



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE BABAHOYO
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA



TRABAJO DE TITULACIÓN

Componente práctico del Examen de Grado de carácter complejo,
presentado al H. Consejo Directivo de la Facultad, como requisito
previo para obtener el título de:

INGENIERO AGROPECUARIO

TEMA:

Cultivo de anteras alternativa biotecnológica útil para la obtención
de plantas doble haploide en especies vegetales.

AUTOR:

Ricardo Alexander Morocho Ochog

TUTOR:

Walter Oswaldo Reyes Borja, Ph.D.

BABAHOYO - LOS RÍOS - ECUADOR

2021

RESUMEN

El cultivo de anteras es una alternativa biotecnológica muy útil para generar plantas homocigotas de forma rápida. Consiste en la recolección de polen para inducir a la formación de células vegetativas, esto se da por la totipotencia que poseen las microsporas inmaduras para formar una nueva planta. Al momento que se incuba la microspora en cultivo *in vitro*, puede generar callo o pasar directamente a un embrión, esto depende de la especie. Las panículas de arroz se recolectan a los 67 días del cultivo, en este periodo contienen microsporas en estado uninucleado, los macollos se deben esterilizar con etanol, luego pasan a la cámara de flujo laminar, posteriormente colocarlas en un frasco de vidrio con agua destilada, se separan las anteras de las panículas, se las coloca en medio de cultivo y se las deja en un cuarto oscuro con una temperatura de 24 °C por unos 34 días. Una de las mejores soluciones para el medio de cultivo es: 2mg /L de 2.4-D, 10 mg/L de AFA, 0.5 mg/L de Cinetina, 80g/L de maltosa y con un pH de 5.8. Para regeneración de callos se usa una solución de: 1 mg/L de ANA, 4 mg/L de cinetina, 30 g/L de sacarosa, 3 g/L Gellan Gum con un pH ideal de 5.8, luego pasan al medio de aclimatación donde salen las raíces y hojas no diferenciadas, finalmente se las mantiene en invernadero. El cultivo de tabaco no pasa por la etapa de callo, se debe recolectar flores cuando la longitud de los sépalos sea igual a la de los pétalos, cada flor se desinfecta y se trasladan al laboratorio donde se colecta polen con pinceles para depositar en placas Petri que es dónde se almacenan a una temperatura aproximada de 4°C, en la fase de multiplicación uno de los reguladores que da una mayor eficacia es: 0.5 – 1 mL.L-1 es el 6-BAP, de la mano con el ácido 1 – naftalenacético (ANA), las placas Petri que contienen los granos de polen se deben tapar e incubar a oscuridad por 20 días a 27 °C, posteriormente se las pasa a la luz para cultivarse en tubos con medio de crecimiento básico. Existen algunos inhibidores mitóticos para realizar la duplicación cromosómica entre ellos está la colchicina, que tiene algunos efectos negativos para la salud por ser un alcaloide tóxico, y la orizalina, ambos con una buena efectividad.

Palabras claves: cultivo de anteras, homocigotas, uninucleadas, inhibidores mitóticos.

SUMMARY

Anther culture is a very useful biotechnological alternative to generate homozygous plants quickly. Consists of the collection of pollen to induce the formation of vegetative cells, this is due to the capacity of the immature microspores to form a new plant, in the moment incubated *in vitro* culture, the microspore can generate callus or pass directly to an embryo, depending on the species. Rice panicles are harvested 67 days after cultivation, in this period they contain microspores in uninucleated state, the tillers must be sterilized with ethanol, then passed into the laminar flow chamber, then placed in a glass jar with distilled water, the panicles are separated from the anthers, placed in culture medium and left in a dark room with a temperature of 24 °C for 34 days, one of the best solutions for the culture medium is: 2mg/L of 2,4-D, 10 mg/L of AFA, 0.5 mg/L of Cinetine, 80g/L of maltose and with a pH of 5.8. For callus regeneration a solution of: 1 mg/L of ANA, 4 mg/L of cinetine, 30 g/L of sucrose, 3 g/L Gellan Gum with an ideal pH of 5.8 is used, then they pass to the acclimatization medium where the roots and undifferentiated leaves , finally they are kept in greenhouse. Tobacco growing does not go through the callus stage, flowers should be collected when the length of the sepals is equal to the petals, each flower is disinfected and transferred to the laboratory where pollen is collected with brushes to be deposited in Petri dishes where they are stored at a temperature of approximately 4°C, in the multiplication phase one of the most effective regulators is: 0.5 - 1 mL.L-1 of 6-BAP or 1 - naphthalenacetic acid (ANA). Petri dishes containing pollen grains should be covered and incubated in darkness for 20 days at 27 °C, then passed to light to be grown in tubes with basic growth medium. There are some mitotic inhibitors to perform chromosome duplication among them are colchicine, which has some negative health effects because it is a toxic alkaloid, and orizaline, both with good effectiveness.

