

Universidad Nacional Agraria La Molina

ESCUELA DE POSTGRADO

Especialidad de Mejoramiento Genético de Plantas



**“ DESARROLLO DE LINEAS MUTANTES DOBLES
HAPLOIDES DE CEBADA (*Hordeum vulgare* L.)
MEDIANTE EL CULTIVO “*In vitro*” DE ANTERAS Y
SU EVALUACION EN CONDICIONES DE CAMPO ”**

Tesis para optar el Grado de

Magister Scientiae

Jorge Eduardo Jiménez Dávalos

Lima-Perú

1999

Indice

1. Introducción.	1
2. Revisión Bibliográfica.	3
2.1. Las mutaciones en el mejoramiento de los cultivos.	3
2.2. Agentes mutagénicos.	6
2.2.1. Mutagénicos químicos.	6
2.2.1.1. Agentes alcalinizantes.	7
2.2.1.2. Azida.	7
2.3. Producción de Dobles Haploides.	10
2.4. Uso de la tecnología “ <i>in vitro</i> ”, en el mejoramiento por mutaciones.	16
2.5. Variaciones somaclonales en el mejoramiento de las plantas.	20
3. Materiales y Métodos	23
3.1. Material vegetal utilizado para el tratamiento mutagénico y la producción de líneas dobles haploides.	23
3.2. Características agronómicas.	24
3.3. Agentes mutagénicos.	24
3.3.1. Preparación de las soluciones.	24
3.4. Tratamiento a las semillas.	25
3.4.1. Procedimiento.	25
3.5. Producción de líneas dobles haploides.	26
3.5.1. Población M1.	26
3.5.2. Población testigo.	29
3.6. Evaluación de las líneas dobles haploides producidas en condiciones de campo.	29
3.6.1. Datos de cultivo.	30

3.6.2. Evaluaciones.	33
3.6.3. Análisis estadístico.	35
4. Resultados	37
4.1. Fase de laboratorio.	37
4.1.1. Respuesta de las anteras.	37
4.1.2. Inducción de callos o embriones.	38
4.1.3. Callos o embriones transferidos a medio de regeneración.	39
4.1.4. Número de plantas verdes por cada 100 anteras en medio de cultivo.	40
4.1.5. Número de plantas albinas regeneradas por cada 100 anteras en cultivo.	41
4.1.6. Tasa de regeneración de plantas verdes.	43
4.2. Fase de campo.	45
4.2.1. Comportamiento de los mutantes dobles haploides de la línea 2194.	45
4.2.2. Comportamiento de los mutantes dobles haploides de la línea 3545.	49
5. Discusión de Resultados.	57
6. Conclusiones.	63
7. Recomendaciones.	65
8. Bibliografía.	66
9. Resumen	
10. Anexo	

1. Introducción

La cebada es un cultivo de importancia mundial en la alimentación como fuente proteica y energética, aporta el 5.8 % de proteínas y el 7.9 % de la energía. En nuestro país es el tercer cultivo en importancia de la sierra, después de la papa y el maíz. Su cultivo está relegado a los terrenos marginales superiores a los 3000 m. de altitud donde el agricultor tiene pocas alternativas de producción debido a los factores adversos de clima y suelo. Los rendimientos por hectárea son bajos. Sin embargo, a través de los trabajos que realiza el Programa de Cereales de la Universidad Nacional Agraria La Molina desde hace muchos años, se ha demostrado que con el uso de nuevas variedades es posible incrementar la productividad de la cebada en el Perú, especialmente con las que se han adaptado a las principales zonas de cultivo.

El desarrollo de variedades mejoradas requiere del establecimiento de programas de mejoramiento. En los programas de mejoramiento genético es importante la variabilidad genética donde es posible seleccionar plantas con caracteres deseados. La variabilidad genética, puede proceder de colecciones existentes en los bancos de germoplasma, de cruzamientos entre genotipos para producir nuevas combinaciones de genes, de la inducción de mutaciones y otros. Las mutaciones pueden ser recesivas y deletéreas. Sin embargo, muchas de ellas son positivas y han contribuido significativamente al mejoramiento de plantas en el mundo, y en algunos casos han tenido un gran impacto en la productividad de ciertos cultivos (OIEA, 1995).

La biotecnología es una herramienta que se puede utilizar en el mejoramiento genético para la obtención de nuevas variedades. En el caso específico de la cebada, la utilización del cultivo de anteras para la producción de dobles haploides (DH), es una vía rápida para la producción de líneas homocigotas mediante la cual se acortará el tiempo de la obtención de nuevas variedades, comparado con los métodos convencionales de mejoramiento.

La utilización de la técnica de producción de dobles haploides en combinación con la inducción de mutaciones puede mejorar la eficiencia del método convencional de mejoramiento en la obtención de variedades mejoradas de cebada.

El presente trabajo de investigación tiene como objetivos:

- 1. Desarrollar líneas Dobles Haploides de cebada a partir de poblaciones MI, empleando la técnica de cultivo de anteras "in vitro".*
- 2. Evaluar el efecto de la aplicación de azida de sodio (NaN_3) y MNH (N-metil-N-nitroso Urea) en la producción de Líneas Dobles Haploides de cebada.*
- 3. Evaluar el comportamiento de las Líneas Mutantes Dobles Haploides, en condiciones de campo.*

2. Revisión Bibliográfica

2.1. El uso de las mutaciones en el mejoramiento de los cultivos.

Las mutaciones, son cambios heredables en el material genético de los organismos. Son descritas como cambios en la secuencia de las cuatro bases que proporcionan la información del ADN (OIEA/FAO, 1995). Constituyen las fuentes de la variación genética entre los individuos. Las mutaciones son extremadamente importantes en la evolución y proporcionan el material base para el mejoramiento de los cultivos. El uso de las mutaciones naturales o mutaciones inducidas se conoce como mejoramiento por mutaciones. El mejoramiento por mutaciones incrementa la posibilidad de obtención de nuevos cultivares o ampliar la variabilidad del germoplasma y pueden ser usadas como herramienta en los trabajos de investigación en las plantas.

El uso de mutantes naturales en el mejoramiento de los cultivos es tan antiguo como la agricultura misma. En 1741, Linnaeus describió un mutante rojizo de manzana, luego se conocieron reportes de mutaciones de “botón” en cultivos propagados vegetativamente tales como árboles frutales, ornamentales, papa, etc. (Carriere, 1865; Darwin, 1868; Cramer, 1907; Dorst, 1924; Shamel and Pomeroy, 1936) citados por Broertjes et al., 1988.

Broertjes et al., 1988 subrayan que en los inicios del siglo 20, apenas se descubrió los rayos X el científico alemán Hugo de Vries predijo

el uso de las mutaciones inducidas y sugirió su aplicación. Años más tarde Muller (1927) y Stadler (1928) probaron que los rayos X podían inducir mutaciones en *Drosophila* y en plantas respectivamente. Los mutagénicos químicos no fueron usados hasta aproximadamente 1940. Los pioneros en el campo de la mutagenesis química son F. Oehlkers y C. Auerbach , 1940. Casi al mismo tiempo se describió el efecto del doblamiento del número de cromosomas por efecto de la colchicina por A.F. Blakeslee y A.G. Avery. Un pionero en el mejoramiento por mutaciones fue W.E. De Mol, quien en 1922 empezó su trabajo con *Hyacinthus* (De Mol, 1953) y en 1945, obtuvo el primer mutante comercial aplicando rayos X en *Tulipa*.

Además de la obtención de mayor número de cultivares mutantes es de gran importancia el beneficio económico que éstos puedan proporcionar. No existen reportes debidamente documentados y los existentes corresponden a algunos programas de mejoramiento exitosos, tales como el grupo “Horim” de mutantes de *Chrysanthemum* en Holanda que en 1979 cubrió con 35 % del mercado alemán (Broertjes et al., 1980).

El OIEA reportó, antes de 1950 el uso de una variedad comercial mutante de tabaco en Indonesia. En el período 1961 - 1997 la cantidad de cultivares mutantes se incrementó notablemente hasta alcanzar un total de 1846 en 154 especies. El 94 % de las a especies son propagadas por semilla (FAO/OIEA Mutant Varieties Database 1997).

El uso de las mutaciones es de gran valor en el mejoramiento de plantas, particularmente cuando se desea mejorar una o dos caracteres fácilmente identificables en una variedad adaptada. La principal ventaja es que el genotipo de la variedad es levemente alterado (comparado con la hibridación de dos variedades distintas); cambiando el carácter deseado, y el tiempo requerido para cambiar este carácter es menor que cuando se usan las hibridaciones para mejorar el mismo carácter. El uso de los mutantes inducidos en hibridaciones es probablemente más importante que el uso directo de los mutantes, y la proporción de cultivares mutantes inducidos utilizados en hibridaciones está en continuo crecimiento.

Las mutaciones naturales son responsables por gran parte de la variación usada para mejorar los cultivos propagados vegetativamente, como consecuencia las mutaciones inducidas tienen un alto potencial para el mejoramiento genético de estos cultivos. Su uso es amplio en el mejoramiento comercial de las plantas ornamentales.

El mejoramiento por mutaciones está siendo más satisfactorio en los cereales. El 64% de los cultivares mutantes liberados dentro de los cultivos propagados por semilla son cereales dentro de los cuales el 30 % son cultivares de cebada (FAO/OIEA Mutant Varieties Database 1997).

2.2. Agentes mutagénicos.

Un mutágeno es un agente físico o químico capaz de incrementar significativamente los eventos mutacionales elevando la tasa de mutaciones sobre el nivel natural (Rieger et al., 1976). Este término se limita a los agentes capaces de inducir mutaciones puntuales o ruptura de cromosomas. Los agentes poliploidizantes como la colchicina, no están considerados. El uso de un mutagénico en el mejoramiento de las plantas no depende sólo de su efectividad o frecuencia de mutaciones; sino de su eficiencia mutagénica o producción de cambios deseados en relación a los cambios no deseados (Konzak et al. , 1965).

2.2.1. Mutágenos químicos,

Muchos agentes químicos exhiben un potencial mutagénico; sin embargo, sólo algunos son realmente útiles para inducir mutaciones en las plantas cultivadas. La mayoría de estos pertenecen al grupo de agentes alcalinizantes: Etil-metano-sulfonato (EMS), dietil sulfato (dES), Etilenoimina (EI), Etil-nitroso-úrea y metil-nitroso-úrea (MNH). Las azidas son mutágenos indirectos altamente eficientes en las especies vegetales, donde el promutágeno es enzimáticamente activado para exhibir el efecto mutagénico. Los mutagénicos químicos pueden clasificarse en cuatro grupos: bases análogas y componentes relacionados; antibióticos; agentes alcalinizantes; y las azidas.

2.2.1.1. Agentes alcalinizantes. Es el grupo de agentes mutagénicos químicos más importante para la inducción de mutaciones en las plantas cultivadas. Estos componentes tienen uno o más grupos alquil, los cuales pueden ser transferidos a otras moléculas donde la densidad de electrones es suficientemente alta. Todas estas sustancias reaccionan con el ADN, alcalinizando los grupos fosfato de las bases purina y pirimidina. El evento más frecuente conduce a la formación de 7-alkyl-guanina. El metil-nitroso-úrea (MNH) es considerado un mutágeno efectivo. Maluszynska and Maluzsynski, (1983), reportaron la importancia del período “interincubation germination” (iig), en el incremento del efecto genético y somático del MNH, en semillas de cebada, duplicando el efecto mutagénico. Sin embargo, este efecto es más ventajoso cuando se aplican concentraciones bajas del mutágeno (0.5 mM MNH x 0.5 mM MNH), durante tres horas de remojo en la solución y señalan que indujo una frecuencia de 6 % de mutaciones clorofílicas, comparado con 4 % inducidas por el tratamiento simple de 1mM. MNH.

2.2.1.2. Azida. Es un mutagénico químico bajo ciertas condiciones de tratamiento. Es posible obtener altas frecuencias de mutaciones, la mayoría de ellas de genes con insignificante frecuencia de aberraciones cromosómicas. Se encontró que en soluciones ácidas es

muy efectiva en la inducción de deficiencias clorofílicas y mutaciones morfológicas (Kleinhofs et al., 1974). El modo de acción de la azida como un mutágeno no es conocido aún (Nilan, Kleinhofs and Sander, 1975).

Thakur y Sethi, en 1995, reportaron la interacción mutagénica de los rayos gamma con Etil Metano Sulfonato (EMS) y Azida de sodio (NaN_3), en tres genotipos de cebada. Dichas combinaciones mostraron efectos sinérgicos en la reducción de la germinación, esterilidad de las semillas y quimeras clorofílicas de la generación M1 y en la frecuencia de mutaciones en la generación M2. El grado de sinérgismo varió de un genotipo a otro siendo más notorio a dosis altas de los mutágenos químicos.

Kim et al, (1995), trataron tres cultivares de cebada con NaN_3 , Dietil Sulfato y Etil Metano Sulfonato (EMS) los cuales produjeron altas frecuencias de mutaciones morfológicas en plantas M2 a las más altas dosis del mutágeno, mientras que la mayor variabilidad se produjo usando bajos niveles del mutágeno. La frecuencia de inducción de mutaciones en la población M2 estuvo correlacionada positivamente con la tasa de mutaciones clorofílicas, y en la población M1 estuvo correlacionada negativamente con la fertilidad de los granos. Algunos caracteres fueron específicos en su respuesta al mutágeno. Así los mutantes de color, los mutantes semi-enanos, fueron inducidos por la Azida de Sodio en los tres cultivares estudiados, y la frecuencia de éstos se incrementó más aún al incrementarse la dosis del mutágeno.

Hay varios ejemplos de la implementación de variedades mutantes en la producción de muchos cultivos. En arroz la mayoría de variedades mutantes fueron obtenidos en forma directa como el caso de la variedad 'Reimei' (Japón) y 'Calrose 76' (USA). Las radiaciones fueron más usadas para generar caracteres deseados (190 variedades), mientras que 23 variedades de arroz fueron inducidas por mutagénicos química (Maluzsynski et al., 1994). Rutger (1992) presentó datos de 11 variedades mutantes las cuales son cultivadas en una área anual de 100,000 hectáreas. Dentro de ellas las variedades chinas 'Zhefu 802' cultivada en 1,400,000 hectáreas y la variedad 'Yuanfengzao' con un área de cerca de un millón de hectáreas.

En Pakistán, NIAB (1988) anota que se irradiaron con rayos gamma las semillas F1 de algodón provenientes de un cruce de una variedad americana por una local. El mutante seleccionado tuvo caracteres mejorados como tipo de planta determinado, tolerancia al calor y precocidad. Este cultivar fue liberado en 1983 como 'NIAB 78' y su cultivo duplicó la producción de algodón de Pakistán los siguientes 5 años. En China, fue desarrollado un mutante de algodón 'Lumian No.1' por irradiación de las semillas con rayos gamma y fue liberado en 1974 alcanzando un área de cultivo anual de más de un millón de hectáreas.

En Checoslovaquia, se irradiaron las semillas de cebada, variedad 'Valticky', con 10 Krad. de rayos X. La selección de los mutantes dió como resultado la variedad 'Diamante', liberado en 1965, cuyas características con relación al parental fueron: reducción de la

longitud del tallo en 15 cms., resistente al acame, hábito de crecimiento semi-postrado, alta capacidad de macollamiento, incremento del rendimiento en 12 % y una relación de grano-paja de 1: 0.95 comparado con 1: 1.3 de 'Valticky' (Maluszynski, 1995).

2.3. Producción de Dobles Haploides

Los haploides son autónomos, son plantas esporofíticas que tienen un número de cromosomas gametofítico, porque se originan de una célula gamética en el saco embrionario o en el grano de polen. El embrión haploide puede originarse de la célula huevo (gynogenesis) o de otra célula del saco embrionario (apogamia), o de un gameto masculino (androgenesis).

Desde los primeros reportes de Guha y Maheshwari (1966,1967), los haploides han sido obtenidos mediante cultivo "*in vitro*" de anteras o microsporas de unas 247 especies de plantas pertenecientes a 88 géneros y 34 familias de angiospermas (Maheshwari et al., 1983). Sin embargo, el sistema establecido está disponible para pocas especies como, *Asparagus officinalis*, *Hordeum vulgare*, *Brassica napus* y muchas subespecies de *Brassica oleracea*, *Datura innoxia*, *Gerbera jamesonii*, *Nicotiana sp.*, *Solanum tuberosum*, *Lolium perenne*, *Oryza sativa (japonica)*, *Beta vulgaris*, *Triticale* y *Triticum aestivum* (Maluszynski, 1995).

En muchas especies cultivadas, particularmente los cereales, se ha desarrollado el sistema de producción de dobles haploides (Hu y Yang

1986). Este sistema capaz de producir líneas dobles haploides en número suficiente para contribuir directamente a los programas de mejoramiento, proporciona a los mejoradores, genotipos completamente homocigotas de progenitores heterocigotas en una sola generación, los que pueden usarse directamente para la producción de nuevas variedades. Este sistema proporciona 2 ventajas importantes: la reducción del ciclo de mejoramiento y el incremento de la eficiencia de selección (Snape 1989).

Generalmente hay tres vías para la obtención de plantas haploides: a través de la androgénesis, de la ginogénesis y de las cruzas amplias, siendo la primera potencialmente mas eficiente en la mayoría de las especies. En cebada se han desarrollado dobles haploides a través de cruzas amplias que produce la eliminación de cromosomas en los híbridos interespecíficos, conocido como "método bulbosum" que fue desarrollado entre otros por Kasha y Kao (1970), Jensen (1976) y Pickering (1983); a través del cultivo de anteras (Hunter, 1987) y usando el cultivo de microsporas aisladas (Olsen, 1987; Kasha, 1993).

Zhang (1989) reporta el desarrollo de dos cultivares de arroz, a través del cultivo de anteras, cultivados a escala comercial, el primero fue "Yin Xun" en 1976 y "Hua Han Zhao" en 1981 con características de precocidad y tolerancia al frío y buena calidad de grano.

