



Universidad Autónoma de Nuevo León
FACULTAD DE AGRONOMIA



SEMINARIO

PROPUESTA METODOLOGICA PARA LA OBTENCION
DE PLANTAS HAPLOIDES DE TOMATE (*Lycopersicon esculentum* Mill)
MEDIANTE EL CULTIVO DE ANTERAS

QUE PRESENTA:

MARIO ALBERTO MONCADA GUERRA

COMO REQUISITO PARA OBTENER
EL TITULO DE INGENIERO AGRONOMO FITOTECNISTA

T
SB 34
M6
C. 1



1080062822

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE AGRONOMIA

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

SEMINARIO

PROPUESTA METODOLOGICA PARA LA OBTENCION
DE PLANTAS HAPLOIDES DE TOMATE (*Lycopersicon esculentum* Mill)
MEDIANTE EL CULTIVO DE ANTERAS

Elaborado por:

Mario Alberto Moncada Guerra

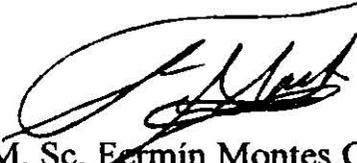
Aceptado y aprobado como requisito para
optar por el titulo de:

INGENIERO AGRONOMO FITOTECNISTA

COMISION REVISORA:


Ing. Cesáreo Guzmán Flores
Asesor principal


Dra. Elizabeth Cárdenas Cerda
Asesor


Ing. M. Sc. Fermín Montes Cavazos
Asesor

Marín, N.L.

Junio de 1994.

11766

BIBLIOTECA AGRONOMIA U.A.N.L.

T
SB 349
MG

040 • 635
FA 2
1994
C.5



Bureau Central
Mayan Solidarity

F. Lessis



Bureau Raúl Rangel Files
UA
FO
TESIS TURA

Sirve a tu Dios con rectitud, séle fiel... y no te preocupes de nada: porque es una gran verdad que "si buscas el reino de Dios y su justicia, El te dará lo demás -lo material, los medios- por añadidura".

JOSEMARIA ESCRIVA DE BALAGUER
(Camino, 472)

DEDICATORIA

A DIOS: por haberme dado la oportunidad de culminar una etapa más de mi vida .

A MIS PADRES:

José Moncada Hernández
María Elena Guerra Hernández

Por todo su amor, comprensión y apoyo que para mi significaron un gran aliciente para lograr terminar mi carrera profesional.

A MIS HERMANOS:

José Ismael, Hilda Maricela, Erik, y de manera muy especial a mi hermana Isabel Cristina, por el esfuerzo y los sacrificios pasados para que me fuera posible cursar mis estudios y lograr lo que hoy presento, gracias Cristina, ésta es tu obra.

A MIS AMIGOS:

J. Guillermo Elizondo E. Mario E. Jiménez L.
Gerardo Guerrero G. Ignacio Espinoza G.
Reynaldo Serna R.

Gracias por sus consejos y por todos esos gratos momentos que pasamos juntos, por ser siempre fieles a una amistad. Amigos siempre en las buenas y en las no tan buenas.

A Tí: no pienses que por no poner tu nombre te he olvidado, gracias.

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores: Dra. Elizabeth Cárdenas Cerda,
Ing. Cesáreo Guzmán Flores
M.Sc. Fermin Montes Cavazos

Por todo el apoyo brindado desde el inicio de este trabajo, por el empeño y dedicación mostrada durante el desarrollo del mismo, y por todas las oportunidades dadas para mi formación profesional.

A los maestros Ing. Roberto Treviño López y el M.Sc José Elías Treviño Ramírez por el interés puesto en mi educación desde el inicio de mis estudios, gracias por su incondicional apoyo.

A la Lic. María de la Luz González López por todos sus consejos, que siempre me fueron y me serán útiles, gracias por esa especial dedicación.

A el personal de los laboratorios de Fisiología Vegetal, Genética y Biotecnología Vegetal.

A todos los maestros involucrados en mi educación.

INDICE

1.- INTRODUCCION	1
2.- MARCO TEORICO	3
2.1 El Tomate	3
2.1.1 Clasificación Taxonómica	3
2.1.2 Descripción de órganos florales ...	3
2.2 Androgénesis	5
2.2.1 Descripción	5
2.2.2 Importancia	7
2.3 Factores a considerar en la técnica de la Androgénesis	9
2.3.1 Condiciones de Desarrollo de la Planta Madre	9
2.3.2 Edad de la planta donadora	10
2.3.3 Estado de desarrollo de la microspora	10
2.3.4 Pretratamiento de yemas o anteras .	12
2.3.5 Medio de Cultivo	13
2.3.5.1 Consistencia del medio	14
2.3.5.2 Microelementos y Vitaminas.	14
2.3.5.3 Reguladores del crecimiento	15
2.3.5.4 Suplementos orgánicos y otros de Nitrógeno	16
2.3.5.5 Carbón activado	16
2.3.5.6 Potencial hídrico en el medio de cultivo	17
2.3.6 Condiciones de Incubación	17
2.3.6.1 Luz	17
2.3.6.2 Temperatura	18
3.- PROPUUESTA METODOLOGICA	19
3.1 Primer Etapa: Caracterización Citológica de las Fases de la Microsporogénesis	19
3.2 Segunda Etapa: Pretratamiento de anteras.	21
3.3 Tercer Etapa: Modificaciones al medio de cultivo y condiciones de incubación	22
4.- TECNICA DE TINCION PROPUUESTA	24
4.1 Técnicas para estudios cromosómicos	24
4.1.1 Obtención del material	25
4.1.2 Fijación	27
4.1.2.1 Fijación por tratamiento químico	27
4.1.2.2 Fijación por tratamiento físico	29
4.1.3 Aplastado de anteras	30

