



TÓPICOS DE HERRAMIENTAS BIOTECNOLÓGICAS PARA EL DESARROLLO AGRÍCOLA

Topics of Biotechnological Tools for Agricultural Development



Tópicos de Herramientas Biotecnológicas para el Desarrollo Agrícola

Topics of Biotechnological Tools for Agricultural Development

EDITOR

José Juvencio Castañeda Nava

AUTORES

Janet María León Morales

Soledad García-Morales

Antonia Gutiérrez Mora

José Juvencio Castañeda-Nava

Prasad Rout Nutan

José Manuel Rodríguez Domínguez

Julio A. Massange Sánchez

Rodrigo Barba González

Jhony Navat Enriquez Vara

Gabriel Rincón Enríquez



AGRADECIMIENTOS

El libro “Tópicos de Herramientas Biotecnológicas para el Desarrollo Agrícola” fue apoyado por el programa 2020 Programa de Difusión y Divulgación de la Ciencia, Tecnología e Innovación (DyD) del Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología de Jalisco (COECYTJAL).

Agradecemos al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y al Laboratorio Nacional PlanTECC por el apoyo económico otorgado en el proyecto “Mantenimiento de la infraestructura del Laboratorio Nacional PlanTECC” con número 315918 en el año 2021.

“Tópicos de Herramientas Biotecnológicas para el Desarrollo Agrícola”

© Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C.

Av. Normalistas # 800

Col. Colinas de la Normal

C.P. 44270

Guadalajara, Jalisco, México.

www.ciatej.mx

Año de edición 2021

Primera edición impresa 2021

Número Internacional Normalizado del Libro impreso (ISBN): 978-607-8734-32-0

Número Internacional Normalizado del Libro digital (ISBN): 978-607-8734-35-1

Fotografía de la Portada: José Juvencio Castañeda-Nava

Diseño de portada: Karen Elizabeth Pérez Beltrán

Capítulo VIII

Herramientas Biotecnológicas para el Mejoramiento Genético de Plantas Ornamentales, con Énfasis en la Poliploidización

Biotechnological Tools for Genetic Improvement of Ornamental Plants with Emphasis on Polyploidization

Rodrigo Barba González^{1*}

¹ Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C. Camino Arenero 1227, El Bajío, Zapopan, Jalisco, México, CP 45019. * Autor correspondencia: rbarba@ciatej.mx

Introducción

El mejoramiento genético consiste básicamente en generar nuevas variedades, que sean más productivas y resistentes a factores bióticos, como hongos y bacterias que les causan enfermedades y a factores abióticos, como altas temperaturas o heladas. En el mejoramiento genético de plantas ornamentales no basta con generar variedades más productivas o resistentes, sino que es necesario desarrollar variedades nuevas y diferentes a las existentes. La industria de las plantas ornamentales se caracteriza por su gran diversidad. Actualmente hay más especies ornamentales cultivadas que todos los cultivos agrícolas y hortícolas combinados. Existe un continuo desarrollo de tecnologías para introducir versiones mejoradas de flores ya conocidas, así como nuevas especies desconocidas como ornamentales [1]. Por esta razón, cada vez se buscan y seleccionan más plantas nativas con características ornamentales adecuadas [2]. Para competir globalmente se requieren productos superiores, nuevas variedades o especies únicas.

Mejoramiento genético

Para iniciar un programa de mejoramiento genético es imprescindible conocer si se pretende iniciar el mejoramiento desde cero, es decir, con una especie silvestre o si se pretende mejorar un cultivar existente. El objetivo final de un programa de mejoramiento genético es alcanzar la introgresión del o los caracteres deseados en una nueva variedad o cultivar [3], lo cual consiste en mover los genes de una especie a otra (o de una variedad a otra) por un proceso de hibridación y retrocruzas posteriores. Existen tres factores básicos a considerar en un programa de mejoramiento genético, los cuales son: i) La base genética, ya que entre mayor sea el número de especies o cultivares, con características deseadas, mayor será la probabilidad de éxito al crear una nueva variedad. ii) La técnica o combinación de técnicas que se aplicarán para tener éxito (Figura 1). En este factor no existe una regla o una serie de técnicas o pasos que se deban aplicar para todas las especies, sino que se necesitarán aplicar dependiendo del éxito en cada uno de los pasos para lograr la introgresión. iii) La relación taxonómica de la especie silvestre seleccionada con el cultivo donde se debe expresar

Introduction

Genetic improvement consists of basically generating new varieties that are more productive and resistant to biotic factors, such as fungi and bacteria that cause them diseases and abiotic factors as high or freezing temperatures. In genetic improvement of ornamental plants, it is not only sufficient to generate more productive or resistant varieties but also develop new and different ones to those that already exist. The ornamental plant industry is characterized for its great diversity. Currently, more ornamental cultivated species exist than all agricultural and horticultural species combined. A continuous development of technologies exists to introduce improved versions of flowers already known, as well as new unknown ornamental species [1]. For this reason, more and more native plants with suitable ornamental characteristics are sought and selected [2]. To compete globally, superior products, new varieties or unique species are required.