De Buyser et al, 1987, reportaron el desarrollo de una variedad de trigo a la que le denominaron 'Florin', a partir del cultivo "*in vitro*" de

anteras de una población F1. El cruce se realizó en Chile en 1978. La obtención de las líneas dobles haploides en Francia y los ensayos de rendimiento hasta el registro de la nueva variedad en Chile en 1984.

Pauk et al. (1995) reportaron la liberación de la variedad de trigo invernal 'GK Delibab' desarrollada a través del cultivo "in vitro" de anteras provenientes de una población F3 seleccionada. En cebada, el cruce entre parentales se realizó en 1984 y el registro oficial en 1992.

En cebada, se informa del desarrollo de variedades comerciales empleando la técnica de los Dobles Haploides (Cuadro 1).

Sin embargo, la técnica de producción de dobles haploides a través del cultivo de anteras "in vitro" está influenciada por diversos factores: genotipo (Powell 1990), condiciones de desarrollo de las plantas donadoras de anteras (Foroughi-Wehr et al 1979), estado de desarrollo de la microspora, pretratamiento a las espigas antes de la inducción (Szarejko y Kasha 1991, Hou et al 1993, Hoekstra et al., 1997), medio de cultivo y condiciones de cultivo (Kasha and Seguin-Swartz 1983; Hu 1985; Chen, 1986, Sorvari and Scheider 1987) entre otros. La ocurrencia de plantas albinas es un factor adverso que limita la producción de dobles haploides y su uso en los programas de mejoramiento de los cereales, alcanzando altos niveles como por ejemplo: 99% en cebada (Grunewaldt and Malepzy, 1975), 70-90 % en arroz (Martin and Milo, 1981; Zapata et al., 1986; Datta et al., 1990), 82 % en trigo duro (Aissa, 1977) y 75 % en centeno (Wenzel et al., 1990). La literatura indica que el albinismo puede estar

influenciado por factores genéticos y fisiológicos tales como la temperatura durante la inducción y regeneración (Kasha and Seguin-Swartz, 1983). Bjornstad et al, 1993 indican que en la variedad de cebada primaveral “Nordic” de 6 hileras la frecuencia del albinismo fue el principal impedimento para lograr una buena respuesta al cultivo de anteras.

Cuadro 1. Variedades de Cebada obtenidas con al aplicación del sistema de producción de dobles haploides

Compañía/Instituto	País	Nombre de la Variedad	Referencia
Abed PBS	Dinamarca	Etna, Give, Loma, Loke, Riga, Rima, Verona, Perma Paloma, Bereta, Aberdeen, Pondus, Tender	Comunicación personal Rasmussen
Agriculture Canada	Canada	DB202	Choo et al. 1995
Canterbury Malting	Nueva Zelanda	Valetta	Comun. Pers. Pickering
Crop & Food Res	Nueva Zelanda	Gwylan	Coles, 1986
Florimond Desprez	Francia	Michka, Lombard, Anka, Vodka, Gaelic, Gotic, Logic, ZF3642, Lyric Moka, Tattoo, Jerka, Jing Zhuo, Douchka,	Pickering and Devaux, 1992 comun. Pers. Lefebvre
ICI seeds	Inglaterra	Waveney	NIAB 1988
IPG/PBS	Polonia	KA7/3	Adamski et al., 1995
IPGG	USSR	Istok, Odesskill 15, Preria	Comun. Pers. Choo
NSW Agriculture	Australia	Tantangara	Read 1995
Saaten-Union	Alemania	Anthere, Henni	Comun. Pers. Jager-Gussen
Semico	Canada	HD87-18.14, HD87-12.1	Choo et al., 1995
WG Thompson	Canada	Mingo, Rodeo, Craig Winthrop, Lester Ontario, TB891-6, Prospect, Bronco Sandrina, Beluga McGregor, T090-017, T086-156, T081-009, T103-003, H30-11	Ho and Jones, 1980 Campbell et al., 1984 Shugar and Etienne, 1994 Choo et al. 1985 Comun. Pers. Shugar
WPBS	Inglaterra	Doublet, Pipkin	Jones et al., 1985; 1986

Devaux, P.; M. Zivy, A. Kilian & Kleinhofs, 1996. In: G. Scoles & B. Rosnagel (eds.) Proc. V Int. Oat Conf. and VII Int. Barley Genet. Symp., pp. 216-222.

Powell et al. (1984) estudiaron la variación de 74 líneas dobles haploides de cebada cultivar “Sabarlis” obtenidas a través del cultivo

de microsporas y los compararon con 16 líneas provenientes de autofecundación. Evaluaron: susceptibilidad a mildiu, hábito de crecimiento, días al espigado, longitud del último entrenudo, altura de planta, número de tallos con espiga, número de granos de la espiga principal, peso de 1000 granos y rendimiento de grano de la espiga principal. Encontraron diferencias significativas en días al espigado, longitud del último entrenudo, altura de planta y número de tallos con espiga. Explicaron que esta variación probablemente se deba a mutaciones nucleares ocurridas al nivel haploide coincidiendo con Oono (1975) y Walcasa (1982).

En 1986 Powell et al, compararon líneas dobles haploides de cebada provenientes de la población F1 del cruce “Golden Promise x Mazurka”, obtenidas a través del método *bulbosum* y cultivo de microsporas y líneas del mismo cruce obtenidas a través del método uniseminal. Encontraron diferencias significativas en los caracteres evaluados en las líneas dobles haploides, explicando que la variación se produjo en la fase del cultivo “*in vitro*” debido a un desequilibrio en el ligamiento que incluye genes epistáticos.

Bjornstad et al, en 1993 compararon líneas dobles haploides, producidas por cultivo “*in vitro*” de anteras, líneas dobles haploides obtenidas por el método “*bulbosum*” y líneas de cruces de cebada manejando el método uniseminal. Ellos evaluaron los caracteres cuantitativos durante 2 años en condiciones de campo en una localidad. Los resultados que obtuvieron señalan que éstos métodos difieren en los genotipos obtenidos, así como en la frecuencia de las

líneas obtenidas por cada método; sin embargo opinan que los tres métodos pueden ser considerados equivalentes desde el punto de vista del mejoramiento, como por la calidad de las líneas concernientes.

Lokos et al, en 1997, analizaron los caracteres agronómicos de 3 genotipos dobles haploides de trigo con la finalidad de evaluar la variabilidad fenotípica existente en estos genotipos teóricamente homocigotas. Evaluaron, altura de planta, longitud de la espiga, diámetro de la espiga, longitud de las espiguillas, diámetro de las espiguillas, número de nudos por espiga y número de granos por espiga. No encontraron diferencias en los caracteres evaluados de las líneas dobles haploides frente a las líneas originales.

El tamaño de la población de Líneas dobles haploides producidas por este método es considerado una desventaja; sin embargo 100 líneas dobles haploides por cruce son suficientes para producir una línea superior en rendimiento. (Wenzel et al., 1995). Muchos cultivares dobles haploides han sido seleccionados de menos de 20 líneas dobles haploides producidas por cruce (Pickering and Devaux, 1992; Alejar et al., 1995).

Devaux et al, 1996 , reportan una lista de 59 cultivares de cebada desarrollados a través del sistema de dobles haploides hasta 1995. Khush & Virmani, 1996, reportan 10 cultivares de trigo desarrollados entre 1983 y 1992, usando el sistemas de producción de dobles haploides a través del cultivo “in vitro’ de anteras.

2.4. Uso de la tecnología “*in vitro*”, en el mejoramiento por mutaciones

La obtención de variedades utilizando como técnica de Mejoramiento Genético la inducción de mutaciones puede ser acortada significativamente a través de la aplicación de la técnica de producción de dobles haploides (Zsarejko et al., 1991). La técnica a ser usada depende de la especie. Beversdorf & Kott, (1987) desarrollaron un sistema de mutagenesis y selección “*in vitro*” usando cultivo de microsporas de colza. Este sistema incluye el tratamiento con rayos gamma o mutagénico químico de microsporas uninucleadas potencialmente embriogénicas, seguido por la selección de estructuras embrionales o plántulas en un medio con un factor selectivo (Swanson et al., 1989). Huang (1992), reportó que Calogen Inc. y Allelix Crop Technologies usaron la técnica de la mutagénesis en microsporas para modificar el contenido de ácidos grasos en la colza.

En cebada, se pueden utilizar el cultivo de anteras, el método bulbosum, o el cultivo de microsporas (Kasha et al., 1993) para producir mutantes en forma rápida. Umba di-Umba et al. (1991), sugirieron el uso de semillas dormantes en lugar del cultivo “*in vitro*” para el tratamiento mutagénico.

En los trabajos reportados por King (1949), bajas dosis de rayos X en cultivos “*in vitro*” de tabaco (*Nicotiana glauca* x *N. langsdorfii*) estimularon significativamente su crecimiento en 10 días, mientras que altas dosis de rayos X redujeron el crecimiento de los cultivos. Un efecto similar fue observado en experimentos donde los Dobies

Haploides fueron producidos empleando plantas M1 como donadoras de anteras. Vagera et al. (1976), reportaron un efecto estimulante de los mutágenos N-metil-N-nitroso úrea (MNH) y n-butil metano sulfonato (BMS) en tratamiento de semillas de tabaco (*Nicotiana tabacum*), usadas en la producción de plantas donadoras de anteras. El porcentaje de haploides obtenidos por antera cultivada tuvo un incremento de 100-220 % en comparación con el testigo. Aún altas dosis de mutágenos (0.1-0.2 mM MNH/24h o 5-10 mM BMS/24h) incrementaron la frecuencia de haploides obtenidos. Przewozny et al. (1980) describió un incremento significativo de estructuras multicelulares derivadas de microsporas en el cultivo de anteras de papa diploide después del tratamiento de las inflorescencias. Ellos aplicaron rayos X, rayos gamma y N-metil-N-nitroso úrea (MNH). Se obtuvo el mayor efecto estimulador con las dosis del mutágeno químico (0.1 o 0.5 mM. MNH), en 165 % y 126 % respectivamente. Sax (1963), hizo una revisión del efecto estimulante, en estados tempranos del desarrollo, en varias especies de plantas, luego de recibir bajas dosis de irradiación o mutágeno químico. Maluzsynski & Adamska (1976) observaron dos diferentes efectos estimulantes después del tratamiento con MNH a las semillas de *Nicotiana langdorffii*, *N. tabacum* y *N. rustica*. La dosis baja de 1 mM..MNH/3h causó estimulación insignificante en el crecimiento de la planta en sus estados iniciales de desarrollo. La dosis alta del mutágeno (3 mM.MNH/3h) inhibió el crecimiento, pero mas tarde incrementó el índice mitótico en los meristemas apicales.

El efecto estimulante es muy importante en la producción de plantas androgénicas de variedades recalcitrantes de algunos cultivos. Mac Donald et al., (1988), reportaron que el desarrollo de Dobles Haploides es pobre en la colza (*Brassica napus ssp. oleifera*) cv. 'Ariana' después de la irradiación de yemas con 10 Gy rayos gamma. Zhang et al., (1992) reportaron que solo se indujo callos en el cultivo de anteras de *Malus x domestica* cv. 'Golden Delicious'; sin embargo, después de la irradiación de los botones florales antes del cultivo de anteras se indujo embriogenesis.

La aplicación práctica de los tratamientos mutagénicos a las plantas antes del cultivo de anteras para la obtención de dobles haploides de cultivares recalcitrantes ha sido estudiado con mayor detalle en arroz (*Oryza sativa*) y Trigo (*Triticum aestivum*) Aldemita y Zapata (1991), investigaron el efecto de varias dosis de irradiación gamma en la respuesta androgénica de seis cultivares recalcitrantes y dos de alta respuesta del arroz (*O. indica*). Se irradiaron las semillas y las plantas M1 fueron las donadoras de anteras. Los cultivares recalcitrantes mejoraron en la inducción de callos y regeneración de plantas verdes.

Ling et al (1991) investigaron la respuesta, al cultivo de anteras de trigo en diferentes dosis de rayos gamma, de dos cultivares 'Grebe' (alta respuesta) y 'Kite' (recalcitrante). Se irradiaron las espigas, antes del cultivo de anteras. En el cultivar 'Grebe' el porcentaje de respuesta de las anteras y la producción de plantas verdes se incrementaron significativamente a bajas dosis de irradiación (1-3

Gy), mientras que a dosis más altas (7-10 Gy) se inhibió la respuesta; sin embargo, para el cultivar 'Kite' sólo se obtuvo callos y plantas verdes en los tratamientos con bajas dosis de irradiación . Laib et al. (1995) intentó hacer lo mismo en cebada, es decir irradió las espigas antes del cultivo de anteras, pero ninguno de los tres genotipos en estudio respondieron con una estimulación y por el contrario con la dosis de 1 Gy rayos gamma disminuyó el porcentaje de respuesta de las anteras y la regeneración de plantas. En general puede concluirse que la aplicación de bajas dosis de mutágenos antes de realizar el cultivo de anteras puede ser una herramienta importante para la producción de haploides en variedades y especies de baja respuesta o recalcitrantes.

El uso de plantas M1 (plantas de semillas tratadas con mutagénico), como donadoras de anteras o microsporas para la producción de Dobles Haploides evita casi todos los problemas del efecto somático del mutágeno en el tejido. Asimismo, la producción de plantas Dobles Haploides de gametos mutados pueden ayudar a evitar las quimeras, que aparecen usualmente cuando una estructura multicelular es tratada mutagénicamente (Maluzsynski et al., 1995).

Sin embargo, Picard et al. (1978) observaron diferencias en altura, rendimiento y resistencia a enfermedades entre las progenies de DH originadas de líneas puras en trigo. Parisi y Picard (1986) encontraron diferencias en rendimiento en la respuesta de tres líneas DH del cultivar Moisson.

2.5. Variaciones Somaclonales en el mejoramiento de las plantas

Larkin y Scowcroft (1981) reportaron luego de un minucioso trabajo, las variaciones ocurridas en el proceso androgénico y los llamó “variaciones somaclonales”. Pero más adelante Evans et al. (1984) creyeron conveniente definir la variación observada después del cultivo de anteras y óvulos como “variación gametoclonal”. Ellos definen “Variación Somaclonal”, a aquella variación que se origina en plantas obtenidas a través del cultivo de tejidos. Incluye toda la variación que pueda resultar en las plantas producidas a partir de protoplastos (protoclonal), de anteras y microsporas (gametoclonal), de callos (calliclonal), de meristemas apicales (mericlonal), hojas y tejidos del tallo (somaclonal).

El cultivo de células, tejidos y embriones sexuales, origina la formación de callos, mientras mayor es el tiempo de permanencia en estado de callo, es mayor la posibilidad de encontrar variaciones somaclonales entre las plantas regeneradas. Las semillas de la progenie dan lugar a plantas que muestran segregación de fenotipos en la población F2 o M2. Es necesario luego estudiar la estabilidad genética de la variación somaclonal al menos en las dos siguientes generaciones de propagación de semilla, o en las siguientes dos o tres propagaciones vegetativas (Alhoowalia, 1997).

El objetivo de la multiplicación “*in vitro*” de un genotipo es la producción de clones por lo tanto se debe evitar o minimizar la variación somaclonal. Si se reduce la cantidad de reguladores de

crecimiento y se evita la regeneración a partir de callos se disminuye la frecuencia de variaciones somaclonales. Estas son menos en plantas producidas de embriones somáticos que las regeneradas de callos.

Los tipos de variaciones somaclonales comunmente observadas han sido: albinos, virescentes, enanos, hojas grandes, hojas angostas, cambio de color del mid-rib y pétalos, forma de la flor, esterilidad masculina, variantes cromosomales: tetraploides, aneuploides, cambios estructurales en el cromosoma: translocaciones, deleciones, duplicaciones, inversiones. En algunos casos se activan transposones e inestabilizan a los genotipos. Frecuentemente los somaclones muestran cambios en más de un carácter (Ahloowalia, 1997).

Se conoce que un somaclon de tomate con alto contenido de sólidos, ha sido de uso directo, sin mejoramiento adicional. La mayoría de somaclones obtenidos han sido usados como fuente de germoplasma. Se ha reportado en la India dos somaclones de alto rendimiento de aceite de *Brassica* (BIO-902 y BIO-YSR) del cultivar parental "Varuna". La variedad de arroz 'Dama' liberada en Hungría es también el resultado de la variación somaclonal obtenida en regenerantes de callos haploides. Esta variedad es de 140 días de período vegetativo, 80-85 cms. de altura, con resistencia al acame y a *Pyricularia oryzae*.

Mientras que cada variación es un problema para los propagadores que necesitan uniformidad en los clones (Skirvin et al., 1994), esta

variación es aprovechada por los mejoradores, debido a que proporciona la posibilidad de seleccionar variantes deseadas.

3. Materiales y Métodos

La investigación fue ejecutada en el Programa de Cereales de la Universidad Nacional Agraria La Molina. La fase de laboratorio se inició en Abril de 1996 a Mayo de 1997 y la fase de campo se llevó a cabo en los campos del Instituto de Desarrollo de Sierra de la UNALM de Diciembre de 1997 a Junio de 1998.

El trabajo fue dividido en dos partes:

- Trabajo de laboratorio: consistió, en la realización del tratamiento con los mutagénicos químicos y la producción de las líneas dobles haploides.
- Trabajo de campo: incluyó la siembra de la población M1 para la producción de plantas donadoras para el cultivo de anteras, y el ensayo de rendimiento de las líneas dobles haploides producidas (Gráfico 1).

3.1. Material vegetal utilizado para el tratamiento mutagénico y la producción de líneas dobles haploides.

Los genotipos estudiados fueron dos líneas avanzadas del programa de mejoramiento de cebada que lleva a cabo del Programa de Cereales de la Universidad Nacional Agraria La Molina. Estos genotipos fueron seleccionados por adaptabilidad a las diversas condiciones de sierra y costa, resistencia a roya morena (*Puccinia hordei*), roya amarilla (*Puccinia striiformis f.sp hordei*), tolerancia a oidium o

Gráfico 1. Esquema desarrollado en la producción de Líneas Mutantes Dobles Haploides



mildiu polvoriento (*Erysiphe graminis f. sp. hordei*), resistencia al acame y alto potencial de rendimiento.