4.2	Técnicas de Fijación y Tinción	30
4.2.1	Método de frotis con carmin-propiónico	30
4.2.2	Procedimiento con carmin de Snow ..	32
4.3	Soluciones Colorantes	34
4.3.1	Preparación del colorante carmin ..	34
4.3.2	Preparación del colorante carmin de Snow	35
4.4	Resultados del Estudio	35
5.-	BIBLIOGRAFIA	37

INDICE DE FIGURAS

Figura		Pagina
1	Corte lingitudinal de una flor de tomate	4
2	Etapas del desarrollo <u>in vivo</u> (-----) de la microspora y rutas dirigidas <u>in vitro</u> (——) para la obtención de embriones haploides y diploides (Dodds y Roberts, 1982).	6
3	Técnicas para producir plantas haploides mediante la androgénesis utilizando el cultivo de anteras y polen aislado (modificado de Bajaj, 1983).....	8
4	Diagrama que ilustra los pasos generales propuestos que se tienen que seguir, desde la colecta del botón, hasta identificar las condiciones óptimas para la obtención de embriones y/o callos....	20
5	Esquema general de las operaciones básicas para el estudio de cromosomas meióticos	26
6	Método de frotis con carmín-propiónico .	31
7	Procedimiento con carmín de Snow	33
8	Microfotografía de microsporas en Metafase II. Obsérvese la nitidez en la tinción de cromosomas que hace que se distingan del citoplasma. La técnica utilizada es la descrita por Hernández (1990).	36

1.- INTRODUCCION

En México, el cultivo del tomate es uno de los más importantes desde el punto de vista económico, por motivo de las divisas que el país obtiene por concepto de su exportación. Estados Unidos es el país que constituye el principal mercado para este producto hortícola.

Lo anterior justifica cualquier esfuerzo encaminado a lograr una reducción de costos y una mejor calidad del producto cosechado (Campos, 1971), así como un aumento en el rendimiento, para lo cual es importante la obtención de nuevas variedades por medio del mejoramiento genético.

Los métodos del mejoramiento genético del tomate siguen los lineamientos usuales para las plantas autóгамas. Estos tradicionalmente consumen de 8 a 12 años de trabajos intensos por parte de los fitomejoradores para obtener y liberar una nueva variedad comercial (Ortega, 1986).

Actualmente se han desarrollado algunas técnicas de mejoramiento genético, basadas en la biotecnología, las cuales acortan el tiempo para la obtención de nuevas variedades. Entre dichas técnicas podemos mencionar a la androgénesis. La cual es relativamente nueva y permite la producción de plantas haploides y doble haploides originadas de células jóvenes de polen (Nitsch, 1981).

El mayor interés en los haploides está en ser intermediarios en la producción de plantas homocigóticas, producidas por duplicación de cromosomas. Tal ruta rápida de homocigosis tiene un gran potencial en la mejora de plantas como una alternativa para repetir ciclos de mejoramiento en cultivos autopolinizables (Dunwell, 1985).

Por lo anterior, los objetivos del presente seminario son:

- 1.- Proponer una metodología para la obtención de plantas haploides de tomate mediante la técnica de androgénesis.
- 2.- Describir la técnica de tinción de cromosomas, en el caso de anteras de tomate, más apropiada según las verificaciones efectuadas experimentalmente por el autor del presente seminario.

2.- MARCO TEORICO

2.1 El Tomate.

2.1.1 Clasificación Taxonómica (Sánchez, 1980)

Reino	Vegetal
División	Tracheophyta
Subdivisión	Pteropsidae
Clase	Angiospermae
Subclase	Dicotyledonae
Orden	Personatae
Suborden	Solaníneas
Familia	Solanaceae
Subfamilia	Soláneas
Genero	<i>Lycopersicum</i>
Especie	<i>esculentum</i>

2.1.2 Descripción de órganos florales.

La inflorescencia de tomate se presenta en forma de cima o corimbo. Cada racimo de flores está formado por un número variable de las mismas, generalmente entre 6 y 15, lo cual depende de la variedad. En la mayoría de las variedades, el primer racimo de flores, suele aparecer después del nacimiento de la quinta hoja, contada a partir de los cotiledones; después de este primer racimo, siguen dos hojas y a continuación aparece un nuevo racimo; el resto de las flores y hojas siguen el mismo patrón: dos hojas y un racimo de flores.

Las flores individuales son hermafroditas de pedúnculo corto (Fig. 1). Están formadas por 5-10 partes de cáliz verde, 6 pétalos amarillos unidos en su base. Se presentan generalmente 6 estambres, éstos están unidos por sus anteras

