridos que se obtengan expresen el fenotipo Navajo en el endospermo y en el escutelo (embrión), ya que *R1-nj* predomina sobre el alelo *r1*, que no tiene color. Gracias a la expresión diferencial de *R1-nj*, es posible distinguir los haploides maternos de los granos diploides. Cuando en la cruce de inducción se utilizan inductores de haploidía con una alta tasa de inducción (HIR), normalmente se producen haploides maternos con una frecuencia de 6 a 10%.

En la práctica, es posible obtener tres tipos de grano a partir de una cruce de inducción:

- (1) Granos diploides normales o híbridos con coloración púrpura en el endospermo (aleurona) y en el embrión (escutelo);
- (2) Granos haploides con endospermo púrpura pero sin coloración en el embrión; y
- (3) Granos sin coloración púrpura en el embrión ni el endospermo, lo cual puede ser resultado de contaminación por polen o inhibición de la expresión del color.

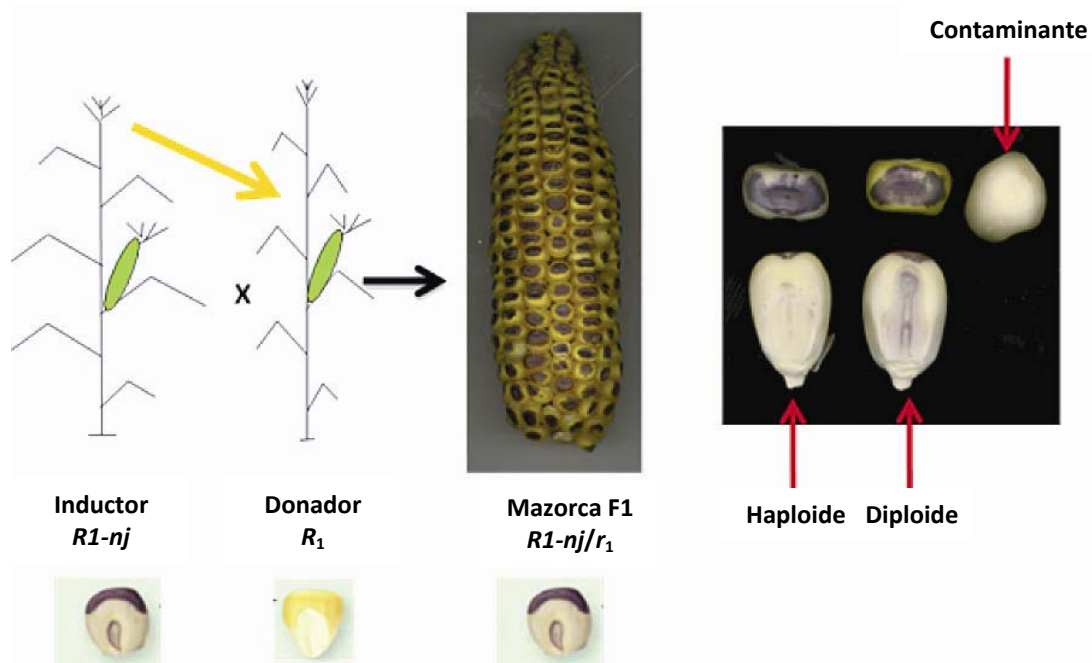


Figura 1. Ejemplo de la inducción de haploides maternos y de tipos de grano derivados de una típica cruz de inducción.

Aunque el sistema del marcador $R1-nj$ es un método eficiente para identificar haploides, podría ser que la composición genética del progenitor femenino tenga gran influencia en la expresión de $R1-nj$. La pigmentación de corona Navajo puede variar, expresándose como una mancha pequeña (en la región que sostiene los estigmas del grano) o incluso puede llegar a cubrir toda la aleurona (excepto la base). Asimismo, la intensidad del color de la aleurona puede variar, desde muy pálida hasta muy oscura. La expresión de color en el escutelo también puede variar, de pálida a oscura (Figura 2).

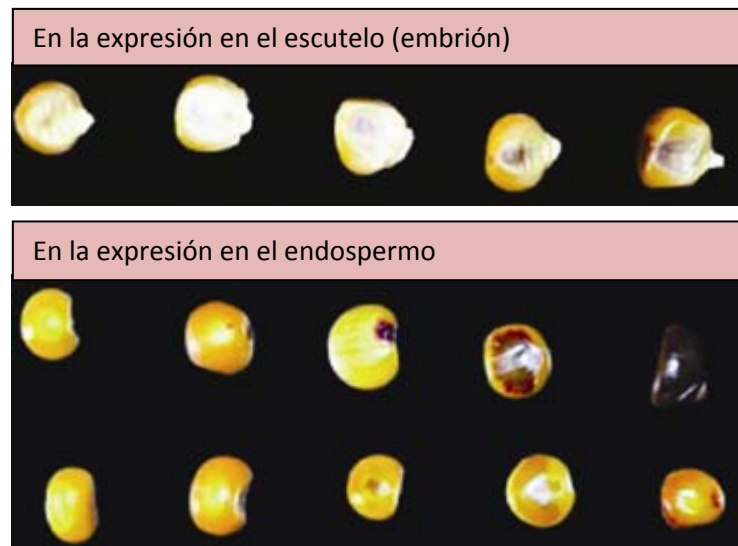


Figura 2. Variación de la expresión de $R1-nj$ en el embrión y en el endospermo.

La variación de la expresión de $R1-nj$ puede producir resultados como los que se mencionan a continuación:

- (1) Hay pigmentación en todo el endospermo y en todos los tejidos del embrión, lo cual facilita la identificación de haploides.
- (2) La corona del endospermo y el escutelo presentan buena coloración, lo cual facilita la identificación de haploides.

- (3) Solo se observa un punto color púrpura en la corona del endospermo y una tenue expresión en el embrión: aunque es posible identificar los haploides, puede haber una alta tasa de falsos positivos a causa de las dificultades que presenta la identificación.
- (4) Inhibición total de la coloración tanto en el endospermo como en el embrión: no es posible identificar los haploides.
- (5) Inhibición total de la coloración en el endospermo, pero cierta parte del tejido del embrión sí tiene color: en esos casos, todos los granos cuyos embriones tienen coloración se consideran diploides. Sin embargo, cabe señalar que no es posible distinguir los haploides de los contaminantes de polen con base en este resultado.

Limitaciones del sistema *R1-nj*

- (1) Cuando las poblaciones fuente contienen genes dominantes inhibidores de la antocianina, como *C1-l*, que son comunes en el maíz cristalino (Röber et al., 2005), éstos suprimen por completo la expresión del marcador de color *R1-nj* y es casi imposible identificar los granos haploides. Actualmente está llevándose a cabo una evaluación del germoplasma elite del CIMMYT para determinar hasta qué punto el marcador de color de la semilla funciona y permite la detección eficiente de semilla haploide. Al parecer, en el presente, la expresión de color de *R1-nj* es inhibida solo en aproximadamente 8% de las cruces de inductores de haploidía con diversas poblaciones fuente.
- (2) Cuando se utilizan poblaciones F1 o F2 como materiales fuente y solo uno de los progenitores tiene el gene inhibidor, los granos presentan segregación del fenotipo Navajo. En tal caso, quizá no sea posible identificar de manera eficiente todos los granos haploides y se pierda hasta 50% ó 75% de los haploides.
- (3) La precisión y la velocidad con que se identifican los haploides dependerá de que el personal esté debidamente capacitado y tenga los conocimientos necesarios para detectarlos mediante la expresión de color en el endospermo y en el embrión.
- (4) Resulta difícil, si no es que imposible, automatizar la identificación de haploides con este sistema.
- (5) La humedad de los granos en el momento de la cosecha podría afectar la intensidad de la expresión de color (Rotarenco et al., 2010).

Marcadores del color púrpura en raíz y tallo para identificar haploides

En vista de las limitaciones antes mencionadas del sistema del marcador de color *R1-nj*, algunos investigadores han explorado la posibilidad de utilizar otros marcadores de color, en especial aquellos que se expresan en la raíz y en el tallo, para identificar, de manera confiable, los haploides maternos (Rotarenco et al., 2010). Dos de los genes que confieren color púrpura o rojo a los tejidos vegetales son *Pl1* (*Purple1*), que condiciona la pigmentación púrpura de los tejidos vegetales, independientemente de los rayos solares, y *B1* (*Booster1*), que condiciona una pigmentación púrpura que depende de los rayos del sol en la mayoría de los tejidos vegetales aéreos (Coe, 1994).

Los genes *B1* y *Pl1* se pueden integrar en las líneas inductoras junto con el sistema del marcador *R1-nj*. Cuando la coloración Navajo no se expresa en los granos, una forma de identificar los haploides es basándose en el color de la raíz de la plántula o del tallo en el campo. Cuando este tipo de inductor es cruzado con material fuente, las raíces y los tallos de las plantas diploides tendrán coloración púrpura, no así los de las plantas de los supuestos dobles haploides.

Algunas líneas inductoras templadas como MHI (Eder y Chalyk, 2002) y el Inductor de Haploidía Procera (Rotarenco et al., 2010) tienen *R1-nj* y también los genes *B1* y *Pl1*, lo cual permite identificar los haploides de manera más eficaz.

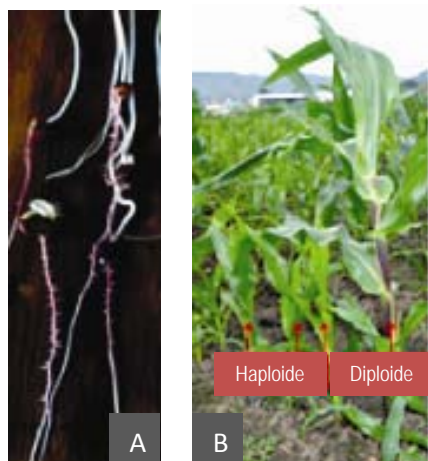


Figura 3. (A) Expresión del color púrpura en las raíces; (B) tallos de plantas diploides de color púrpura y tallos verdes normales en plantas de supuestos dobles haploides.

Limitaciones del sistema *B1* y *PI1*:

- (1) Muchas poblaciones fuente tienen los genes *B1* y *PI1*. En tales poblaciones, las plantas haploides, al igual que las plantas diploides, expresan coloración en la raíz y el tallo, lo cual hace imposible distinguirlas de manera confiable.
- (2) La expresión de los genes *B1* y *PI1* se ve afectada por las condiciones de crecimiento, sobre todo la radiación solar y la temperatura. Se ha observado que hay una mejor acumulación de pigmentos púrpura a bajas temperaturas.

Otras posibilidades

Algunos grupos de investigadores están explorando sistemas nuevos de marcadores que quizá faciliten la detección automatizada de haploides con un mínimo de falsos positivos. Rotarenco et al. (2007) propusieron que la identificación de haploides se haga basándose en el contenido de aceite en el grano, cuya determinación podría automatizarse utilizando técnicas de la resonancia nuclear magnética (TRM). Li et al. (2009) recientemente crearon CAUHOI, inductor derivado de Stock 6 con una HIR de ~2% y alto contenido de aceite (78 g kg^{-1}), que permite identificar haploides con base en la falta, en el escutelo, de la coloración conferida por *R1-nj* y el bajo contenido de aceite en los embriones. Este novedoso método parece promisorio, pero es necesario hacer más estudios para confirmar su confiabilidad y aplicabilidad en la producción de alto rendimiento de DH en composiciones genéticas tropicales.

Referencias

- Coe EH (1994) Anthocyanin genetics. *En*: M Freeling, V Walbot (eds) The maize handbook. Springer-Verlag, New York, pp. 279–281.
- Eder J, Chalyk ST (2002) *In vivo* haploid induction in maize. *Theor. Appl. Genet.* 104: 703-708.
- Greenblatt IM, Bock M (1967) A commercially desirable procedure for detection of monoploids in maize. *J. Hered.* 58: 9-13.
- Li L, Xu X, Jin W, Chen S (2009) Morphological and molecular evidences for DNA introgression in haploid induction via a high oil inducer CAUHOI in maize. *Planta* 230: 367-376.
- Nanda DK, Chase SS (1966) An embryo marker for detecting monoploids of maize (*Zea mays* L.). *Crop Sci.* 6: 213-215.
- Rotarenco VA, Kirtoca IH, Jacota AG (2007) Possibility to identify kernels with haploid embryo by oil content. *Maize Genet. Coop. Newslett.* 81: 11.
- Rotarenco V, DG, State D, Fuiá S. (2010) New inducers of maternal haploids in maize. *Maize Genet. Coop. Newslett.* 84: 1–7.
- Röber FK, Gordillo GA, Geiger, HH (2005) *In vivo* haploid induction in maize—performance of new inducers and significance of doubled haploid lines in hybrid breeding. *Maydica* 50: 275–283.

5. Duplicación de cromosomas de haploides maternos

Vijay Chaikam y George Mahuku

Introducción

Las plantas diploides contienen en sus células dos copias de cada cromosoma; una copia proviene del progenitor masculino y la otra del progenitor femenino. En las estructuras reproductoras (en el maíz, las espigas y mazorcas), los gametofitos del haploide masculino (los granos de polen) y del haploide femenino (el saco del embrión) son resultado de divisiones de células meióticas que consisten en el apareamiento de cromosomas homólogos y su recombinación.

Las plantas haploides solo contienen una copia de cada cromosoma en sus células. Los haploides derivados de la inducción materna *in vivo* contienen cromosomas únicamente del progenitor femenino. En las estructuras reproductoras de las plantas haploides, no se dan las divisiones de células meióticas, ya que no es posible que se formen pares de cromosomas homólogos y, en consecuencia, no se producen ni gametofitos ni gametos masculinos y femeninos. Por consiguiente, las plantas haploides suelen ser estériles. El propósito de la duplicación de cromosomas es conferir fertilidad a las plantas haploides mediante la generación de una planta haploide doble ($2n$) a partir de una haploide (n); las plantas que resultan son autopolinizadas a fin de producir líneas dobles haploides (DH).