Plant breeding

It is essential to know if the intention to start a breeding program is from zero, that is, with a wild species or improving an existing cultivar. The final objective of a breeding program is to reach introgression of the desired characteristics in a new variety or cultivar [3], which consists of moving the genes from one species to the other one (or from a variety to another one) through a hybridization process and subsequent backcrosses. Three basic factors should be considered in a genetic improvement program: (i) The genetic base, since the greater the number of species or cultivars with desired characteristics, the greater the probability of success in creating a new variety; (ii) The technique or combination of techniques that will be applied to be successful (Figure 1.) In this factor there is no rule or series of techniques or steps that must be applied for all species, but that will need to be applied depending on the success in each of the steps to achieve introgression; (iii) The taxonomic relationship of the selected wild species to the crop where the trait is to

el rasgo. La taxonomía tradicional agrupa diferentes especies en géneros, secciones y subsecciones basadas en caracteres morfológicos. Bajo este criterio, cuando la hibridación interespecífica es posible dentro de un grupo taxonómico específico, se podría esperar que las cruza que involucren especies relacionadas sean posibles. Sin embargo, esto no siempre es cierto para ciertas especies agrupadas (por taxonomía tradicional) en una sección o subsección determinada dentro de un género [4]. Los caracteres morfológicos no siempre son suficientes para determinar si las especies están estrechamente relacionadas o no. Hoy en día las técnicas moleculares permiten mejorar el establecimiento de relaciones taxonómicas entre diferentes especies. La consideración de la taxonomía tradicional, reforzada con evidencia molecular, podría dar una visión más clara de la relación taxonómica entre especies y contribuir a mejorar un programa de mejoramiento [4].

be expressed. Traditional taxonomy groups different species into genera, sections, and subsections based on morphological characters. Under this criterion, when interspecific hybridization is possible within a specific taxonomic group, crosses involving related species might be expected to be possible. However, this is not always true for certain species grouped (by traditional taxonomy) in a given section or subsection within a genus [4]. Morphological characters are not always sufficient to determine whether species are closely related or not. Nowadays, molecular techniques allow to improve the establishment of taxonomic relationships between different species. Consideration of traditional taxonomy, reinforced with molecular evidence, could give a clearer view of the taxonomic relationship between species and contribute to improve a breeding program [4].

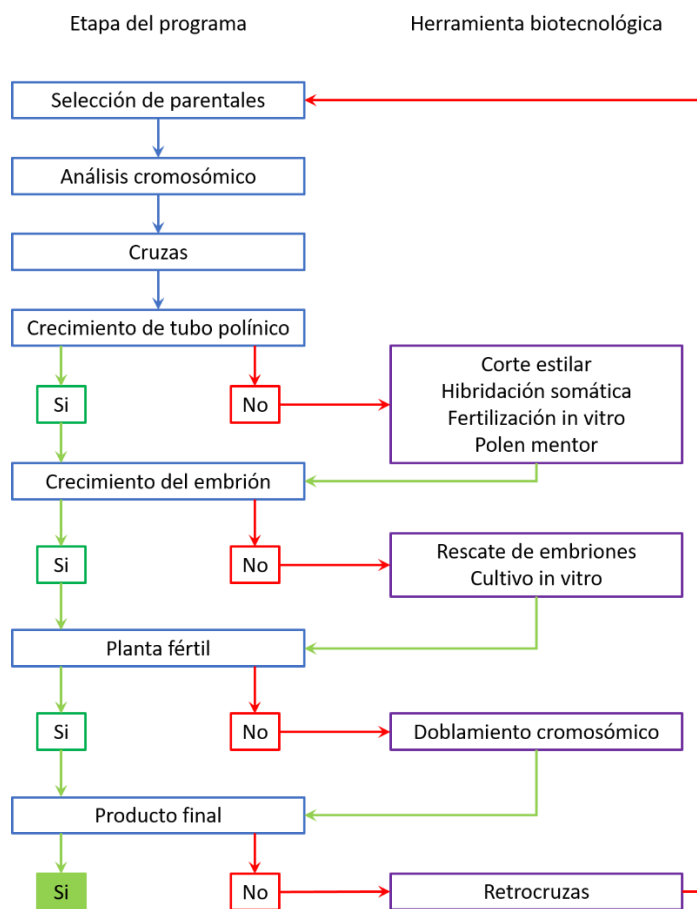


Figura 1. Representación esquemática simplificada de las diferentes etapas de un programa de mejoramiento genético vegetal y las herramientas biotecnológicas que pueden utilizarse para solventar los problemas que pudieran presentarse hasta lograr el producto final

Figure 1. Simplified schematic representation of the different stages of a plant breeding program and the biotechnological tools that can be used to solve the problems that may arise until the final product is obtained.

Hibridación

Un programa de mejoramiento genético es exitoso cuando en una cruce se logra la fecundación, el crecimiento y germinación del embrión y existe la capacidad de realizar cruces con la nueva planta. La reproducción sexual de las plantas depende de la interacción altamente específica entre el polen y el pistilo, el gametofito masculino y el órgano reproductor femenino, respectivamente [5]. Este proceso comienza cuando el grano de polen entra en contacto con el estigma y se hidrata. Después germina y emerge el tubo polínico que penetra intercelularmente a través de la matriz extracelular del tejido transmisor hasta que alcanza al ovario donde libera espermatozoides dentro del óvulo, para culminar con la germinación. Este proceso es muy complejo e implica muchas interacciones, incluido el reconocimiento de célula a célula, las señales intracelulares e intercelulares, así como otros factores [5].