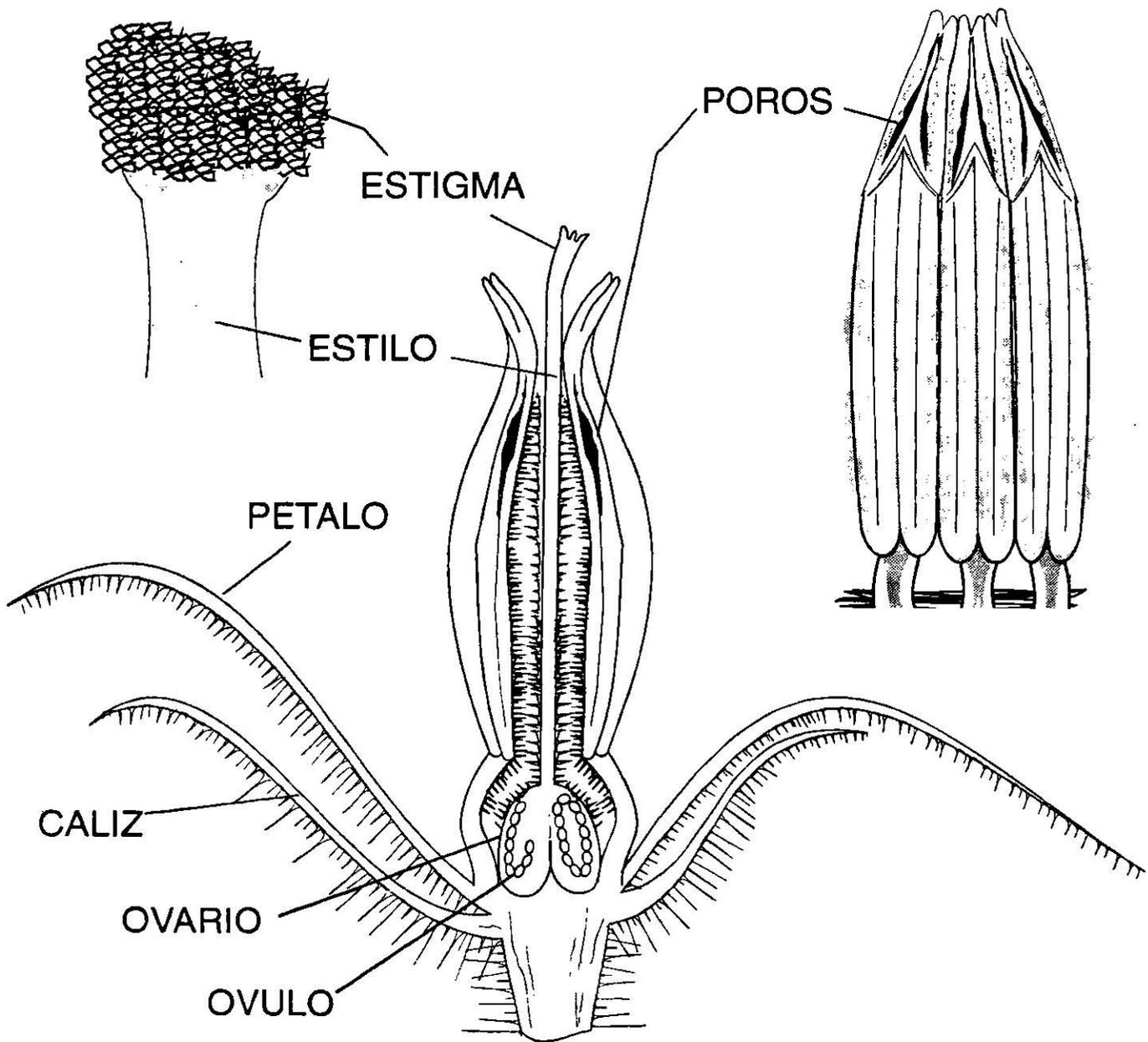


Fig. 1 Corte longitudinal de una flor de tomate (McGregor, 1976).

amarillas, las cuales se abren por unos orificios internos y fecundan automáticamente el estigma, lo que favorece a la autopolinización. El ovario es súpero con 2-10 carpelos generalmente.

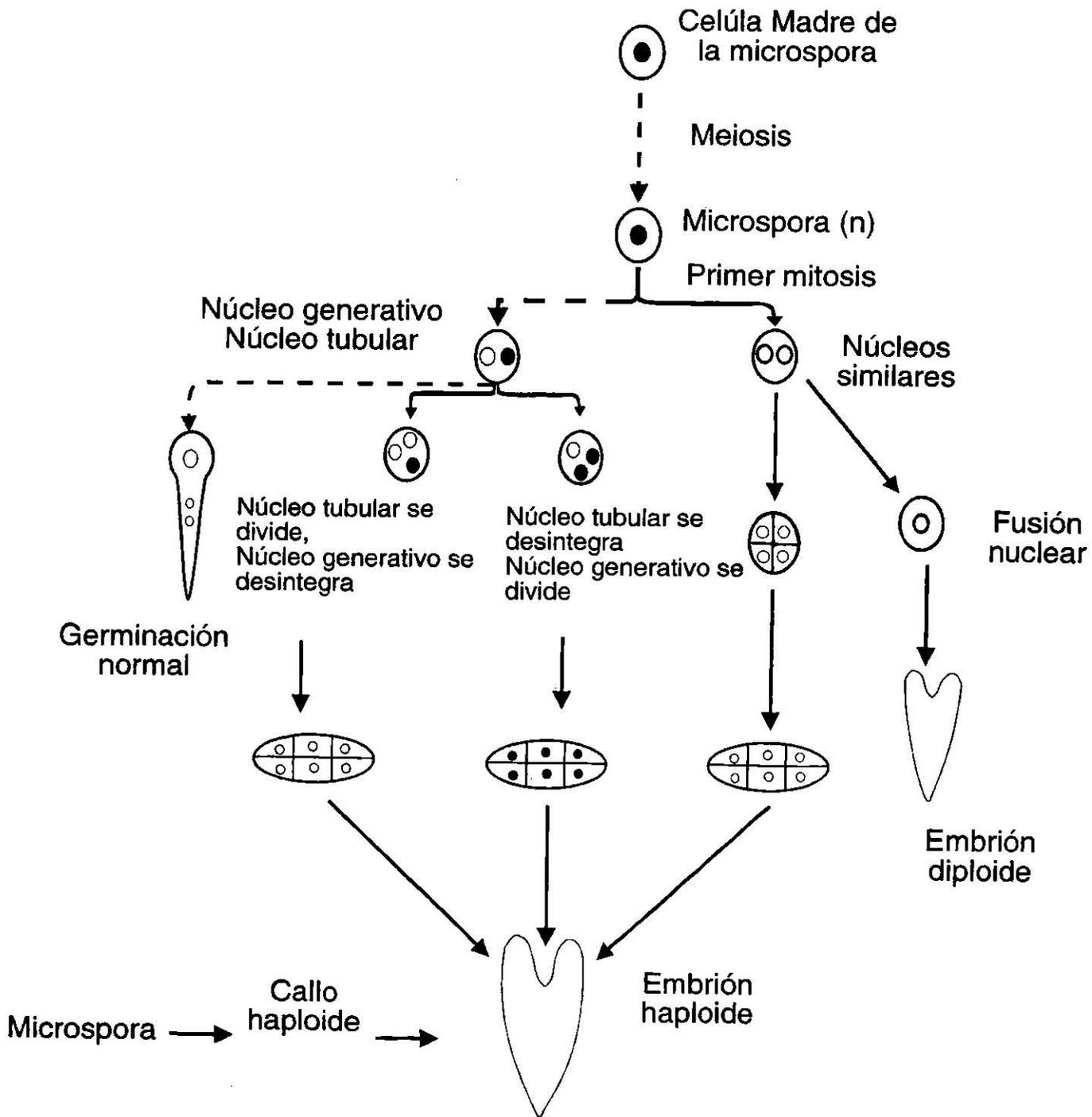
A la apertura de la corola le corresponde el inicio del período de receptividad de los estigmas y después de 24-48 horas se inicia la dehiscencia de los estambres. El estigma permanece receptivo por 4-8 días y la menor vibración de las anteras provoca una lluvia de polen sobre el mismo (McGregor, 1976; Maroto, 1986).