El mecanismo de la duplicación cromosómica

La duplicación cromosómica espontánea ocurre con poca frecuencia, pero cuando sucede, produce algunas plantas haploides fértiles. La frecuencia de la duplicación espontánea depende del genotipo de la población fuente. Para lograr que la duplicación cromosómica ocurra con alta frecuencia, las plantas haploides son tratadas con químicos llamados inhibidores mitóticos. Estos químicos alteran la mitosis normal de manera tal que ésta da como resultado una sola célula con dos veces el número de cromosomas. Un químico que se usa comúnmente para este fin es la colchicina, alcaloide soluble en agua que se obtiene de los bulbos de *Colchicum autumnale*. Cuando hay colchicina presente, la replicación de cromosomas ocurre normalmente en la interfase. La colchicina se adhiere a los túbulos y evita que se formen microtúbulos del huso mitótico en la etapa de la metafase de la mitosis. Durante la anafase, las dos cromátidas hermanas del cromosoma replicado se separan, pero como no pueden desplazarse a los polos opuestos de la célula, se quedan en el centro de ésta. En la telofase se forma una membrana nuclear alrededor de los cromosomas que no se desplazaron. Por tanto, el resultado de la mitosis es una célula con dos veces el número de cromosomas.

En las plantas, todos los órganos aéreos, incluidas las estructuras reproductoras, surgen del meristemo apical del vástago (MAV). Esta estructura contiene células meristemáticas que se dividen y se diferencian para convertirse en primordios de órganos. Para que los tejidos reproductores de las plantas haploides sean totalmente fértiles, la duplicación cromosómica de las células meristemáticas debe ocurrir antes de que éstas se diferencien y se conviertan en órganos reproductores. Por esta razón, se recomienda exponer las plántulas muy jóvenes (de tres a cinco días después de la siembra) a inhibidores de la mitosis.

Instalaciones y equipo requeridos para la duplicación cromosómica

Por cuestiones de conveniencia operacional y seguridad de los trabajadores, las actividades de la duplicación cromosómica se realizan en tres áreas:

- (1) Un cuarto de germinación donde las semillas se procesan y germinan, y las plántulas se preparan para ser tratadas con colchicina. Este cuarto debe contar con bancas de trabajo donde la semilla es procesada y las plántulas son preparadas para ser tratadas. Asimismo, debe haber también una incubadora para germinar la semilla.
- (2) Un laboratorio de tratamiento de colchicina donde se guardan los químicos, se prepara la solución y se tratan las plántulas. Este laboratorio debe contar con un refrigerador para guardar los químicos, una campana extractora para preparar las soluciones, tanques para el tratamiento con colchicina y un extractor.

- (3) Un cuarto donde se almacenan los residuos de la colchicina hasta que puedan eliminarse, siguiendo las disposiciones para el manejo de residuos. Este lugar debe contar con un extractor de aire.

Artículos necesarios para la germinación de semilla y el procesamiento de plántulas:

- Papel de germinación
- Tinas de plástico
- Distribuidores de semilla (placas de acrílico)
- Bisturís
- Ligas
- Marcadores Sharpie
- Bolsas de malla

Artículos necesarios para el tratamiento de colchicina y el manejo de residuos:

- Refrigerador
- Báscula
- Vasos de precipitado: 5,000 ml; 1,000 ml; 500 ml; 100 ml
- Pipetas: 1,000 microlitros; 200 microlitros; 100 microlitros
- Agitador magnético con magnetos
- Bote de polipropileno (de 20 litros) para preparar las soluciones
- Tanques de metal para aplicar el tratamiento
- Tanques de metal o recipientes de polipropileno para recolectar los residuos
- Ropa, guantes y mascarillas protectoras
- Overol (Tyvek)

Productos químicos que se requieren:

- Colchicina
- Dimetil sulfóxido (DMSO)
- Cloro comercial (blanqueador)

Pasos de la duplicación cromosómica

Germinación de la semilla:

- Marque el papel de germinación haciéndole corte en una de las esquinas y humedézcalo con una solución de cloro al 0.05% para evitar la proliferación de hongos.
- Tome dos papeles de germinación, extiéndalos uno sobre otro, alineando las orillas donde se hizo el corte y, con la ayuda de un dispensador, distribuya de manera uniforme la semilla (Figura 1).
- Al colocar las semillas, asegúrese de poner el lado del embrión hacia abajo; el lado por donde emerge la radícula deberá colocarse en dirección del corte, casi en la orilla del papel (Figura 2). Enseguida cubra las semillas, poniendo otro papel encima y alineando los extremos donde hizo el corte (Figura 3).
- Doble con firmeza las tres capas de papel de germinación con las semillas, enróllelas hasta formar un tubo cilíndrico en forma de taco y sujételo con ligas en ambos extremos (Figuras 3, 4 y 5).
- A continuación, los tacos de semilla de una misma población se colocan verticalmente en una bolsa de malla, con los extremos hacia abajo, y se depositan en recipientes de plástico a los cuales se agrega una solución clorada (100 ppm para mantener la humedad de la semilla; ver las Figuras 6 y 7). La solución clorada ayuda a evitar la propagación de hongos durante el periodo de germinación.
- Los recipientes de plástico que contienen la semilla se colocan en la cámara de incubación (Figura 8), cuya temperatura deberá mantenerse a alrededor de 25 a 30 °C. Se dejan ahí 72 horas para que la semilla germine.

Preparación de las plántulas:

- Los recipientes de plástico que contienen las semillas se sacan de la cámara después de tres días de incubación. Los tacos con semilla se colocan en una mesa de trabajo y se abren (Figuras 9 y 10).
- Las plántulas con raíces de 3 a 5 cm de longitud y cuyos coleóptilos miden aproximadamente 2 cm son ideales para el tratamiento a base de colchicina. Antes de aplicar el tratamiento, con un bisturí esterilizado haga cortes de 5 mm en el extremo superior del coleóptilo (Figura 11). Los bisturís se esterilizan flameándolos en un mechero de Bunsen. El corte de la punta del coleóptilo facilita que la solución penetre en la pared celular y llegue hasta el primordio meristemático.



Figura 1. Colocación de semillas en el papel de germinación.



Figura 2. Alineación de semillas con la radícula hacia el extremo del papel donde se hizo el corte y el lado del embrión hacia abajo.



Figura 3. Se cubren las semillas con papel de germinación.



Figura 4. Se enrollan y se atan los papeles con las semillas.



Figura 5. Atado después de enrollar.



Figura 6. Atado en una bolsa de malla (arpilla).



Figura 7. Arpillas en una tina de plástico con solución de cloro.



Figura 8. Tina de plástico (con semillas) en una incubadora.



Figura 9. Abrir los tacos.



Figura 10. Plántulas haploides germinadas.

- Las plántulas cortadas que pertenecen a una misma población deberán guardarse en una misma bolsa (arpilla de plástico con orificio pequeño de menos de 2 μm ; Figura 12).
- Las bolsas que contienen las plántulas deben mantenerse en agua desinfectada unas cuantas horas, antes de transferirlas al tanque de colchicinización (Figura 13).
- Los papeles de germinación que presentan plántulas muy pequeñas y semillas no germinadas se pueden volver a amarrar y dejarse en la cámara de crecimiento por más tiempo. Se puede aplicar el mismo procedimiento del corte de plántulas en los días siguientes. La germinación de la semilla haploide es más lenta que la de los diploides, por lo que es necesario realizar hasta cuatro cortes del coleóptilo cada 24 horas.

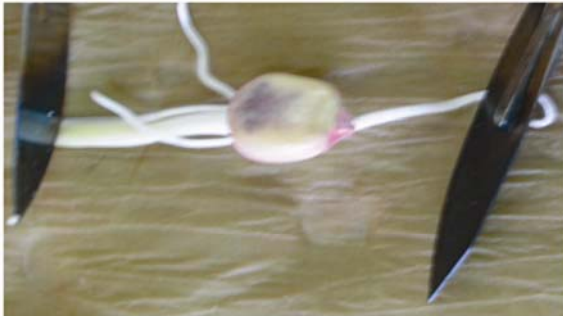


Figura 11. Corte del coleóptilo de las plántulas germinadas.



Figura 12. Plántulas con corte de coleóptilo de la misma población en una sola bolsa.



Figura 13. Bolsas de malla (arpilla) con plántulas que se mantienen en agua hasta que son tratadas con colchicina.

Tratamiento de colchicina

Dado que esta sustancia es muy tóxica y cancerígena para los seres humanos, quienes la utilizan deben tomar las precauciones necesarias para no exponerse a sus efectos. Las plántulas se pueden tratar con colchicina en la oscuridad, en tanques especiales que eviten que los trabajadores entren en contacto directo con dicha sustancia. Los tanques son de acero inoxidable a fin de evitar la corrosión (Figura 14). La tapa del tanque tiene una abertura para conectar éste a una llave de agua corriente o al recipiente que contiene la solución de colchicina (Figura 15A). El tanque tiene una válvula en el centro de la base que permite drenar el líquido de desecho (Figura 15B) y está colocado sobre una base sostenida por patas metálicas, lo cual permite poner los contenedores debajo del tanque para recolectar los desechos. La base tiene ruedas que facilitan su desplazamiento (Figura 14).

El volumen de la solución de colchicina que se necesita se estima colocando las plántulas cortadas en el tanque de tratamiento (Figura 16) y llenándolo, poco a poco, con agua, hasta cubrir las todas. El agua se vacía en un recipiente, desde la abertura en la base (Figura 15B), y luego se mide el volumen recolectado. Dicho volumen es la cantidad de solución de colchicina que hay que preparar. Otra forma de estimar el volumen es colocar las bolsas con semilla en un recipiente y agregar agua hasta que queden totalmente cubiertas, y luego medir el volumen de agua.

Para la duplicación de cromosomas se utiliza una solución con 0.04% de colchicina y 0.5% DMSO. El polvo de colchicina se pesa bajo una campana extractora y se disuelve en agua en un tanque de plástico cubierto con

papel aluminio. El polvo, junto con el DMSO, se vacía en el agua y se disuelve con la ayuda de un agitador magnético; luego se deja reposar de dos a tres horas. La persona que prepara la solución deberá usar overol, guantes, botas de hule y mascarilla protectora. El recipiente en que se prepara la solución tiene una abertura en el fondo que se conecta a un tubo y a una bomba dispensadora para vaciar la solución en el tanque de tratamiento automáticamente. Las plántulas se colocan en el tanque y se dejan ahí 12 horas. Por comodidad, el tratamiento se puede iniciar a las 8:00 p.m. y suspenderse a las 8 a.m. La solución de colchicina, una vez utilizada, se recolecta en recipientes de plástico, abriendo la llave del fondo del tanque de tratamiento. Las plántulas se lavan por lo menos dos o tres veces bombeando agua destilada en el tanque. Los residuos se recolectan en tambores de plástico cerrados de 200 litros y se guardan en un cuarto aislado junto con la solución de colchicina de desecho, hasta que son sometidos al proceso de eliminación de desechos químicos.



Figura 14. Tanque y bombeo de solución de colchicina del contenedor al tanque.



Figura 15. (A) Tapa del tanque con una conexión al suministro de agua o recipiente que contiene colchicina; (B) recolección de los residuos desde la apertura del fondo.

Figura 16. Plántulas cortadas en bolsas de malla en el tanque.



Trasplante de plántulas y cuidado en el invernadero:

- Las plántulas se sacan del tanque de tratamiento y se trasplantan de inmediato a charolas de Styrofoam que contienen substrato Promix (elaborado a base de musgo y minerales) (Figuras 17, 18 y 19). Las plántulas deben manipularse con mucho cuidado, ya que se vuelven muy frágiles después de que se someten al tratamiento de colchicina. Las plántulas con hipocótilos largos son más propensas a dañarse.
- Las plántulas se dejan en las charolas de Styrofoam durante tres semanas en un invernadero que se mantiene a una temperatura de 28 a 30°C. Se riegan con mucho cuidado desde arriba, todas las tardes. En el primer riego se utiliza agua; a partir del segundo, se aplica Hakaphos (13-40-13 NPK y micronutrientes), ya que esto ayuda a que crezcan las raíces y se establezcan las plántulas.
- Para evitar que proliferen hongos, se aplica el fungicida Tecto (Tiabendazol); una sola aplicación es suficiente. Una semana antes del trasplante al campo, durante el riego se aplica Gaucho

(Imidacloprid), insecticida sistémico que evita los ataques de insectos. Se pueden combinar Hakaphos y Gaucho en una misma aplicación.

Dosis adecuadas en los diferentes pasos de la duplicación cromosómica

En el CIMMYT, es normal obtener un porcentaje de germinación de 85 a 90% en los supuestos granos haploides. Es posible que durante la duplicación se pierda un número considerable de plántulas debido a los efectos tóxicos de la colchicina, dependiendo de la composición genética del material fuente y del procedimiento que se siga al aplicarla. Únicamente 40 a 80% de las supuestas plántulas haploides que son tratadas lograrán establecerse en el campo. Entre las plantas establecidas, puede ser que de 10 a 30% resulten ser falsos positivos (diploides) y, en ese caso, deberán identificarse y eliminarse antes de que comience la floración. Entre los verdaderos haploides que quedan, de 0 a 40% de las plantas producen polen y estigmas, y por tanto, se puede lograr una buena polinización. También en este caso, la fertilidad del polen depende del genotipo del germoplasma fuente. Por lo general, únicamente de 30 a 50% de las plantas polinizadas producen semilla.



Figura 17. Trasplante de plántulas tratadas.