Keywords: Anther culture, homozygous, uninucleate, mitotic inhibit.

INDICE

RESUMEN	I
SUMMARY	II
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Objetivos.....	2
1.1.1 General.....	2
1.1.2 Específicos	2
CAPITULO II	3
MARCO METODOLÓGICO	3
2.1. Definición de tema caso de estudio.....	3
2.2. Planteamiento del problema.....	3
2.3. Justificación	3
2.4. Fundamentación teórica.....	4
2.4.1. Importancia del cultivo de anteras	4
2.4.2. Proceso del cultivo de anteras	4
2.4.3. Gametogénesis masculina.....	5
2.4.4. Cultivo de anteras en arroz.....	6
2.4.5. Inicio del proceso de cultivo de anteras	7
2.4.6. Esterilización, selección e inoculación de flores.....	7
2.4.7. Transferencia de callos al medio de regeneración.....	8
2.4.8. Transferencia de callos con órganos a medio de aclimatación	8
2.4.9. Cultivo de anteras en Tabaco	9
2.4.10. Duplicación cromosómica	10
2.5. Hipótesis	11
2.6. Metodología de la investigación	11
CAPITULO III	12
RESULTADOS DE LA INVESTIGACIÓN	12
3.1. Desarrollo de caso	12
3.2. Situaciones detectadas (hallazgo).....	12
3.3. Soluciones planteadas	12
3.4. Conclusión	13
3.5. Recomendaciones (propuesta para mejorar el caso)	14
BIBLIOGRAFÍA	15

I. INTRODUCCIÓN

Desde tiempos remotos se viene cultivando distintos tipos de especies vegetales, los cuales han sido mejorados genéticamente a través de distintas técnicas aplicadas por el hombre, una de ellas, es el cultivo de anteras, cuya finalidad es obtener plantas que se adapten a diferentes condiciones agroecológicas y sean más productivas (Angeles et al. 2020).

En este contexto, uno de los principales objetivos de realizar el mejoramiento de plantas es inducir tolerancia o resistencia a las distintas plagas, acoplando cada una de ellas a las condiciones del medio en las cuales se van a desarrollar y así, cumplir con las necesidades de las grandes industrias que requieren una excelente calidad para satisfacer la demanda de la población mundial (Roca et al. 1991).

La biotecnología como una herramienta que da lugar a diversos mejoramientos de especies vegetales, lo que permite que las especies produzcan de una manera satisfactoria para la alimentación de un pueblo. Uno de los beneficios del cultivo de anteras es que es una técnica que permite la obtención de plantas doble haploides, también conocidas como diploides, esto se lo consigue directamente del grano de polen (Pauli 2009).

Existen algunos procesos para la obtención de plantas haploides, uno de ellos es la ginogénesis, si la planta haploide viene de los gametos femeninos, y por otra parte androgénesis si la planta haploide se deriva de los gametos masculinos, el más utilizado por su rapidez y eficacia es el método de androgénesis mediante el cultivo de anteras (Rojas 2020).

En el cultivo de anteras las microsporas pueden generar individuos haploides, los mismos que deben pasar por cultivo *in vitro*. En diversas especies pueden generar de manera directa una planta, mientras que en otras es necesario pasar por etapas de callos, como en el caso del cultivo de arroz, el mismo que es un tejido no diferenciado, para posteriormente diferenciarse (Ordoñez 2017).

Al final del proceso se obtienen plantas regeneradas generalmente doble haploide homocigotas; sin embargo, en algunas ocasiones pueden resultar ser haploides, posteriormente se puede realizar una duplicación cromosómica mediante el uso de tratamientos a base de colchicina o algún otro inhibidor mitótico que puede ser efectivo para generar plantas dobles haploide (Pintos et al. 2014).

1.1 Objetivos

1.1.1 General

- Conocer el proceso del cultivo de anteras para la obtención de plantas doble haploide en especies vegetales.

1.1.2 Específicos

- Investigar el proceso de la gametogénesis masculina el estado adecuado para que el cultivo de anteras cumpla con su propósito.
- Identificar la técnica más eficiente para generar plantas doble haploide.