De manera natural, existen diferentes mecanismos que previenen la hibridación interespecífica, los cuales se dividen en barreras pre- y post-fertilización [6]. Las barreras pre-fertilización, además del aislamiento geográfico son conocidas incongruencias e incompatibilidades que impiden la fertilización. La incompatibilidad se puede describir como un crecimiento deficiente del tubo polínico. Los granos de polen de especies incompatibles no son capaces de metabolizar ciertas sustancias presentes en el estigma, reduciendo sus propias reservas y provocando un crecimiento deficiente [7]. Las especies incompatibles se han dividido en dos grupos dependiendo de si las sustancias del grano de polen, responsables de la incompatibilidad, se forman antes o después de que se haya producido la meiosis. Si estas sustancias se forman en la célula madre del polen, se dice que la especie muestra una incompatibilidad determinada esporofíticamente. Si esas sustancias no se forman hasta después de la meiosis y, por tanto, se ha producido la segregación, se considera que presentan incompatibilidad determinada gametofíticamente. Existen variaciones en cada uno de estos sistemas, en particular con respecto al número de loci S y las relaciones de interacción entre los alelos [8]. La incongruencia se puede describir como resultado de la falta de información genética en uno de los padres para completar los procesos pre- y post-polinización en el otro [9].

Las barreras post-fertilización principalmente afectan el desarrollo del embrión [6]. Se han desarrollado muchas técnicas diferentes para superar las barreras previas a la fertilización, entre las que se incluyen: i) Corte estilar. El cual consiste en cortar el estilo de la flor y colocar el polen del progenitor paterno. [10]. ii) Extracción de estilo, donde se extrae el estilo, se frota con polen de otra especie y se reintroduce en el ovario [11]. iii) Polinización intraestilar. En esta técnica se utiliza un estilo de especie compatible como donante del pistilo y el estigma se poliniza con polen de otra especie [12,13]. iv) Polinización in vitro, que se puede dividir

Hybridization

A breeding program is successful when fertilization, embryo growth and germination are achieved in a cross and there is the ability to cross with the new plant. Sexual plant reproduction depends on highly specific interaction between pollen and pistil, the male gametophyte and the female reproductive organ, respectively [5]. This process begins when the pollen grain comes into contact with the stigma and hydrates. It then germinates and the pollen tube emerges and penetrates intercellularly through the extracellular matrix of the transmitter tissue until it reaches the ovary where it releases sperm into the ovule culminating in germination. This process is very complex and implies many interactions, including cell-to-cell recognition, intracellular and intercellular signaling, as well as other factors [5].

Naturally, there are different mechanisms that prevent interspecific hybridization, which are divided into pre- and post-fertilization barriers [6]. Pre-fertilization barriers, in addition to geographic isolation, are known incongruities and incompatibilities that prevent fertilization. Incompatibility can be described as poor pollen tube growth. Pollen grains of incompatible species are not able to metabolize certain substances present in the stigma, reducing their own reserves and causing poor growth [7]. Incompatible species have been divided into two groups depending on whether the substances in the pollen grain responsible for the incompatibility are formed before or after meiosis has occurred. If these substances are formed in the pollen mother cell, the species is said to show a sporophytically determined incompatibility. If these substances are not formed until after meiosis and segregation has therefore occurred, they are said to exhibit gametophytically determined incompatibility. There are variations in each of these systems, particularly with respect to the number of S loci and the interaction relationships between the alleles [8]. Incongruity can be described as a result of the lack of genetic information in one parent to complete the pre- and post-pollination processes in the other [9].

Post-fertilization barriers mainly affect embryo development [6]. Many different techniques have been developed to overcome pre-fertilization barriers, including: (i) Cut Style – this technique consists of cutting the style of the flower and placing the pollen from the paternal parent [10]; (ii) Stylar extraction – where the style is removed, rubbed with pollen from another species and reintroduced in the ovary [11]; (iii) Intrastylar pollination – this technique uses a style from a compatible species as pistil donor and the stigma is pollinated with the pollen of another species [12,13]; (iv) In vitro pollination, which can be divided

en: a) Polinización estigmática. Consiste en la polinización normal y el cultivo artificial sucesivo de todo el pistilo [14] y b) Polinización placentaria. Se hace un corte longitudinal en el ovario, exponiendo los óvulos, y luego se aplica polen [15]. Una vez que se logra la polinización, el embrión híbrido debe crecer. Debe haber un equilibrio para el intercambio de nutrientes entre el embrión y el endospermo. Si no se logra este equilibrio, el embrión es abortado en las primeras etapas de desarrollo o el endospermo se desintegra. Dependiendo de la etapa del aborto embrionario, se pueden aplicar diferentes técnicas in vitro para rescatar al embrión abortado [16]. Estas técnicas se han utilizado para generar varios híbridos interespecíficos: i) Corte de ovario. El ovario se secciona en rodajas, y estas se colocan in vitro, donde las semillas pueden crecer hasta que los embriones puedan ser disecados y cultivados [10,17,18]. ii) Cultivo de ovarios. Los ovarios se esterilizan en la superficie y los óvulos se cultivan in vitro hasta que los embriones se pueden extirpar o germinar [19]. iii) Rescate de embriones. Los embriones inmaduros se extraen de los óvulos y se colocan en un medio nutritivo hasta que germinan [10,19]. Este podría ser el método más eficaz para producir híbridos.

Una alternativa a la hibridación sexual es la hibridación somática ó fusión de protoplastos [20]. Puede considerarse como una técnica simple para la producción de híbridos interespecíficos, intergenéricos e incluso interfamiliares. Sin embargo, dado que implica la fusión de dos especies relacionadas lejanamente, no siempre resulta en la formación de plántulas. La hibridación somática es posible mediante el uso de fusión eléctrica o fusiones químicas, inducidas por: i) nitrato de sodio, ii) polietilenglicol (PEG), iii) pH alto, Ca + 2 alto o una combinación de ii y iii. [21,22]. Con estas técnicas, primero se ponen en contacto los protoplastos, después de lo cual se puede inducir a sus membranas plasmáticas a fusionarse para finalmente formar una sola célula [23]. Una de las principales ventajas de la hibridación somática es la producción de "cíbridos" que, a diferencia de los híbridos convencionales, los genes citoplasmáticos son de ambos padres.