3.2. Características agronómicas :

Línea 2194. Semi-tardía de hábito primaveral, espiga entre 70-90 días y madura entre 110-140 días, su rendimiento supera los 4,000 kg/ha., proviene de un cruce (LB IRAN / CI 9650 / LINEA 527) realizado en México (ICARDA-CIMMYT) e introducida al Perú en la generación F₃ (Romero y Gómez, 1996).

Línea 3545. Semi-precoz, de hábito primaveral, espiga de 60-70 días y madura entre 110-130 días, su rendimiento promedio es de 4,700 kg/ha., proviene de un cruce (GLORIA "S" / CELO "S" / ESC.II-72-83-3E-7E-5E-1E / 3 / LINEA 527), realizado por ICARDA-CIMMYT e introducida al Perú en el vivero F3 cebada zona andina II-87 (Romero y Gómez, 1996).

3.3. Agentes mutagénicos:

N-metil-nitroso úrea (MNH).

Azida de Sodio (NaN₃)

3.3.1. Preparación de las soluciones:

N-metil-nitroso úrea (MNH). Se preparó la solución de acuerdo a las dosis (0.5 mM. y 0.75 mM), pesando la cantidad de producto y diluyéndolo en agua destilada.

Azida de Sodio (NaN₃). Para lograr el efecto mutagénico se diluyó el producto en una solución buffer de fosfato pH:3 a la concentración de 1.0 mM. utilizando , 0.4 M de KH₂PO₄ y 0.0635M de H₃PO₄ por litro de solución buffer.

3.4. Tratamiento a las semillas

En el cuadro 2 se describen los tratamientos mutagénicos realizados a las semillas de las líneas avanzadas 2194 y 3545 utilizados en el experimento.

Cuadro 2. Tratamiento mutagénico a las semillas de las líneas avanzadas de cebada 2194 y 3545.

Genotipo	Tratamiento a las semillas
Línea 2194	sin tratamiento
	0.5 mM MNH x 0.5 mM MNH (5 horas intervalo*)
	1.0 mM NaN ₃ x 0.75 mM MNH (5 horas intervalo*)
Línea 3545	sin tratamiento
	0.5 mM MNH x 0.5 mM MNH (5 horas intervalo*)
	1.0 mM NaN ₃ x 0.75 mM MNH (5 horas intervalo*)

* Intervalo de tiempo de remojo de las semillas en agua destilada entre cada remojo en la solución mutagénica.

3.4.1. Procedimiento

- 1.- Pre-remojo de 100 gramos de semillas de ambas líneas en agua destilada durante 12 horas a temperatura ambiente.
- 2.- Remojo de las semillas en la solución conteniendo 1.0 mM. de NaN₃ ó 0.5 mM. de MNH e incubación de las mismas durante 3 horas a una temperatura de 24 °C.
- 3.- Se enjuagó las semillas tres veces con agua corriente y se dejó nuevamente en remojo en agua destilada durante 5 horas.

4.- Transcurridas las 5 horas de intervalo se realizó un segundo remojo en la solución conteniendo 0.75 mM. de MNH ó 0.5 mM. de MNH respectivamente incubando durante 3 horas adicionales a la misma temperatura , es decir 24 °C.

5.- Enjuague de las semillas tres veces con agua corriente e inmediatamente se procedió a la siembra de las semillas tratadas en terreno húmedo.

3.5. Producción de líneas Dobles Haploides.

3.5.1. Población M1.

a. Siembra de semillas M1 donadoras de anteras: Se realizó en parcelas de 20 surcos de 1m. de longitud, distribuyendo las semillas en forma uniforme a lo largo de todo el surco y en suelo húmedo.

b. Colección de espigas.

b.1. Selección de espigas: Las espigas fueron seleccionadas en el estado ideal para el cultivo de anteras, es decir, con microsporas en estado uninucleado. Este estado fue determinado con ayuda de un microscopio electrónico y fue asociado a la longitud existente entre la base de la hoja bandera y la penúltima hoja. Se colectaron 150 espigas, 25 por cada tratamiento. La esterilización superficial a los tallos con la espiga en el interior de la hoja bandera se hizo con un aerosol conteniendo alcohol al 96%, antes de remover las espigas.

- b.2. Coloración: Se tomaron las anteras de la parte media de la espiga con ayuda de un par de pinzas bajo un estereoscopio y luego de colocarlas en un porta objetos fueron coloreadas con acetocarmín al 4% y se examinaron bajo el microscopio. Se tomaron 120 espigas, 20 por tratamiento.
- c. Pretratamiento de frío a las anteras: Las espigas con microsporas en estado uninucleado se colocaron en una placa petri conteniendo otra pequeña, con unas gotas de agua destilada estéril y permanecieron durante 21 días a una temperatura de 5°C en oscuridad (condiciones de refrigeradora).
- d. Preparación de las anteras: Se tomaron las anteras con ayuda de un estereoscopio usando pinzas pequeñas. Luego éstas se colocaron en el medio de cultivo. Se colocó 30 anteras por placa petri conteniendo 3 ml. de medio de cultivo BAC-3, conteniendo 30 % de ficol y 6% de maltosa. La densidad de anteras en el medio de cultivo está estimada en 10 anteras por mililitro de medio de cultivo. Luego, cada placa petri se identificó, se selló con parafina y papel aluminio, y enseguida se las ubicó en una incubadora. Se tomaron las anteras de 93 espigas de acuerdo al cuadro 3:



Foto 1.
Extracción y siembra
de anteras en medio
de cultivo BAC-3.



Foto 2.
Incubación de anteras
en medio de cultivo BAC-3
a 24 °C en oscuridad.

Cuadro 3. Número de repeticiones por tratamiento para realizar la producción de dobles haploides.

Genotipo	Tratamiento mutagénico	# de espigas colectadas	# de espigas en tratamiento de frío	# de anteras en cultivo	Repeticiones (espigas)
Línea 3545	Testigo	25	20	450	15
	0.5mM MNH x 0.5 mM MNH	25	20	510	17
	1.0 mM NaN ₃ x 0.75 mM MNH	25	20	450	15
Línea 2194	Testigo	25	20	510	17
	0.5mM MNH x 0.5 mM MNH	25	20	390	13
	1.0 mM NaN ₃ x 0.75 mM MNH	25	20	480	16
Total		150	120	2790	93

e. Incubación: Las anteras fueron incubadas a una temperatura de 28°C en oscuridad. Después de 14 días se reemplazó la tercera parte del medio de cultivo por la misma cantidad de medio de cultivo fresco y continuó la incubación de las anteras.

f. Regeneración: Después de los 30 días en incubación, los callos o embriones inducidos con 2mm. ó más de diámetro fueron transferidos a medio de regeneración en placas petri de 100 x 20 mm., colocándose bajo luz difusa por un periodo de aproximadamente 1-2 semanas, a una temperatura aproximada de 22°C. Las plántulas formadas fueron transferidas luego a un medio de regeneración conteniendo 4 gr/lit de carbón activado para favorecer su enraizamiento.

g. Aclimatación: Las plantas verdes regeneradas fueron transferidas a macetas de plástico con sustrato (tierra vegetal

: arena en proporción 3 : 1), se las cubrió con vasos de vidrio para minimizar el estrés producido por el cambio de medio; y se mantuvieron en una cámara de crecimiento durante 1-2 semanas a la temperatura aproximada de 23°C.

h. Las plantas aclimatadas se transfirieron a camas en invernadero hasta la obtención de semillas.

3.5.2. Población testigo.

Considerando evidencias de variación gametoclinal en especies cultivadas “*in vitro*” se obtuvo Dobles Haploides de cebada de la población testigo, repitiendo el mismo procedimiento señalado para la población M1, a las que llamamos líneas Dobles Haploides (DH). La semilla de las líneas MDH y DH se incrementaron en La Molina.

3.6. Evaluación de las líneas dobles haploides producidas en condiciones de campo.

Se probaron 58 líneas mutantes dobles haploides (MDH), 34 líneas dobles haploides (DH) y los testigos Línea 2194 (UNA La Molina 94) y Línea 3545 (UNA La Molina 96) (Cuadro No. 5). En función al número de Líneas MDH así como del número de Líneas DH originados a partir de cada población se consideraron 4 Ensayos de Rendimiento. Las líneas MDH y las Líneas DH son las siguientes (Cuadro 4). Cabe señalar que en el Ensayo 1 están incluidas todas las Líneas MDH y Líneas DH provenientes de la población 2194,

mientras que en los ensayos 2, 3 y 4 están distribuidas las Líneas MDH y las Líneas DH provenientes de la población 3545. En los 4 ensayos se tuvieron como testigos las 2 poblaciones básicas.

En el Ensayo 1 se incluyeron 10 Líneas DH, 13 Líneas MDH y 2 testigos es decir, 25 tratamientos, y 3 repeticiones por tratamiento. En los Ensayos 2,3 y 4 se. La distribución de las líneas se realizó como sigue: en el Ensayo 2 se incluyeron 12 Líneas DH, 11 Líneas MDH y dos testigos. En el Ensayo 3 se incluyeron 7 Líneas DH, 16 Líneas MDH y dos testigos y en el Ensayo 4 se incluyeron 5 Líneas DH, 18 Líneas MDH y dos testigos (Cuadro 4).

Los ensayos se llevaron a cabo en el Fundo San Juan de Yanamuco propiedad del Instituto de Desarrollo de Sierra (IRD-Sierra) de la Universidad Nacional Agraria La Molina ubicado en el distrito de San Lorenzo, Provincia de Jauja, Departamento de Junín, a una altitud de 3,300 m.s.n.m.. La fecha de siembra fue el 12 de diciembre de 1997.

3.6.1. Datos del cultivo

a. Densidad de siembra: 100 Kg/ha.

b. Dosis de fertilización: 80-60-0

A la siembra: 60-60-0

Al macollaje: 20-0-0

c. Fertilizantes utilizados: Fosfato Diamónico + Urea agrícola.

Cuadro 4 Ensayos de Rendimiento instalados en el Valle del Mantaro 1997-1998

Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4
DH2194-001	DH3545-024	DH3545-047	DH3545-070
DH2194-002	DH3545-025	DH3545-048	DH3545-071
DH2194-003	DH3545-026	DH3545-049	DH3545-072
DH2194-004	DH3545-027	DH3545-050	DH3545-073
DH2194-005	DH3545-028	DH3545-051	DH3545-074
DH2194-006	DH3545-029	DH3545-052	MDH3545-075
DH2194-007	DH3545-030	DH3545-053	MDH3545-076
DH2194-008	DH3545-031	MDH3545-054	MDH3545-077
DH2194-009	DH3545-032	MDH3545-055	MDH3545-078
DH2194-010	DH3545-033	MDH3545-056	MDH3545-079
MDH2194-011	DH3545-034	MDH3545-057	MDH3545-080
MDH2194-012	DH3545-035	MDH3545-058	MDH3545-081
MDH2194-013	MDH3545-036	MDH3545-059	MDH3545-082
MDH2194-014	MDH3545-037	MDH3545-060	MDH2194-083
MDH2194-015	MDH3545-038	MDH3545-061	MDH2194-084
MDH2194-016	MDH3545-039	MDH3545-062	MDH2194-085
MDH2194-017	MDH3545-040	MDH3545-063	MDH2194-086
MDH2194-018	MDH3545-041	MDH3545-064	MDH3545-087
MDH2194-019	MDH3545-042	MDH3545-065	MDH3545-088
MDH2194-020	MDH3545-043	MDH3545-066	MDH3545-089
MDH2194-021	MDH3545-044	MDH3545-067	MDH3545-090
MDH2194-022	MDH3545-045	MDH3545-068	MDH3545-091
MDH2194-023	MDH3545-046	MDH3545-069	MDH3545-092
Línea 2194-Testigo1	Línea 2194-Testigo1	Línea 2194-Testigo1	Línea 2194-Testigo1
Línea 3545-Testigo2	Línea 3545-Testigo2	Línea 3545-Testigo2	Línea 3545-Testigo2

DH = Líneas Dobles Haploides

MDH = Líneas Mutantes Dobles Haploides

d. Modalidad de siembra: A surco corrido colocando la semilla al fondo del surco, luego de haberse colocado el fertilizante.

3.6.2. Evaluaciones.

Fase de laboratorio. En esta etapa se realizaron las siguientes evaluaciones:

1. Respuesta de las anteras. Se estima entre 20000 a 30000 microsporas por antera, y cada microspora es capaz de regenerar una planta; sin embargo, es dificultoso determinar el número exacto de microsporas que se está introduciendo al medio de cultivo. Esto conduce a que se evalúe la respuesta de las anteras, realizando el conteo de anteras que han formado al menos un callo o embrión, transformando luego estos datos a porcentaje.

$$\% \text{ de respuesta de las anteras} = \frac{\text{Número de anteras con al menos un callo o embrión}}{\text{Número total de anteras introducidas al medio de cultivo}} \times 100$$

2. Inducción de callos o embriones, determinado en base al número de callos o embriones inducidos en medio de cultivo durante el periodo de incubación de las anteras. En el conteo se tomó en cuenta todos los callos inducidos a los 35 días de iniciada la incubación de las anteras. El porcentaje se determinó en base al número de anteras en cultivo.

$$\% \text{ de callos o embriones} = \frac{\text{Número de callos o embriones formados}}{\text{Número total de anteras introducidas al medio de cultivo}} \times 100$$

3. Transferencia de callos o embriones a medio de regeneración, es el número de callos o embriones capaces de regenerar plantas y se consideran aquellos con 2 mm. o más de diámetro.

$$\% \text{ de transferencia} = \frac{\text{Número de callos o embriones transferidos}}{\text{Número de callos o embriones formados}} \times 100$$

4. Número de plantas regeneradas, se realizó el conteo de plantas albinas o verdes regeneradas por cada 100 anteras en medio de cultivo. Este dato es uno de los más importantes, pues va a determinar las respuestas de los genotipos al cultivo “*in vitro*” de anteras

$$\% \text{ de regeneración} = \frac{\text{Número de plantas regeneradas (verdes y albinas)}}{\text{Número total de anteras introducidas al medio de cultivo}} \times 100$$

5. Tasa de regeneración, determina el potencial de regeneración de plantas de los genotipos. Se obtiene dividiendo el número de plantas verdes regeneradas entre el número de callos o embriones transferidos.

$$\text{Tasa de regeneración} = \frac{\text{Número de plantas verdes}}{\text{Número de callos o embriones transferidos}} \times 100$$

Las características evaluadas en esta fase se analizaron en base a los promedios y tendencias obtenidas por cada tratamiento.

Fase de campo, Se tomaron en cuenta las siguientes características:

1. Días al espigado. Se tomó el número de días transcurridos desde la siembra de los ensayos de rendimiento hasta que el 50% de las plantas de cada parcela espigó.

2. Días a la maduración. Se tomó el número de días transcurridos desde la siembra hasta la maduración del grano determinado.

3. Número de granos por espiga, se tomó 20 espigas de cada parcela, se trilló y se obtuvo el promedio.
4. Peso de 1000 granos. Se contaron 1000 granos al azar de cada parcela cosechada y se pesaron.
5. Rendimiento por hectárea, se obtuvo pesando la cosecha de cada parcela (gr/parcela); luego se hizo la transformación a Kg/ha.

3.6.3. *Análisis estadístico.*

Todos los ensayos fueron analizados bajo el Diseño de Bloques Completo al Azar, con 25 entradas por tratamiento y tres repeticiones por cada uno. Así se tuvo el siguiente modelo aditivo lineal:

$$Y_{ij} = \mu + \beta_j + \tau_i + \epsilon_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = Observación realizada en la unidad experimental (parcela), del Genotipo i , en la Repetición j .

μ = Media general

β_j = Efecto del j -ésimo bloque o repetición.

τ_i = Efecto del i -ésimo Genotipo.

ϵ_{ij} = Efecto del error experimental

Además se consideró la descomposición de la suma de cuadrados de los tratamientos para apreciar las diferencias entre las líneas MDH y DH y las diferencias entre las líneas dentro de cada grupo de MDH y DH. El Análisis de variancia será como sigue:

Fuentes de variación	Grados de Libertad
Repeticiones	2
Genotipos	24
Dobles Haploides	22
DH	9
MDH	12
DH vs. MDH	1
Dobles Haploides vs. testigos	1
Error	48
Total	74

En los ensayos 2, 3 y 4 además del Análisis de Variancia individual, se realizó un Análisis de Variancia Combinado, considerando tratamientos comunes y no comunes, donde los tratamientos comunes fueron los dos testigos, mientras que los tratamientos no comunes fueron las Líneas MDH y DH con el siguiente Análisis de Variancia:

Fuentes de variación	Grados de Libertad
Experimentos	2
Repeticiones dentro de experimentos	6
Tratamientos (ajustados),	70
Interacción tratamientos comunes x experimentos	2
Error	144
Total	224

4. Resultados

4.1. Fase de laboratorio,

Las evaluaciones realizadas durante el desarrollo de las líneas haploides permitieron obtener información de la respuesta de las líneas avanzadas de cebada al cultivo de anteras “*in vitro*” y el efecto de los agentes mutagénicos (MNH y NaN_3).

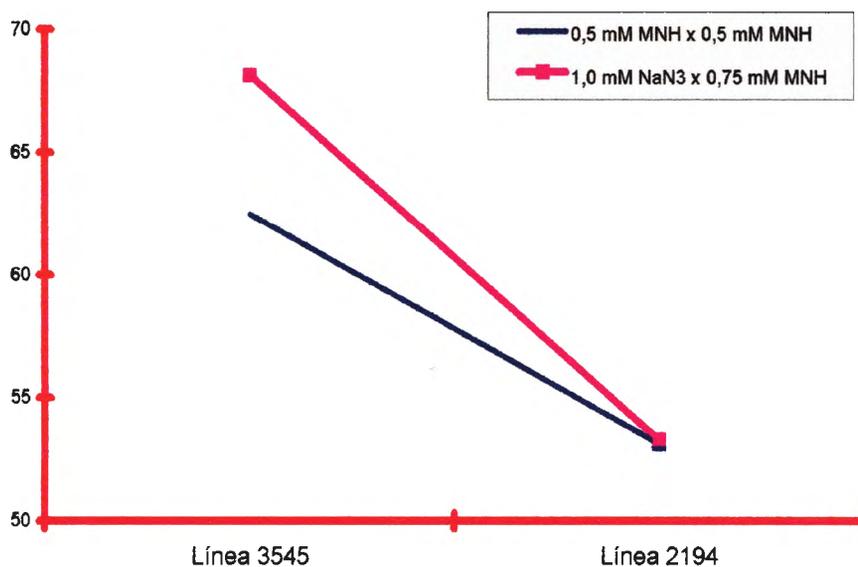
4.1.1. Respuesta de las anteras.