CAPÍTULO II

MARCO METODOLÓGICO

2.1. Definición de tema caso de estudio

La presente investigación tiene como finalidad conocer el proceso del cultivo de anteras para obtener plantas haploides y doble haploides en especies vegetales de la zona, tales como son arroz (*Oryza sativa* L.) y tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), también conocer inhibidores mitóticos para realizar duplicación cromosómica (doble haploides).

2.2. Planteamiento del problema

Las distintas técnicas tradicionales que se han venido usando desde tiempos pasados para obtener plantas haploides, toman un largo tiempo para conseguir plantas homocigotas con un determinado porcentaje no muy eficiente en cuanto al grado de efectividad.

Sin embargo, con la técnica del cultivo de anteras es posible obtener plantas homocigotas con un alto grado de efectividad, en un corto tiempo en cuando a plantas haploides, por lo que también se establecerá la mejor técnica usada para realizar la duplicación cromosómica.

2.3. Justificación

Las especies vegetales hoy en día se han convertido en uno de los principales alimentos para la población mundial, seguido por los productos provenientes de los animales, por esta razón es muy importante conocer la forma más adecuada para realizar mejoramiento genético en plantas, para obtener líneas puras y alcanzar un mejor rendimiento.

Existen algunos métodos convencionales para poder obtener líneas puras, pero esto lleva un mayor tiempo de trabajo y es más complejo; por lo tanto, es indispensable conocer el método de cultivo de anteras, ya que se trata de una técnica rápida y eficiente en comparación a las demás, para obtener plantas haploides y doble haploides.

2.4. Fundamentación teórica

2.4.1. Importancia del cultivo de anteras

El cultivo de anteras es una técnica novedosa ya que reduce grandemente el tiempo para obtener plantas haploides y diploides, así tener mejores variedades, esta técnica se basa prácticamente en la recolección de granos de polen en estados tempranos de formación, también llamadas microsporas, y sembrarlas en un medio de cultivo adecuado para inducir a la formación de células vegetativas, de esta manera se cambia por completo la normalidad de la formación de una nueva planta; es decir se altera el patrón sexual que es gametofito a un patrón vegetativo el cual es llamado esporofito, el mismo que cambia por completo su función normal de tener polen, producir tubo polínico y gametos a formar callos mediante las microsporas para obtener una nueva planta haploide, este proceso también es conocido como androgénesis (Angeles et al. 2020).

2.4.2. Proceso del cultivo de anteras

Desde tiempos remotos la biotecnología ha venido evolucionando constantemente trayendo consigo herramientas innovadoras para obtener mejoramientos en especies vegetales, un claro ejemplo es el cultivo de anteras. Por otra parte, la androgénesis es una forma de referirse a la totipotencia que puede llegar a tener las microsporas para formar una nueva planta, este proceso se da en la incubación de la microspora inmadura en cultivo *in vitro*, causando de esta manera divisiones celulares (Gómez 2016).

La microspora puede pasar por dos estados dependiendo la flor de cada especie; es decir, unas veces puede pasar directamente a embrión para finalmente generar una nueva planta, o también la microspora puede pasar por una etapa llamada “callo” para luego generar un embrión y finalmente una nueva planta, con este proceso da lugar para obtener plantas haploides o doble haploides 100% homocigotas (Ordoñez 2017). En la Figura 1, se observa Microsporas y su forma de generar una nueva planta.

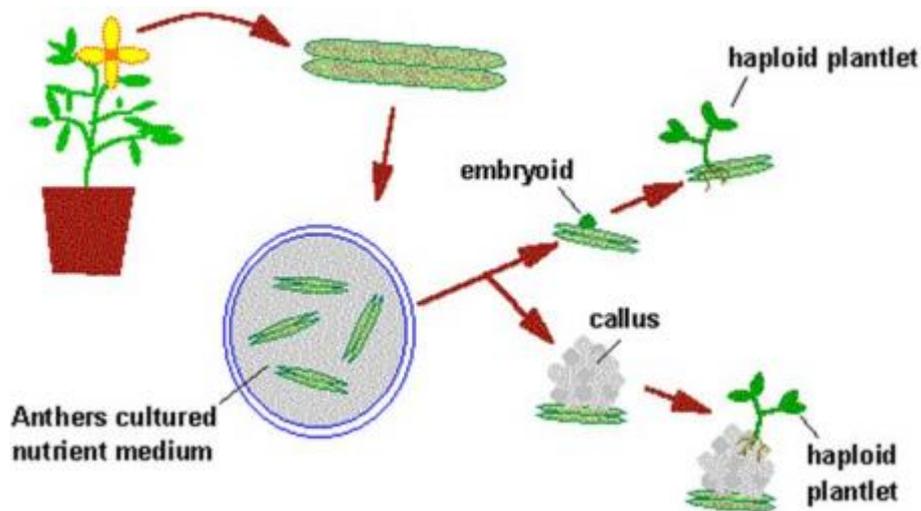


Figura 1. Microsporas y su forma de generar una nueva planta.