Esterilidad de los híbridos

Una vez que se ha logrado obtener los híbridos interespecíficos puede surgir un nuevo problema, este es la esterilidad en los híbridos F¹. La principal causa de esta esterilidad es debida a un bajo apareamiento de cromosomas durante la meiosis [24,25,26], además de muchas otras anomalías, las cuales pueden ser letales, lo que dificulta la reproducción posterior de los híbridos, imposibilitando continuar con los trabajos de mejoramiento [27].

into: (a) Stigmatic pollination – it consists of normal pollination and successive artificial culture of the entire pistil [14] and (b) Placental pollination – a longitudinal cut is made in the ovary; ovules are exposed and then pollen is applied to the ovary [15].

Once pollination is achieved, the hybrid embryo must grow. There must be a balance for nutrient exchange between the embryo and the endosperm. If this balance is not achieved, the embryo is aborted in the early stages of development or the endosperm disintegrates. Depending on the stage of embryo abortion, different in vitro techniques can be applied to rescue the aborted embryo [16]. These techniques have been used to generate several interspecific hybrids: (i) Ovary slice – the ovary is sectioned in slices and these placed in vitro where the seeds can grow until the embryos can be dissected and cultured [10,17,18]; (ii) Ovule culture – ovaries are surface sterilized and the ovules are cultured in vitro until the embryos can be excised or germinated [19]; (iii) Embryo rescue – immature embryos are removed from the ovules and placed in a nutrient medium until they germinate [10,19]. This could be the most efficient method to produce hybrids.

An alternative to sexual hybridization is somatic hybridization or protoplast fusion [20]. It can be considered as a simple technique for the production of interspecific, intergeneric, and even interfamilial hybrids. However, since it implies the fusion of two distantly related species, it does not always result in the formation of seedlings. Somatic hybridization is possible by using electrical fusion or chemical fusions, induced by: (i) sodium nitrate; (ii) polyethylene glycol (PEG); (iii) high pH, high Ca + 2, or a combination of ii and iii. [21,22]. With these techniques, protoplasts are first brought into contact, after which their plasma membranes can be induced to fuse to finally form a single cell [23]. One of the main advantages of somatic hybridization is the production of "cybrids" which, unlike conventional hybrids, the cytoplasmic genes are from both parents.

Hybrid sterility

Once interspecific hybrids have been obtained, a new problem may arise, namely sterility in F¹ hybrids. The main cause of sterility is due to low chromosome pairing during meiosis [24,25,26] in addition to many other anomalies, which can be lethal, making it difficult to reproduce the hybrids later, making it impossible to continue with the breeding work [27].

Restauración de la fertilidad

La poliploidización mitótica, o doblamiento cromosómico es la técnica más utilizada para restaurar la fertilidad. En esta técnica se utilizan "venenos del huso acromático", ya que actúan inhibiendo la formación del huso durante la división celular [28]. Existen muchos venenos del huso, entre los que destacan: i) la colchicina, que se extrae de las semillas o granos de *Colchicum autumnale* L. (azafrán de pradera o azafrán de otoño). Actúa con la misma naturaleza que otros inhibidores del huso mitótico, una vez que entra en contacto con las células en división, inhibe la polimerización de los microtúbulos al unirse a la tubulina, lo que provoca una distribución desigual de los cromosomas que degenera en un cambio de la ploidía de las células hijas. Suele aplicarse en un rango de concentración de 1.25 a 2.5 mM [29]. ii) La orizalina, un herbicida de dinitroanilina, también se utiliza como agente anti-microtúbulos. La ventaja del uso de la orizalina, al uso de la colchicina, es que con la orizalina se utilizan concentraciones muy bajas ($1.0 \cdot 10^{-8}$ M) para reducir la tasa de migración de los cromosomas anafase. Mientras que concentraciones más altas ($1.0 \cdot 10^{-7}$ M) detienen completamente la migración cromosómica. A esta concentración, los microtúbulos se despolimerizan y previenen la polimerización de nuevos microtúbulos en todas las etapas del ciclo mitótico, sin afectar la condensación cromosómica [30]. La utilización de este veneno del huso para inducir tetraploides ha aumentado con los años, reemplazando el uso de colchicina. Y iii) El óxido nitroso, este es conocido como anestésico por inhalación, sin embargo, también se utiliza como agente poliploidizante como la colchicina y la orizalina. La diferencia más importante entre estos inhibidores del huso es que el óxido nitroso es un gas. Los primeros reportes de su acción como inhibidor del huso bajo presión se remontan a 1950 [31]. Los primeros poliploides y aneuploides con el uso de óxido nitroso se obtuvieron en *Crepis capillaris* [32] y se ha aplicado con éxito para producir poliploides en otras especies vegetales.