En el cuadro 6 y gráfico 2 se aprecia que la respuesta de las anteras al cultivo “*in vitro*” de las líneas 3545 y 2194 están afectadas por la interacción genotipo- mutagénico químico. La línea 3545 respondió incrementando la respuesta con ambos mutagénicos comparado con la línea 2194 y tendió a una mayor respuesta en el tratamiento con NaN_3 + MNH. La línea 2194 no tuvo diferencias en la respuesta de las anteras a los tratamientos mutagénicos utilizados. Los tratamientos mutagénicos mejoraron la respuesta de las anteras de la línea 3545 y disminuyeron en la Línea 2194.

Cuadro 6. Respuesta de las líneas 3545 y 2194 a la aplicación de MNH y NaN_3 . Porcentaje de respuesta de las anteras

	Línea 3545	Línea 2194	Promedio
0.5mM MNH x 0.5 mM MNH	62.67	53.15	57.81
1.0 mM NaN_3 x 0.75 mM MNH	68.13	53.31	60.72
Promedio	65.30	53.23	
Semillas sin tratar	59.13	74.19	

Gráfico 2. Respuesta de las líneas 3545 y 2194 a la aplicación de MNH y NaN₃.
Respuesta de las anteras



4.1.2. Inducción de callos o embriones

En el cuadro 7 y gráfico 3 se aprecia que el doble tratamiento con MNH incrementó el número de callos o embriones formados por cada 100 anteras en cultivo comparado al tratamiento con NaN₃ + MNH en ambas líneas. Por otro lado es notorio que la inducción de callos o embriones se vió afectada también por la interacción genotipo-mutagénico químico. De este modo se indujo mayor número de callos o embriones con los tratamientos mutagénicos en la línea 3545 y disminuyó en la línea 2194.

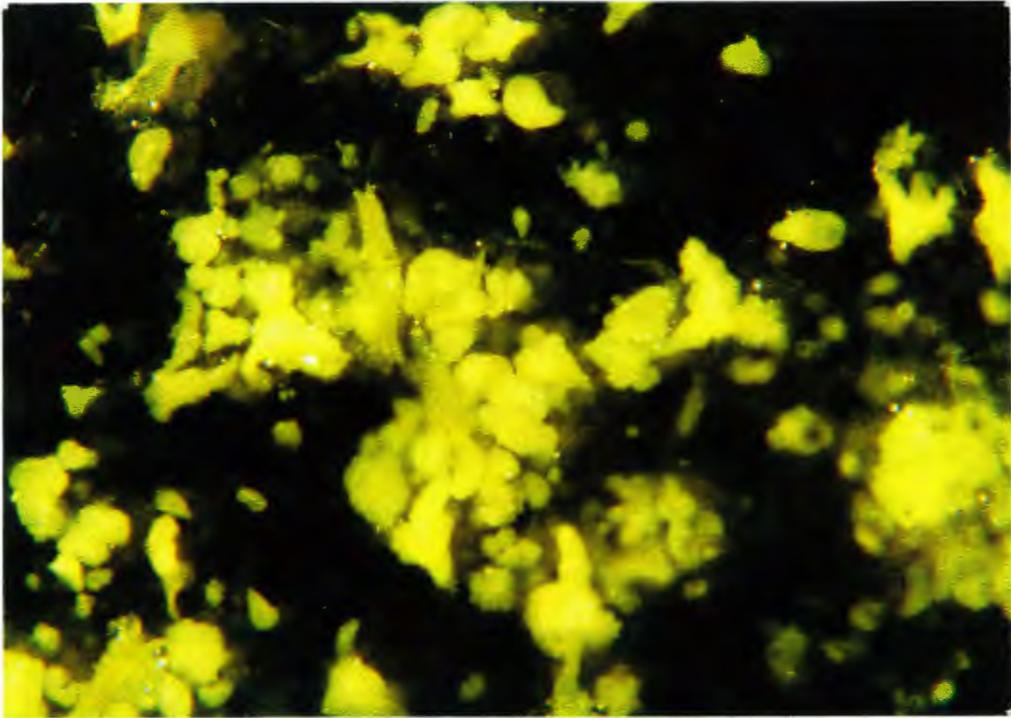


Foto 3. Respuesta de las anteras al cultivo "in vitro". Inducción de callos y embriones en medio de cultivo BAC-3

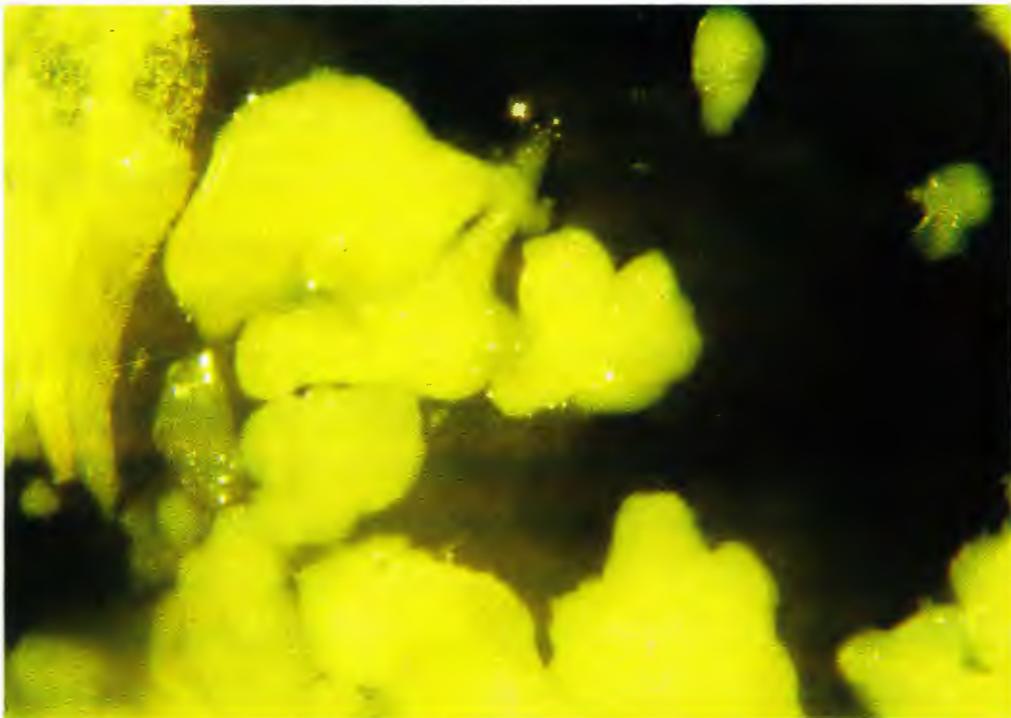
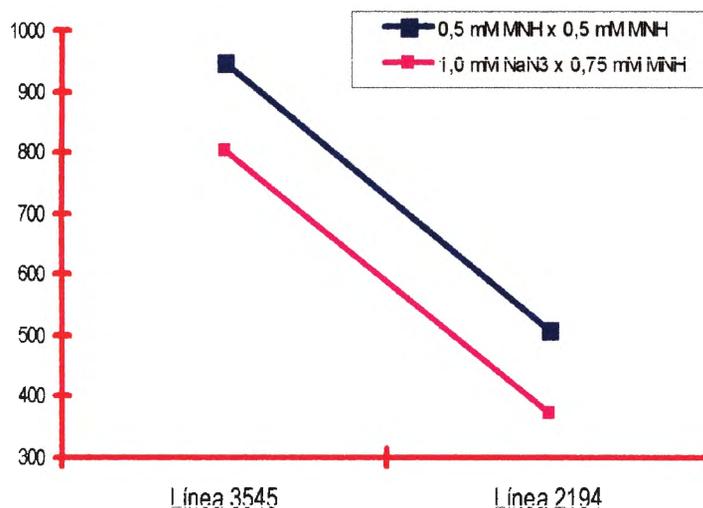


Foto 4. Callos y embriones en etapa de transferencia a medio de regeneración en medio de cultivo BAC-3

Cuadro 7. Respuesta de las líneas 3545 y 2194 a la aplicación de MNH y NaN_3 . Porcentaje de callos o embriones inducidos por cada 100 anteras en cultivo

	Línea 3545	Línea 2194	Promedio
0.5mM MNH x 0.5 mM MNH	947.24	509.31	728.28
1.0 mM NaN_3 x 0.75 mM MNH	803.93	374.00	588.97
Promedio	875.59	441.66	
Semillas sin tratar	707.93	673.35	

Gráfico 3. Respuesta de las líneas 3545 y 2194 a la aplicación de MNH y NaN_3 . Porcentaje de de callos o embriones inducidos



4.1.3. Callos o embriones transferidos a medio de regeneración

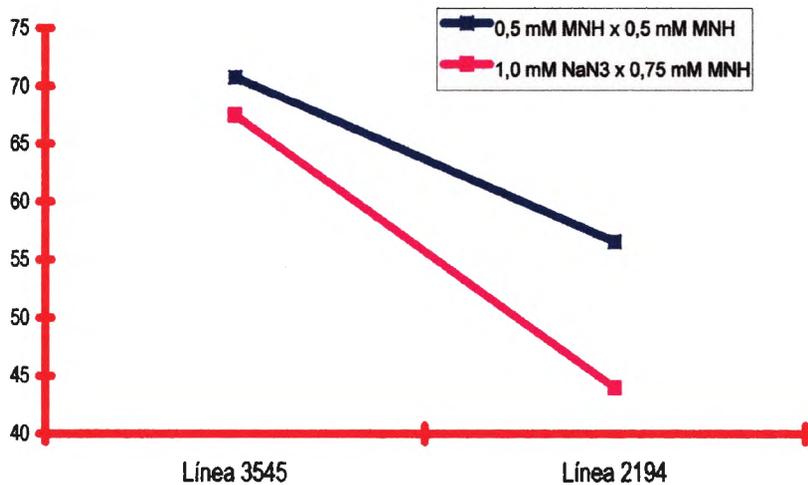
En el cuadro 8 y gráfico 4 se aprecia que la transferencia de callos o embriones a medio de regeneración se vió afectada por la interacción genotipo-mutagénico químico. En la línea 3545 con el tratamiento doble de MNH se incrementó ligeramente el número de callos o embriones transferidos y en la línea 2194 el incremento fue mayor

comparado al tratamiento de NaN_3 + MNH. En ambas líneas se transfirió menor número de callos o embriones en los tratamientos mutagénicos comparado a lo transferido cuando no se trató la semilla.

Cuadro 8. Respuesta de las líneas 3545 y 2194 a la aplicación de MNH y NaN_3 . Porcentaje de callos o embriones transferidos a medio de regeneración

	Línea 3545	Línea 2194	Promedio
0.5mM MNH x 0.5 mM MNH	70.76	56.54	63.65
1.0 mM NaN_3 x 0.75 mM MNH	67.47	44.00	55.74
Promedio	69.12	50.27	
Semillas sin tratar	75.40	61.49	

Gráfico 4. Respuesta de las líneas 3545 y 2194 a la aplicación de MNH y NaN_3 . Porcentaje de callos o embriones transferidos a medio de regeneración



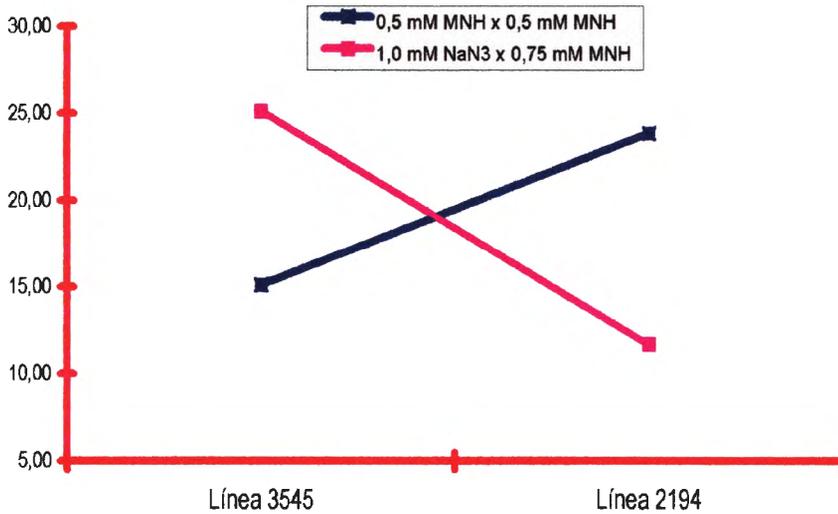
4.1.4. Número de plantas verdes por cada 100 anteras en medio de cultivo.

En el cuadro 9 y gráfico 5 se aprecia que la regeneración de plantas verdes por cada 100 anteras en cultivo se vió afectada por la interacción genotipo-mutagénico químico. El tratamiento doble de MNH incrementó la regeneración de plantas verdes en la línea 3545, y el tratamiento con NaN_3 + MNH en la línea 2194. El efecto del mutagénico fue notorio en la línea 3545 con la aplicación de NaN_3 + MNH, el porcentaje de regeneración de plantas verdes se duplicó comparado a la regeneración obtenida con las semillas sin tratar. Este mismo efecto reportaron Umba di Umba et al. (1993).

Cuadro 9. Respuesta de las líneas 3545 y 2194 a la aplicación de MNH y NaN_3 . Porcentaje de plantas verdes regeneradas por cada 100 anteras en cultivo.

	Línea 3545	Línea 2194	Promedio
0.5mM MNH x 0.5 mM MNH	15.10	23.83	19.47
1.0 mM NaN_3 x 0.75 mM MNH	25.10	11.67	18.39
Promedio	20.10	17.75	
Semillas sin tratar	12.23	18.03	

Gráfico 5. Respuesta de las líneas 3545 y 2194 a la aplicación de MNH y NaN_3 .
Número de plantas verdes por cada 100 anteras en cultivo.



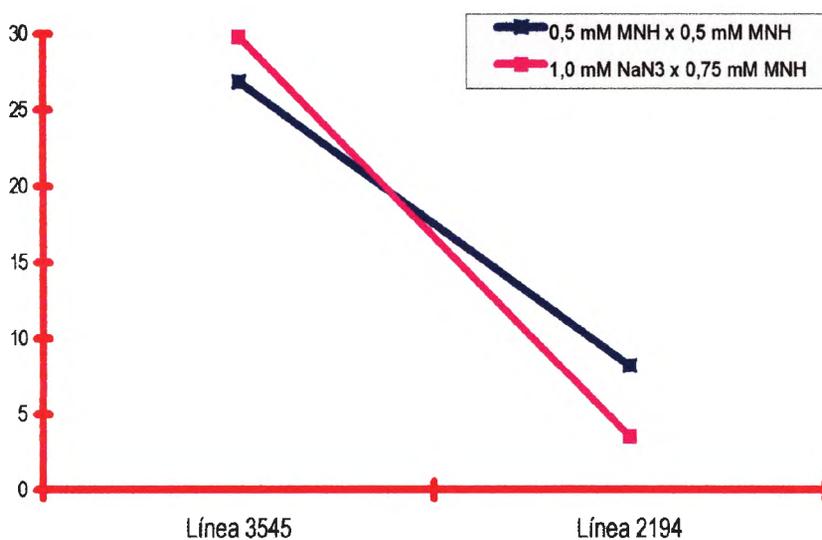
4.1.5. Número de plantas albinas regeneradas por cada 100 anteras en cultivo.

En el cuadro 10 y gráfico 6 se aprecia que el tratamiento con NaN_3 + MNH disminuyó la regeneración de plantas albinas por cada 100 anteras en cultivo de la línea 2194 y la aumentó en la línea 3545. El tratamiento doble con MNH por el contrario disminuyó la regeneración de plantas albinas de la línea 3545 e incrementó en la línea 2194. Por otro lado la regeneración de plantas albinas de la línea 2194 fue menor.

Cuadro 10. Respuesta de las líneas 3545 y 2194 a la aplicación de MNH y NaN_3 . Porcentaje de plantas albinas regeneradas por cada 100 anteras en cultivo.

	Línea 3545	Línea 2194	Promedio
0.5mM MNH x 0.5 mM MNH	26.86	8.21	17.54
1.0 mM NaN_3 x 0.75 mM MNH	29.78	3.54	16.66
Promedio	28.32	5.88	
Semillas sin tratar	32.67	8.24	

Gráfico 6. Respuesta de las líneas 3545 y 2194 a la aplicación de MNH y NaN_3 . Número de plantas albinas por cada 100 anteras en cultivo.