Fuente: (Ordoñez 2017).

Cabe recalcar que no en todos los cultivos se puede realizar esta técnica, tal es el caso del maíz que depende mucho del genotipo, es complicado realizar cultivo de anteras *in vitro* ya que son recalcitrantes; es decir, presentan poca respuesta a medios de cultivo, por lo que se usan otros medios como es el caso del medio *in vivo* de haploidía que ha dado mejores resultados en el cultivo de maíz (Informa 2019).

2.4.3. Gametogénesis masculina

Es la formación de un esporofito también conocido como célula madre, están presentes en los sacos polínicos, las mismas que son diploides $2n$, en la meiosis se dividen formando una tétrada con cuatro microsporas uninucleadas que contienen la mitad de la información genética de la célula madre, posteriormente la microspora forma grano polínico, la cual comprende algunas etapas que son: Uninucleado temprano, U. medio, U. tardío, Binucleado medio, B. tardío. El estado uninucleado medio es la etapa más adecuada para realizar cultivo de anteras; es decir, cuando la doble pared está bien definida y el núcleo inicia a desplazarse hacia el costado, esto debido a la existencia de una vacuola grande, también el uninucleado tardío cuando el núcleo está en el costado de la microspora listo para entrar en mitosis. (Ordoñez 2017).

2.4.4. Cultivo de anteras en arroz

En cultivo de anteras en arroz es una técnica muy valorada ya que toma alrededor de 6 meses a 1 año en un laboratorio para obtener plantas doble haploides completamente homocigotas, en comparación a los 6 a 8 ciclos que se toman con los métodos tradicionales, de esta manera se reduce significativamente el tiempo y el costo (Ceppa et al. 2015). En la Figura 2, se observa el tiempo que tarda el cultivo de anteras vs método tradicional.

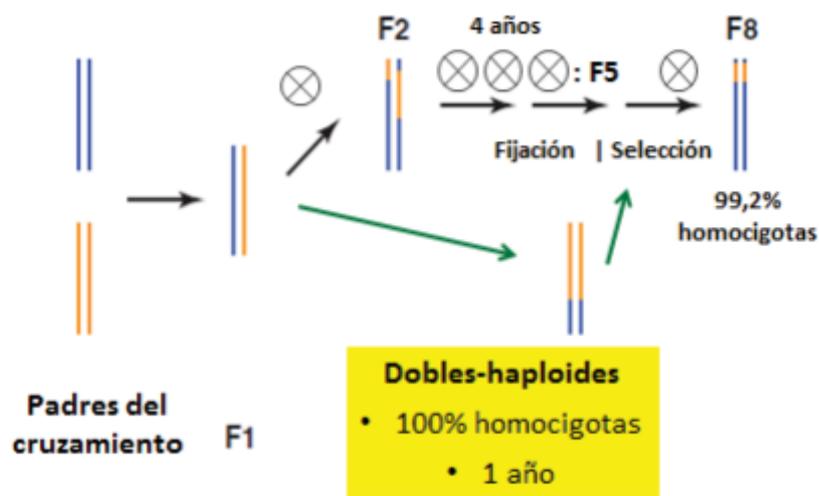


Figura 2. Tiempo que tarda el cultivo de anteras vs método tradicional.

Fuente: (Ceppa et al. 2015).

El genoma del arroz contiene 24 cromosomas, en el caso del cultivo de anteras las microsporas deben pasar por una etapa llamada callo, la misma que culmina con la formación de embriones, y finalmente en la generación de una nueva planta. De todas las plantas producidas aproximadamente entre 40 a 70% pueden ser haploides, triploides o tetraploides, mientras que el porcentaje restante (60 a 30%) puede ser doble haploide y de mayor interés para el mejoramiento; sin embargo, hay otras que se necrosan, por lo tanto no prosperan (Crespo 2018).

2.4.5. Inicio del proceso de cultivo de anteras

Aproximadamente a los 67 días del cultivo de arroz en estado de embuchamiento, se procede a recolectar las panículas, en horas de la mañana o de la tarde, es importante conservar el nudo y la hoja bandera para evitar la contaminación por patógenos presentes en el ambiente, se debe recolectar cuando la distancia entre las aurículas de las dos últimas hojas se encuentren entre 2 a 5 cm entre ellas, en este estado contienen microsporas en estado uninucleado medio - tardío (se debe comprobar mediante análisis citológico) y glumas de color amarillo verdoso, el mismo que es el ideal para el cultivo de anteras (Arana 2012).