2.2 Androgénesis.

2.2.1 Descripción.

Las células gametofíticas (microsporas o megasporas) pueden ser inducidas en el cultivo in vitro a abandonar su curso ontogénico normal para seguir una vía esporofítica que conduzca a la formación de esporofitos haploides. El proceso se llama androgénesis cuando las microsporas producen embriones y plantas (Fig. 2), y ginegénesis cuando el proceso tiene lugar en el cultivo de óvulos y de ovarios (Roca et al, 1991).

Mediante la androgénesis, las anteras inmaduras que contienen microsporas en una etapa específica de desarrollo, se colocan en medio de cultivo donde se dividen para formar embriones o callo. Transferidos éstos a medios de



BIBLIOTECA Agrícola U.A.N.

Fig. 2 Etapas del desarrollo in vivo (-----) de la microspora y rutas dirigidas in vitro (——) para la obtención de embriones haploides y diploides (Dodds y Roberts, 1982).

regeneración, se forman plantas. En la mayoría de los casos se producen plantas haploides estériles, pero en algunas especies ocurre una duplicación espontánea de los cromosomas en las etapas de desarrollo del callo y de regeneración de la planta (Roca et al, 1991), éstas son fértiles.

2.2.2 Importancia.

El potencial que posee el cultivo de anteras surge de la constitución genética de las células del polen. Las células del polen de los híbridos F_1 contienen la dotación genética de las plantas paternas y las recombinaciones esperadas según las proporciones mendelianas. Estas células son haploides y permiten por ello al mejorador seleccionar eficazmente los recombinantes deseables; además, una vez duplicadas esas células, se forman líneas homocigóticas (Fig. 3).

Alcanzar la homocigocidad inmediata constituye una de las aplicaciones más importantes del cultivo de anteras en el desarrollo de variedades nuevas porque, el tiempo, el espacio y los costos necesarios para desarrollar nuevas líneas mejoradas disminuirían considerablemente (Roca et al, 1991).

El porcentaje de individuos homocigóticos en las distintas generaciones de autofecundación, se calcula de acuerdo a la siguiente fórmula: $F = 1/2 (1+F_1)$ donde F_1 = coeficiente de endogamia de la generación anterior (Allard, 1967). Por lo tanto, por los métodos tradicionales, para alcanzar un alto grado de homocigosis, se necesitan de 7 a 8