4.1.6. Tasa de regeneración de plantas verdes

En el cuadro 11 se aprecia en promedio de los tratamientos mutagénicos que de 100 plantas regeneradas 31 fueron plantas verdes de la línea 3545 y 75 plantas verdes de la línea 2194. Con el tratamiento mutagénico NaN_3 + MNH se incrementó la regeneración

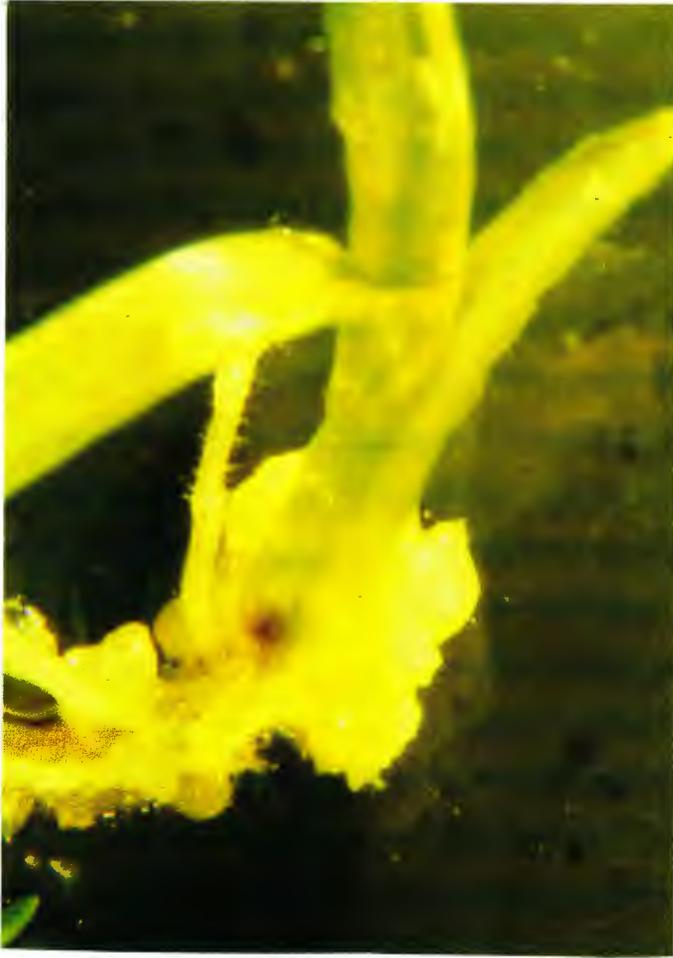


Foto 5.
Regeneración de plantas
Verdes en medio de cultivo
BAC-3



Foto 6. Acimatación de plantas verdes regeneradas en macetas

de plantas verdes de 27 a 46 plantas verdes por cada 100 regeneradas en la línea 3545 y de 68 a 74 plantas verdes en la línea 2194 en el tratamiento doble con MNH.

Cuadro 11. Respuesta de las líneas 3545 y 2194 a la aplicación de MNH y NaN_3 . Tasa de regeneración de plantas verdes

	Línea 3545			Línea 2194		
	verdes	albinas	Total	verdes	albinas	Total
0.5mM MNH x 0.5 mM MNH	15.10	26.86	41.96	23.83	8.21	32.04
1.0 mM NaN_3 x 0.75 mM MNH	25.10	29.78	54.88	11.67	3.54	15.21
Promedio	20.10	28.32	63.42	17.75	5.88	23.63
Semillas sin tratar	12.23	32.67	44.90	18.03	8.24	26.27

En el cuadro 12 se muestra el resumen de los resultados obtenidos de la evaluación de la respuesta de las líneas 3545 y 2194 a la aplicación de NaN_3 y MNH, en el cultivo “*in vitro*” de anteras.

Cuadro 12. Respuesta de la línea 3545 y línea 2194 al cultivo de anteras “*in vitro*”.

Genotipo	Tratamiento mutagénico	Respuesta de las anteras %	Callos o embriones inducidos %	Número de callos o embriones transferidos %	Número de plantas albinas por cada 100 anteras %	Número de plantas verdes por cada 100 anteras %
Línea 3545	Testigo	59.13	707.93	75.40	32.67	12.23
	0.5mM MNH x 0.5 mM MNH	62.47	947.24	70.76	26.86	15.10
	1.0 mM NaN_3 x 0.75 mM MNH	68.13	803.93	67.47	29.78	25.10
Línea 2194	Testigo	74.18	673.35	61.49	8.24	18.03
	0.5mM MNH x 0.5 mM MNH	53.15	509.31	56.54	8.21	23.83
	1.0 mM NaN_3 x 0.75 mM MNH	53.31	374.00	44.00	3.54	11.67

4.2. Fase de Campo

Esta fase permitió evaluar el valor agronómico de las líneas mutantes dobles haploides y las diferencias entre ellas especialmente en caracteres agronómicos importantes.

4.2.1. Comportamiento de las líneas mutantes dobles haploides de la línea 2194.

En el cuadro 13 se aprecian los Cuadrados Medios (CM) del análisis de variancia realizado en el primer ensayo donde se incluyeron 10 líneas dobles haploides, 13 líneas mutantes dobles haploides y 2 líneas testigo (Línea 2194 y Línea 3545). El análisis estadístico muestra diferencias significativas entre genotipos, en el peso de 1000 granos y rendimiento; entre las líneas dobles haploides (DH), para días al espigado y peso de 1000 granos; entre líneas MDH en el peso de 1000 granos y rendimiento y al comparar el grupo de líneas DH con las líneas MDH en el peso de 1000 granos.

Cuadro 13. Análisis de variancia de los Dobles Haploides de la línea 2194

Fuentes de Variación	Cuadrados Medios					
	Grados de Libertad	Días al espigado	Días a la maduración	# granos/ espiga	Peso 1000 granos	Rendimiento kg/ha.
Repeticiones	2	9.28	21.64	36.49	18.89 *	10010638.00 *
Genotipos	24	16.56	23.53	26.22	15.15 **	1279234.95 *
Dobles Haploides	22	16.93 *	25.47	26.95	16.51 **	1363871.75 *
DH	9	22.61 *	25.29	23.04	14.89 **	1128313.03
MDH	12	13.80	24.25	31.88	17.17 **	1567803.43 *
DH vs. MDH	1	3.30	43.83	3.03	23.28 *	1036810.30
DHs. Vs. Test.	1	20.98	0.06	4.26	0.16	336922.80
Error	48	9.32	21.46	21.86	5.29	679217.11
Total	74					

* Significación al 5 % de probabilidad

** Significación al 1 % de probabilidad

En el cuadro 14 se muestran los parámetros de variabilidad: S^2 y Coeficiente de Variabilidad (C.V.) y los valores máximo, mínimo y promedio de las variables agronómicas evaluadas de la línea 2194. No hubo diferencias en la variabilidad de los parámetros: días al espigado, días a la maduración del grano, número de granos por espiga y peso de 1000 granos, pero si fue notoria en el rendimiento. Por otro lado se aprecia mayor variabilidad entre las líneas MDH provenientes de la inducción de mutaciones.

Días al espigado.

En el cuadro 14 se aprecia que la variación entre las líneas DH (provenientes de variación somaclonal) fue ligeramente superior a la variación entre las líneas MDH. El rango de variación dentro de los genotipos obtenidos por variación somaclonal (DH) fue de 10 días. La línea DH2194-006, espigó a los 70 días y la línea DH2194-009 a los 60 días. Entre los genotipos mutantes dobles haploides (MDH) el rango fue de 8 días. La línea MDH2194-012 espigó a los 71 días y la línea MDH2194-014 a los 63 días. La línea testigo espigó a los 69 días.

Días a la maduración del grano.

En el mismo cuadro 14 se aprecia que las diferencias en la variabilidad entre las líneas DH y MDH es insignificante para este carácter. Dentro del grupo de genotipos DH el rango fue de 9 días. La líneas DH2194-001 y DH2194-006 maduraron a los 136 días y la línea DH2194-009 maduró a los 127 días. Dentro

de los genotipos MDH el rango de variación fue de 8 días, las líneas MDH2194-013 y MDH2194-016 maduraron a los 135 días y las líneas MDH2194-020 y MDH2194-022 maduraron a los 127 días. La línea testigo maduró a los 133 días.

Número de granos por espiga.

La variabilidad y el promedio de las líneas MDH fue ligeramente superior a la de las líneas DH. Dentro de los genotipos DH el rango de variación fue 8 granos. Las líneas DH2194-001 y DH2194-002 formaron 48 granos por espiga y la línea DH2194-006 formó 40 granos. Dentro de los genotipos MDH el rango fue 12 granos por espiga. La línea MDH2194-011 formó 52 granos y las líneas MDH2194-013 y MDH2194-017 40 granos. El testigo formó 47 granos (Cuadro 14).

Peso de 1000 granos

La variabilidad y el promedio de las líneas MDH son también ligeramente superior a la de las líneas DH. Dentro de los genotipos DH, 2 de las líneas superaron al testigo. El peso de 1000 granos de la línea DH2194-009 fue de 41.87 gramos y de la línea DH2194-005, 34.73 gramos mostrando un rango de 7.14 gramos. En el grupo de genotipos MDH, el peso de 1000 granos varió desde 34.40 gramos en la línea MDH2194-017 hasta 42.33 gramos en la línea MDH2194-021 alcanzando un rango de 7.93 gramos. En el testigo, 1000 granos pesaron 37.37 gramos (Cuadro 14).

Cuadro 14. Valores promedio, máximo y mínimo, variancia y coeficiente de variación de los caracteres agronómicos de los dobles haploides de la línea 2194.

	Días al espigado	Días a la maduración	No. granos por espiga	Peso de 1000 granos	Rendimiento (Kg/ha)
Líneas DH					
Valor Máx.	70	136	48	41.87	4427
Valor Mín.	60	127	40	34.73	2635
Promedio	67.47	133.30	44.80	37.03	3647.92
S ²	7.60	7.79	7.73	4.96	376104.38
C.V.	4.09 %	2.09 %	6.21 %	6.01 %	16.81 %
Líneas MDH					
Valor Máx.	71	135	52	42.33	4906
Valor Mín.	63	127	40	34.40	1969
Promedio	66.92	131.69	45.23	38.20	3400.64
S ²	4.91	7.23	11.36	5.73	696798.22
C.V.	3.31 %	2.04 %	7.45 %	6.27 %	24.55 %

DH: Dobles haploides provenientes de variación gametoclonal

MDH : Mutantes dobles haploides

Rendimiento en Kg/ha.

En el rendimiento la variabilidad existente entre las líneas MDH es muy superior a la de las líneas DH permitiendo afirmar que la variación inducida por los agentes mutagénicos utilizados en el experimento es mayor que la producida por la variación gametoclonal. El rango de variación fue de 1792 kg/ha. dentro de los genotipos DH. La línea DH2194-002 rindió 4427 kg/ha. de grano y la línea DH2194-004, 2635 kg/ha. Dentro de los genotipos MDH el rango de variación fue de 3037 kg/ha. . La

línea MDH2194-022 rindió 4906 kg/ha y la línea MDH2194-013, 1969 kg/ha. El testigo rindió 3510 kg/ha.. Se obtuvo mayor variación en el rendimiento con los tratamientos mutagénicos que con variación gametoclinal (Cuadro 14).

4.2.2. Comportamiento de las líneas mutantes dobles haploides de la línea 3545.

En el cuadro 15 se aprecian los resultados obtenidos luego de realizar el análisis de variancia combinado considerando tratamientos comunes: dos líneas testigo (Línea 3545 y Línea 2194) y no comunes: 24 Líneas dobles haploides (DH), 45 Líneas mutantes dobles haploides (MDH). Las 71 líneas evaluadas: 69 dobles haploides de la línea 3545 y los 2 testigos fueron distribuidas en tres experimentos: Ensayo 2 incluyó 12 líneas DH, 11 Líneas MDH y las dos líneas testigo mencionadas. Ensayo 3 con 7 líneas DH, 16 líneas MDH y dos líneas testigo y Ensayo 4 con 5 líneas DH, 18 líneas MDH y las dos líneas testigo. Las diferencias entre los genotipos fueron significativas en todos los caracteres agronómicos evaluados: días al espigado, días a la maduración del grano, número de granos por espiga, peso de 1000 granos y rendimiento en kg/ha.

Cuadro 15. Análisis de variancia combinado de experimentos con tratamientos comunes y no comunes de los dobles haploides de la línea 3545.

Fuentes de Variación	Cuadrados Medios					
	Grados de Libertad	Días al espigado	Días a la maduración	# granos/ espiga	Peso 1000 granos	Rendimiento kg/ha.
Experimentos	2	10.86	287.37 **	69.69 *	5.22	7878229.50 **
Repeticiones	6	23.02 **	57.37 **	25.69 *	16.75 *	1667362.50 **
Trat. (ajustados)	70	18.56 **	42.43 **	25.09 **	11.46 **	643554.33 **
Inter. Genotipo X Experimento.	2	22.72 *	9.72	20.97	1.99	135796.00
Error	144	5.99	8.10	12.21	5.89	345576.22
Total	224					

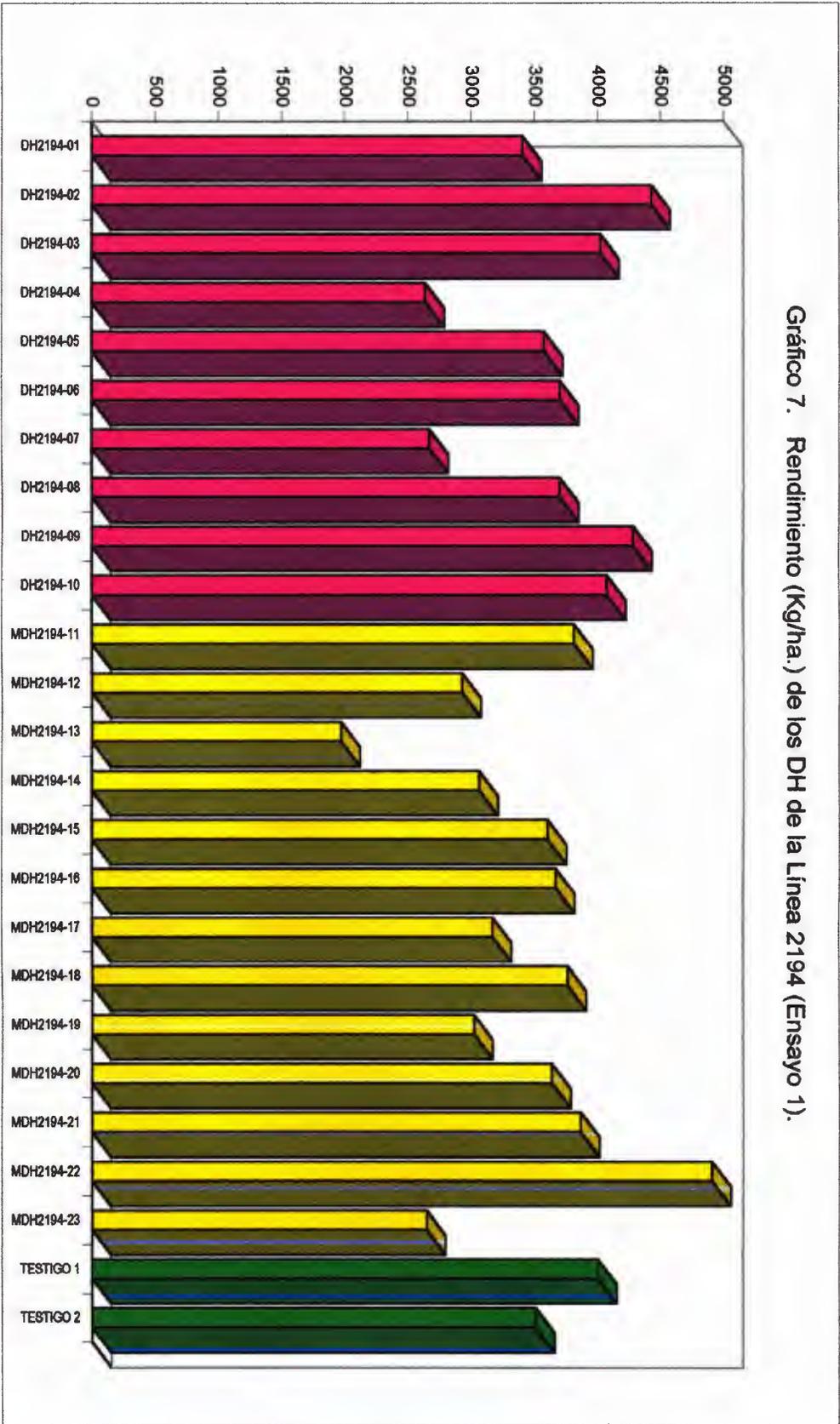
* Significación al 5 % de probabilidad

** Significación al 1 % de probabilidad

En el cuadro 16 se aprecian los promedios ajustados de los grupos de líneas DH, MDH y testigos. Los datos obtenidos en promedio de los días al espigado, días a la maduración del grano, número de granos por espiga y peso de 1000 granos no difieren significativamente en ambos grupos de líneas DH y MDH y rindieron menos que el testigo 2 (Línea 3545).

Cuadro 16. Promedios ajustados de los DH de la línea 3545

Grupo de líneas	No. de líneas	Días al espigado	Días a la maduración	No. de granos por espiga	Peso de 1000 granos	Rendimiento Kg/ha.
DH	24	64.55	124.88	47.68	41.86	3550.29
MDH	45	64.31	123.85	44.19	41.01	3655.54
T1-2194	1	68.67	131.33	48.98	41.83	3826.33
T2-3545	1	63.33	123.67	45.91	43.62	4017.33



En el análisis de variancia individual de los ensayos se aprecia diferencias en algunos de los caracteres evaluados. En el cuadro 17 se muestra el ANVA realizado en el ensayo 2 en donde se aprecian diferencias altamente significativas entre los genotipos en los días al espigado, días a la maduración del grano y número de granos por espiga. Hubo diferencias también entre las líneas DH y MDH en los días al espigado y días a la maduración del grano. Del mismo modo las diferencias fueron significativas al comparar las líneas DH vs. MDH en el número de días al espigado, número de granos por espiga y rendimiento en kg/ha y también al comparar los dobles haploides (DH + MDH) con los testigos. Los Dobles haploides difieren significativamente de los testigos en el número de granos por espiga y el peso de 1000 granos.