2.4.6. Esterilización, selección e inoculación de flores

Los macollos colectados se deben esterilizar de forma superficial con etanol a 90% en una probeta, para luego pasar a la cámara de flujo laminar a retirar las flores de las panículas, de esta manera se deja solo el tercio medio de forma invertida, para posteriormente colocarlas en un frasco de vidrio con agua destilada estéril y luego inducir la siembra en el medio de cultivo. (Crespo 2018).

Posteriormente, se toman las panículas con una pinza muy cuidadosamente para colocarlas en un plato Petri, se debe cortar con un bisturí esterilizado los filamentos que mantiene unidas las anteras con las cariósides, luego con una pinza se toman las flores del lado no cortado para realizar pequeños golpes en el borde del recipiente con el fin de que caigan y queden inoculadas en 20 mL de medio de cultivo. Posteriormente se los sella con Parafilm y se los deja en un lugar oscuro a temperatura de 24 °C por unos 34 días aproximadamente para promover el proceso de la androgénesis, donde interviene la división mitótica de las microsporas (Crespo 2018).

Una de las mejores respuestas para la inducción de callos se presenta con la solución de 2mg/L de 2.4-D, 10 mg/L de AFA, 0.5 mg/L de Cinetina, 80g/L de maltosa y con un pH de 5.8 antes del autoclavado, también se adiciona 100 mL/L de agua de coco y se esteriliza mediante filtración con porosidad de 0.22 micras (Reyes et al. 2012).

2.4.7. Transferencia de callos al medio de regeneración

Se agrega todo el medio de cultivo que tiene la inducción de callos dentro de un frasco con la solución para el medio de regeneración de plantas también conocida como (MS), luego con la ayuda de un bisturí o una pinza se transfiere al medio de regeneración final que contiene medio de cultivo MS, sembrando entre 5 y 10 callos por recipiente para luego poder diferenciar sus órganos, luego se los deja a exposición de luz directa con lámparas fluorescentes de 80 a 100 $\mu\text{ε.m-2.s-1}$ durante 12 horas para simular la luz que genera el sol (Crespo 2018).

La solución usada con la que se ha logrado mejores resultados en cuanto a regeneración de callos en arroz es la *Murashige & Skoog*, también conocida con las letras (MS) la misma que contiene: 1 mg/L de ANA, 4 mg/L de cinetina, 30 g/L de sacarosa, 3 g/L Gellan Gum con un pH ideal de 5.8 Según (Reyes et al. 2012).

2.4.8. Transferencia de callos con órganos a medio de aclimatación

En la parte de regeneración de plantas, los callos formaron órganos como raíces y hojas no diferenciados, luego de esto se los pasa a recipientes plásticos con medio de cultivo de regeneración con la única diferencia que esta vez no se le agregan hormonas, para que así la planta tenga la regeneración completa R1 posteriormente se trasladada a invernadero, cuando tengan buen desarrollo de raíces y hojas, se los deja por un día en flujo laminar, en el medio de cultivo dentro del invernadero, al día siguiente se las retira y se lava con agua destilada, como último paso se envía a macetas con suelo estéril para posteriormente aplicar fertilizantes edáficos a los 20 y 40 días (Crespo 2018).

El nivel de ploidía se debe reconocer concretamente mediante un análisis citológico; sin embargo, si la planta presenta una morfología normal se puede deducir que es doble haploide; por otra parte, algunas plantas en este proceso de aclimatación pueden presentar albinismo, por lo que pueden morir cuando se someten al sol debido a la deficiencia de clorofila (Duarte 2018).

2.4.9. Cultivo de anteras en Tabaco

El tabaco es uno de los cultivos que tiene una respuesta positiva en cuanto al cultivo de anteras por su efectividad, la androgénesis en tabaco es un poco distinta a la del arroz, ya que no pasa por la etapa de callo, la recolección de flores se debe realizar al inicio de floración sin haber la presencia de ninguna antera abierta, donde la longitud de los sépalos sea igual a la de los pétalos, para así obtener esporas uninucleadas, la misma que generará mayor respuesta androgénica, esto se realiza generalmente en las primeras horas de la mañana (Pacheco 2018).

Cada flor se sumerge en una solución de etanol al 70% aproximadamente por 1 minuto, luego se sumerge en hipoclorito de sodio por aproximadamente 10 minutos, posterior a la desinfección se lavan con agua destilada durante 5 y 10 minutos. Finalmente, el medio de cultivo donde se siembran las flores, se esterilizan en autoclave para de esta manera asegurar que no exista ningún patógeno que malogre el cultivo de anteras (Beatriz y Fedrizzi 2016).