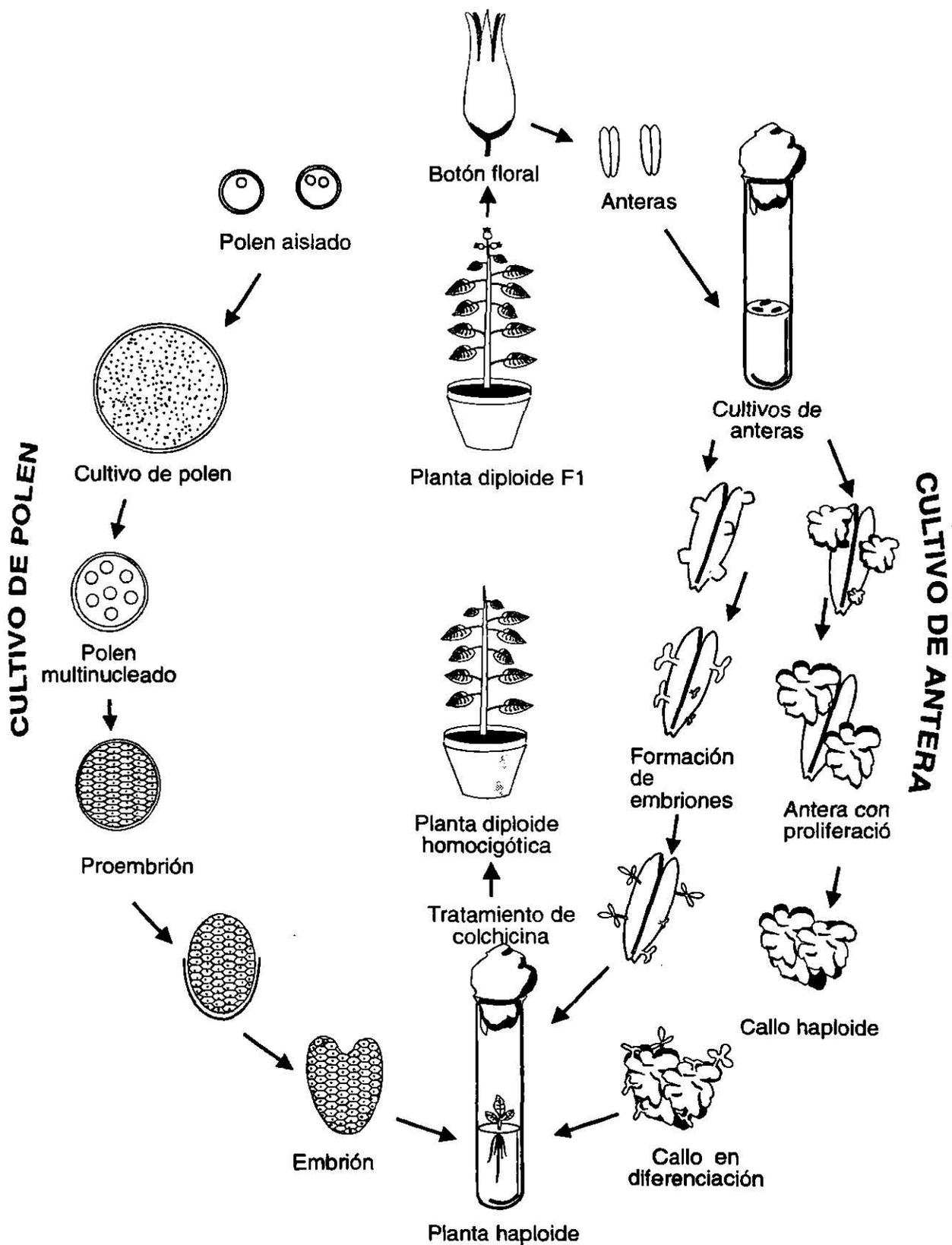


Fig. 3 Técnicas para producir plantas haploides mediante la androgénesis utilizando el cultivo de anteras y polen aislado (modificado de Bajaj, 1983).

generaciones de autofecundación; en contraste, en el caso de la androgénesis, sólo se requiere una generación al duplicar los haploides.

2.3 Factores a considerar en la técnica de la Androgénesis.

2.3.1 Condiciones de Desarrollo de la Planta Madre.

Las condiciones de crecimiento de las plantas donadoras que se usan para proveer las anteras para el cultivo, tienen un profundo efecto sobre el rendimiento de los derivados de las microsporas (Dunwell, 1985).

La planta donadora debe ser cuidada desde el momento en que se presenta la inducción a la floración hasta que se toman los botones florales. Debe de estar bien nutrida y colocada en un fotoperíodo óptimo, con una alta intensidad de luz. La luz artificial no puede reemplazar a la luz solar. Por lo cual se sugiere que si la planta va a estar en interiores, se deben usar invernaderos con luz de día natural suplementada con luz artificial, en vez de usar cámaras de crecimiento que solo tienen luz artificial (Nitsch, 1981).

Los requerimientos óptimos de fotoperíodo y luminosidad son diferentes para cada especie, por lo cual no se pueden dar recomendaciones generales. Los estudios mas completos que se han hecho han sido en tabaco (Nicotiana tabacum) en los cuales se encontraron que los fotoperíodos cortos (8 horas) y altas intensidades (16000 lux) eran benéficos. Los estudios

con cebada (Hordeum vulgare) recomiendan temperaturas bajas de 12°C y altas intensidades de luz (20000 lux) (Dunwell, 1985).

La temperatura bajo la cual han sido desarrolladas las plantas es importante. Por ejemplo, en plantas del género Datura cultivadas a 24°C se presenta una alta frecuencia de androgénesis (45%), mientras que cuando se cultivan a 17°C la frecuencia de androgénesis es baja (8%) (Nitsch y Norrel citados por Bajaj, 1983).

2.3.2 Edad de la planta donadora.

En general, para todas las especies, se recomienda que las yemas florales sean colectadas de plantas que estén en inicio de floración. Dado que las plantas viejas frecuentemente producen pequeños botones los cuales contienen anteras con una mezcla heterogénea de microsporas y polen joven. Si es necesario continuar con los experimentos por un período mas extenso, se deben de remover las yemas que no se van a usar, evitándoles madurar en la planta (Reinert y Bajaj, 1977).

2.3.3 Estado de desarrollo de la microspora.

El estado de desarrollo de la microspora, cuando se colectan los botones, es crítico para el éxito de los trabajos de androgénesis. Por lo cual es absolutamente necesario antes de iniciar cualquier cultivo in vitro, seguir

el desarrollo que conduce a la formación de polen (Nitsch, 1981); por lo tanto, para controlar la androgénesis, es crucial la caracterización citológica y bioquímica de las etapas muy tempranas en el desarrollo de las microsporas (Roca et al, 1991).

El estado de desarrollo de las microsporas adecuado para androgénesis, va desde antes de la primera mitosis hasta después de la misma (Nitsch, 1981). En relación a esto, Sunderland (citado por Dodds y Roberts, 1982) reporta que en flores de muchas plantas, las anteras caen dentro de una de tres categorías, premitótica, mitótica y postmitótica. En la categoría premitótica la mejor respuesta es obtenida usando anteras en las cuales las microsporas aún no hayan iniciado la primera división del polen (ejemplo Hordeum vulgare). Anteras de plantas del grupo mitótico responden optimamente al momento de la primera división del polen (ejemplo Nicotiana tabacum, Datura innoxia). El estado binuclear temprano del desarrollo del polen es mejor en las plantas postmitóticas (ejemplo, Atropa belladonna, Nicotiana spp).

Para identificar la etapa óptima de desarrollo de la microspora, si se quieren tener altas frecuencias de inducción a androgénesis, existe una buena cantidad de técnicas de tinción.

Específicamente, para el estudio de los cromosomas meióticos, existen técnicas como las citadas por Curtis (1981) y Hernández (1990), las cuales están descritas en el

apartado 4.