A pesar de que se restablece la fertilidad, estos métodos pueden definirse como un "callejón sin salida" para futuros programas de reproducción, porque no hay recombinación entre los genomas parentales debido al emparejamiento autosindético de los cromosomas, es decir, al duplicar los cromosomas en una célula, existen ahora dos juegos cromosómicos provenientes de la madre del híbrido y dos juegos cromosómicos del padre del híbrido, y durante la meiosis, los cromosomas maternos se aparean con los maternos y así los paternos. Por esta razón, los híbridos de cromosomas duplicados se denominan "híbridos permanentes" y ofrecen pocas posibilidades de crear variación genética [33]. Dejando a un lado la carencia de variabilidad genética, los poliploides en general tienen otras

Restoring fertility

Mitotic polyploidization, or chromosome doubling, is the most commonly used technique to restore fertility. In this technique, "achromatic spindle poisons" are used, as they act by inhibiting spindle formation during cell division [28]. There are many spindle poisons, including: i) colchicine, which is extracted from the seeds or grains of *Colchicum autumnale* L. (meadow saffron or autumn saffron). It acts in the same nature as other mitotic spindle inhibitors, once it comes into contact with dividing cells, it inhibits the polymerization of microtubules by binding to tubulin, resulting in an uneven distribution of chromosomes that degenerates into a change in the ploidy of daughter cells. It is usually applied in a concentration range of 1.25 to 2.5 mM [29]. ii) Oryzalin, a dinitroaniline herbicide, is also used as an anti-microtubule agent. The advantage of using oryzalin, to the use of colchicine, is that with oryzalin, very low concentrations ($1.0 \cdot 10^{-8}$ M) are used to reduce the rate of anaphase chromosome migration. Whereas higher concentrations ($1.0 \cdot 10^{-7}$ M) completely stop chromosome migration. At this concentration, microtubules depolymerize and prevent the polymerization of new microtubules at all stages of the mitotic cycle, without affecting chromosome condensation [30]. The use of this spindle poison to induce tetraploids has increased over the years, replacing the use of colchicine. And iii) Nitrous oxide, this is known as an inhalation anesthetic, however, it is also used as a polyploidizing agent like colchicine and oryzalin. The most important difference between these spindle inhibitors is that nitrous oxide is a gas. The first reports of its action as a spindle inhibitor under pressure date back to 1950 [31]. The first polyploids and aneuploids with the use of nitrous oxide were obtained in *Crepis capillaris* [32] and has been successfully applied to produce polyploids in other plant species.

Although fertility is restored, these methods can be defined as a "dead end" for future breeding programs because there is no recombination between the parental genomes due to autosynthetic pairing of chromosomes, i.e., by duplicating chromosomes in a cell, there are now two sets of chromosomes from the maternal parent of the hybrid and two sets of chromosomes from the paternal parent of the hybrid, and during meiosis, the maternal chromosomes pair with the maternal and thus the paternal chromosomes. For this reason, hybrids with duplicated chromosomes are called "permanent hybrids" and offer little chance of creating genetic variation [33]. Leaving aside the lack of genetic variability, polyploids in general have other advantages over their diploid counterpart, since:

- a) The increase in the number of alleles of a given

ventajas sobre su contraparte diploide, ya que: a) El aumento en el número de alelos de un gen dado en un poliploide debería permitir el enmascaramiento de mutaciones recesivas dañinas [34]. b) Respecto a alopoliploides y autopoliploides heterocigotos; La heterosis permite que la descendencia muestre un comportamiento transgresor en comparación con la especie parental [35]. A diferencia de los híbridos diploides en los que el vigor híbrido disminuye en generaciones posteriores debido a la recombinación homóloga, la heterosis es estable en los alopoliploides debido al apareamiento disómico predominante de cromosomas homólogos idénticos [36,37]. c) Existe la posibilidad de que las copias genéticas duplicadas puedan evolucionar para asumir funciones nuevas o ligeramente variadas, permitiendo potencialmente la expansión de nichos ecológicos o una mayor flexibilidad en la capacidad del organismo para responder a los cambios ambientales [38,39]. d) De manera general, los poliploides presentan mayor tamaño de sus hojas, tallos y flores que su contraparte diploide.

Una alternativa a la poliploidización mitótica es la utilización de gametos " $2n$ " ó "no reducidos" (poliploidización meiótica). Este tipo de gametos se originan debido a una variación de la meiosis en las plantas. El proceso que conduce a la formación de gametos $2n$ se llama restitución nuclear meiótica que ocurre durante la micro o megasporogénesis [33]. Los gametos no reducidos contribuyen con dos conjuntos de cromosomas a la progenie (de plantas diploides), la mayoría de las veces genera progenies triploides y tetraploides, dependiendo de si los gametos " n " o " $2n$ " son aportados por uno o ambos padres, o si la cruce se realiza utilizando un progenitor tetraploide y uno que genere los gametos no reducidos. Los gametos " n " se encuentran en la mayoría de las especies y muchos autores les atribuyen el origen de especies de plantas poliploides [33,40,41].

Este tipo de poliploidización ofrece grandes posibilidades de reproducción, porque la heterocigosidad no es fija, porque la recombinación entre los genomas parentales está presente en los poliploides sexuales [42,43]. El atributo principal de los gametos no reducidos es que se logra la introgresión de segmentos cromosómicos de la especie parental e incluso si se realizan retrocruzas, los segmentos cromosómicos introgresados permanecen en la progenie.