Cuadro 17 . Análisis de variancia de los Dobles Haploides de la línea 3545. Ensayo 2

Fuentes de Variación	Cuadrados Medios					
	Grados de Libertad	Días al espigado	Días a la maduración	# granos/ espiga	Peso 1000 granos	Rendimiento kg/ha.
Repeticiones	2	39.24 **	153.78 **	26.77	1.92	2070644.20 **
Genotipos	24	20.26 **	25.96 **	36.00 **	8.74	425890.75
Dobles Haploides	22	21.66 **	21.59 **	34.66 **	7.59	401163.92
DH	11	17.42 **	21.06 **	19.31	8.08	126130.36
MDH	10	23.95 **	23.56 **	19.34	7.75	126130.36
DH vs. MDH	1	45.25 **	7.71	356.58 **	0.65	5404500.00 **
Dob. Hap. vs. Tes.	1	8.28	43.87 *	101.41 **	33.68 *	871288.40
Error	48	4.25	7.70	12.83	5.04	363773.03
Total	74					

* Significación al 5 % de probabilidad

** Significación al 1 % de probabilidad

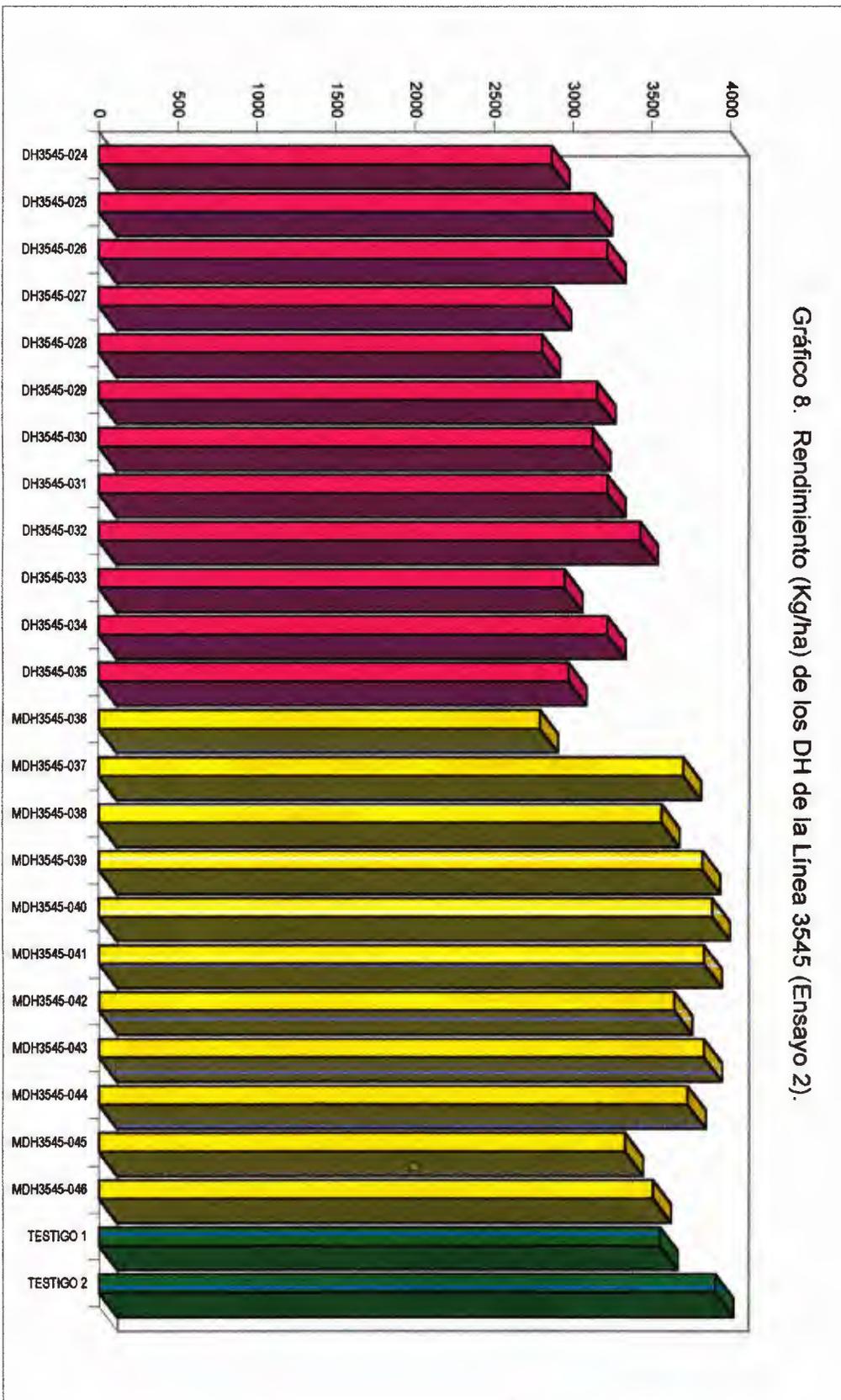


Gráfico 8. Rendimiento (Kg/ha) de los DH de la Línea 3545 (Ensayo 2).

En el cuadro 18 se muestra el ANVA del ensayo 3 donde se aprecian diferencias significativas entre los genotipos en los días al espigado y rendimiento. Hubieron diferencias altamente significativas entre las líneas MDH en rendimiento, al comparar las líneas DH vs. MDH en el número de días al espigado y del mismo modo al comparar las líneas dobles haploides (DH + MDH) con los testigos en los días al espigado y días a la maduración del grano.

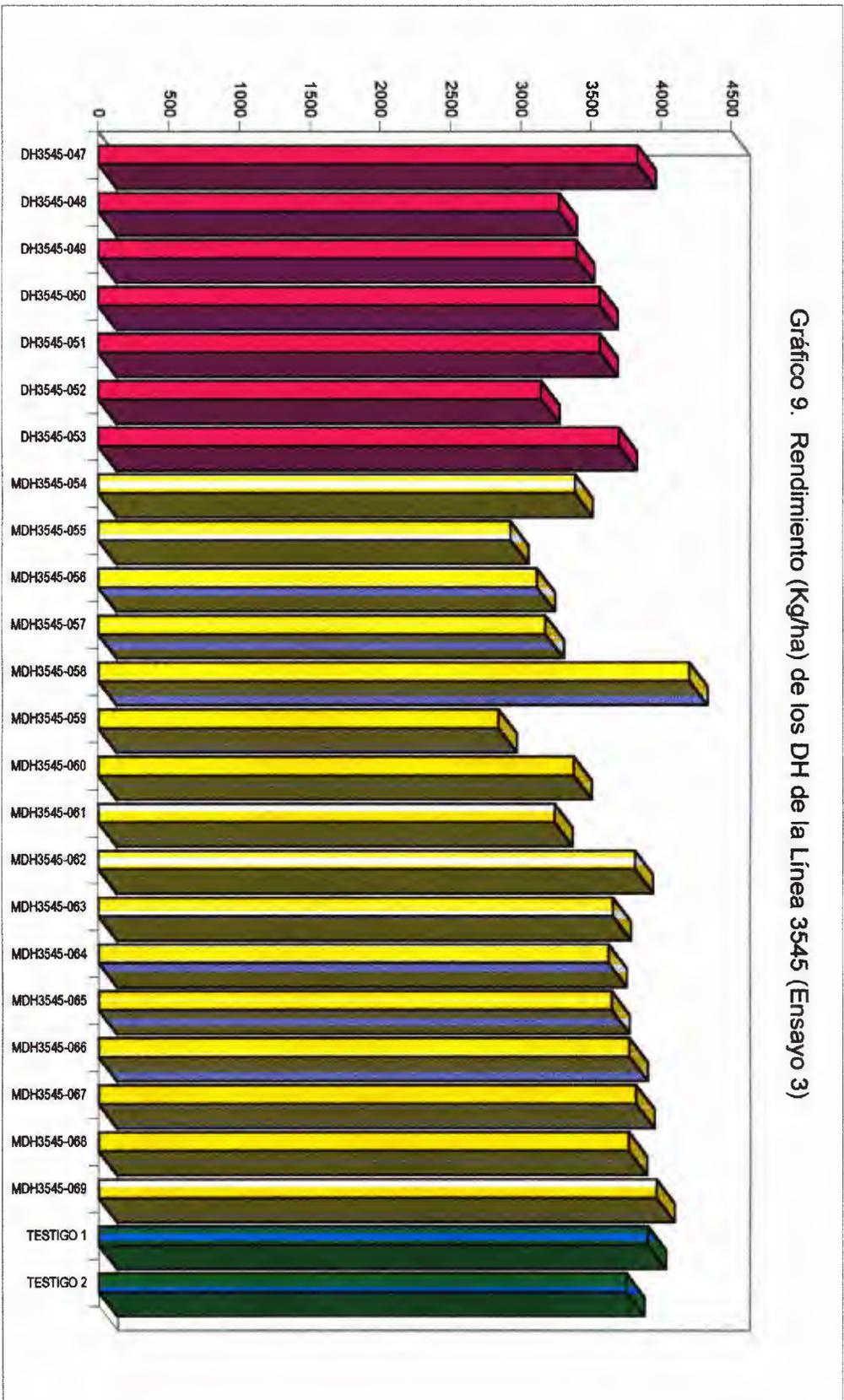
Cuadro 18. Análisis de variancia de los DH de la línea 3545. Ensayo 3

Fuentes de Variación	Cuadrados Medios					
	Grados de Libertad	Días al espigado	Días a la maduración	# granos/ espiga	Peso 1000 granos	Rendimiento kg/ha.
Repeticiones	2	4.18	16.00	12.69	6.85	524570.32 *
Genotipos	24	15.86 *	13.25	10.470	5.17	341137.15 *
Dobles haploides	22	13.72	11.31	10.94	5.20	344459.71 *
DH	11	5.60	7.54	16.90	7.07	173378.58
MDH	10	14.29	11.08	8.63	4.19	433420.67 **
DH vs. MDH	1	43.98 *	0.94	8.73	0.44	4.40
Dob. Hap. vs. Tes.	1	34.70 *	68.18 **	1.91	9.20	609173.70
Error	48	7.85	8.71	9.39	7.09	154724.39
Total	74					

* Significación al 5 % de probabilidad

** Significación al 1 % de probabilidad

En el cuadro 19 se muestran los cuadrados medios de las diferentes fuentes de variación obtenidos del ANVA del ensayo 4 donde se aprecian diferencias significativas entre los genotipos en los días al espigado, días a la maduración.



Cuadro 19. Análisis de variancia de los DH de la línea 3545. Ensayo 4

Fuentes de Variación	Cuadrados Medios					
	Grados de Libertad	Días al espigado	Días a la maduración	# granos/ espiga	Peso 1000 granos	Rendimiento kg/ha.
Repeticiones	2	25.66 *	2.34	37.62	41.47 **	2705004.41 **
Genotipos	24	19.98 **	59.72 **	24.01	19.52 **	454917.92
Dobles Haploides	22	19.40 **	54.15 **	25.46 *	19.97 **	425042.51
DH	11	23.23 **	79.17 **	21.53	30.96 **	489518.20
MDH	10	11.85 *	42.62 **	22.13	18.19 **	421304.18
DH vs. MDH	1	52.69 **	137.79 **	0.01	24.37 *	1247163.00
Dob. Hap. vs. Tes.	1	0.02	104.35 **	16.17	4.64	319932.00
Error	48	5.86	7.89	14.40	5.54	513937.31
Total	74					

* Significación al 5 % de probabilidad

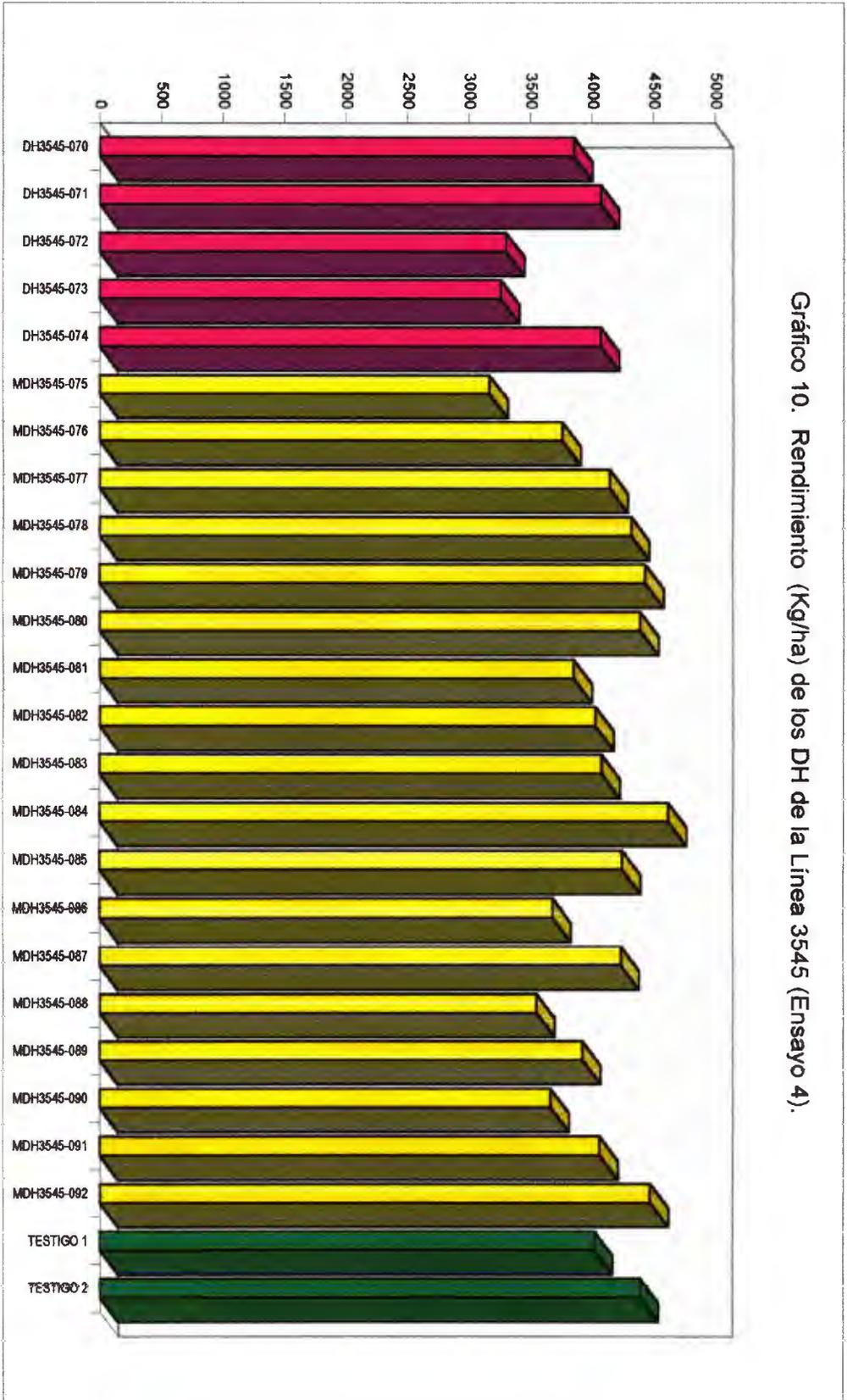
** Significación al 1 % de probabilidad

del grano y peso de 1000 granos, entre las líneas DH, MDH y al comparar ambos grupos de líneas (DH vs. MDH) en días al espigado, días a la maduración del grano y peso de 1000 granos y también al comparar los dobles haploides (DH + MDH) con los testigos en los días a la maduración del grano.

En el cuadro 20 se muestran los parámetros de variabilidad: S^2 y Coeficiente de Variabilidad (C.V.) y los valores máximo, mínimo y promedio de las variables agronómicas evaluadas de la línea 3545. Se encontró mayor variabilidad en los parámetros: número de granos por espiga y rendimiento. La mayor variabilidad encontrada fue en las líneas MDH provenientes de la inducción de mutaciones.

Días al espigado

La variabilidad en las líneas MDH fue ligeramente superior a la de las líneas DH mientras que el promedio fue menor. Dentro de



los grupos de genotipos DH, las líneas DH3545-071 y DH3545-072 espigaron más tardíamente, a los 68 días y la línea DH3545-075 espigó a los 58 días mostrando un rango de 10 días. Dentro de los genotipos MDH la línea MDH3545-039 espigó a los 69 días y la línea MDH3545-077 espigó a los 60 días con un rango de 9 días. El testigo espigó a los 63 días (Cuadro 20).

Días a la maduración del grano

Se aprecia variabilidad ligeramente superior entre las líneas MDH mientras que el promedio es algo menor. El rango de variación dentro de los genotipos DH fue de 10 días, la línea DH3545-035 maduró a los 130 días y la línea DH3545-053 maduró a los 120 días. Dentro de los genotipos MDH el rango de variación fue de 12 días, la línea MDH3545-043 fue la más tardía con 132 días y las líneas MDH3545-059, MDH3545-064, MDH3545-065, MDH3545-079, MDH3545-084, MDH3545-085, MDH3545-088, MDH3545-089, MDH3545-090, maduraron a los 120 días. El testigo maduró a los 123 días. Se observó una mayor variabilidad en los genotipos provenientes de inducción de mutaciones. La mayor parte de los genotipos maduró antes que el testigo (Cuadro 20).

Número de granos por espiga

La variabilidad y el promedio de las líneas DH provenientes de variación gametoclinal fue superior. El rango de variación dentro de las líneas DH de 14 granos, la línea DH3545-031 formó 54 granos, y la línea DH3545-074, formó 40 granos por

espiga. El rango de variación dentro de las líneas MDH fue de 11 granos, la línea MDH3545-092, formó 50 granos y la línea MDH3545-087 formó 39 granos por espiga. El testigo formó 46 granos por espiga (Cuadro 20).

Peso de 1000 granos

La variabilidad entre las líneas MDH fue ligeramente superior mientras que el promedio fue ligeramente menor. El rango de variación dentro de las líneas DH de 5.97 gramos, 1000 granos de la línea MDH3545-071 pesaron 44.48 gramos y de la línea MDH3545-025 pesaron 38.51 gramos. Dentro de las líneas MDH el rango de variación fue de 7.29 gramos, 1000 granos en la línea MDH3545-090 pesaron 44.72 gramos y en la línea MDH3545-077 pesaron 37.43 gramos. En el testigo 1000 granos pesaron 43.62 gramos. (Cuadro 20).

Rendimiento en grano (kg/ha.)