Figura 18. Plántulas trasplantadas después de una semana.

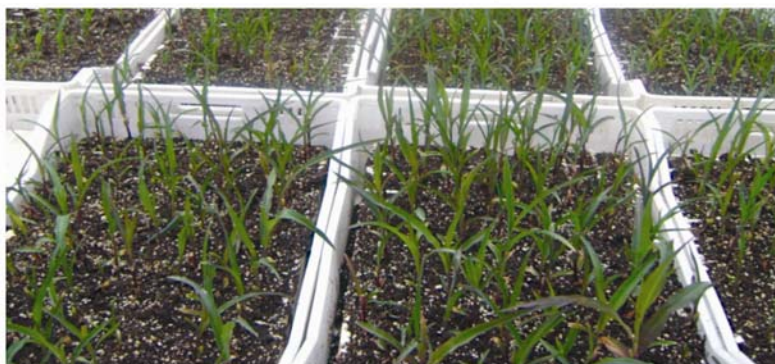


Figura 19. Plántulas trasplantadas después de tres semanas.

Toxicidad de la colchicina y precauciones que deben tomarse

Toxicidad:

En concentraciones de 0.1–1 g/ml, la colchicina puede provocar la interrupción de la división mitótica (en células tanto de plantas como de animales) durante la metafase, al interferir con la organización de los microtúbulos, en particular de aquéllos del huso mitótico. La colchicina tiene efectos fatales si se ingiere, inhala o es absorbida por la piel. La exposición a la colchicina causa irritación del sistema respiratorio, irritación de piel y ojos, serias lesiones en los ojos y puede ser cancerígena.

Precauciones que deben tomarse:

- Para evitar que los trabajadores sean expuestos a la colchicina, se deberá asignar un cuarto separado para almacenar el polvo, preparar la solución y realizar los tratamientos.

- El laboratorio deberá estar equipado con una campana extractora, para cuando se utilice el producto, y con un extractor para eliminar el olor y los vapores.
- Deberá haber un carrito de uso específico para el laboratorio, para trasladar las soluciones.
- La colchicina debe conservarse en un refrigerador, que debe cerrarse con llave.
- El proceso del tratamiento con colchicina deberá ser automatizado, tanto como sea posible, para reducir el contacto con la sustancia.
- El personal del laboratorio deberá tener fácil acceso a las fichas técnicas de seguridad de materiales de todos los químicos que se utilicen.
- Quienes trabajan con colchicina deben usar guantes protectores, equipo de protección para la nariz y los ojos, y vestimenta que cubra todo el cuerpo.
- Asimismo, deberán lavarse perfectamente las manos cada vez que terminen de trabajar con dicha sustancia.
- Los residuos de colchicina deberán almacenarse en un cuarto aislado, que debe estar cerrado con llave.
- Únicamente un equipo bien capacitado en la eliminación de desechos peligrosos podrá sacar los residuos de colchicina.
- En caso de exposición, con mucho cuidado, lave con agua la parte afectada por varios minutos. Llame de inmediato a un centro de toxicología o un médico con experiencia en seguridad ocupacional. Al ser atendida la persona, deben entregarse al médico las fichas técnicas de seguridad del material.

6. Manejo de supuestas plántulas DH: Del laboratorio al campo

George Mahuku

El manejo que se haga de las plántulas haploides es crucial para lograr el desarrollo de líneas dobles haploides (DH). Son dos los pasos críticos: (1) el manejo de las plántulas D0 tratadas con colchicina y su restablecimiento en condiciones de invernadero; (2) el manejo de las supuestas plantas DH en condiciones de campo. En cada uno de estos pasos puede haber pérdida de probables plantas DH, lo cual, a su vez, afecta la obtención de líneas DH. En este capítulo se tratan algunas de las condiciones pertinentes (manejo de plántulas DH, disposición de sitios adecuados para sembrar plantas DH de mantenimiento, así como multiplicar semilla y optimizar el manejo de las supuestas líneas DH en condiciones de campo y de invernadero) que deben cumplirse para la recuperación óptima de líneas DH.

Manejo de plántulas D0

Después de aplicar el tratamiento de colchicina a las plántulas haploides, drene la solución del recipiente del tratamiento y recójala en recipientes especialmente destinados para ello. Enjuague las plántulas con agua de la llave, al menos tres veces, para retirar los residuos de colchicina. Para enjuagarlas, llene el recipiente del tratamiento con agua de la llave hasta que las plántulas queden totalmente sumergidas; luego drénelas y recolecte el agua en contenedores especiales para desechos tóxicos, para que después sean eliminados de manera correcta. Debe hacerse un lavado o enjuague final utilizando una solución de cloro a 100 ppm, que además de desinfectar, reduce la contaminación bacteriana o fúngica de las semillas. Después de este paso, las plántulas están listas para ser trasplantadas al invernadero.

***Nota:** Todos los residuos de colchicina deben recolectarse en contenedores especialmente destinados para ese propósito y rotulados claramente, que luego serán eliminados por una empresa o institución autorizada. Le rogamos que cumpla con las normas y leyes respecto a la eliminación segura de desechos químicos peligrosos, de conformidad con las disposiciones específicas vigentes en su institución y su país. Bajo ninguna circunstancia deberán desecharse estos residuos tóxicos simplemente vaciándolos en el fregadero o lavabo.*

Manejo de plántulas tratadas: Sea lo más cuidadoso posible mientras manipula las plántulas, sobre todo después que han sido tratadas. El coleóptilo es un tejido sumamente vulnerable que se rompe con facilidad si no se le manipula apropiadamente. Por tanto, cuando trabaje con plántulas, sosténgalas por el grano y no toque la raíz ni el coleóptilo, para evitar que se rompan. Si el tejido se daña mientras las plántulas son preparadas para recibir el tratamiento o cuando son manipuladas después de haber sido tratadas, el tejido del vástago se vuelve necrótico y sobreviene la muerte de la plántula.

Materiales de trasplante:

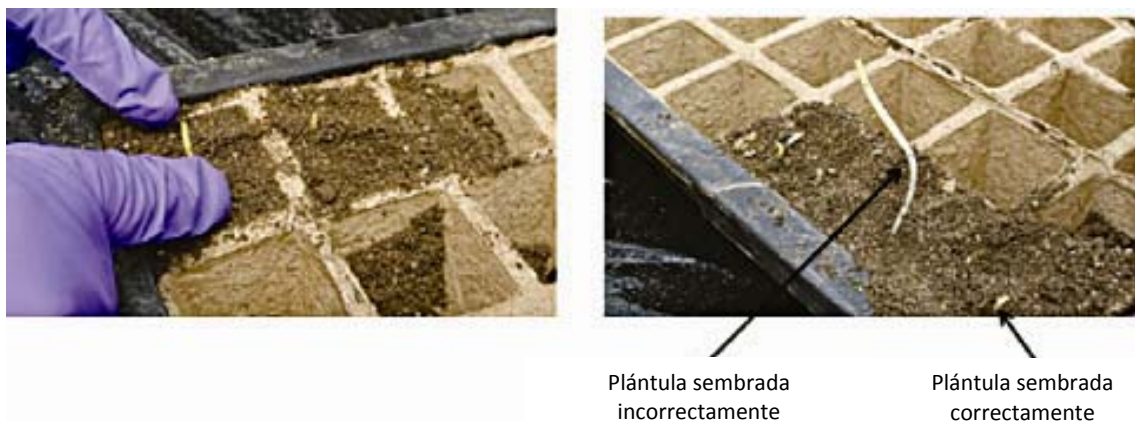
- **Plántulas tratadas con colchicina:** Cada población debe ser rotulada claramente para evitar confusiones al trasplantarlas.
- **Charola (bandeja) con agua destilada estéril:** Las plántulas deben llevarse al invernadero en una charola con agua para evitar que se deshidraten.
- **Batas de laboratorio, guantes y ropa de trabajo:** Recuerde que las plántulas han sido tratadas con colchicina y que, por tanto, debe tomar medidas apropiadas de seguridad e higiene en el trabajo mientras maneje este tipo de materiales.
- **Invernadero de malla o invernadero de cristal:** Éstos deben contar con condiciones controladas de temperatura, luz y humedad.
- **Rotulación de estacas de madera:** Esto es necesario para la debida identificación de las poblaciones que vayan a trasplantarse.
- **Cinta adhesiva protectora (masking tape) y marcadores permanentes:** Éstos se utilizan para anotar toda la información pertinente.

- **Macetas Jiffy (en charolas) con un sustrato:** Utilice el suelo del invernadero (mezcla de turba), si es posible, pero se puede utilizar cualquier suelo siempre y cuando se esterilice apropiadamente. De ser posible, utilice suelo con alto contenido de materia orgánica y evite los suelos con alto contenido de arcilla. En el CIMMYT usamos promix o mezcla de turba de primera. El promix viene mucho más comprimido y está listo para usarse, en tanto que la mezcla de turba tiene que mezclarse con por lo menos 10% de perlita (agrolita).
- **Suelo en el invernadero:** Use suelo estéril con alto contenido de materia orgánica.

Procedimiento de trasplante:

- Lleve las plántulas ya tratadas y lavadas al invernadero para trasplantarlas; asegúrese de ponerlas en una charola con agua para evitar que se deshidraten.
- Se pueden utilizar diferentes tipos de maceta (ver abajo) para el trasplante; la elección dependerá del presupuesto, la disponibilidad de materiales y los métodos de trasplante.
- Primero, en cada una de las macetas ponga tierra, hasta la mitad (ver abajo tipos de tierra). Enseguida, con cuidado, coloque las plántulas (sosteniendo la semilla adherida en lugar del vástago o la raíz) en el suelo y sosténgalas mientras va poniendo más tierra a su alrededor, hasta que la maceta quede llena al ras y solo se vea la punta del coleóptilo (Figura 1). Con cuidado y poco a poco, haga presión para que la tierra se compacte y no haya escurrimiento cuando se aplique riego. Si se deja afuera una gran parte del coleóptilo alargado, hay una mayor probabilidad de que se dañe y de que sean menos las plantas que sobrevivan para trasplantarlas en el campo.
- Hay que tener cuidado y evitar que se rompan los coleóptilos, ya que las plántulas son muy frágiles y se rompen fácilmente después de que son tratadas. Cuando las trasplante, asegúrese de que la parte del coleóptilo que sobresale de la superficie sea de menos de 2 cm, ya que si excede este tamaño, aumenta el riesgo de que se rompa, lo cual afecta el número de plantas DH que se logran establecer.

Nota: Utilice guantes protectores cada vez que manipule plántulas tratadas con colchicina.



Plántula sembrada incorrectamente

Plántula sembrada correctamente

Figura 1. Trasplante de supuestas plántulas DH (D0) tratadas a macetas jiffy en el invernadero. Asegúrese de que se vea solo la punta del coleóptilo para evitar daños y pérdida de plantas. [Fotos: G. Mahuku]

Manejo del invernadero D0

Tipos de macetas para trasplante en el invernadero: Se pueden utilizar varios tipos de maceta: (1) las típicas macetas de plástico (de aproximadamente 5×5×8 cm) que normalmente se usan en experimentos en el invernadero y en la horticultura; están hechas de plástico durable y son reutilizables; (2) vasos de Styrofoam, que comúnmente se utilizan para café o té; son muy económicos pero duran poco; o (3) macetas elaboradas de un material biodegradable que se desintegran en el suelo y permiten hacer el trasplante directo (con todo y maceta), utilizando una sembradora (Figura 2). Todas las macetas deben tener perforaciones en la base para drenar el exceso de agua.

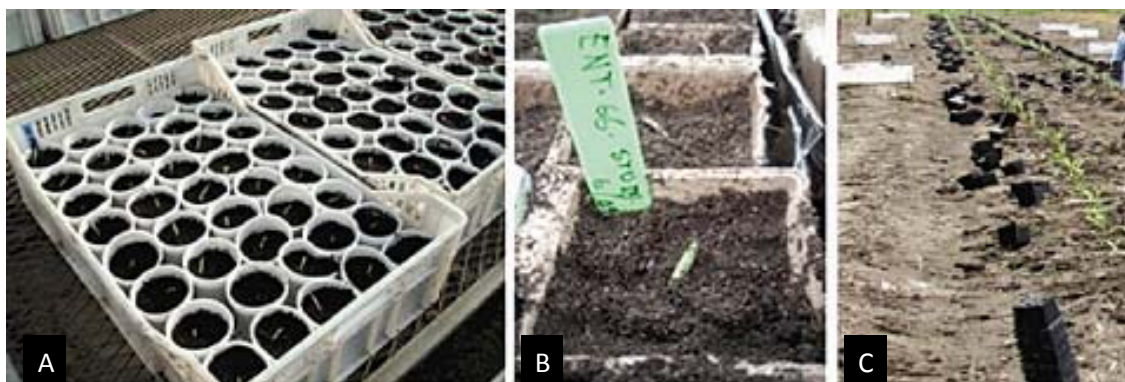


Figura 2. Trasplante de plántulas tratadas a macetas: (A) vasos de Styrofoam que normalmente se utilizan para café; (B) macetas jiffy; y (C) macetas de plástico. Las macetas se llenan de tierra estéril con alto contenido de materia orgánica. Se colocan en recipientes especiales para facilitar su manipulación y traslado. [Fotos A & B: V. Prigge; foto C: G. Mahuku]

Mantenimiento de plántulas en el invernadero: Coloque las plántulas sembradas en maceta en los contenedores especiales que hay en el invernadero (Figura 2) y déjelas aproximadamente 10 a 15 días para que se recuperen del tratamiento con colchicina y alcancen la etapa de tercera o cuarta hoja. Es importante aplicar fertilización apropiada y controlar las plagas y enfermedades, a fin de que las plantas se recuperen bien y sean vigorosas. Durante este periodo, mantenga las siguientes condiciones que favorecen el crecimiento de las plántulas:

- Mantenga húmedo el suelo, pero evite el exceso de agua. Se puede regar una vez al día, o según sea necesario.
- Aplique la dosis necesaria de fertilizante en forma soluble con el agua de riego. También es recomendable aplicar fertilizante con alto contenido de fósforo para estimular el crecimiento de la raíz.
- Tres días después del trasplante, fertilice las plantas con Triple 20 (preparar disolviendo 2 cucharadas de fertilizante en 20 litros de agua y usar esta solución para regar las plantas hasta que estén listas para ser trasplantadas al campo).
- Una semana después del trasplante, aplique Hakaphos violeta (13-40-13; NPK) en el agua de riego, a una dosis de 2 gramos por 1 litro de agua. Hakaphos estimula el desarrollo y el crecimiento de la raíz.
- Aplicar Gaucho (un insecticida sistémico) 10 después del trasplante o una semana antes de trasplantar las plántulas al campo; use solo el agua suficiente para humedecer las charolas, sin que se derrame. Gaucho se aplica en dosis de 2.4 gramos por 20 litros de agua; la cantidad dependerá del número de plantas que vayan a tratarse.