Hasta ahora se conoce que la formación de gametos no reducidos puede suceder en muchas especies y que existen controles genéticos que activan su producción [33], los cuales están en la mayoría de las veces, ligados a cambios ambientales drásticos. Durante la formación de estos gametos, los cromosomas migran hacia los polos en distintas etapas, segregando las cromátidas de diferente manera, por lo que estos gametos pueden agruparse por la manera en que segregan las cromátidas durante la meiosis y por sus consecuencias genéticas. i) "Restitución de la

gene in a polyploid should allow masking of deleterious recessive mutations [34]. b) With respect to heterozygous allopolyploids and autopolyploids; heterosis allows the offspring to show transgressive behavior compared to the parental species [35]. Unlike diploid hybrids in which hybrid vigor decreases in later generations due to homologous recombination, heterosis is stable in allopolyploids due to the predominant disomic pairing of homologous identical chromosomes [36,37]. c) There is the possibility that duplicate gene copies may evolve to take on new or slightly varied functions, potentially allowing for the expansion of ecological niches or greater flexibility in the organism's ability to respond to environmental changes [38,39]. d) In general, polyploids have larger leaf, stem and flower size than their diploid counterpart.

An alternative to mitotic polyploidization is the use of " $2n$ " or "unreduced" gametes (meiotic polyploidization). This type of gametes originate due to a variation of meiosis in plants. The process leading to the formation of $2n$ gametes is called meiotic nuclear restitution that occurs during micro- or megasporogenesis [33]. The unreduced gametes contribute two sets of chromosomes to the progeny (of diploid plants), most often generating triploid and tetraploid progeny, depending on whether the " n " or " $2n$ " gametes are contributed by one or both parents, or whether the cross is made using a tetraploid parent and one that generates the unreduced gametes. The " n " gametes are found in most species and many authors attribute to them the origin of polyploid plant species. [33,40,41].

This type of polyploidization offers great reproductive possibilities, because heterozygosity is not fixed, because recombination between the parental genomes is present in sexual polyploids [42,43]. The main attribute of unreduced gametes is that introgression of chromosomal segments from the parental species is achieved and even if backcrosses are performed, the introgressed chromosomal segments remain in the progeny.

So far it is known that the formation of unreduced gametes can occur in many species and that there are genetic controls that trigger their production [33], which are most often linked to drastic environmental changes. During the formation of these gametes, chromosomes migrate toward the poles at different stages, segregating chromatids in different ways, so these gametes can be grouped by the way they segregate chromatids during meiosis and by their genetic consequences. (i) "First division restitution" (FDR) – the entire chromosomal complement divides equally before telophase I followed by cytokinesis,

primera división” o FDR por sus siglas en inglés (First Division Restitution), en este tipo, todo el complemento cromosómico se divide de manera equitativa antes de la telofase I seguida de la citocinesis, lo que lleva a la formación de una díada. ii) “Restitución de la segunda división” ó SDR (Second Division Restitution), los cromosomas se dividen de manera reductiva en la anafase I y en la telofase I ocurre la citocinesis, las cromátidas se dividen, pero el núcleo se restituye produciendo una díada. Y iii) Restitución meiótica indeterminada o IMR (Indeterminate Meiotic Restitution), este mecanismo combina características de ambos tipos mencionados anteriormente, durante la primera división meiótica algunos de los univalentes se dividen ecuacionalmente (como en FDR) y algunos bivalentes se separan reduccionalmente (como en SDR) antes de la telofase I cuyo resultado final, al igual que en los mecanismos anteriores, es a una díada [28,44].

Inducción de gametos no reducidos

Como se describió anteriormente son obvias las ventajas del uso de gametos no reducidos sobre los gametos de plantas a las que se les han doblado los cromosomas por métodos químicos, denominados “autopoliploides somáticos”. El gran problema que existe es que la producción de gametos no reducidos es que no son fácil de detectar, se producen en baja frecuencia y dependen de condiciones climáticas aún desconocidas. Algunos de los intentos por inducir este tipo de gametos incluyen: la selección genética [45], alta irradiación solar [46], bajas temperaturas [47], tratamientos con calor [48]. Sin embargo, ninguno de los intentos anteriores ha sido realmente exitoso. Recientemente se ha utilizado el óxido nitroso (N_2O) para inducir este tipo de gametos, ya que el N_2O es un gas y es posible tratar órganos enteros bajo presión. Estos tratamientos han sido realizados en el género *Lilium*, en donde botones florales, en donde la meiosis aún no ha ocurrido fueron tratados con el gas bajo diferentes presiones y por diferentes tiempos. El resultado fue el incremento de la producción de gametos no reducidos en genotipos que se conocía que los producían, sumado a la producción de este tipo de gametos en genotipos completamente estériles. Fue posible generar progenie utilizando tanto el polen como los óvulos de las plantas tratadas y lo más importante fue la detección de recombinación cromosómica en la progenie, logrando así una verdadera introgresión [49,50].

Conclusión

Como se ha descrito, no existe una sola técnica para alcanzar el éxito en un programa de mejoramiento genético, las técnicas a utilizar dependen del éxito alcanzado en cada uno de los pasos y en la medida en que se vayan solucionando las diferentes barreras o problemas que se

leading to the formation of a dyad; (ii) “Second division restitution” (SDR) – the chromosomes divide reductively in anaphase I and in telophase I cytokinesis occurs, the chromatids divide, but the nucleus is restored producing a dyad. And (iii) Indeterminate meiotic restitution (IMR) – his mechanism combines features of both types mentioned above, during the first meiotic division some of the univalents divide equationally (as in FDR) and some bivalents separate reductively (as in SDR) before telophase I which final result, as in the previous mechanisms, is a dyad. [28,44].