La variabilidad y el promedio de las líneas MDH fueron superiores a lo obtenido entre las líneas DH. Al igual que en la línea 2194, hubo mayor variación en la obtenida por inducción de mutaciones con los mutágenos utilizados que aquella obtenida por variación gametoclonal. El rango de variación dentro de las líneas DH fue de 1240 kg/ha., la línea DH3545-075 rindió 4365 kg/ha. y fue la única que superó el rendimiento del testigo y la línea DH3545-025 rindió solo 3125 kg/ha. Dentro de las líneas MDH el rango de variación fue de 1833 kg/ha., la línea MDH3545-085 rindió 4625 kg/ha. y la línea MDH3545-047



Foto 7.
Cosecha de las parcelas de los Ensayos de Rendimiento de las líneas Dobles Haploides en el Valle del Mantaro 97-98.



Foto 8. Ensayos de Rendimiento en la etapa de maduración del grano en el Valle del Mantaro 97-98

rindió 2792 kg/ha de grano; 9 líneas superaron el rendimiento del testigo. El testigo rindió 4017 kg/ha (Cuadro 20).

Cuadro 20. Valores promedio, máximo y mínimo, variancia y coeficiente de variación de los caracteres agronómicos de los dobles haploides de la línea 3545.

	Días al espigado	Días a maduración	No. granos por espiga	Peso de 1000 granos	Rendimiento (Kg/ha)
Líneas DH					
Valor Máx.	68	130	54	44.48	4365
Valor Mín.	58	120	40	38.51	3125
Promedio	65.55	124.88	47.68	41.86	3550.30
S ²	12.89	7.92	31.06	2.98	198447.94
C.V.	5.48 %	2.25 %	11.69 %	4.12 %	12.55 %
Líneas MDH					
Valor Máx.	69	132	50	44.72	4625
Valor Mín.	60	120	39	37.43	2792
Promedio	64.31	123.85	44.20	41.01	3655.54
S ²	16.28	13.95	13.96	3.89	555034.63
C.V.	6.27 %	3.02 %	8.45 %	4.81 %	20.38 %

DH: Dobles haploides provenientes de variación gametoclonal

MDH : Mutantes dobles haploides

5. *Discusión de Resultados*

La producción de líneas dobles haploides, a través del cultivo “*in vitro*” de anteras, en las condiciones de la investigación realizada resultó altamente dependiente del genotipo, reafirmando lo reportado por otros investigadores. (Grunewaldt and Malepzy, 1975 en cebada, Martin and Milo, 1981; Zapara et al.,1986; Data et al 1990, en arroz; Powell, 1990, etc.). La variable más importante y que determina la eficiencia en la respuesta al cultivo de anteras “*in vitro*”, es el porcentaje de plantas verdes regeneradas. La línea 2194 regeneró mayor porcentaje de plantas verdes que la línea 3545.

El medio ambiente en el cual se desarrollan las plantas donadoras de anteras es otro de los factores determinantes, en la producción de dobles haploides debido a que las variaciones en las condiciones medioambientales ocasionan desuniformidad en el desarrollo de las microsporas dentro de la antera. En las observaciones realizadas, en microscopio, se observaron microsporas en estados tempranos, (meiosis-tétrada, donde no se observa el núcleo); microsporas en estado óptimo (uninucleado) y en estado tardío, (binucleado). Las plantas donadoras de las líneas avanzadas (Línea 3545 y Línea 2194) crecieron en condiciones de campo. Olsen en 1987 reportó la regeneración de 464 plantas verdes por cada 100 anteras en cultivo y Hunter et al en 1988, reportó 600 plantas verdes regeneradas por cada 100 anteras en cultivo, las plantas donadoras de anteras crecieron bajo condiciones de invernadero.

Es importante añadir el efecto estimulante del agente mutagénico en la regeneración de plantas verdes en función con la dosis utilizada del mutagénico, el tratamiento mutagénico mismo (simple o doble) y el genotipo. El efecto del mutagénico químico ya fue reportado por Maluszynski y Adamska en 1976, ellos utilizaron MNH en semillas de *Nicotiana langsdorfii*, *N. tabacum* y *N. rustica*, Przewoszny et al. en 1980 también reportaron el efecto estimulante del mutagénico MNH aplicado a las inflorescencias de papa diploide antes de realizar el cultivo de anteras, Umba di Umba et al, en 1991 reportaron el efecto del MNH aplicado a las semillas de cebada que crecieron y donaron las anteras para el cultivo “*in vitro*”. La utilización de los agentes mutagénicos NaN_3 + MNH permitió incrementar significativamente la regeneración de plantas verdes de la línea 3545, se regeneraron 25 plantas verdes por cada 100 anteras mientras que 23 plantas verdes por cada 100 anteras fueron regeneradas con el tratamiento doble de MNH en la línea 2194. Es decir la eficiencia en la respuesta al cultivo de anteras “*in vitro*” de estas líneas avanzadas en las condiciones de este experimento dependió del genotipo, tratamiento mutagénico a las semillas y del uso combinado de los agentes mutagénicos utilizados.

El uso del tratamiento mutagénico doble a las semillas incluyendo al MNH y la Azida de Sodio fue recomendado por Maluszynska y Maluszynski en 1983. El doble tratamiento mutagénico induce una mayor frecuencia de mutaciones clorofílicas sin afectar la tasa de daño somático en comparación con el tratamiento mutagénico simple. Del mismo modo, a bajas dosis del doble tratamiento mutagénico se obtiene una alta frecuencia de mutaciones puntuales, comparado con el tratamiento

mutagénico simple debido a que altas concentraciones del mutágeno ocasionan una menor sobrevivencia de las plantas de la población M1.

El efecto estimulante de los agentes mutagénicos en el mayor número de plantas verdes regeneradas incrementa la producción de líneas dobles haploides. De este modo es posible superar el número mínimo de líneas dobles haploides posibles de seleccionar. Pickering and Devaux en 1992 y Alejar et al. en 1995 reportaron la selección de muchos cultivares de menos de 20 líneas dobles haploides producidas por cruce. Luego de evaluar las características de las Líneas DH producidas se las puede incluir en los programas de mejoramiento de la cebada.

La mayor respuesta de las anteras, no implicó una mayor inducción de callos o embriones y una mayor regeneración de plantas. En algunos casos se logró inducir una mayor cantidad de callos o embriones; sin embargo, no todos ellos lograron regenerar plantas verdes, es decir que no existió para las condiciones del experimento, relación entre la respuesta de las anteras, el número de callos inducidos y transferidos con el número de plantas verdes regeneradas.

El efecto de los agentes mutagénicos (inducción de mutaciones) y el “estres” del cultivo “*in vitro*” (variación gametoclinal), produjo variaciones en una serie de parámetros evaluados en campo. La variación gametoclinal probablemente se deba a que gran cantidad de callos se transfirieron al medio de regeneración después de los 40 días. La mayor parte de callos fueron transferidos después de los 70 días de permanencia en medio de inducción en que lograron el desarrollo mínimo para ser

transferido de 2mm. de diámetro (Cuadro 21). Alhoowalia, (1997) sostuvo que mientras mayor es el tiempo de permanencia en estado de callo, es mayor la posibilidad de encontrar variaciones somaclonales entre las plantas regeneradas.

Cuadro 21. Días a la transferencia de callos o embriones a medio de regeneración de las líneas 2194 y 3545 en el cultivo de anteras "in vitro".

Genotipo	Tratamiento mutagénico	Número de callos transferidos				
		30-40 días	41-50 días	51-60 días	61-70 días	+ 71 días
Línea 3545	Testigo	75	0	406	19	631
	0.5mM MNH x 0.5 mM MNH	0	61	263	0	879
	1.0 mM NaN ₃ x 0.75 mM MNH	0	299	29	0	685
Línea 2194	Testigo	115	27	313	0	592
	0.5mM MNH x 0.5 mM MNH	0	101	348	0	564
	1.0 mM NaN ₃ x 0.75 mM MNH	0	43	163	0	508

En los ensayos llevados a cabo en campo se pudo evaluar las diferencias entre las líneas dobles haploides producidas a través del cultivo de anteras "in vitro" y determinar las diferencias en la magnitud de la variabilidad producida por la inducción de mutaciones provocada por los tratamientos mutagénicos (NaN₃ y MNH) y la provocada por la variación gametoclinal. Considerando la importancia de la variabilidad en los programas de mejoramiento, ambas vías: tanto la inducción de mutaciones como la variación obtenida a través del cultivo "in vitro" (Variación gametoclinal) pueden utilizarse para generar mayor variabilidad. Los cambios ocasionados por la variación gametoclinal fueron reportados por Oono 1975, Walcasa 1982, Powell et al 1986, Bjornastad et al 1993. Estos cambios que fueron definidos como "variaciones gametoclonales" por Scowcraft and Larkin en 1981 se muestran principalmente en los caracteres cuantitativos y son positivos cuando nuestro objetivo es ampliar la variabilidad genética para utilizarla en el mejoramiento de una

variedad; sin embargo, por otro lado es negativo si el objetivo es la purificación de una variedad.

Para los caracteres evaluados en la línea 2194: días al espigado y días a la maduración hubo mayor variación en los genotipos provenientes de variación gametoclinal y para los caracteres: número de granos por espiga, peso de 1000 granos y rendimiento en grano la mayor variación estuvo en los genotipos provenientes de la inducción de mutaciones. En la línea 3545 hubo mayor variación en los genotipos provenientes de variación gametoclinal para los siguientes caracteres: Días al espigado y número de granos por espiga; mientras que para los demás caracteres evaluados: Días a la maduración del grano, altura de planta, peso de 1000 granos y rendimiento en grano la mayor variación estuvo en los genotipos provenientes de la inducción de mutaciones.

Es decir que la inducción de mutaciones ocasionó mayor variación en los componentes del rendimiento, en ambas líneas avanzadas. En la línea 2194, uno de los trece genotipos MDH superó en rendimiento de grano al testigo. La línea MDH2194-022 rindió 4906 kg/ha, es decir 40% más que el testigo. También uno de los diez genotipos DH provenientes de variación gametoclinal rindieron más que el testigo. La Línea DH2194-002 rindió 4427 kg/ha., es decir, 26% más que el testigo. En la línea 3545, dos genotipos DH de 24 provenientes de variación gametoclinal rindió más que el testigo superándolo en tan solo 8 %. Mientras que 9 de los 45 genotipos MDH rindieron más que el testigo. La línea MDH3545-085 rindió 4625 kg/ha., es decir 15 % más. La variabilidad reportada en los mutantes y gametoclones mayormente se refieren a modificaciones en

los caracteres cualitativos; sin embargo, también se reportó incrementos significativos en el rendimiento; en 1983 en Pakistán, el cultivar mutante de algodón 'NIAB 78' duplicó la producción de dicho país; en Checoslovaquia se liberó la variedad mutante de cebada 'Diamante' que superó en 12% al rendimiento de la variedad original. En la India se reportó dos somaclones de *Brassica*, BIO-902 y BIO-YSR de alto rendimiento de aceite.

Hay que anotar que no hubo incidencia de enfermedades de importancia económica que afectaron la producción del cultivo en el experimento. No se observó ataques de roya probablemente debido a que estas líneas (línea 2194 y línea 3545), son resistentes al patógeno *Puccinia hordei* y *Puccinia striiformis f.sp. hordei*, sin embargo es importante anotar también el incremento de las manchas foliares causadas principalmente por el patógeno *Drechslera sp.*

6. Conclusiones

Las conclusiones obtenidas del presente experimento son válidas bajo las condiciones del mismo. A continuación se presentan:

- 1.- Fue posible producir líneas DH de las líneas avanzadas de cebada 3545 y 2194 a partir del cultivo de anteras "*in vitro*".
- 2.- La línea 2194 tuvo mejor respuesta que la Línea 3545 en número de plantas verdes regeneradas por cada 100 anteras en cultivo. En la línea 2194 se regeneraron 18 % y en la línea 3545 se regeneraron 12 % plantas verdes.
- 3.- Se apreció alta dependencia del genotipo y gran influencia de las condiciones medioambientales en la respuesta al cultivo de anteras "*in vitro*".
- 4.- Los tratamientos mutagénicos a las semillas tuvieron efecto en la regeneración de plantas verdes en el cultivo de anteras "*in vitro*". El tratamiento doble con MNH incrementó en 30 % el número de plantas verdes regeneradas en la línea 2194; el incremento en la línea 3545 fue insignificante con el mismo tratamiento. El tratamiento doble de Azida de sodio más MNH duplicó el porcentaje de regeneración de plantas verdes en la línea 3545 (25 plantas verdes regeneradas por cada 100 anteras en cultivo); por el contrario, este porcentaje disminuyó en la línea 2194 con el mismo tratamiento. Es importante

añadir que el porcentaje de regeneración de plantas verdes dependió del genotipo y del tratamiento mutagénico.

- 5.- No hubo relación entre la respuesta de las anteras, callos inducidos, callos transferidos y plantas verdes regeneradas.
- 6.- La inducción de mutaciones produjo mayor variación en los caracteres que la variación gametoclonal. En el rendimiento fue más notoria dicha variación, y permitió obtener 3 líneas que superaron significativamente a los testigos (MDH2194-022, 4906 kg/ha; MDH3545-085, 4625 kg/ha; MDH3545-092, 4479 kg/ha.). Los testigos: la línea 2194 rindió 3510 kg/ha. y la línea 3545 rindió 4017 kg/ha.
- 7.- La reducción en el número de días a la maduración provocada tanto por la inducción de mutaciones como por la variación gametoclonal no fue significativa.
- 8.- La variación gametoclonal produjo mayor variación en el número de días al espigado y número de días a la maduración del grano en la línea 2194 y en el número de días al espigado y número de granos por espiga en la línea 3545.
- 9.- La inducción de mutaciones produjo mayor variación en el número de granos por espiga, peso de 1000 granos y rendimiento en grano en la línea 2194 y en el número de días a la maduración, peso de 1000 granos y rendimiento en grano en la línea 3545.

7. Recomendaciones

- 1.- Es recomendable para asegurar que existe estabilidad en el comportamiento de las líneas repetir los mismos ensayos en otras localidades y años con el objeto de tomar la decisión de liberar la nueva variedad.
- 2.- Es importante asimismo complementar el trabajo con el estudio minucioso de las características morfológicas de la planta y de la calidad del grano.
- 3.- La técnica de producción de DH a través del cultivo de anteras “*in vitro*” puede utilizarse junto con la inducción de mutaciones en el mejoramiento de la cebada con el objeto de fijar rápidamente los caracteres inducidos deseados para el mejoramiento de las variedades de cebada y abren la posibilidad para su adopción en los programas de mejoramiento de la cebada y de otros cereales de importancia.
- 4.- Tanto la inducción de mutaciones como la variación gametoclinal pueden utilizarse como vías para incrementar la variabilidad y utilizarla en los programas de mejoramiento de los cultivos.

8. Bibliografía

- Aldemita, R.R. & F.J. Zapata, 1991. Anther culture of rice: effects of radiation and media components on callus induction and plant regeneration. *Cereal Res. Commun.* 19(1-2): 9-32.
- Bjornstad, A. H. Skinnnes & K. Thoresen, 1993. Comparison between doubled haploid lines produced by anther culture, the *Hordeum bulbosum* method and lines produced by single seed descent in barley crosses. *Euphytica* 66: 135-144.
- Broertjies, C. and Van Harten, A.M. 1988. Applied Mutation Breeding for Vegetatively Propagated Crops. Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam-Oxford-New York-Tokyo. pp 3-13.
- Chen, Y., Sun, G., Zhang, Y. And Shang, Z. 1986. Breeding disease resistant new strains of wheat by using radiation and distant hybridization, In: Proc. International Symposium on Plant Breeding by Inducing Mutation and *in-vitro* Biotechniques, Beijing (China), 16-20 October 1985, pp 28-33.
- De Buyser, J., Y. Henry, P. Lonnet, R. Hertzog & A. Hespel, 1987. 'Florin': a doubled haploid wheat variety developed by the anther culture method. *Plant Breeding* 98: 53-56.
- Evans, D.A. & W.R. Sharp, 1983. Single gene mutations in tomato plants regenerated from tissue culture. *Science* 221: 949-951.
- FAO/IAEA. 1997. Mutant Varieties Database.
- Foroughi-Wher, B. and Mix, G. 1979. *In vitro* response of *Hordeum vulgare* L. anthers cultured from plants grown under different environments. *Environ. Exp. Bot.* 19:303-309.
- Guha, S. Maheshwari, S.C., 1966. Cell division and differentiation of embryos in pollen grains of *Datura in vitro*, *Nature (London)* 212, pp. 97-98.
- Guha, S. Maheshwari, S.C., 1967. Development of embryos from pollen grains of *Datura in vitro*, *Phytomorphology* 17, pp. 454-61.
- Hou, L., Ullrich, S.E., Kleinhofs, A. and Stiff, C.M. 1993. Improvement of anther culture methods for doubled haploid production in Barley Breeding. *Plant Cell Rep.* 12:334-338.
- Hu, H. and H.Y. Yang. 1986. Haploids of higher plants *in vitro*. China Academic Publishers Beijing. Springer-Verlag Berlin.
- Huang, and N., Sunderland, 1982.: Temperature-stress pre-treatment in barley anther culture. *Ann. Bot.* 49, 77-88.