2.3.4 Pretratamiento de yemas o anteras.

En varias especies, los mejores rendimientos de derivados de microsporas (tejido embriogénico y/o embriones) han sido obtenidos de anteras cultivadas previa exposición a una temperatura específica. Según Dunwell (1985) dicha temperatura y la duración de la exposición a la misma, varía de acuerdo a la especie y a la etapa de desarrollo de la microspora al momento en que se colectan los botones florales, aunque en las etapas más viejas se requiere comunmente de duraciones cortas de exposición. El autor mencionado describe tratamientos de bajas temperaturas, por ejemplo, en cebada, un tratamiento de 28 días a 4°C o uno de 14 días a 7°C produce óptimos resultados. Este pretratamiento puede ser aplicado a espigas o a espiguillas o aún a anteras aisladas.

El incremento en la androgénesis es principalmente atribuido al hecho de que las temperaturas bajas (3-5°C) mantienen la viabilidad, retarda la senescencia y previene la aborción de la microspora. De este modo se incrementa la cantidad de microsporas que son destinadas a la formación de embriones (Bajaj, 1983).

El efecto de baja temperatura puede ser análogo a inducir reposo o vernalización. El grado de frío al cual se debe tratar la antera es dependiente de las especies. Este

requerimiento se puede reemplazar por calor en el caso de nabo (Brassica napus). Para solanáceas y trigo el tratamiento de frío puede variar entre 3° y 6°C de 3 a 15 días, pero el maíz responde mejor a temperaturas de 14°C (Nitsch, 1981).

En general, el máximo efecto del pretratamiento es alcanzado alrededor del tercer día de exposición. Después se ponen las anteras en cultivo, dando incrementos graduales en la temperatura de 14° a 18° y de ésta a 25°C, manteniéndolo de 5 a 7 días en cada temperatura, lo cual incrementa la producción de embriones (Nitsch, 1981).

También se ha estudiado el efecto de la alternancia de temperaturas altas y bajas. Tratamientos de frío y exposiciones breves a altas temperaturas han sido consignados como estimuladores de divisiones repetidas de la microspora. Por ejemplo, en el género Brassica, la embriogénesis es estimulada en anteras sometidas a 30°C por 24 hr o 40°C por solo 1 hr (Bajaj, 1983).

2.3.5 Medio de Cultivo.

Aunque frecuentemente se considera al medio de cultivo de primera importancia en las metodologías de los cultivos in vitro, el mismo está subordinado a la variable de etapa de desarrollo de la microspora (Dunwell, 1985); sin embargo, existen otros aspectos importantes relacionados con el propio medio de cultivo, algunos de los más relevantes se dan a continuación:

2.3.5.1 Consistencia del medio. Es bien conocido desde hace años que la mayoría de tipos de agar, usados para solidificar el medio de cultivo, contiene componentes que son deletéreos para la sobrevivencia del polen (Dunwell, 1985).

Las alternativas son usar agarosa o un medio de cultivo líquido. La desventaja de usar medio no solidificado es que, aunque se producen buenos rendimientos de callos por microspora, los niveles de regeneración de la planta frecuentemente son lentos. Se ha sugerido que esto es debido a que las condiciones anaeróbicas inhiben el crecimiento de los callos los cuales se hunden en el medio líquido (Dunwell, 1985).

Para ciertas especies, incluyendo especies de Nicotiana, Anemone, Clematis y Papaver, se ha usado el sistema de dos fases. En esta técnica, las anteras se hacen flotar en una capa de 4 ml de líquido, puesta sobre una base de 5 ml de medio solidificado conteniendo carbón activado (5%) en una caja Petri (50 mm de diámetro) (Dunwell, 1985).

2.3.5.2 Microelementos y Vitaminas. Los elementos menores y las vitaminas no parecen ser necesarios para la inducción de androgénesis (Nitsch, 1981).

Las mezclas comunes de vitaminas son las basadas en la fórmula de Murashige y Skoog. No hay evidencia que esos compuestos sean actualmente necesarios para la inducción, sin embargo, se recomienda la adición de ellas para promover el

desarrollo de los embriones en las etapas posteriores a la androgénesis (Ochoa, 1985).

Se ha demostrado que la absorción de sal de hierro juega un rol importante para la diferenciación de los embriones globulares hacia la forma de corazón y posteriormente hacia plantas completas (Nitsch, 1981).

2.3.5.3 Reguladores del crecimiento. Las especies se han separado entre aquellas que requieren la adición de hormonas para el medio de cultivo de antera (Gramineae, Cruciferae), y aquellas que son consideradas independientes de las hormonas (Solanaceae). Sin embargo, hay evidencias de que, bajo óptimas condiciones, es posible una respuesta de las anteras del primer grupo, si éstas se desarrollan en un medio libre de hormonas, al menos en la primera etapa de cultivo (Dunwell, 1985).

La técnica de la androgénesis es uno de los casos raros donde las sustancias de crecimiento exógenas no tienen efecto o aún pueden ser perjudiciales. Por ejemplo, la embriogénesis es inhibida por sustancias de crecimiento, como lo demostró Halperin y Wetherell citados por Nitsch (1981).

En algunos casos, la presencia de sustancias de crecimiento en el medio de cultivo, especialmente auxinas y citoquininas, aumenta la división celular hasta llegar a que la célula de polen pierda su carácter y llega a desorganizarse formando callos (Nitsch, 1981).

2.3.5.4 Suplementos orgánicos y otros de Nitrógeno. La adición de aminoácidos definidos, especialmente glutamina, son benéficos para el cultivo de anteras de ciertas especies (Dunwell, 1985).

Se ha concluido, estudiando el efecto en varias especies, que la glutamina probablemente es benéfica para la mayoría de las plantas, como ayuda para llevar a cabo la diferenciación in vitro de una célula hasta formar la planta completa (Nitsch, 1981).

Un análisis completo de los aminoácidos presentes en el tejido, en varias etapas del desarrollo in vivo del embrión cigótico, ha demostrado la necesidad de algunos aminoácidos específicos. Se ha demostrado que Nicotiana requiere de glutamina y serina, en cambio Zea mays la prolina (Nitsch, 1981).