Induction of unreduced gametes

As described above, the advantages of using non-reduced gametes over gametes from plants that have had their chromosomes doubled by chemical methods, called “somatic autopolyploids”, are obvious. The major problem is that the production of unreduced gametes is not easy to detect, occurs at low frequency and depends on as yet unknown climatic conditions. Some of the attempts to induce such gametes include: genetic selection [45], high solar irradiation [46], low temperatures [47], heat treatments [48]. However, none of the above attempts have been really successful.

Recently, nitrous oxide (N_2O) has been used to induce such gametes, since N_2O is a gas and it is possible to treat whole organs under pressure. These treatments have been carried out in the genus *Lilium*, where flower buds, where meiosis has not yet occurred, were treated with the gas under different pressures and for different times. The result was an increase in the production of unreduced gametes in genotypes known to produce them, in addition to the production of such gametes in completely sterile genotypes. It was possible to generate progeny using both pollen and ovules from treated plants, and the most important thing was the detection of chromosomal recombination in the progeny, thus achieving true introgression. [49,50].

Conclusion

As described above, there is no single technique to achieve success in a genetic improvement program. The techniques to be used depend on the success achieved in each of the steps and on the extent to which the different barriers or problems that may arise are solved, this will be the guide to select the different techniques to meet the objectives of the breeding program.

puedan ir presentando, esto será la guía para seleccionar las diferentes técnicas para cumplir con los objetivos del programa de mejoramiento genético.

Referencias References

1. Weiss D (2002) Introduction of new cut flower: domestication of new species and introduction of new traits not found in commercial varieties. In: Vainstein A (ed). *Breeding for ornamentals: Classical and Molecular approaches*. Kluwer academic, Netherlands, pp 129-137
2. Chimonidou D, Vlahos JC, Odysseos E, *et al.* (2005) Evaluation of species from Cyprus Flora for sustainable use in commercial floriculture. *Acta Hort* 683: 111-119
3. Lim K-B, Van Tuyl JM (2006). Lily, *Lilium* hybrids. In: Anderson NO (ed), *Flower breeding & genetics: Issues, challenges and opportunities for the 21st century*, Springer Verlag, pp 517-537
4. Barba-Gonzalez R, Tapia-Campos E, Rodriguez-Domínguez JM (2020). Wild species, invaluable resources for breeding new ornamental crops. *Acta Hort* 1283, 105-120
5. Knox RB (1984). Pollen-pistil interactions. In: Linskens HF, Heslop-Harrison J (eds) *Cellular interactions*. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 508-608
6. Stebbins GL (1958) The inviability, weakness, and sterility of interspecific hybrids. *Adv Genet* 9:147-215
7. Ascher PD (1966) A gene action model to explain gametophytic self- incompatibility. *Euphytica* 15: 179-183
8. Bali PN, Hecht A (1965) The genetics of self-incompatibility in *Oenothera rhombipetala*. *Genetica* 36: 159-171
9. Hogenboom NG (1973) A model for incongruity in intimate partner relationships. *Euphytica* 22: 219-233
10. Van Tuyl JM, Van Diën MGM, Van Creij TCM, *et al.* (1991) Application of in vitro pollination, ovary culture, ovule culture and embryo rescue for overcoming incongruity barriers in interspecific *Lilium* crosses. *Plant Sci* 74: 115-126
11. Dubouzet JG, Arisumi K-I, Etoh T (1994) Studies on the development of new ornamental *Allium* through interspecific hybridization III. Hybridization of autumn-flowering species through pull-style pollination, cutflower culture and embryo rescue. *Mem Fac Agr Kagoshima Univ* 30: 35-42
12. Asano Y, Myodo H (1977) Studies on crosses between distantly related species of Lilies. I. For the intrastylar pollination technique. *J Jpn Soc Hortic Sci* 46: 59-65.
13. Asano Y (1980) Studies on crosses between distantly related species of Lilies. VI. Pollen-tube growth in interspecific crosses on *Lilium longiflorum* (L). *J Japan Soc Hort Sci.* 49: 392-396
14. Balatková V, Tupý J (1973). The significance of the methods of stigmatal and placental pollination in vitro in *Antirrhinum majus* L.; seed and callus formation on placentae. *Biologia Plantarum.* 15: 102-106
15. Zenkteler M, Wojciechowicz M, Bagniewska-Zadworna A, *et al.* (2003). Preliminary results on studies of in vivo and in vitro sexual reproduction of *Salix viminalis* L. *Dendrobiology* 50: 37-42
16. Van Tuyl JM, De Jeu MJ (1997) Methods for overcoming interspecific crossing barriers. In: Shivanna KR, Sawhney VK (eds), *Pollen biotechnology for crop production and improvement*. Cambridge University Press
17. Van Creij MGM, Kerckhoffs DMFJ, Van Tuyl JM (2000) Application of four pollination techniques and of hormone treatment for bypassing interspecific crossing barriers in *Lilium* L. *Acta Hort* 508: 267-274
18. Arzate-Fernandez AM, Nakazaki T, Tanisaka T (2006) Production of diploid and triploid interspecific hybrids between *Lilium concolor* and *L. longiflorum* by in vitro ovary slice culture. *Plant Breeding.* 117: 479-484