Posteriormente, se trasladan al laboratorio en frascos de cristal que se encuentren totalmente secos, esto servirá para monitorear la dehiscencia de las anteras, luego de esto se colecta polen con pinceles para depositar en placas Petri que se almacenarán en un lugar fresco y seco a una temperatura aproximada de 4°C hasta ser usadas. (Pacheco 2018).

Generalmente se usa el medio llamado Murashige-Skoog, el mismo que se suplementa con algunos reguladores u hormonas de crecimiento como son citoquininas o auxinas. Dentro de la fase de multiplicación se usan reguladores de crecimiento en dosis más altas, uno de los reguladores que da una mayor eficacia es: 0.5 – 1 mL.L⁻¹ de 6-BAP, que va de la mano con el ácido 1 – naftalenacético (ANA) (Grijalva 2018).

Las placas Petri que contienen los granos de polen deben contener aproximadamente 0.01 L. de medio de cultivo, se debe tapar e incubar en la oscuridad por 20 días a 27 °C para de esta manera maximizar el tiempo que tienen los granos de polen con el medio de cultivo, posterior a esto se pasan a

la luz, estas plantas deben cultivarse en tubos con medio de crecimiento básico, cuando empiezan su desarrollo se puede notar que son doble haploide homocigotas por su características normales a la madre, de lo contrario pueden ser haploides, esto se determinará mediante un análisis citológico, y se determinará si es necesario realizar una duplicación cromosómica mediante la mejor técnica (García 2020).

2.4.10. Duplicación cromosómica

En algunas ocasiones se produce la duplicación cromosómica de forma natural; es decir, se forman doble haploides totalmente fértiles, pero esto depende mucho del genotipo, cuando esto no sucede se puede realizar duplicaciones mediante el uso de químicos, también conocidos como inhibidores mitóticos. Como su nombre lo indica estos son capaces de alterar la mitosis, como resultado final se obtiene a una misma célula con 2 veces el número de cromosomas (Prasanna et al. 2013).

La duplicación cromosómica se da generalmente en la interfase, al momento de adicionar colchicina, en dosis de 0.04%, hace que se pegue en los tubos y evite la formación de microtúbulos del huso mitótico, esto sucede en la mitosis, en la anafase las cromátidas hermanas del cromosoma replicado se separan, pero no les permite avanzar hasta los polos opuestos de la célula por lo que se quedan en el centro, finalmente dentro de la telofase se forma una membrana nuclear que cubren los cromosomas y así se obtiene una célula con dos veces el mismo número de cromosomas (De Jesus 2018).

Por otra parte, existen otros métodos para realizar la duplicación cromosómica, los cuales resultan muy efectivos tal es el caso de la orizalina, este es un herbicida que posee similares características a la colchicina, capaz de despolimerar el huso mitótico con una alta efectividad en cuanto a la duplicación cromosómica si se lo usa en dosis adecuadas, a diferencia de la colchicina, esta no genera un alto grado de fitotoxicidad en los brotes nuevos (Albano 2016).

La colchicina es una buena opción para realizar duplicaciones por su gran efectividad, pero por otra parte es un alcaloide que tiene efectos tóxicos, puede traer efectos cancerígenos para los seres humanos, por esta razón muchas veces se usan otras opciones para realizar este trabajo como es orizalina que es un inhibidor mitótico muy eficaz de menor costo y menos tóxico (Roughani et al. 2017).

2.5. Hipótesis

Ho= Para el cultivo de anteras la flor se la puede recolectar en cualquier estado y tendrá efectividad.

Ha= Para el cultivo de anteras la flor se la debe recolectar antes que se abra, conteniendo microsporas uninucleadas para tener una mayor efectividad.

2.6. Metodología de la investigación

El presente trabajo se realizó mediante la revisión de documentos proporcionados por algunas páginas web, como por ejemplo tesis, ensayos, artículos de revistas científicas, libros, capítulos de libros y otras fuentes de información confiable.

CAPITULO III

RESULTADOS DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. Desarrollo de caso

La finalidad del presente documento fue recolectar la mayor información posible para conocer la eficiencia, rapidez y proceso en general del cultivo de anteras en el mejoramiento genético de especies vegetales de la zona.

Mediante otras técnicas convencionales se obtenían líneas homocigotas, pero con una efectividad baja y un alto tiempo para su producción, así como también conocer inhibidores mitóticos para realizar la duplicación cromosómica en caso de necesitarlo.