Condiciones en el invernadero: Las condiciones deben ser óptimas para que las plantas crezcan. La temperatura deberá mantenerse a menos de 30°C y nunca deberá descender a menos de 20°C en la noche. Si la temperatura es demasiado alta o demasiado baja, esto causa estrés en las plantas y afecta su establecimiento y desarrollo. Si es posible, utilice registradores de datos para monitorear la temperatura y la humedad relativa dentro del invernadero.

Trasplante de plántulas D0 al campo

Condiciones en el campo: Elegir el sitio apropiado es crucial para lograr generar líneas DH. Si le es posible, elija un sitio que tiene poca presión de enfermedades y plagas, o ninguna. La temperatura raramente deberá elevarse a más de 30°C y por la noche no deberá descender a menos de 20°C durante el ciclo de crecimiento de las plantas. Por tanto, es importante tener registradores de datos en el campo para monitorear las variables climáticas (Figura 3). Si la intensidad de la luz es demasiado alta, use pantallas termorreflectoras aluminizadas 50% (<http://www.greenhousemegastore.com/Stock-Shadecloth-50-Aluminet/productinfo/SC-ST50A/>). Las pantallas protegerán a las plantas de la luz y reducirán la temperatura debajo de la malla sombra.

Nota: Hay pantallas para interiores y exteriores. Son muy útiles porque reducen la intensidad de la luz en un 50%, lo cual ayuda al establecimiento de las plantas y la formación del polen. La pantalla deberá colocarse a 4 ó 5 metros por encima de las plantas, de manera que quede espacio suficiente para que el tractor pueda maniobrar en el campo. Asimismo, asegúrese de que haya muy buena circulación de aire; de no ser así, la temperatura aumenta y esto afecta la formación y el derrame del polen.



Figura 3. Manejo agronómico del vivero D0 para reducir el estrés que afecta a las plantas: (A) se utiliza una malla sombra aluminizada al 50% para reducir la intensidad de la luz y la temperatura, y así evitar estrés en las plantas y foguero en la espiga. La malla sombra se coloca a 4 metros de altura para permitir que el aire circule bien, que los tractores puedan desplazarse, etc. (B) Registradores de datos para medir la intensidad de la luz y la temperatura. (C) Registrador de datos Hobo que mide la humedad relativa y la temperatura. Este dispositivo está programado para registrar datos cada 30 minutos. [Fotos: G. Mahuku]

Materiales:

- **Plántulas:** Éstas deberán tener dos semanas de establecimiento en el invernadero.
- **Contenedores de plástico para almacenamiento:** Estos materiales son necesarios para transportar las plántulas al campo y reducir el daño a las plantas.
- **Campo preparado y listo para el establecimiento del vivero D0:** Es preferible aplicar riego por goteo y colocar cubiertas de plástico (acolchado). De ser necesario, también se pueden poner mallas sombra.
- **Transporte para llevar las plántulas al campo:** Dependiendo del número de plántulas que vayan a trasplantarse, se puede usar un remolque montado en un tractor o una camioneta.

Trasplante al campo: Se trasplantan plántulas bien establecidas al campo después de dos semanas (máximo), de la siguiente manera:

- Saque las plántulas del invernadero y póngalas en una casa sombra cercana al vivero D0; déjelas ahí de uno a tres días para que se aclimaten a las condiciones del campo.
- Transporte las plántulas en charolas de plástico, en una camioneta, para reducir los daños y el estrés causado a las plantas.
- Organice las plántulas según la población y trasplántelas juntas, para evitar confusiones y no mezclar las poblaciones.
- Riegue bien las plántulas, aproximadamente una hora antes de trasplantarlas.
- El trasplante deberá hacerse temprano en la mañana para evitar las altas temperaturas del mediodía; riegue de inmediato las plantas trasplantadas para evitarles estrés. Si el suelo tiene alto contenido de arcilla, es posible que las macetas jiffy no se degraden completamente, lo cual creará un ambiente de estrés para las plantas. En estos casos, elimine las macetas jiffy justo antes de trasplantar las plántulas.
- Inmediatamente después del trasplante (o cuando haya terminado de trasplantar una hilera), abra la válvula de riego por goteo y empiece a regar.
- Haga una lista del número total de plantas que acaba de trasplantar.

Nota: El trasplante al campo se puede hacer a mano o con una trasplantadora (Figura 4). Esto es conveniente sobre todo en aplicaciones a gran escala.



Figura 4. Dependiendo del tipo de suelo, la disponibilidad de mano de obra y el tamaño de las poblaciones, el trasplante de plántulas al campo puede hacerse de forma manual (A) o mecanizada (B) utilizando una sembradora adaptada a un tractor. [Fotos: G. Mahuku]

Manejo agronómico: Este es el factor más crítico para lograr recuperar plántulas D0 como parte del sistema de generación de líneas DH. Si no se hace un buen manejo agronómico, se obtendrán pocas líneas, aunque los demás pasos se sigan al pie de la letra. La optimización del régimen de riego, la aplicación de fertilizante y el manejo eficaz de malezas, enfermedades y plagas son de crucial importancia para reducir el estrés en las plantas D0. Dado que estas plantas son débiles desde el comienzo, cualquier tipo de estrés contribuirá a reducir las posibilidades de éxito y la tasa de recuperación de líneas DH. Es importante que las condiciones climáticas sean óptimas; siempre que sea posible, elíjase un sitio que cumpla con estas condiciones, que tenga el tipo de suelo requerido con buena fertilidad, y poca o ninguna presión de plagas y enfermedades. La aplicación oportuna de insumos como riego, fertilizante, herbicidas y pesticidas es crítica para que las plantas se establezcan correctamente. Las redes de protección solar pueden ser de mucha utilidad durante la antesis, sobre todo cuando la temperatura aumenta por encima de lo normal. Este tipo de redes disminuyen el estrés por temperatura y radiación en las plantas (Figura 3).

Riego: Como las raíces de las plántulas D0 son débiles, necesitan mucho menos agua que las líneas endogámicas o híbridos normales. Por tanto, es de suma importancia aplicar la cantidad correcta de agua para lograr el desarrollo óptimo de la planta. Si se aplica muy poca agua, las plantas se estresarán y esto afectará su establecimiento y desarrollo normal. El aplicar demasiada agua producirá líneas cloróticas con tallos delgados, lo cual afectará el tamaño del jilote y la producción de polen. Dependiendo del tipo de suelo y de su capacidad de retención de agua, deberá establecerse un programa de riego apropiado que optimice



la eficiencia en el uso del agua y los nutrientes. En estos casos, el riego por goteo es lo más apropiado en el vivero D0; cuando sea posible, deberán hacerse sondeos en varios puntos del vivero, a fin de monitorear la humedad del suelo y ayudar a que se programen regímenes de riego apropiados (Figura 5).

Figura 5. Riego por goteo para controlar la aplicación de agua en el vivero D0. También se puede aplicar fertilizante mediante un sistema de riego por goteo. [Fotos: G. Mahuku]

Fertilización apropiada: Este paso es crítico en el desarrollo de la planta y, por ello, cuando se utiliza riego por goteo, el fertilizante deberá aplicarse en forma de solución junto con el agua de riego. Al primer riego después del trasplante deberá agregársele fertilizante fosforado [por ejemplo, gotas de Polyfeed de Haifa 13-36-13 o Peter's Professional 9-45-15 (NPK)] para optimizar el desarrollo de la raíz y el establecimiento de las plantas. Tanto la aplicación excesiva de agua como las lluvias abundantes pueden afectar la disponibilidad de nutrientes, ya que gran parte de éstos se escurre con el agua. Esta es una situación problemática durante la temporada de lluvias, pues si llueve continuamente, los fertilizantes deben aplicarse en bandas y evitar así que se sature el suelo. Las capas de plástico y la siembra en camas reducirán este problema. Cuando se aplique riego por goteo, conecte un tanque fertilizador a la fuente principal de riego por medio de una válvula Venturi, calcule la cantidad de fertilizante que quiere aplicar por hectárea y agregue la solución concentrada al agua de riego. Los micronutrientes resultan cruciales para lograr un mejor establecimiento y una mejor floración. Los micronutrientes deben aplicarse en las hojas durante todo el periodo de crecimiento, siguiendo las recomendaciones respecto a la dosis y la frecuencia de aplicación. Al preparar la tierra se incorpora en el suelo 75% N, 100% P y 100% K; esto se aplica también con el riego por goteo justo antes de la floración. La aplicación foliar de nutrientes es esencial para que la planta crezca y se desarrolle mejor. Tres días después del trasplante, aplicar Hakaphos violeta 13-40-13 (NPK) en una proporción de 2.4 gramos por 20 litros de agua, una vez a la semana, e Impulsor a 40 ml por 15 litros de agua (en una proporción de 0.75 litros de Impulsor por hectárea). Es importante que se monitoreen periódicamente las plantas y se apliquen nutrientes foliares y fertilizantes, cuando sea necesario.

Control de malezas: Aplicar un control apropiado de malezas es vital para evitar la competencia entre plantas y aumentar al máximo la disponibilidad de nutrientes para las plantas DH. Es preferible desyerbar manualmente y, de ser posible, reducir al mínimo el uso de herbicidas, ya que la mayoría de las plantas DH son muy sensibles a los herbicidas residuales, pues éstos afectan su adecuado desarrollo y establecimiento. El plástico acolchado (láminas) constituye un medio excelente y económico para el manejo de las malezas; es de uso común en los cultivos hortícolas. Además de su utilidad en el manejo de malezas, las láminas de plástico ayudan a regular la temperatura del suelo y la humedad en el interior del sistema radical, lo cual redundará en el establecimiento y crecimiento uniforme de las plantas DH. La tubería para el riego por goteo y las láminas de plástico se pueden colocar en un solo paso, utilizando un dispositivo adaptado a un tractor (Figura 6).



Figura 6. Las láminas de plástico se utilizan para manejar mejor las malezas y regular la humedad del suelo y del ambiente. Se ha observado que las plantas DH que se cubren con láminas de plástico se desarrollan mejor que aquéllas sin cubierta. [Fotos: G. Mahuku]

Control de plagas y enfermedades: En las zonas tropicales, la presión ejercida por las enfermedades y plagas es un problema grave que afecta la tasa de recuperación de líneas DH. Se requiere un buen régimen de manejo de plagas y enfermedades para reducir los daños a las plantas y elevar la tasa de recuperación de líneas DH. El momento en que se aplican los fungicidas e insecticidas es decisivo para disminuir el efecto que tienen en la floración, pero sobre todo en el derrame del polen. Suspenda la aplicación de fungicida e

insecticida dos semanas antes de la floración para reducir al mínimo los posibles efectos en la floración. Dependiendo de la incidencia de plagas y enfermedades, utilice los fungicidas o pesticidas recomendados. Las enfermedades foliares como el tizón foliar norteño y el tizón foliar sureño se controlan con Tilt (Propiconazol), que se aplica un mes después de la siembra o cuando los síntomas se manifiestan y, posteriormente, una vez cada 15 días, en una proporción de 0.75 litros por hectárea. Este fungicida es eficaz para eliminar la mayoría de las enfermedades foliares, pero debe suspenderse su aplicación una o dos semanas antes de la floración. Gaucho es un insecticida sistémico que se aplica en la etapa de plántula y que protege a las plantas del ataque de la mayoría de los insectos (Figura 7). Los gusanos trozadores y plagas del suelo se controlan con el insecticida Lorsban granulado 5% (40 kg/ha), que se aplica en el fondo de los surcos durante la preparación de la tierra. Para los barrenadores del tallo se utiliza Lorsban 480 EM, en una proporción de 1 litro por hectárea, o Karate Zeon a 0.5 litros por hectárea.

Nota: El hecho de que a lo largo de este manual mencionemos la marca de algunos de los productos que utilizamos (incluidos fertilizantes, fungicidas y pesticidas) no significa que el CIMMYT promueva su comercialización. Sabemos que hay productos similares o mejores en el mercado que sirven para el mismo propósito.



Figura 7. Los gusanos eloteros pueden ser devastadores en el vivero D0 y, por tanto, es necesario establecer un programa muy eficaz para el manejo de plagas. Esta figura muestra (A) el daño que ocasiona el gusano elotero (*Heliothis* sp.) y (B) una planta que ha sido tratada con insecticida. [Fotos: G. Mahuku]

Autofecundación de plantas D0 para derivar nuevas líneas DH: En este paso, las supuestas plantas dobles haploides (D0) son cuidadosamente autofecundadas para derivar semilla D1 —que de hecho es la nueva línea DH— para realizar la multiplicación de semilla o para que los mejoradores la utilicen. Cabe señalar que, algunas veces, el tratamiento de colchicina no produce una duplicación cromosómica total o uniforme de todas las células de una plántula; a esto se le conoce como “diploidización por sectores”. Los efectos pueden variar, sobre todo en el genotipo y en la aplicación de colchicina. Puede haber plantas con espigas que producen polen abundante, en tanto que, en la mayoría de los casos, las espigas tienen anteras que producen o poco o nada de polen (Figura 8). En consecuencia, la autopolinización puede resultar difícil. Es necesario contar con personal bien capacitado para evitar que se pierdan esos genotipos a causa de una autopolinización inadecuada.