- Huang, B., 1992. Genetic manipulation of microspores and microspore-derived embryos. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 28: 53-58.
- Hunter, C. P., 1987. Plant regeneration method. European Patent Appl. N° 0245898 A2: 1-8.
- Jensen, C. J. 1976. Barley monoploids and doubled monoploids: Techniques and experience. In Gaul, (Ed.), Barley Genetics III. Proc. 3rd. Int. Barley Genet. Symp. pp. 316-345.
- Kasha, K.J., A. Ziauddin, E. Simion & L. Cistue, 1993. Microspore cultures of barley and wheat: targets for change. P. 77-81. In Maluszynski & A. ashri (Eds). Report of the First FAO/IAEA Seminar on the Use of Induced mutations and Related Biotechnology for Crop Improvement for the Middle East and the Mediterranean Regions. IAEA, Vienna. Kinoshita, T., 1982. Inheritance of cytoplasmic male sterility induced by chemical mutagens in sugarbeet. Proc. Sugar Beet Res. Assoc. 38-45.
- Kasha, K. J. & K.N. Kao, 1970. High frequency haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.) Nature 225:874-876.
- King, G.S., 1949. Direct and transmitted X-ray effect on growth of tobacco callus *in vitro*. Am. J. Bot. 36: 265-270.
- Kleinhofs, A., Sander, C., Nilan, R.A., Konzak, C.F., 1974. "Azide mutagenicity-mechanism and nature of mutant produced", Polyploidy and Induced Mutations in Plant Breeding (Proc. Meeting Bari, 1972), IAEA, Vienna, pp. 195-99.
- Konzak, C.F., Nilan, R.A., Wagner, J. and Foster, R.J., 1965. Efficient chemical mutagenesis, in: The Use of Induced Mutations in Plant Breeding, (Report of the FAO/IAEA Technical Meeting. Rome 1964), Oxford. Pergamon Press, pp 49-70.
- Laib, A., I. Szarejko, K. Polok & M. Maluszynski, 1994. Barley anther culture for doubled haploid mutant production. MBNL 42 (in press).
- Larkin, P.J., and Scowcroft, W.R. 1981. Somaclonal variation-a novel source of variability from cell cultures for plant improvement Theor. Appl. Genet. 60: 197-214.
- Ling, D.X., D.J. Lockett & N.L. Darvey, 1991. Low-dose gamma irradiation promotes wheat anther culture response. Aust. J. Bot. 39: 467-474.
- Maheshwari, S.C., A. Rashid & A. K. Tyagi, 1983. Anther/pollen culture for production of haploids and their utility. Newsletter IAPTC 41:2-9.
- Maluszynska, J., and M. Maluszynski, 1983: MNUA and MH mutagenics effect after double treatment of barley seeds in different germination periods. Acta Biologica 11, 238-248.

- Maluszynski, M. & E. Adamska, 1976. Long term growth stimulation of *Nicotiana langdorffii* (Weinm.) plants induced by the action of MNH. (In Polish with English abstract). *Acta Biologica* 2: 48-53.
- Maluszynski, M., B. Alhoowalia & B., Sigurbjornsson, 1995. Application of *in vivo* and *in vitro* mutation techniques for crop improvement. *Euphytica* 00: 1-13.
- Maluszynski, M., E. Amano, B. Alhoowalia, L. van Zanten & B., Sigurbjornsson, 1994. Mutation techniques and related technologies for rice improvement. P. 294. In: *Seventh Meeting of the International Program on Rice Biotechnology, May 1994, Bali, The Rockefeller Foundation, New York.*
- Muller, H.J. 1927. Artificial transmutation of the gene, *Science* 66, pp. 84-87.
- NIAB, 1988. Successful application of nuclear techniques for improvement of cotton crop and role of NIAB-78 in cotton production. P. 1-16. In: *Nuclear Institute for Agriculture and Biology. Faisalabad.*
- Nilan, R.A., Kleinhofs, A.K., Sander, C.S. 1975. "Azide mutagenesis in Barley", *Proc. Int. Barley Genetics Symp.* (in press).
- Olsen, F.L., 1987. Induction of microspore organogenesis in cultured anthers of *Hordeum vulgare*. The effects of ammonium nitrate, glutamine and asparagine as nitrogen sources. *Carlsberg Res. Commun.* 52: 259-264.
- Oono, K. 1975. Production of haploid plants of rice (*Oryza sativa*) by anther culture and their use for breeding. *Bull. Natl. Inst. Agric. Sci.* 26: 139-222.
- Pickering, R.A., 1983. The influence of genotype on doubled haploid barley production (*Hordeum vulgare*, *Hordeum bulbosum*). *Euphytica* 32:863-876.
- Pickering, R.A. & P., Devaux. 1992. Haploid Production: Approaches and Use in Plant Breeding. 519-547.
- Powell, W. 1990. Environmental and genetical aspects of pollen embryogenesis. In: Bajaj, Y.P.S. (ed.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol.12. Haploids in Cereal Improvement.* 1. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, p.45-65.
- Roca, W. y Mroginski, L. 1993. Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali-Colombia. pp. 271-294
- Romero, M. y Gómez L. 1996. Cultivo de la Cebada en el Perú. Lima-Perú. pp. 37-41.
- Sax, K., 1963. The stimulation of plant growth by ionizing radiations, *Radiat. Bot.* 3, pp. 179-86.
- Skirvin, R.M., McPheeters, K.D. and Norton, M. 1994. Sources and frequency of somaclonal variation. *HortScience* 29: 1232-1237.

- Snape, J. W. 1989. Doubled haploid breeding: Theoretical basis and practical applications. In: Mujeeb-Kazi, A. & L.A. Sitch (Eds.) Review of Advances in Plant Biotechnology, 1985-88, pp. 19-30. CIMMYT, IRRI, México, Manila.
- Sorvari, S. & Schieder, O. (1987) Influence of sucrose and melibiose on barley anther cultures in starch media. *Plant Breeding* 99, 164-71.
- Stadler, L.J., 1928. Mutations in barley induced by X-rays and radium. *Science* 68:186-187.
- Stadler, L.J., 1930. Some genetic effects of X-rays in plant. *The Journal of Heredity*. 21:3-19.
- Szarejko, I. and Kasha, K.J. 1991. Induction of anther culture derived doubled haploids in barley. *Cereal Res. Comm.* 19:219-237.
- Szarejko, I., and K.J. Kasha, 1991: Induction of anther culture derived doubled haploids in barley. *Cereal Res. Commun.* 19, 219-237.
- Szarejko, I., M. Maluszynski, K. Polok & A. Kilian, 1991. Doubled haploids in the mutation breeding of selected crops. P. 355-378. In: *Plant Mutation breeding for Crop Improvement, Vol.2.* IAEA, Vienna.
- Umba, di-Umba, M. Maluszynski, I. Szarejko & J. Zbieszczyk, 1991. High frequency of barley DH-mutants from M1 after mutagenic treatment with MNH and sodium azide. *MBNL* 38: 8-9.
- Vagera, J. , F. J. Novak & B. Vyskot, 1976. Anther culture of *Nicotiana tabacum* L. mutants. *Theor. Appl. Genet.* 47:109-114.
- Zhang, Z.H. 1989. The practicability of anther culture breeding in rice. In: Mujeeb-Kazi, and L.A. Sitch, eds. Review of Advances in Plant Biotechnology, 1985-88. 2nd International symposium on genetic Manipulation in crops. Mexico, D.F. Mexico and Manila. Philippines: CIMMYT and IRRI.

Resumen

La técnica de producción de Dobles Haploides (DH), está siendo utilizada en muchas áreas del mejoramiento genético y la investigación. Esta técnica proporciona dos ventajas importantes, la reducción del tiempo en el proceso de desarrollo de una variedad mejorada y permite mejorar la eficiencia de la selección. La homocigosidad de los individuos heterocigotas que ocurre en la primera generación es la clave de la técnica. Otro sistema en donde los DH tienen gran utilidad son las mutaciones inducidas. A través del sistema de DH se puede fijar rápidamente la característica de los genotipos mutantes y seleccionar los mismos con mayor eficiencia. La combinación de ambas técnicas constituye un sistema importante para mejorar la eficiencia en el desarrollo de una variedad de cebada y otros cultivos. Los métodos de obtención de DH de cebada más utilizados son la androgenesis (cultivo "*in vitro*" de anteras o microsporas) y por cruces interespecíficas (método "bulbosum"). Los rayos gamma y los mutagénicos químicos son las fuentes de inducción de mutaciones más usadas. El trabajo realizado tuvo como objetivos: 1). Desarrollar Líneas Dobles Haploides de cebada a partir de poblaciones M1, empleando la técnica de cultivo de anteras "*in vitro*". 2). Evaluar el efecto de la aplicación de azida de sodio (NaN_3) y N-metil-N-nitroso Urea (MNH) en la producción de Líneas Dobles Haploides de cebada. y 3). Evaluar el comportamiento de las líneas Mutantes Dobles Haploides, en condiciones de campo. Se utilizaron 2 Líneas avanzadas de cebada: Línea 2194 y Línea 3545. Las semillas de estas líneas se trataron con dos mutagénicos químicos (NaN_3 y MNH) en tratamientos dobles (0.5 mM. MNH x 0.5

mM MNH y 1.0 mM. NaN_3 x 0.75 mM. MNH). El experimento fue dividido en dos partes:

1^{ra} Parte. Fase de Laboratorio.

Se tomaron las anteras de las plantas M1 y los testigos (sin tratamiento mutagénico) desarrollados en condiciones de campo y se cultivaron “ *in vitro* ” siguiendo el protocolo establecido para el cultivo de anteras de cebada. La respuesta al cultivo “ *in vitro* ” de anteras se evaluó a través del número de plantas verdes regeneradas por cada 100 anteras en medio de cultivo. La regeneración se incrementó 30 % con el tratamiento de 0.5 mM. MNH x 0.5 mM. MNH (23 %) comparado al testigo Línea 2194 (18 %) y se duplicó en el tratamiento con 1.0 mM. NaN_3 x 0.75 mM. MNH (25 %) comparado al testigo Línea 3545 (12 %).

2^{da} Parte. Fase de Campo, las líneas DH (Dobles Haploides) y MDH (Mutantes Dobles Haploides) producidas fueron cultivadas en el Valle del Mantaro 97-98 agrupándolas en 4 Ensayos de Rendimiento. En cada Ensayo de Rendimiento de 25 genotipos se incluyeron los testigos (Línea 2194 y Línea 3545) con 3 repeticiones. Se evaluó los días al espigado, días a la maduración del grano, número de granos por espiga, peso de 1000 granos y rendimiento en kg/ha. Se analizó estadísticamente cada ensayo utilizando el Diseño de Bloques Completo al Azar y en los ensayos 2, 3 y 4 (DH y MDH de la Línea 3545) se realizó el análisis Combinado con tratamientos comunes y no comunes. Se obtuvo diferencias significativas en el rendimiento entre los Dobles Haploides evaluados. El MDH2194-022 rindió 4906 kg/ha y superó al testigo Línea 2194 que rindió 3510 kg/ha., el MDH3545-085 y el MDH3545-092 rindieron 4625 kg/ha y 4479

kg/ha respectivamente superando el rendimiento de 4017 kg/ha del testigo Línea 3545 . La inducción de mutaciones produjo mayor variación en el rendimiento por hectárea en ambas líneas, comparada con la variación gametoclonal.

Ambas técnicas, la producción de Dobles Haploides a través del cultivo “*in vitro* ” de anteras de cebada y la inducción de mutaciones pueden utilizarse juntas en los programas de mejoramiento.

ANEXO

**Cuadro A1. Promedios de los caracteres evaluados
en los DH de la línea 2194 (ensayo 1)**

Línea	Días al espigado	Días a la maduración	No. de granos por espiga	Peso de 1000 granos	Rendimiento Kg/ha
DH2194-001	68	136	48	36,48	3406,25
DH2194-002	68	135	48	37,79	4427,08
DH2194-003	67	135	47	35,39	4020,83
DH2194-004	69	131	47	34,78	2635,42
DH2194-005	67	133	41	34,73	3572,92
DH2194-006	70	136	40	39,39	3697,92
DH2194-007	69	133	44	36,50	2666,67
DH2194-008	68	132	44	35,91	3697,92
DH2194-009	60	127	44	41,87	4281,25
DH2194-010	68	135	45	37,48	4072,92
MDH2194-011	64	133	52	35,55	3979,17
MDH2194-012	71	133	45	35,39	2927,08
MDH2194-013	67	135	40	37,68	1968,75
MDH2194-014	63	134	45	38,88	3062,50
MDH2194-015	67	130	42	38,58	3604,17
MDH2194-016	68	135	47	35,91	3666,67
MDH2194-017	68	133	40	34,40	3166,67
MDH2194-018	66	130	47	38,36	3760,42
MDH2194-019	68	132	43	38,87	3020,83
MDH2194-020	67	127	45	39,53	3635,42
MDH2194-021	68	130	47	42,33	3864,58
MDH2194-022	69	127	48	39,49	4906,25
MDH2194-023	64	133	47	41,72	2645,83
Testigo 1	70	132	42	37,68	4000,00
Testigo 2	68	133	47	37,37	3510,42

D.L.S (0,05, 48) 1,75 2,66 2,68 1,32 337,43

Testigo 1 = Línea 2194

Testigo 2 = Línea 3545

Cuadro A2. Medias ajustadas de los caracteres evaluados en los DH de la línea 3545 (ensayos 2,3 y 4)

Línea	Días al espigado	Días a la maduración	No. de granos por espiga	Peso de 1000 granos	Rendimiento Kg/ha
DH3545-024	68,67	126,34	50,69	39,58	3013,67
DH3545-025	68,67	126,34	51,95	40,92	3107,67
DH3545-026	63,67	126,34	51,17	41,86	3586,67
DH3545-027	68,67	128,34	48,75	40,90	3451,67
DH3545-028	67,67	125,34	49,30	42,70	3711,67
DH3545-029	69,67	126,34	54,29	43,56	3773,67
DH3545-030	63,67	126,34	58,35	41,64	3721,67
DH3545-031	62,67	124,34	51,77	42,73	3534,67
DH3545-032	64,67	124,34	53,59	42,57	3721,67
DH3545-033	66,67	126,34	52,42	45,54	3617,67
DH3545-034	68,67	131,34	53,45	43,87	3221,67
DH3545-035	66,67	129,34	53,34	39,93	3398,67
DH3545-047	65,67	124,67	45,44	41,95	3565,67
DH3545-048	62,67	121,67	41,12	41,34	3003,67
DH3545-049	65,67	122,67	48,27	44,47	3128,67
DH3545-050	63,67	121,67	43,82	42,26	3295,67
DH3545-051	62,67	121,67	43,99	41,71	3295,67
DH3545-052	63,67	119,67	45,39	41,25	2878,67
DH3545-053	63,67	121,67	42,04	39,30	3430,67
DH3545-070	64,67	126,67	42,47	43,02	4232,67
DH3545-071	64,67	126,67	44,29	38,59	4451,67
DH3545-072	58,67	121,67	39,49	42,93	3680,67
DH3545-073	58,67	122,67	36,29	42,84	3638,67
DH3545-074	54,67	124,67	42,71	39,21	4743,67
MDH3545-036	69,67	129,34	53,38	40,42	3034,67
MDH3545-037	69,67	133,34	47,47	40,25	3023,67
MDH3545-038	71,67	127,34	51,84	42,74	3107,67
MDH3545-039	70,67	129,34	48,92	42,35	2763,67
MDH3545-040	69,67	129,34	44,20	42,18	2690,67
MDH3545-041	70,67	124,34	46,47	39,32	2982,67
MDH3545-042	64,67	133,34	50,32	41,12	3315,67
MDH3545-043	65,67	124,34	45,45	42,46	2836,67
MDH3545-044	70,67	131,34	47,65	44,30	3107,67
MDH3545-045	65,67	127,34	48,67	42,94	2867,67
MDH3545-046	65,67	125,34	45,55	43,63	2680,67
MDH3545-054	64,67	122,67	44,61	41,18	3117,67

pasa a la siguiente página

Cuadro A3. Medias ajustadas de los caracteres evaluados en los DH de la línea 3545 (ensayos 2, 3 y 4)

Línea	Días al espigado	Días a la maduración	No. de granos por espiga	Peso de 1000 granos	Rendimiento Kg/ha
MDH3545-055	66,67	121,67	46,52	40,49	2659,67
MDH3545-056	68,67	124,67	43,06	42,17	2847,67
MDH3545-057	68,67	122,67	46,27	42,40	2909,67
MDH3545-058	65,67	119,67	43,54	43,54	3930,67
MDH3545-059	64,67	122,67	46,74	42,40	2576,67
MDH3545-060	67,67	121,67	47,57	40,41	3107,67
MDH3545-061	65,67	121,67	44,81	40,50	2972,67
MDH3545-062	66,67	121,67	43,32	40,94	3545,67
MDH3545-063	62,67	119,67	43,92	42,10	3388,67
MDH3545-064	67,67	119,67	44,06	40,43	3357,67
MDH3545-065	66,67	126,67	46,99	44,27	3378,67
MDH3545-066	62,67	121,67	47,12	42,63	3107,67
MDH3545-067	67,67	124,67	42,12	43,18	3555,67
MDH3545-068	61,67	121,67	43,71	42,24	3503,67
MDH3545-069	61,67	122,67	46,12	41,95	3701,67
MDH3545-075	61,67	126,67	41,49	40,27	4253,67
MDH3545-076	56,67	127,67	36,47	35,97	4347,67
MDH3545-077	60,67	122,67	40,01	41,34	4524,67
MDH3545-078	60,67	119,67	39,46	39,56	4701,67
MDH3545-079	60,67	121,67	40,96	38,56	4816,67
MDH3545-080	61,67	122,67	41,07	37,91	4774,67
MDH3545-081	63,67	122,67	41,49	40,03	4232,67
MDH3545-082	58,67	121,67	41,76	38,60	4409,67
MDH3545-083	58,67	119,67	39,49	41,14	4461,67
MDH3545-084	57,67	119,67	41,87	41,59	5003,67
MDH3545-085	60,67	126,67	44,29	42,67	4628,67
MDH3545-086	57,67	121,67	35,79	36,80	4066,67
MDH3545-087	63,67	119,67	45,29	40,31	4618,67
MDH3545-088	63,67	119,67	39,37	37,56	3930,67
MDH3545-089	58,67	119,67	40,09	43,26	4305,67
MDH3545-090	60,67	122,67	41,77	37,74	4045,67
MDH3545-091	60,67	122,67	40,82	39,18	4445,67
MDH3545-092	63,67	126,67	46,96	40,22	4857,67
Testigo 1	68,67	131,33	48,99	41,83	3826,00
Testigo 2	63,33	123,67	45,91	43,62	4017,00
D.L.S. (0,05, 144)	1,66	1,93	2,37	1,64	397,98

Testigo 1= Línea 2194

Testigo 2= Línea 3545