3.2. Situaciones detectadas (hallazgo)

La biotecnología es una herramienta muy útil al momento de realizar mejoras genéticas, pero existen formas convencionales las cuales tienen un bajo grado de efectividad y tardan incluso años para poder concluir, por esta razón es importante conocer nuevas técnicas para acelerar el proceso y tener una mayor efectividad al momento de obtener una planta doble haploide homocigota.

Es importante conocer los tiempos exactos para realizar la recolección de la flor; es decir, la fase donde la flor se encuentre en estado óptimo para realizar un cultivo de anteras, así como también el proceso completo del cultivo, tales como las soluciones a usar en el medio de cultivo, para lograr tener resultados.

3.3. Soluciones planteadas

Se debe usar el cultivo androgénico de anteras, ya que este ayuda a obtener líneas homocigotas puras en un corto tiempo, así como también conocer el estado adecuado de la flor para encontrar las microsporas en estado uninucleado, generalmente las flores presentan algún aspecto en especial, por

ejemplo deben estar completamente cerradas, se recolectan en días específicos en base a la edad del cultivo o en base a los sépalos y pétalos, un punto importante es que la recolección se debe realizar en horas de la mañana de preferencia.

Es importante conocer el comportamiento del material al momento de realizar el cultivo de anteras, para poder realizar el proceso de la mejor manera, en especial con el cultivo de arroz, ya que pasa por la etapa de callo, por esto se debe conocer los tiempos exactos para pasarlos al medio de regeneración, y tener un buen resultado final.

Por otra parte, el cultivo de tabaco tiene una buena respuesta al cultivo de anteras, la misma que no pasa por la etapa de callo y se debe tener en cuenta que la solución a usar sea la mejor, una de ellas es Murashige-Skoog. Adicionalmente, en caso de no obtener plantas doble haploides de puede realizar duplicaciones cromosómicas mediante colchicina o orizanila, los mismos que son inhibidores mitóticos muy usados en la actualidad.

3.4. Conclusión

El cultivo *in vitro* de anteras es una de las técnicas biotecnológicas idónea para obtener plantas doble haploides homocigotas, es un proceso fácil si se conocen bien sus protocolos y fundamentos y además, rápido en comparación a las demás técnicas, se debe conocer las soluciones más efectivas para tener éxito, los tiempos en los que se va a realizar cada proceso y también los requerimientos de condiciones ambientales controladas como lo es la temperatura.

Dentro de la gametogénesis masculina el estado adecuado de la flor es cuando poseen microsporas en estado uninucleado, esto se da antes que la flor se abra, de esta manera el cultivo de anteras tendrá éxito; por otra parte, al momento de la duplicación cromosómica existen algunos inhibidores mitóticos, entre ellos la orizalina y colchicina, ambas tienen una gran efectividad, con la única diferencia que la colchicina es un alcaloide que tiene efectos cancerígenos para los seres humanos. Por ello se usa la orizalina como una buena alternativa.

3.5. Recomendaciones (propuesta para mejorar el caso)

Conocer y realizar los procesos que conlleva el cultivo de anteras de manera estricta para obtener los éxitos deseados, así como también conocer cómo reaccionan las anteras de las diferentes especies antes de realizar este tipo de cultivo *in vitro* ya que algunas no prosperan por tener genotipos recalcitrantes como es el caso del maíz.

Por otra parte, el uso de colchicina se debe realizar con todas las medidas de seguridad para evitar algún accidente que perjudique la salud de quienes la utilizan.

BIBLIOGRAFÍA

Albano, X da C. 2016. Melhoramento vegetal em Lavandula multifida e Lavandula pedunculata: indução de poliploidia e análise morfológica e fisiológica | Estudo Geral (en línea). . Consultado 19 abr. 2021. Disponible en <https://estudogeral.uc.pt/handle/10316/34190>.

Angeles, A; Rodríguez, E; Serrano., R. 2020. Cultivo de anteras e inducción de callo haploide en germoplasma bc3 de girasol (*Helianthus annuus* L.) (en línea). Acta Universitaria 30:1-15. DOI: <https://doi.org/10.15174/au.2020.2765>.

Arana, L. 2012. Cultivo in vitro de anteras en arroz (*Oryza sativa* L) para inducir plantas doble haploides homocigóticas (en línea). s.l., s.e. 1-59 p. Consultado 12 abr. 2021. Disponible en <http://dspace.utb.edu.ec/handle/49000/952>.