Figura 8. Producción de polen de una planta DH: (A) producción de una buena cantidad de polen; (B) solo unas cuantas espiguillas producen polen y el resto son estériles debido a una diploidización por sectores; y (C) espiga estéril, problema que se observa comúnmente en un vivero D0. [Fotos: G. Mahuku]

Identificación y eliminación de plantas “falsas” (diploides) en el vivero D0. La clasificación errónea de granos haploides a veces es resultado de una expresión insuficiente de los marcadores de color fenotípicos, de la presencia de genes dominantes que inhiben el color a base de antocianina y de la falta de personal capacitado. Sin embargo, las supuestas plantas DH se distinguen fácilmente de las plantas diploides normales en condiciones de campo, por su vigor, hábito foliar, tamaño de espiga y pigmentación a base de antocianina en el tallo. Haga un monitoreo de la coloración del tallo de las probables plantas DH antes de la floración y elimine aquéllas cuyos tallos presentan coloración púrpura. Es necesario descartar a tiempo las que son falsas para evitar la competencia por la luz, el agua y los nutrientes, así como la contaminación por polen de las verdaderas plantas DH, y concentrarse en el mantenimiento de estas últimas.

Autopolinización para mantener las nuevas líneas DH y multiplicar su semilla

Requerimientos:

1. Bolsas de glassine para cubrir los jilotes (jiloteo), bolsas blancas de papel hechas a la medida para recolectar el polen (bolsas para polinización) y bolsas comunes para polinización Lawson No. 501 (para cubrir las espigas).
2. Personal capacitado y comprometido con su trabajo.

Monitoreo de la emergencia de anteras: Es fundamental contar con personal bien capacitado para realizar este paso. Por lo general, las plantas DH son débiles, tienen pocas anteras que producen polen, y suelen producir solo un poco durante unos cuantos días. Por lo tanto, debe hacerse un monitoreo constante para identificar las plantas D0 que sí producen polen (entre las muchas cuyas espigas son infértiles), recolectar el polen y hacer la autopolinización de inmediato es un paso crítico para la recuperación de semilla D1 y para el desarrollo de líneas DH. Cabe señalar que el genotipo DH se perderá si la polinización no se realiza apropiadamente, aunque los pasos anteriores se cumplan al pie de la letra. La polinización es un paso que requiere mucho trabajo y durante este periodo es indispensable contar con un equipo de trabajo bien capacitado en el campo, a fin de evitar la pérdida de plantas que están listas para ser polinizadas.

***Nota:** El éxito del proceso de DH depende de contar con personal bien capacitado, sobre todo personal de laboratorio y de campo. Tener experiencia es importante en esta labor y con cada ciclo va aumentando la eficiencia. Por esta razón, trate de no rotar al personal, ya que esto puede afectar considerablemente el número de líneas que finalmente se obtienen.*

Polinización: Cubra los vástagos (jilotes) antes de que emerjan los estigmas/filamentos. Las bolsas transparentes, sin recubrimiento (de aproximadamente 6×20 cm) son las más adecuadas para recolectar el polen de las probables plantas DH para usarlo en la autopolinización. Dado que estas plantas suelen producir poco polen, las bolsas transparentes permiten hacer una evaluación visual de la cantidad de polen recolectado para la autofecundación. De ser necesario, se puede hacer otra polinización el siguiente día. Después de la polinización, se pueden usar bolsas comunes o bolsas para espigas para cubrir y proteger las mazorcas



polinizadas. Si va a polinizar, cubra las espigas con bolsas antes de la hora prevista para dicha actividad y trate de polinizar todas las plantas. Cubra adecuadamente las mazorcas polinizadas con bolsas de espigas para protegerlas y asegúrelas firmemente con grapas (Figura 9).

Figura 9. Polinización en el vivero D0: (A) se utilizan bolsas de glassine transparentes, sin recubrimiento, o bolsas para espigas para recolectar polen de las probables plantas DH y hacer la autofecundación; (B) planta polinizada. [Fotos: G. Mahuku]

Cosecha de mazorcas autopolinizadas después de la madurez fisiológica: Con frecuencia solo se forman unas cuantas semillas en la mazorca de una planta DH (Figura 10). Por tanto, deben extremarse los cuidados para evitar pérdidas en el campo. Las mazorcas deberán cosecharse con mucho cuidado y guardarse en bolsas protectoras apropiadas para trasladarlas al almacén, donde se les quitarán las hojas y se pondrán a secar. Esta semilla representa una línea, completamente homocigota, recién desarrollada, que posiblemente se siembre de nuevo para multiplicar la semilla y utilizar la línea en otras actividades de investigación y mejoramiento. Si encuentra mazorcas con semilla de color púrpura, deséchelas porque son de plantas que fueron incorrectamente clasificadas (diploides normales, no DH) y que no fueron eliminadas en los pasos anteriores. Es de esperar que se logrará una mayor producción de semilla DH en ciclos subsecuentes de producción DH porque: (1) se selecciona germoplasma fuente que posee genes que confieren una respuesta favorable a la inducción de haploidía y a la duplicación cromosómica artificial; y (2) el personal técnico y de campo que participa en las operaciones para obtener materiales DH tendrá más experiencia.



Figura 10. Mazorcas cosechadas en el vivero D0. Puede haber una variación considerable en la cantidad de semilla que producen las mazorcas (DH) D1, desde una o dos semillas hasta más de 50. Por tanto, debe ponerse especial cuidado para evitar pérdidas mientras se cosechan las mazorcas. [Fotos: G. Mahuku]

7. Integración de selección asistida por marcadores en el sistema de mejoramiento de DH para acelerar el desarrollo y la distribución de líneas progenitoras y variedades superiores

R. Babu, Sudha K. Nair, B.S. Vivek, Félix San Vicente y B.M. Prasanna

Introducción

En años recientes, han surgido los dobles haploides (DH) y los marcadores moleculares, dos de las tecnologías más potentes que están revolucionando la generación de líneas homocigotas en los programas de mejoramiento aplicado de maíz (Mayor y Bernardo, 2009). Como se explica en secciones anteriores de este manual, en comparación con los métodos convencionales, la tecnología DH reduce de manera considerable el tiempo requerido para obtener líneas genéticamente homocigotas y puras. Algunas ventajas importantes de usar líneas DH en los programas de mejoramiento son la máxima varianza genética entre las unidades de selección y mayor precisión al estimar el valor genotípico de las líneas DH y de sus cruzas de prueba (CP) (Gordillo y Geiger, 2008). Además, el uso de las líneas DH en los programas de mejoramiento permite hacer una selección temprana de híbridos potenciales, simplifica la logística de la multiplicación y el mantenimiento de semilla endogámica, y permite una fijación rápida de alelos favorables en loci de caracteres cuantitativos (QTL) (Mayor y Bernardo, 2009; Lubberstedt y Ursula, 2012). Cuando se le combina con genotipado de la semilla con base en el ADN (Gao et al., 2009), especialmente en regiones con grandes efectos genómicos que condicionan la calidad nutricional (por ejemplo, contenido de betacaroteno regulado por *crTRB1*-) o caracteres de resistencia a enfermedades (por ejemplo, resistencia al virus del rayado del maíz, conferida por *msv1*-), el mejoramiento molecular de DH produce enormes ahorros de tiempo, mano de obra, extensión de tierra y otros recursos.

El desarrollo de líneas y el mejoramiento de poblaciones mediante selección recurrente (SR) son dos de las actividades que con mayor frecuencia se realizan en los programas de mejoramiento de maíz. Las mejores poblaciones fuente que se obtienen mediante SR se utilizan, ya sea como germoplasma fuente nuevo para derivar líneas endogámicas, o directamente como sintéticos que pueden ser liberados para los agricultores en regiones de escasos recursos. Aquí describimos dos métodos posibles y prácticos para integrar las estrategias de la selección asistida por marcadores (SAM) en los programas de mejoramiento de DH.

Integración de SAM en el sistema de mejoramiento de pedigrís de DH

El mejoramiento del pedigrí, junto con los extensos ensayos multilocacionales en una amplia diversidad de ambientes, ha sido el pilar de los programas de mejoramiento de maíz en todo el mundo. El mejoramiento de pedigrí comienza con la cruce de dos genotipos elite que poseen rasgos que se complementan (como buen comportamiento agronómico, tolerancia al estrés abiótico, resistencia a enfermedades y calidad nutricional) y, en las generaciones sucesivas, las progenies superiores que reúnen los rasgos deseables son seleccionadas hasta que se logra la homocigosis, en la generación F7 o F8. Se mantiene un historial de selección de todas las generaciones de mejoramiento. Con la llegada de la tecnología DH, ahora es posible obtener líneas homocigotas en solo dos generaciones, en lugar de las siete u ocho que son obligatorias en el mejoramiento convencional del pedigrí. Aunque la tecnología DH permite ahorrar una cantidad de tiempo considerable, elimina, hasta cierto punto, las oportunidades de selección que normalmente tiene un mejorador durante las múltiples generaciones filiales. En general, ha sido una práctica de rutina en el mejoramiento de maíz inducir haploidía en generaciones F1 con el fin de ahorrar tiempo. Sin embargo, los dobles haploides derivados de F1 suelen tener pocas recombinaciones (porque hay una sola fase de meiosis) y se ha descubierto que esto disminuye las respuestas a uno o a múltiples ciclos de presión de selección (Riggs y Snape, 1977; Jannink y Abadie, 1999).

En el caso de un carácter controlado por 100 o más QTL, Bernardo (2009) reportó, basándose en experimentos de simulación, que las respuestas acumulativas a la selección de las líneas DH derivadas de la

F2 eran superiores hasta en un 4 a 6% que las de las líneas DH derivadas de F1, por lo cual sugirió hacer la inducción de haploidía en la F2 en lugar de la F1, a fin de mantener por más tiempo una mejor respuesta a la selección. Sin embargo, para elegir entre la F1 y la F2, hay que lograr un cierto balance entre el tiempo y los recursos del programa de mantenimiento. Según la propuesta de Bernardo (2009), si las primeras F1 se forman sobre una base especulativa en el programa de mejoramiento, quizá no sea necesario invertir tiempo adicional en la inducción de haploidía en la F2.

Además de hacer más eficiente la recombinación, una ventaja importante de inducir haploidía en la F2 es que se tiene la oportunidad de someter a los individuos F2 (tanto semilla como plantas) a la presión de selección tanto genotípica como fenotípica. Dependiendo de los caracteres que busca obtener el programa de mejoramiento y de la información que tiene sobre los marcadores moleculares del *locus* o *loci* específicos que controlan dichos caracteres, las semillas F2 se pueden caracterizar fenotípicamente, por separado, mediante un muestreo no destructivo (Gao et al., 2009) y se pueden desechar las semillas homocigotas portadoras de alelos no favorables. Este procedimiento se ha descrito como “enriquecimiento de F2” (Howes et al., 1998; Bonnett et al., 2005; Wang et al., 2007). Hasta la fecha, en el maíz se han identificado pocos *loci* que tienen grandes efectos fenotípicos, y en los que dicho método pudiera ser viable. A continuación damos algunos ejemplos:

- *Crttb1*, un gene de caroteno hidroxilasa (Yan et al., 2010) ha mostrado que multiplica de 2 a 10 veces el contenido de betacaroteno en todas las composiciones genéticas del germoplasma de maíz tropical (Babu et al., en proceso). El genotipado de ADN de maíz de *crtRB1*, sobre todo en generaciones avanzadas como F2 o F3, se utiliza normalmente en el programa de mejoramiento de maíz HarvestPlus en el CIMMYT, lo cual ha generado considerables ganancias que han culminado en el desarrollo de líneas con un mayor contenido (de 15 a 20 ppm) de provitamina A, en comparación con 1 a 2 ppm que contiene el maíz amarillo normal.
- *Opaco 2 (o2)* es un regulador transcripcional del maíz cuyo alelo mutante confiere el doble de lisina y triptófano en el endospermo que el que posee el maíz normal; este gene, junto con los modificadores asociados del endospermo, da como resultado el maíz con calidad proteínica (en inglés, quality protein maize, o QPM) (Prasanna et al., 2001). Los marcadores moleculares que se encuentran dentro de *o2* se han utilizado con éxito para acelerar el desarrollo de versiones QPM de líneas de maíz normal (Babu et al., 2005).
- El virus del rayado del maíz (maize stripe virus, MSV) es una enfermedad importante en la mayoría de África subsahariana; se ha identificado en chr.1 un QTL de gran efecto que condiciona la resistencia a MSV (Welz et al., 1998; Lu et al., 1999; Kyetere et al., 1999) en diferentes composiciones genéticas. El Programa Global de Maíz del CIMMYT identificó recientemente (y ahora está validando) una serie de marcadores SNP en esta región genómica, que quizá puedan utilizarse para hacer una diferenciación eficaz de genotipos resistentes o susceptibles a MSV, sin tener que hacer selección fenotípica. Aunque quizá haya otros *loci* menores que influyen en la resistencia a MSV en otras partes del genoma del maíz o en otras composiciones genéticas, a *msv1* se le puede considerar como un requisito esencial para obtener niveles razonables de resistencia a esta enfermedad (Sudha K. Nair, comunicación personal).