19. Bino RJ, Janssen MG, Franken J, *et al.* (1989) Enhanced seed development in the interspecific cross *Allium cepa* × *A. sphaerocephalon* through ovary culture. *Plant Cell Tiss Org Cult.* 16: 135-142
20. Carlson PS, Smith HH, Dearing RD (1972). Parasexual interspecific plant hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 69: 2292-2294
21. Evans DA (1983) Protoplast fusion. In: Evans DA, Sharp WR, Ammirato PV *et al* (eds) *Handbook of plant cell culture.* Volume I. Macmillan Publications Co. New York
22. Pelletier G, Primard C, Vedel F, *et al.* (1983). Intergeneric cytoplasmic hybridization in cruciferae by protoplast fusion. *Mol Gen Genet* 191: 244-250
23. Gürel S, Gürel E, Kaya Z (2002) Protoplast fusion in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) *Turk J Biol* 26: 163-170
24. Ohri D, Khoshoo TN (1983) Cytogenetics of garden *Gladiolus*. Origin and evolution of ornamental taxa. IV. *Proc Indian National Sci Acad* 3: 279-294
25. Ishizaka H (1994) Chromosome association and fertility in the hybrid of *Cyclamen persicum* Mill. *C. hederifolium* Aiton and its amphidiploid. *Breeding Sci* 44: 367-371
26. Yabuya T (1991) Chromosome associations and crossability with *Iris ensata* Thunb. In induced amphidiploids of *I. laevigata* Fisch. × *I. ensata*. *Euphytica* 55: 85-90
27. Asano Y (1982) Chromosome association and pollen fertility in some interspecific hybrids of *Lilium*. *Euphytica* 31: 121-128
28. Barba-Gonzalez R, Lim K-B, Zhou S, *et al.* (2008). Interspecific hybridization in lily: The use of 2n gametes in Interspecific lily hybrids. In: Teixeira da Silva J.A. (ed) *Floriculture, Ornamental and plant biotechnology. Advances and topical issues* Volume V. Global Science Books, UK
29. Pintos B, Martín Calvarro L, Gómez Garay A (2014) Agentes antimitóticos en la obtención de plantas doble-haploides. *Reduca (Biol.)* 7, 12-18
30. Morejohn LC, Bureau TE, Molè-Bajer *et al.* (1987) Oryzalin, a dinitro-aniline herbicide, binds to plant tubulin and inhibits microtubule polymerization in vitro. *Planta* 172: 252–264
31. Ferguson J, Hawkins SW, Doxey, D (1950) C-mitotic action of some simple gases. *Nature* 165: 1021-1022
32. Östergren G (1954) Polyploids and aneuploids of *Crepis capilaris* produced by treatment with nitrous oxide. *Genetica* 27: 54-64
33. Ramanna MS, Jacobsen E (2003) Relevance of sexual polyploidization for crop improvement – A review. *Euphytica* 133: 3-18
34. Gu Z, Steinmetz LM, Gu X, *et al.* (2003). Role of duplicate genes in genetic robustness against null mutations. *Nature* 421, 63–66
35. Birchler JA, Yao H, Chudalayandi S, *et al.* (2010) Heterosis. *Plant Cell* 22: 2105-2112
36. Ohno S (1970) *Evolution by Gene Duplication*, Springer, New York: Springer
37. Comai L (2005) The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nat Rev Genet* 6: 836-846
38. Adams KL, Wendel JF (2005). Polyploidy and genome evolution in plants. *Curr Opin Biol* 8: 135-141
39. Moore RC, Purugganan MD (2005) The evolutionary dynamics of plant duplicate genes. *Curr Opin Biol* 8: 122-128
40. Harlan JR, De Wet JMJ (1975) On Ö. Winge and a prayer: The Origins of Polyploidy. *Bot Rev* 41: 361-390
41. Veilleux R (1985) Diploid and polyploid gametes in crop plants: mechanisms of formation and utilization in plant breeding. *Plant Breeding Rev* 3: 252-288

42. Bretagnolle F, Thompson JD (1995) Tansley Review No. 78 Gametes with somatic chromosome number: mechanisms of their formation and role in the evolution of autopolyploid plants. *New Phytologist* 129: 1-22
43. Soltis PS, Soltis DE (2000) The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids. *Proc Natl Acad Sci USA - Biology* 97: 7051-7057
44. Lim K-B, Ramanna MS, de Jong JH, *et al.* (2001). Indeterminate meiotic restitution (IMR): a novel type of meiotic nuclear restitution mechanism detected in interspecific lily hybrids by GISH. *Theor Appl Genet* 103: 219-230
45. Jacobsen E (1976) Cytological studies on diplandroid production in dihaploid potato clone and its correlation with seed set in 4x-2x crosses. *Zeitschrift Pflanzzüchtg* 77: 10-15
46. Negri V, Lemmi G (1998) Effect of selection and temperature stress on the production of 2n gametes in *Lotus tenuis*. *Plant Breeding* 117: 345-349
47. Lutkov AN (1937) On the artificial induction of polyploid gametes by treatment by with low temperatures and chloroform. *Trudy po Prikladnoi Botanike Genetike i Seleksii* 7, 127-150
48. Lokker AC, Barba-Gonzalez R, Lim K-B, *et al.* (2004) Genotypic and environmental variation in production of 2n gametes of Oriental × Asiatic lily hybrids. *Acta Hort* 673: 453-456
49. Barba-Gonzalez R, Miller CT, Ramanna MS, *et al.* (2006) Nitrous oxide (N₂O) induces 2n gametes in sterile F₁ hybrids between Oriental × Asiatic lily (*Lilium*) hybrids and leads to intergenomic recombination. *Euphytica* 148, 303-309
50. Barba-Gonzalez R, Miller CT, Ramanna MS, *et al.* (2006). Induction of 2n gametes for overcoming F₁-sterility in lily and tulip. *Acta Hort* 714: 99-106