0

Ceppa, S; Bonilla, M; Dieppa, B; Bentancor, D; Castillo, M; Dalla Rizza, A. 2015. PUESTA EN MARCHA DEL PROYECTO: PRODUCCIÓN DE HAPLOIDES-DUPLICADOS DE ARROZ, TRIGO Y CEBADA. .

Crespo, R. 2018. Androgénesis *in vitro* de poblaciones segregantes F1 de arroz japonico (*Oryza sativa* L. ssp. japonica) para desarrollar líneas homocigóticas (en línea). s.l., s.e. 6 p. Consultado 12 abr. 2021. Disponible en <https://digital.cic.gba.gob.ar/handle/11746/8678>.

Duarte, F. 2018. Diferencias fisiológicas y cambios en los patrones de metilacion del ADN durante la micropropagación de plantas albinas. (en línea). s.l., s.e. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.03728-14>.

García, J. 2020. Androgénesis y producción de doble haploides en pimiento (en línea). Zaragoza :1-69. Consultado 17 abr. 2021. Disponible en https://scholar.googleusercontent.com/scholar?q=cache:f2O1yl80Vh4J:scholar.google.com/+Las+virtudes,+eje+central+de+las+Inteligencias+Múltiples+Virtudes,+central+axis+of+Multiple+Intelligences+Autor+Juan+Romero+Sebastiá&hl=es&as_sdt=0,5%0Ahttps://pdfs.sem.

Gómez, L. 2016. Establecimiento de un protocolo para la inducción de la androgénesis en *Capsicum chinense* Jacq. (en línea). s.l., s.e. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.03728-14>.

Grijalva, Karen. 2018. Determinación de condiciones óptimas para el cultivo *in vitro* de *Nicotiana tabacum* con miras al desarrollo de un prototipo de sistema de inmersión temporal. (en línea). s.l., s.e. . Consultado 17 abr. 2021. Disponible en <http://dspace.udla.edu.ec/jspui/bitstream/33000/9233/1/UDLA-EC-TIB-2018-15.pdf>.

Informa, I. 2019. Tecnología que acelera el desarrollo de nuevas líneas de maíz - INTA Informa (en línea, sitio web). Consultado 19 abr. 2021. Disponible en <https://intainforma.inta.gob.ar/presentan-tecnologia-que-acelera-el-desarrollo-de-nuevas-lineas-de-maiz/>.

De Jesus, CM. 2018. Universidade estadual de feira de santana programa de pós-graduação em recursos genéticos vegetais indução de calos em anteras e poliploidia em genótipos de melancia. s.l., s.e.

Ordoñez, C. 2017. Evaluación del efecto del Picloramo aplicado en el medio de cultivo a la inducción androgénica *in vitro* en el cultivo de anteras de yuca (*Manihot esculenta* Crantz), en el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Palmira Valle del Cauca. (en línea). . Disponible en <https://repository.unad.edu.co/bitstream/handle/10596/21190/94315045.pdf?sequence=3&isAllowed=y>.

Pacheco, J. 2018. Germinación *in vitro* del polen de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) (en línea). Cultivos Tropicales 39(1):102-107. Consultado 14 abr. 2021. Disponible en http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0258-59362018000100013&script=sci_arttext&tIng=en.

Pauli, G. 2009. Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" Interação de. .

Pintos, L; Calvarro, M; Aránzazu, G. 2014. Embriogénesis del polen (embriogénesis gamética). Reduca (Biología). Serie Botánica 7(2):19-33.

Prasanna, BM; Vijay, C; George, M. 2013. Tecnología de dobles

haploides en el mejoramiento de maíz: Teoría y práctica (en línea). s.l., s.e. . Consultado 18 abr. 2021. Disponible en <https://repository.cimmyt.org/xmlui/bitstream/handle/10883/1369/97395.pdf#page=15>.

Reyes, W; Celi, R; Arana, L. 2012. Cultivo *in vitro* de anteras en arroz para inducir plantas doble haploide homocigotas (en línea). Consultado 13 abr. 2021. Disponible en <https://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/1924/1/iniapls4.pdf>.

Roca, W; Nuñez, V; Mornán, K. 1991. Cultivo de anteras y mejoramiento de plantas. s.l., s.e. p. 271-294.

Rojas, MDC. 2020. Generación de doble haploides mediante ginogénesis, una estrategia biotecnológica para la mejora genética de melón (*Cucumis melo*) y pepino (*Cucumis sativus*). s.l., s.e. 50 p.

Roughani, A; Miri, SM; Kashi, AK; Khiabani, BN. 2017. Increasing the ploidy level in spinach (*Spinacia oleracea* L.) using mitotic inhibitors. *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology* 18(3-4):124-130.