Con la amplia adopción de los estudios de asociación en el genoma completo, es probable que la comunidad dedicada a la genética del maíz desentrañe y valide un mayor número de asociaciones marcador-carácter en los años próximos. Se espera que esto hará que en el maíz el enriquecimiento F2 se convierta en el método preferido para hacer una preselección del germoplasma fuente antes de la inducción de haploidía. Cuando los individuos seleccionados con ayuda de marcadores se siembran en el campo, se puede hacer una selección fenotípica adicional del vigor general de la planta, el tipo de planta y otros caracteres *per se*, a fin de asegurar que únicamente los genotipos “buenos” serán sometidos al procedimiento de inducción de haploidía.

En la Figura 1 aparece un esquema ilustrativo de la selección de DH con ayuda de marcadores, dirigida a combinar tolerancia a la sequía con uno de los caracteres de resistencia a enfermedades durante el mejoramiento de pedigrí. Como ya se mencionó, ha sido identificada una región genómica de grandes

efectos que influye en la resistencia a MVS y su efecto fenotípico se ha validado en diversas composiciones genéticas. La selección con ayuda de marcadores de semillas F2 individuales que portan el *msv1* podría ayudar a descartar aquellos individuos homocigotas con un alelo *msv1* no favorable, y se puede hacer selección fenotípica adicional de caracteres *per se* y de caracteres relacionados con el vigor de la planta para garantizar que se eliminen las plantas débiles y no someterlas al proceso de inducción de haploidía. Posteriormente, las plantas seleccionadas tanto con ayuda de marcadores como fenotípicamente se cruzan con el inductor de haploidía tropicalizado y se identifican los posibles granos haploides. Al realizar la duplicación cromosómica y la autofecundación de las plantas D0 para producir semilla D1, de manera simultánea, el polen de las plantas D0 (si es que hay una cantidad suficiente) se puede utilizar para hacer cruza de prueba. Después de producir suficientes cruza de prueba DH (con D0 o D1), éstas se evalúan para determinar su comportamiento en condiciones de sequía y condiciones óptimas en múltiples localidades que representan la población meta de ambientes. Los mejores híbridos tolerantes a sequía que muestren niveles razonables de resistencia a MVS serán identificados y elegidos para incluirlos en los Ensayos Nacionales de Comportamiento, y sus respectivas líneas progenitoras se conservarán. Por otra parte, si se genotipean las líneas DH, se podrán estimar los efectos del marcador en el comportamiento en condiciones de sequía y en condiciones óptimas, lo cual, al paso de los años, contribuirá a la predicción por vía del genoma de líneas DH no ensayadas, las cuales se generan año tras año en el programa de mejoramiento; de esta manera, se reducirían los requerimientos del manejo de selección y el fenotipado.

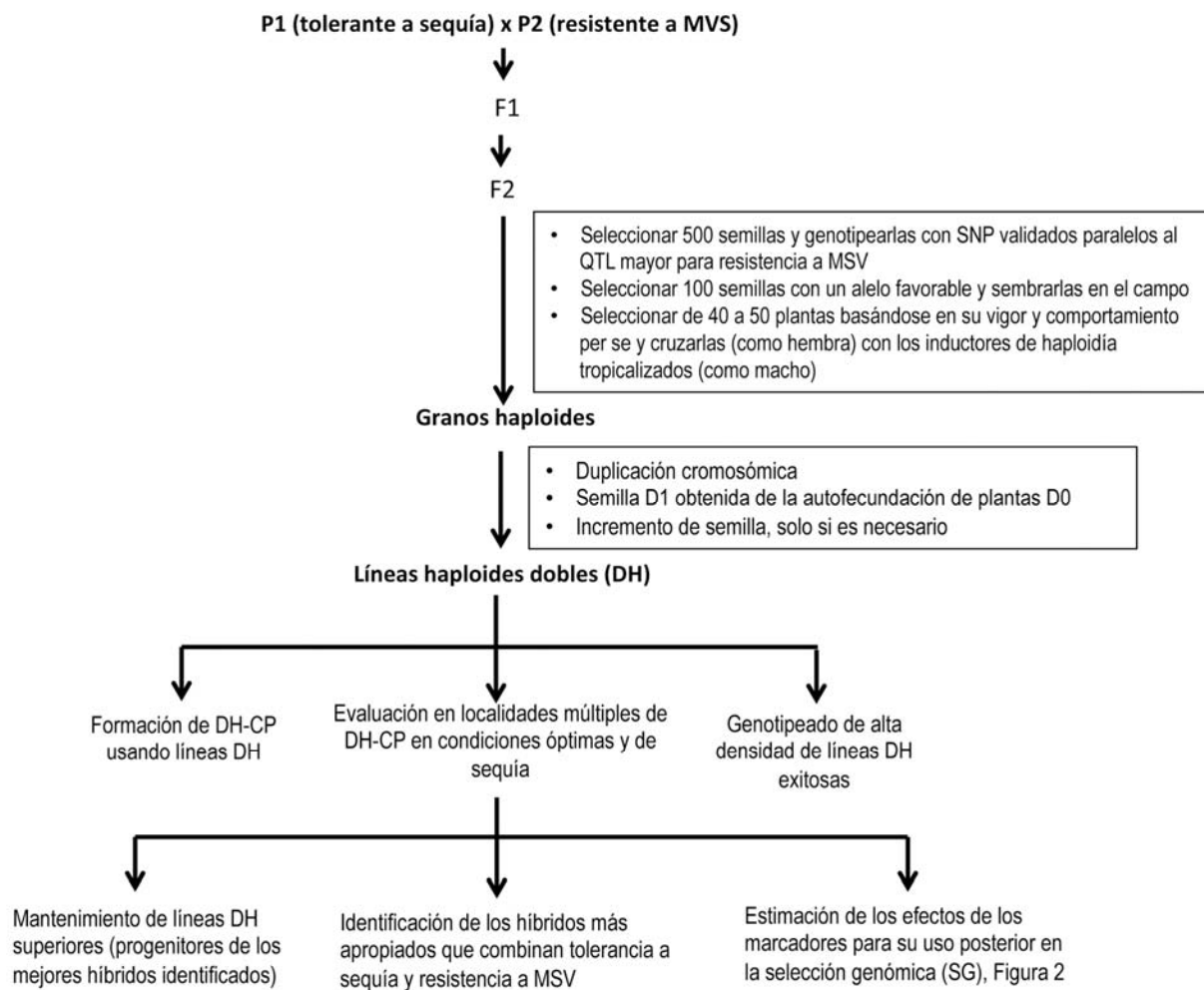


Figura 1. Esquema que ilustra la selección de DH asistida por marcadores dirigida a combinar tolerancia a sequía con resistencia a enfermedades en un programa de mejoramiento de pedigrí. MSV = Virus del rayado del maíz; D0 = probables plántulas DH después de la duplicación cromosómica de haploides; D1 = semilla derivada de plantas D0; CP = cruza de prueba.

Selección genómica de ciclo rápido y fuente abierta

La selección recurrente (SR) ha sido una herramienta importante del mejoramiento de maíz que se usa para crear poblaciones fuente mejoradas cuya frecuencia de alelos deseables ha sido incrementada significativamente, sobre todo en lo que se refiere a caracteres altamente complejos y poligénicos como la tolerancia a la sequía y al calor. Aunque es eficaz, la SR basada únicamente en el fenotipo requiere mucho tiempo y muchos recursos, ya que es necesario generar progenies de CP y evaluar los materiales en múltiples localidades con repeticiones antes de cada paso de la selección. Por tanto, si se pretende realizar cuatro ciclos de SR, esto conlleva un mínimo de cuatro ciclos de generación de CP y otros cuatro ciclos de evaluación de su comportamiento en múltiples localidades. La selección genómica (SG) es un método novedoso que utiliza el genotipado de alta densidad para predecir el valor genético total de un individuo basándose en una serie ejemplar de individuos que son fenotipados en localidades representativas. Los métodos que se basan en la SG suelen no considerar los datos del número y la ubicación de los QTL y se concentran en mejorar genéticamente los rasgos cuantitativos y no en entender su base genética (Jannink et al., 2010). La utilidad de los procedimientos basados en el genotipado de alta densidad que se usan para predecir el comportamiento indica que los marcadores se pueden utilizar como herramientas seleccionables para mejorar un rasgo complejo, aunque no se entienda del todo la genética subyacente del rasgo o carácter en cuestión. La SG de ciclo rápido (SGCR) es un instrumento conveniente para aumentar el ritmo de los ciclos de SR sin tener que fenotipar cada serie de progenies recombinadas. Asimismo, con el SGCR se ahorra una considerable cantidad de recursos materiales, en virtud de que solo se requiere un ciclo de fenotipado en localidades representativas. En las generaciones subsecuentes, los individuos recombinados solo son genotipados y sus valores genéticos se pueden predecir con base en los efectos previamente estimados del marcador.

En la Figura 2 se presenta un ejemplo de SGCR en el contexto de una población multiparental cerrada. La SR en una población multiparental puede ser muy eficaz en comparación con una población biparental, la cual consume muchos recursos y no permite evaluar numerosas poblaciones. Tradicionalmente, de cada grupo heterótico se seleccionan de 8 a 12 líneas de maíz elite con rasgos complementarios como tolerancia a sequía, resistencia a enfermedades y calidad nutricional mejorada, y se producen medios dialelos para poder obtener todas las combinaciones posibles. Las F1 se recombinan ya sea en aislamiento o por medio de polinización controlada para formar una población F2 grande. Dependiendo de los caracteres que se quieran lograr para una agroecología en particular y de la información molecular de dichos caracteres que se tenga, se podría tratar de realizar enriquecimiento F2, como se describió en la sección sobre el mejoramiento de pedigrí. En esta ilustración, las semillas F2 son seleccionadas utilizando cuatro SNP validados, que son paralelos al QTL de resistencia a enfermedades y a un gene mayor, *crtRB1*, que aumenta el contenido de betacaroteno en el endospermo del maíz.

En el ciclo siguiente, después de la selección F2, se establecen al menos 500 familias S2 (C0) de cada población multiparental, que serán genotipadas y sometidas a cruces de prueba. En los siguientes ciclos, las CP se genotiparán en condiciones de sequía y óptimas en localidades representativas, y se estimarán los efectos del marcador, haplotipo o QTL. Se seleccionará el 5 a 10% de los mejores individuos de las familias C0, con base en los datos de las cruces de prueba, y se recombinarán para formar el C1 (ciclo 1). Los individuos del C1 se genotiparán y, según los efectos del marcador C0 calculados con anterioridad, se calcularán los valores genómicos estimados de mejoramiento (VGEM) y el 5 a 10% de los mejores individuos C1 seleccionados por VGEM se recombinarán para formar el C2, sin ser sometidos a evaluación fenotípica. Este paso se repite un ciclo más hasta el C3, en que los individuos seleccionados por VGEM serán cruzados con un inductor de haploidía para generar líneas DH. En caso de que el programa de mejoramiento logre obtener un gran número de líneas DH del C3, es posible seleccionar un número más pequeño de líneas superiores sin evaluación fenotípica utilizando VGEM (efectos del marcador de C0 + información genotípica de las líneas DH). Las líneas seleccionadas por medio de VGEM se pueden distribuir a diferentes empresas pequeñas y medianas (PyME) y a colaboradores de los sistemas nacionales de investigación agrícola (SNIA) para su respectiva evaluación (*per se* y utilizando CP) en los ambientes de producción que ellos elijan. La información fenotípica que generen las semilleras pequeñas y medianas y los colaboradores de los SNIA podría compartirse y esto ayudaría a revisar o actualizar los efectos del marcador, lo cual, a su vez, serviría para hacer predicciones en el futuro. La pre-

selección de individuos F2 (usando información específica sobre el marcador de calidad nutricional y/o resistencia a enfermedades) combinada con múltiples ciclos de selección recurrente basada en estimaciones robustas del efecto de marcadores en condiciones de sequía y óptimas garantizaría que las líneas DH derivadas de C3 sean superiores en cuanto a calidad nutricional y resistencia a enfermedades, y competentes en cuanto a su comportamiento en condiciones de sequía, sin repercusiones en el rendimiento en condiciones óptimas. La naturaleza de fuente abierta del esquema propuesto garantiza también que la información fenotípica que generen las diferentes instituciones asociadas será compartida y que, al mismo tiempo, las instituciones conservarán los derechos de propiedad intelectual sobre los recursos materiales. La población fuente mejorada C3 podrá compartirse también con los SNIA que la soliciten, los cuales, a su vez, pueden promover este material como un sintético superior o una variedad de polinización abierta (VPL) que los agricultores podrán sembrar o utilizar en sus propios programas de mejoramiento para derivar líneas endogámicas superiores. Se pueden obtener mayores beneficios con el esquema propuesto si se siembran viveros todo el año a fin de acelerar el ciclo de mejoramiento.

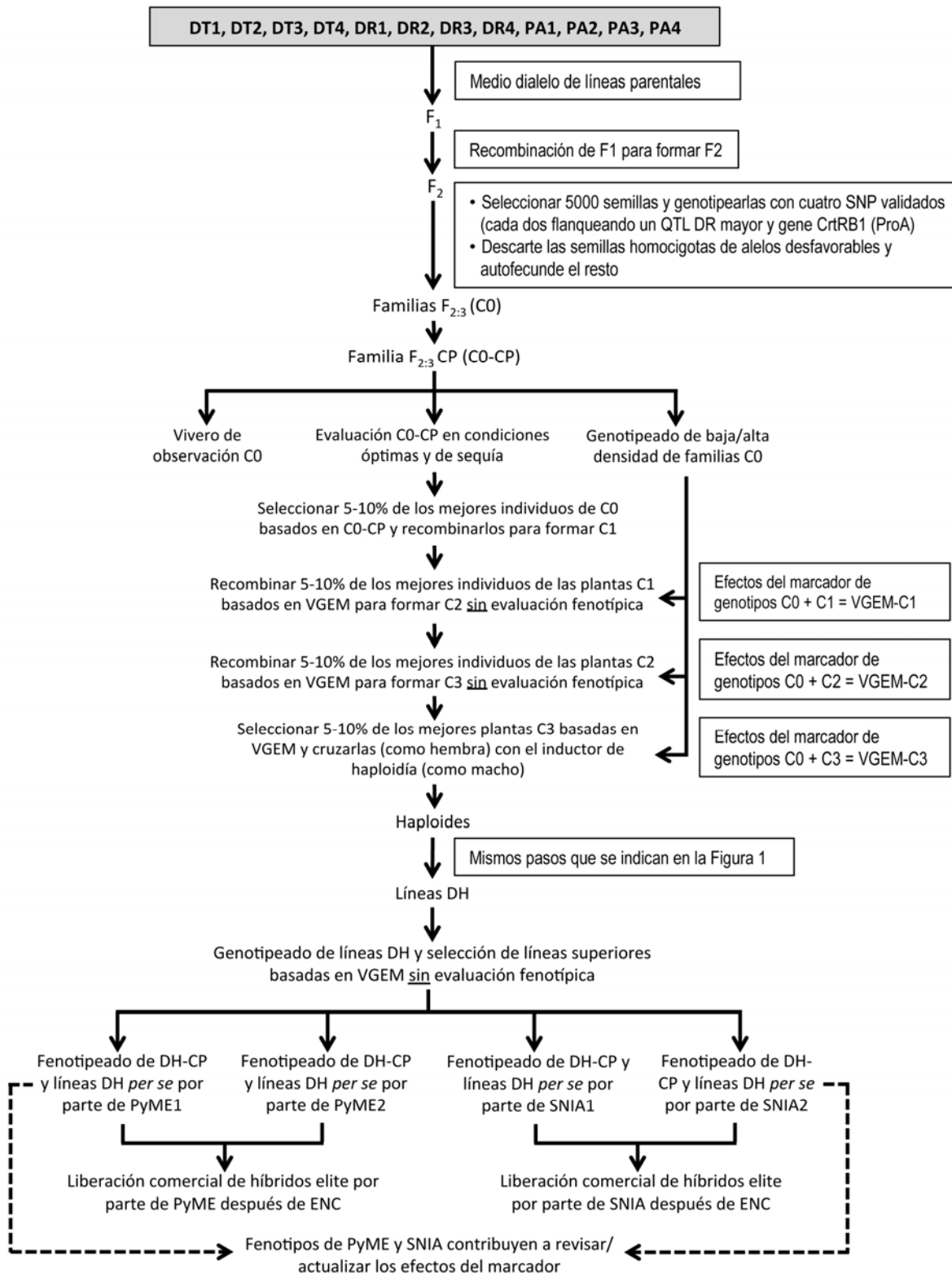


Figura 2. Un modelo multiparental de SR de fuente abierta para la integración de marcadores moleculares y la tecnología DH a fin de distribuir rápidamente líneas superiores con tolerancia a sequía, resistencia a enfermedades y calidad nutricional. TS = tolerancia a sequía; RE = resistencia a enfermedades; PA = provitamina A; C0 = ciclo 0; C1 = ciclo 1; C2 = ciclo 2; C3 = ciclo 3; CP = cruza de prueba; VGEM = valores genómicos estimados de mejoramiento; PyME = pequeñas y medianas empresas; SNIA = sistema nacional de investigación agrícola; ENC = ensayos nacionales de comportamiento.

Referencias

- Babu R, Nair SK, Kumar A, Venkatesh S, Sekhar JC, Singh NN, Srinivasan G, Gupta HS (2005) Two-generation marker aided backcrossing for rapid conversion of normal maize lines to Quality Protein Maize (QPM). *Theor. Appl. Genet.* 111: 888–897.
- Babu R, Palacios N, Gao S, and Yan J, and Pixley K (en proceso) Validation of the effects of molecular marker polymorphisms in *LcyE* and *CrtRB1* on provitamin A concentrations for 26 tropical maize populations. *Theor. Appl. Genet.*
- Bernardo R (2009). Should maize doubled haploids be induced among F1 or F2 plants? *Theor. Appl. Genet.* 119: 255–262.
- Bonnett DG, Rebetzke GJ, Spielmeier W (2005) Strategies for efficient implementation of molecular markers in wheat breeding. *Mol. Breed.* 15: 75–85.
- Gao S, Martinez C, Debra J, Krivanek AF, Crouch JH, Xu Y (2009) Development of a seed DNA-based genotyping system for marker-assisted selection in maize. *Mol. Breed.* 22: 477–494.
- Gordillo A, Geiger HH (2008) Alternative recurrent selection strategies using doubled haploids lines in hybrid maize breeding. *Crop Sci.* 48: 911–922.
- Howes NK, Woods SM, Townley-Smith TF (1998) Simulations and practical problems of applying multiple marker assisted selection and doubled haploids to wheat breeding programs. *Euphytica* 100: 225–230.
- Jannink JL, Abadie TE (1999) Inbreeding method effects on genetic mean, variance, and structure of recurrent selection populations. *Crop Sci.* 39: 988–997.
- Jannink JL, Lorenz AJ, Iwata H (2010) Genomic selection in plant breeding: from theory to practice. *Briefings in Functional Genomics* 9: 166–177.
- Kyetere DT, Ming R, McMullen MD, Pratt RC, Brewbaker J, Musket T (1999) Genetic analysis of tolerance to maize streak virus in maize. *Genome* 42: 20–26.
- Lu XW, Brewbaker JL, Nourse SM, Moon HG, Kim SK, Khairallah M (1999) Mapping of quantitative trait loci conferring resistance to maize streak virus. *Maydica* 44: 313–318.
- Lubberstedt T, Ursula K (2012) Application of doubled haploids for target gene fixation in backcross programmes of maize. *Plant Breed.* doi:10.1111/j.1439-0523.2011.01948.x
- Mayor P, Bernardo R (2009) Doubled haploids in commercial maize breeding: one-stage and two-stage selection versus marker-assisted recurrent selection. *Maydica* 54: 439–448.
- Prasanna BM, Vasal SK, Kassahun B, Singh NN (2001) Quality protein maize. *Curr. Sci.* 81: 1308–1319.
- Riggs TJ, Snape JW (1977) Effects of linkage and interaction in a comparison of theoretical populations derived by diploidized haploid and single seed descent methods. *Theor. Appl. Genet.* 49: 111–115.
- Wang J, Chapman SC, Bonnett, DG, Rebetzke GJ, Crouch J (2007) Application of population genetic theory and simulation models to efficiently pyramid multiple genes via marker-assisted selection. *Crop Sci.* 47: 582–588.
- Welz HG, Schechert A, Pernet A, Pixley KV, Geiger HH (1998) A gene for resistance to maize streak virus in the African CIMMYT maize inbred CML202. *Mol. Breed.* 4: 147–154.
- Yan J, Kandianis C, Harjes CE, Li B, Kim EH, Yang X, Skinner DJ, Zhiyuan F, Mitchell S, Li Q, Salas Fernandez MG, Zaharieva M, Babu R, Yang F, Palacios Rojas N, Li J, Dellapenna D, Brutnell T, Buckler ES, Warburton ML, Rocheford T (2010) Rare genetic variation at *Zea mays crtRB1* increases beta-carotene in maize grain. *Nat. Genet.* 42: 322–327.

8. DH en el mejoramiento de maíz comercial: Selecciones fenotípicas

Daniel Jeffers y George Mahuku

Introducción

El uso de dobles haploides (DH) en los programas de mejoramiento de maíz comercial ofrecen varios beneficios a la industria semillera, como por ejemplo, reducción de los costos relacionados con las operaciones de mejoramiento, aceleración de los ciclos de mejoramiento para llevar los productos al mercado y mayor eficiencia en la caracterización y el aprovechamiento de germoplasma nuevo. Por esta razón, la tecnología DH se ha convertido en un componente fundamental del desarrollo de productos en las grandes empresas semilleras. En este capítulo se describe cómo se está aplicando en los programas de mejoramiento con fines comerciales la tecnología DH, en combinación con fenotipado de alto rendimiento y razonablemente preciso.

Los dobles haploides de maíz comenzaron a producirse para utilizarse en el mejoramiento de ese grano desde la década de 1940 en los Estados Unidos de Norteamérica (Chase, 1947, 1949) y como líneas parentales de híbridos comerciales, desde principios de la década de 1960 (Troyer, 2004; Forster y Thomas, 2005). DeKalb 640, el primer híbrido comercial tolerante a la alta densidad de siembra de amplia aceptación que se sembró en Estados Unidos, contenía tres líneas DH en su pedigrí (Chang y Coe, 2009). Aunque la tasa de inducción y la de duplicación cromosómica inicialmente fueron bajas, las líneas homocigotas que desarrollaron los programas de mejoramiento de pedigrí elite resultaron de mucha utilidad en los programas de mejoramiento de maíz con fines comerciales.

En las actividades de mejoramiento con fines comerciales, acelerar el ciclo de mejoramiento utilizando tecnología DH tiene grandes beneficios, debido a que se reducen de manera significativa los recursos que se necesitan para desarrollar las líneas. Las empresas de mejoramiento comercial, gracias a la tecnología DH, eliminan también las actividades de ensayo de Etapa 1 que se realizan en las líneas endogámicas de generación temprana. En tan solo 3 ó 4 ciclos, después del desarrollo de las líneas D1, las nuevas líneas que se utilizan para generar híbridos comerciales se pueden evaluar en viveros de selección de estrés y en ensayos en múltiples localidades; estas líneas se mandan a las unidades de producción de semilla comercial de las compañías, para que las siembren en ensayos con parcelas en franjas de híbridos precomerciales. Algunas de las grandes compañías semilleras multinacionales actualmente usan líneas DH en la mayoría de sus actividades mejoramiento. Según informes, en 2011, Pioneer generó una cantidad de líneas DH que supera el número total de líneas endogámicas generadas en los primeros 80 años de sus actividades fitotécnicas. Este dato es representativo de la industria semillera multinacional en conjunto. Ahora el foco de atención es la selección asistida por marcadores (SAM) y el fenotipado de alto rendimiento de las recién generadas líneas DH.

La tecnología DH aumenta la capacidad de identificar materiales de mejoramiento con comportamiento superior en diversas condiciones medio ambientales

En los grandes programas de mejoramiento comerciales, las líneas DH ahora se evalúan más rápidamente y se seleccionan gracias a los marcadores moleculares, antes de caracterizar su comportamiento agronómico en muchos ambientes y evaluar su resistencia a estreses bióticos y abióticos relevantes. Estos ambientes incluyen aquéllos con estrés controlado (Campos et al., 2004) que proporcionan información acerca del rendimiento en condiciones no óptimas. La evaluación de las líneas DH completamente homocigotas y sus productos híbridos, brinda una excelente oportunidad de vincular el comportamiento fenotípico con el genotipo. La empresa Dow AgroSciences en Brasil, utilizando un programa de DH a escala comercial junto con una buena caracterización fenotípica de la reacción a enfermedades bióticas, logró cambiar rápidamente los perfiles fenotípicos de enfermedad de sus líneas endogámicas elite para dotarlas con resistencia a numerosas enfermedades, gracias a un reciclado rápido, y como resultado, creó un fuerte sistema de producción comercial de híbridos resistentes a muchas enfermedades. Esto lo hicieron antes de que se comenzaran a utilizar de manera

habitual las herramientas moleculares para ayudar a genotipar las líneas DH endogámicas (D. Jeffers, información personal).

En la última década, las grandes compañías semilleras internacionales han logrado enormes avances en su capacidad de genotipado, pero se han dado cuenta de que su capacidad de fenotipado no ha avanzado al mismo ritmo (Campos et al., 2004). Por tanto, se hicieron cuantiosas inversiones destinadas a mejorar la capacidad de realizar fenotipado de alto rendimiento para evaluar germoplasma de maíz en condiciones tanto óptimas como de estrés utilizando “plataformas de fenotipado”. El término “fenómica” se ha aplicado a todo el campo de la caracterización fenotípica mejorada por medio de la tecnología moderna, que incluye técnicas como las imágenes digitales, el análisis espectral y la medición de la temperatura del follaje (dosel), asociadas con la bioinformática (Finkle, 2009; González-Pérez et al., 2011; Montes et al., 2011; Patil y Kumar, 2011). Estas técnicas se han utilizado para evaluar el comportamiento agronómico en condiciones óptimas y de estrés tanto abiótico como biótico, y proporcionan una medición más cuantitativa de las respuestas del germoplasma. La obtención de resultados más precisos también nos ha dado la oportunidad de entender mejor la base genética de la respuesta a varios estreses.

Utilización de los DH con otras tecnologías para acelerar los avances del mejoramiento

Los dobles haploides son solo un componente del paquete tecnológico que ha permitido a los programas de mejoramiento comerciales aumentar tanto la eficiencia de sus actividades como los avances genéticos logrados en cada ciclo de mejoramiento. Por ejemplo, en la industria semillera Pioneer usa la Tecnología para Acelerar el Rendimiento (Accelerated Yield Technology, AYT™ System), que abarca mejoramiento molecular, bioinformática, dobles haploides, fitogenómica, fenotipado de precisión e instrumentos que apoyan la toma de decisiones, para crear y distribuir mejores productos comerciales. El fenotipado de precisión proporciona la capacidad de evaluar la respuesta fenotípica a nivel macro, y también a nivel molecular, una vez que se entiende la base genética de la respuesta. Las herramientas de fenotipado como la “Proteómica” (Liebler, 2002) y la “Metabolómica” (Daviss, 2005) pueden, entonces, utilizarse para hacer una mejor caracterización de germoplasma.

Perspectivas a futuro

El fenotipado de alto rendimiento en el campo con un grado razonable de precisión desempeña un importante papel en las modernas operaciones de mejoramiento de maíz, pues se han logrado avances significativos en entender la respuesta de la planta a su medio ambiente y, por último, su comportamiento agronómico. A medida que se obtenga más información de la base genética de dicha respuesta, el fenotipado molecular se convertirá en un mayor componente del proceso de fenotipado que predice la respuesta genotípica de las líneas comerciales de maíz. Estas actividades las pueden realizar grandes instituciones como las empresas semilleras multinacionales, ya que es necesario hacer una inversión considerable en infraestructura. Las técnicas para obtener haploidía son herramientas valiosas para acelerar la producción de plantas transgénicas homocigotas y, por tanto, ayudan a establecer las técnicas de transformación. Si se combina la haploidía con otras tecnologías como la selección asistida por marcadores, la mutagénesis inducida y los transgénicos, el mejoramiento de cultivos se hará en mucho menos tiempo. Los haploides dobles proporcionan productos que facilitan estas actividades y constituyen un mecanismo que acelera la utilización de la genética moderna en productos comerciales.

Referencias

- Campos H, Cooper M, Habben JE, Edmeades GO, Schussler JR (2004) Improving drought tolerance in maize: a view from industry. *Field Crops Res.* 90: 19-34.
- Chang MT, Coe EH (2009) Doubled haploids. *En: AL Kriz, BA Larkins (eds) Biotechnology in Agriculture and Forestry.* Vol. 63. Molecular Genetic Approaches to Maize Improvement. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 127–142.
- Chase SS (1947) Techniques for isolating monoploid maize plants. *Am. J. Bot.* 34: 582.
- Chase SS (1949) The reproductive success of monoploid maize. *Am. J. Bot.* 36: 795-796.
- Daviss B (2005) Growing pains for metabolomics. *The Scientist* 19: 25-28.

- Finkle E (2009) With 'Phenomics' plant scientists hope to shift breeding into overdrive. *Science* 325: 380-381.
- Forster BP, Thomas WTB (2005) Doubled haploids in genetics and plant breeding. *Plant Breed Rev.* 25: 57–88.
- González-Pérez JL, Espino-Gudiño MC, Torres-Pacheco I, Guevara-González RG, Herrera-Ruiz G, Rodríguez-Hernández V (2011) Quantification of virus syndrome in chili peppers. *African J. Biotech.* 10: 5236-5250.
- Liebler DC (2002) Introduction to Proteomics: Tools for the New Biology. Humana Press, Totowa, NJ, USA, 201 pp.
- Montes JM, Technow F, Dhillon BS, Mauch F, Melchinger AE (2011) High-throughput non-destructive biomass determination during early plant development in maize under field conditions. *Field Crops Research* 121: 268-273.
- Patil JK, Kumar R (2011) Advances in image processing for detection of plant diseases. *Journal of Advanced Bioinformatics Applications and Research* 2: 135-141.
- Troyer AF (2004) Persistent and popular germplasm in seventy centuries of corn evolution. *En: CW Smith, J Betran, ECA Runge (eds) Corn: Origin, History, Technology and Production.* Wiley-Hoboken, pp.133-232.

9. Acceso a líneas inductoras de haploidía tropicalizadas y servicio de DH a los colaboradores del CIMMYT

B.M. Prasanna, Vijay Chaikam, George Mahuku y Rodrigo Sara

Acceso a líneas inductoras de haploidía tropicalizadas

La adopción de la tecnología DH por parte de algunas instituciones de mejoramiento de maíz integrantes de los sistemas nacionales de investigación agrícola (SNIA), así como de empresas pequeñas y medianas, ha sido limitada, sobre todo en los países en desarrollo, por la falta de líneas inductoras adaptadas a condiciones tropicales y subtropicales. El Programa Global de Maíz del CIMMYT, en colaboración con el Instituto de Fitotecnia, Ciencia de la Semilla y Genética Poblacional de la Universidad de Hohenheim, se ha ocupado de solucionar esta limitación y ya cuenta con líneas inductoras de haploidía que compartirá con las instituciones que tienen interés en utilizarlas, conforme a los siguientes términos y condiciones específicas.

Las líneas inductoras de haploidía tropicalizadas que desarrollaron el CIMMYT y la Universidad de Hohenheim tienen alta capacidad de inducción (~8–10%) y se ha observado que tienen un mejor comportamiento agronómico que las inductoras de clima templado en las estaciones experimentales del CIMMYT en México (Agua Fría y Tlaltizapán). Uno de los híbridos inductores generados utilizando líneas inductoras de haploidía tropicalizadas mostró, en condiciones tropicales, heterosis para las características vigor de planta y producción de polen, y mantuvo una tasa similar de inducción de haploidía (~8-10%). El CIMMYT y la Universidad de Hohenheim han decidido compartir la semilla de una de las líneas inductoras de haploidía tropicalizadas (uno de los progenitores de un inductor híbrido) y del inductor híbrido mismo, y autorizar su uso a quienes lo soliciten, previa firma de un Acuerdo de Transferencia de Materiales (ATM) y bajo ciertas restricciones dirigidas a proteger los derechos de propiedad intelectual de ambas instituciones sobre dichas líneas inductoras.

Lineamientos para obtener líneas inductoras de haploidía tropicalizadas

A continuación aparecen los lineamientos generales para obtener las líneas inductoras con fines de investigación o comerciales.

Para fines de investigación por parte de los SNIA: Las instituciones de los SNIA que se interesen en acceder a las líneas inductoras con un propósito específico, como por ejemplo, generar líneas DH que se utilizarán en programas de mejoramiento, deberán enviar una carta de intención o de expresión de interés al CIMMYT. En el caso de aquellas instituciones que cumplen con los requisitos, el CIMMYT y la Universidad de Hohenheim les proporcionarán las inductoras sin ningún costo, previa firma de un Acuerdo de Transferencia de Materiales con fines de investigación. La utilización de líneas inductoras por parte de las instituciones de los SNIA, ya sea para fines comerciales propios o de otras partes interesadas, deberá tramitarse por separado mediante una licencia de uso comercial, como a continuación se indica.

Para uso comercial: Los solicitantes pueden acceder a las líneas inductoras para uso comercial después de firmar un Acuerdo de Transferencia de Materiales y de Uso Comercial con el CIMMYT y la Universidad de Hohenheim. Cada uno de los solicitantes deberá pagar a la Universidad de Hohenheim una cuota única de licencia (25,000 dólares estadounidenses), que cubrirá el suministro de semilla de dos líneas inductoras de haploidía, es decir, uno de los progenitores de un híbrido inductor de haploidía tropicalizado y el híbrido inductor mismo. Si el solicitante desea obtener el otro progenitor del híbrido inductor, tendrá que realizar un pago único de 10,000 dólares por otra licencia a la Universidad de Hohenheim.

El CIMMYT enviará la semilla de los inductores mencionados en el párrafo anterior al solicitante, normalmente en un periodo de tres semanas, después de la firma del Acuerdo de Transferencia de Materiales (cuando sea para fines de investigación) o del Acuerdo de Transferencia de Materiales y de Uso Comercial, y tras la recepción del pago único por la licencia, según sea el caso.

Servicio de DH de maíz por parte del CIMMYT a sus colaboradores del Consorcio Internacional de Mejoramiento de Maíz (IMIC)

Recientemente, el CIMMYT estableció un sitio de producción de DH de maíz en su estación experimental en Agua Fría, estado de Puebla, México. Al contar con este sitio, se ofrecerá, a un costo de recuperación, un servicio de producción de líneas DH a los miembros de los Consorcios Internacionales de Mejoramiento de Maíz que operan en Asia y América Latina (es decir, IMIC-Asia e IMIC-LA). Si requiere usted información sobre cómo integrarse al Consorcio, póngase en contacto con el director del Programa Global de Maíz del CIMMYT.

En la estación de Agua Fría, el vivero para inducir haploidía en los materiales fuente se siembra a finales de mayo y la semilla se cosecha en septiembre. Las semillas haploides se identifican utilizando marcadores del color de grano y las plántulas son sometidas inmediatamente a duplicación cromosómica. El vivero de haploidía (D0) se cultiva de noviembre a abril. La semilla D1 de las líneas DH se procesa y se envía a los colaboradores en mayo o junio, después de que se realicen los procedimientos requeridos para exportar el germoplasma.

Posibles modelos que pueden utilizar los programas de mejoramiento para adoptar la tecnología DH

Modelo 1 – servicio completo: En este caso, el colaborador manda el germoplasma fuente (poblaciones para generar líneas DH) y el CIMMYT realiza todos los pasos (inducciones, clasificación, duplicación cromosómica y derivación de semilla D1) que sean necesarios para generar líneas DH. Al final del proceso, el CIMMYT envía al cliente toda la semilla de la línea DH (semilla D1) que se haya obtenido. Para que este modelo funcione eficazmente, el colaborador deberá consultar con anticipación al CIMMYT y manifestar que desea enviar poblaciones para que se generen líneas DH.

Modelo 2 – servicio parcial: En este modelo se plantean dos posibilidades: (1) el colaborador realiza la inducción de granos haploides y los manda para que en las instalaciones centralizadas del CIMMYT se lleven a cabo la selección y la duplicación cromosómica, y se generen las líneas DH; y (2) el colaborador realiza la inducción de haploidía y la selección de granos haploides, y manda únicamente los granos haploides para que en las instalaciones del CIMMYT se lleven a cabo la duplicación cromosómica y la generación de líneas DH (semilla D1).

Cómo identificar qué tipo de servicio DH se necesita

- Por ahora, el sitio dedicado al servicio DH en la estación experimental del CIMMYT en Agua Fría tiene capacidad para generar, en total, 150 poblaciones al año para cubrir la demanda interna y externa de producción de líneas DH. Las partes interesadas pueden mandar un máximo de 5 a 10 poblaciones para inducción de haploidía y generación de líneas DH.
- Cada año, en enero, se hará una convocatoria para solicitar la producción de líneas DH. Aquellos colaboradores que deseen utilizar este servicio deberán firmar un Acuerdo de Transferencia de Materiales con el CIMMYT, para finales de febrero.
- Después de haber firmado el Acuerdo de Transferencia de Materiales y pagado, según sea el caso, el cargo correspondiente (es decir, el costo de recuperación) (según los datos que se dan a continuación), para finales de abril, los colaboradores deberán mandar 200 semillas de cada población en la que se hará la inducción de haploidía. Al envío de semilla deberá anexarse información de la etapa de floración (sobre todo de la emisión de estigmas) y de la adaptación del material (tropical/subtropical/valles altos).
- Si los colaboradores desean mandar únicamente semilla haploide seleccionada y solicitar un servicio parcial (duplicación cromosómica y generación de líneas DH), deberán enviar los granos haploides al CIMMYT (después de haber firmado un Acuerdo de Transferencia de Materiales y pagar la cuota correspondiente) el primero de octubre a más tardar.
- Después de concluidas la inducción de haploidía y la generación de líneas, el CIMMYT informará al colaborador en cuestión si logró producir líneas DH de las poblaciones fuentes que recibió. En caso de que una población fuente contenga un gene inhibidor del color del grano, el cual no permite identificar de manera fiable los granos haploides, el CIMMYT informará de esta situación al

colaborador correspondiente y no continuará con el proceso de producir líneas haploides de esa población fuente. En este caso, al colaborador se le cobrará únicamente el costo de la inducción de haploidía (200 dólares por población).

- Los colaboradores de instituciones del sector privado tendrán que pagar el servicio de DH, después de firmar el Acuerdo de Transferencia de Materiales y antes de que se inicie el trabajo de producción de DH. Los colaboradores de instituciones del sector público podrán utilizar recursos del presupuesto del colaborador para pagar los servicios de DH, antes de firmar el Acuerdo de Transferencia de Materiales. Si la solicitud es autorizada, los cargos por el servicio serán deducidos internamente en el CIMMYT del presupuesto del colaborador, según sea el caso. Los aliados del sector público que no cuenten con presupuesto de colaboración deberán obtener los fondos necesarios para cubrir el importe del servicio de DH antes de firmar el Acuerdo de Transferencia de Materiales y antes de que el CIMMYT inicie el proceso.
- Se cobrará un costo de cancelación por cada servicio solicitado que a último momento sea cancelado. Este costo será proporcional a la cantidad de trabajo realizado hasta el momento de recibir la solicitud formal del colaborador cancelando el servicio de DH.

Costo de recuperación del servicio de producción de líneas DH

Los costos del servicio total o parcial se indican a continuación:

- 1) *Únicamente inducción de haploidía*: Se cobrarán 200 dólares estadounidenses por cada población fuente que sea sometida a inducción de haploidía.
- 2) *Identificación de semilla haploide y duplicación cromosómica*: Se cobrarán 25 dólares por cada línea DH proporcionada.
- 3) *Únicamente duplicación cromosómica y producción de semilla DH (D1)*: Se cobrarán 22 dólares por cada línea DH proporcionada.
- 4) *Servicio DH completo (que incluye inducción de haploidía, identificación de haploides, duplicación cromosómica y producción de líneas DH)*: Se cobrarán 30 dólares por cada línea DH proporcionada.

Nota: Cada año, únicamente con el fin de recuperar costos, el CIMMYT revisará y posiblemente ajustará estos costos, dependiendo de los costos de operación.

Para más información, envíe un correo electrónico al:

Dr. B.M. Prasanna, director del Programa Global de Maíz del CIMMYT (b.m.prasanna@cgiar.org), o al

Dr. Vijay Chaikam, especialista en tecnología DH, Programa Global de Maíz del CIMMYT (v.chaikam@cgiar.org).

ISBN: 978-607-8263-06-6