2.3.5.5 Carbón activado. Este compuesto altera el medio de cultivo en varias formas, en particular absorbiendo hormonas, vitaminas y hierro, así como también compuestos fenólicos, frecuentemente producidos por tejidos senescentes en el cultivo (Dunwell, 1985). Ochoa (1985) consigna que aparentemente el carbón activado actúa removiendo inhibidores del crecimiento o el exeso de auxinas en el medio de cultivo. Las concentraciones que se adicionan varían entre 0.5-2%.

2.3.5.6 Potencial hídrico en el medio de cultivo. Varias investigaciones empíricas han separado las especies que requieren baja concentración de sacarosa (2-4 %) de aquellas cuyas anteras producen mejores resultados a altas concentraciones (8-12 %). Esta división de especies parece estar relacionada acorde a que si el polen maduro es bicelular (Solanaceae, Liliaceae) o tricelular (Gramineae, Cruciferae). El primer grupo requiere bajos potenciales hídricos y el segundo grupo altos potenciales hídricos en el medio de cultivo (Dunwell, 1985).

2.3.6 Condiciones de Incubación.

Las condiciones ambientales en la cual se van a colocar los cultivos puede inhibir la diferenciación de los embriones globulares a plantas con cotiledón y raíces (Nitsch, 1981).

2.3.6.1 Luz. Se ha demostrado en trabajos realizados con N. sylvestris que la luz blanca de alta intensidad (5000 lux) es inhibidor para la androgénesis y que la obscuridad o la luz azul no lo es. Sin embargo, la luz blanca a baja intensidad o aún mejor la luz roja, aumenta y mejora marcadamente el número de plantas obtenidas y por lo tanto, la luz roja recorta el tiempo necesario para producir plantas a partir del polen por casi un 20%. En otras palabras, 15 días bajo luz roja (600 Å) a 25°C es suficiente para obtener 500 plantas de una suspensión de polen, en cambio a baja intensidad (500

lux) de luz blanca, son necesarios 20 días y el número de plantas producidas es ligeramente menor (Nitsch, 1981).

La recomendación común es incubar en obscuridad hasta el tiempo de emergencia de los embriones o callos derivados de microsporas (Dunwell, 1985).

2.3.6.2 Temperatura. Esta es la más importante de las variables de incubación. Las anteras de la mayoría de las especies, incluyendo solanáceas, responden adecuadamente si se cultivan a 25°C (Ochoa, 1985). Sin embargo ciertas especies, especialmente del género Brassica, tienen requerimientos de temperatura mas precisos que la mayoría, responde más a 35°C durante periodos cortos o aún a temperaturas mas elevadas (Dunwell, 1985).

3.- PROPUESTA METODOLOGICA

Para producir tejido embriogénico o embriones haploides a partir de anteras de tomate, que se espera sean útiles para la regeneración de plantas haploides y diploides para la formación de líneas puras, se propone que el estudio esté dividido en tres etapas; la primera deberá ser dirigida a relacionar la etapa de la microsporogénesis con la longitud del botón floral, la segunda deberá ser dirigida a detener la ontogenia de la microsporogénesis en fases específicas mediante pretratamientos y la tercera a estudiar variantes en el contenido orgánico del medio MS que permitan el desarrollo de tejido embriogénico o embriones a partir de fases específicas de la microsporogénesis. En la figura 4 se presenta un diagrama de flujo del estudio general.

3.1 Primer Etapa: Caracterización Citológica de las Fases de la Microsporogénesis.

Objetivo particular: Cotejar para los genotipos de tomate a estudiar lo consignado por Gresshoff & Doy (1972) y Jaramillo & Summers (1991), en cuanto a la relación tamaño del botón-fase de la microsporogénesis.

Procedimiento:

Con el objetivo de fijar y teñir las microsporas, se

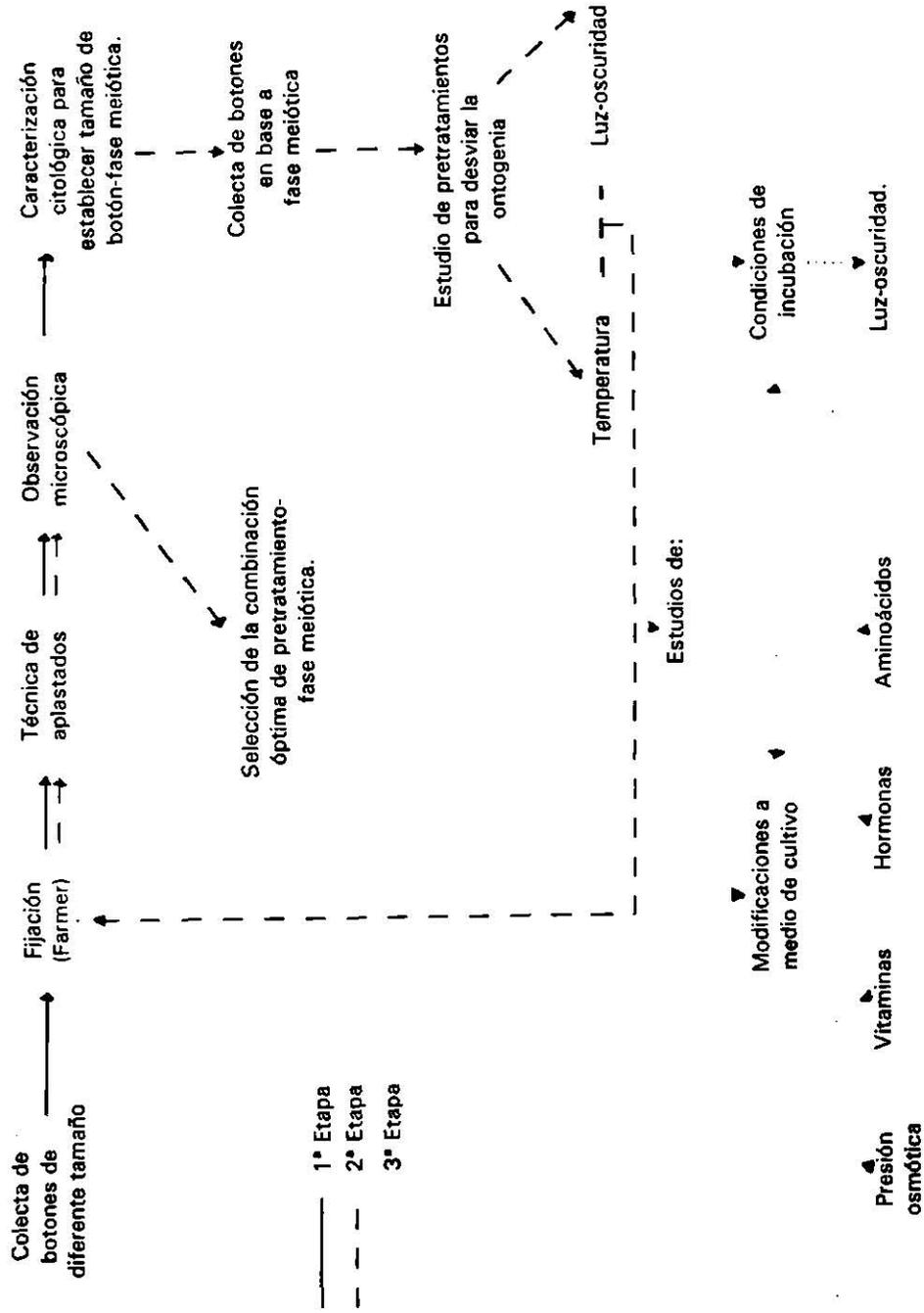


Fig. 4 Diagrama que ilustra los pasos generales propuestos que se tienen que seguir desde la colecta del botón hasta identificar las condiciones óptimas para la obtención de embriones y/o callos.

propone la técnica citológica consignada por Hernández(1990).

Variables propuestas:

Tamaño: se deberá estimar por la longitud del botón. Esta se define como la distancia entre la base del cáliz y el estrechamiento formado por la unión de los sépalos en la parte distal del botón.

Fase de la microsporogénesis: se refiere a la etapa de la meiosis, en que se encuentran las microsporas en el botón al momento de la fijación.

3.2 Segunda Etapa: Pretratamiento de anteras.

Objetivo particular: Determinar el mejor pretratamiento que favorezca la detención de la ontogenia normal del grano de polen e induzca la división celular.

Procedimiento:

Se propone la técnica descrita por Gresshoff & Doy (1972) para el establecimiento aséptico del material.

El medio de cultivo que se propone es el descrito por Nitsch (1981).

El número de anteras por frasco recomendado es de 25. La mitad de los frascos deberán ser colocados a la luz y la otra a la oscuridad. Ambos deberán ser sometidos a diferentes pretratamientos consistiendo en variaciones de temperatura

(4°, 8°, 12°C) por diferentes períodos de tiempo (2,4 y 8 días). Al terminar los pretratamientos, las anteras deberán ser fijadas siguiendo la técnica descrita por Hernández (1990) para su posterior observación al microscopio.

Variables propuestas:

Para el análisis estadístico se propone una escala análoga a la consignada por Willcox *et al* (1991), que se basa en la frecuencia de aparición de células en cuatro niveles, siguiendo una escala exponencial de crecimiento en número de células del tejido embriogénico. Los niveles deberán ser definidos mediante ensayos previos al experimento final.

3.3 Tercer Etapa: Modificaciones al medio de cultivo y condiciones de incubación.

Objetivo particular: Encontrar la combinación óptima medio de cultivo-condición de incubación (luz-oscuridad) que favorezcan la formación de tejido embriogénico y/o embriones haploides.

Procedimiento:

Para el establecimiento aséptico del material se propone la técnica recomendada para la segunda etapa.

El medio de cultivo que se propone, es a partir del medio básico MS, los factores propuestos para evaluación son:

concentración de sacarosa (2%, 5%, 8%), con y sin vitaminas, con y sin aminoácidos (glutamina, serina), con y sin reguladores del crecimiento (variando la concentración).

En lo que respecta a condiciones de incubación se deberá evaluar el efecto de la luz-oscuridad.

Vaiables propuestas:

- Porcentaje de anteras con respuesta: es el cociente entre el número de anteras que presenten evidencia de formación de embriones y/o callos, y el total de anteras sembradas por tratamiento.
- Número de embriones y/o callos por antera: es el número promedio de embriones y/o callos que se produzcan por antera.

4.- TECNICA DE TINCION PROPUESTA

Si se desea obtener altas frecuencias de anteras con inducción a androgénesis, es de vital importancia ser capaz de identificar las etapas de desarrollo que conducen a la formación del polen. Existen variadas técnicas de tinción para el análisis del desarrollo en la formación del polen, de éstas, en el Laboratorio de Biotecnología de la FAUANL, fueron verificadas para el tomate, las técnicas descritas por Hernández (1990) y Curtis (1981). Ambas técnicas se seleccionaron debido a que los reactivos requeridos son económicos y fáciles de conseguir en el mercado. De éstas la denominada "método de frotis con carmín-propiónico" descrita por Hernández (1990) fue la que dió resultados positivos.

En los siguientes apartados se describen las técnicas de Hernández (1990) y Curtis (1981), así como los resultados obtenidos en el Laboratorio de Biotecnología de la FAUANL. Previo a esto se establece el marco teórico que da sustento, en general, a ambas técnicas.

4.1 Técnicas para estudios cromosómicos.

Las técnicas para estudiar los cromosomas meióticos en plantas comprenden las operaciones básicas que se enlistan enseguida (Curtis, 1981) (Fig. 5) y posteriormente se describen.

A) Obtener el material (botones o inflorescencias);

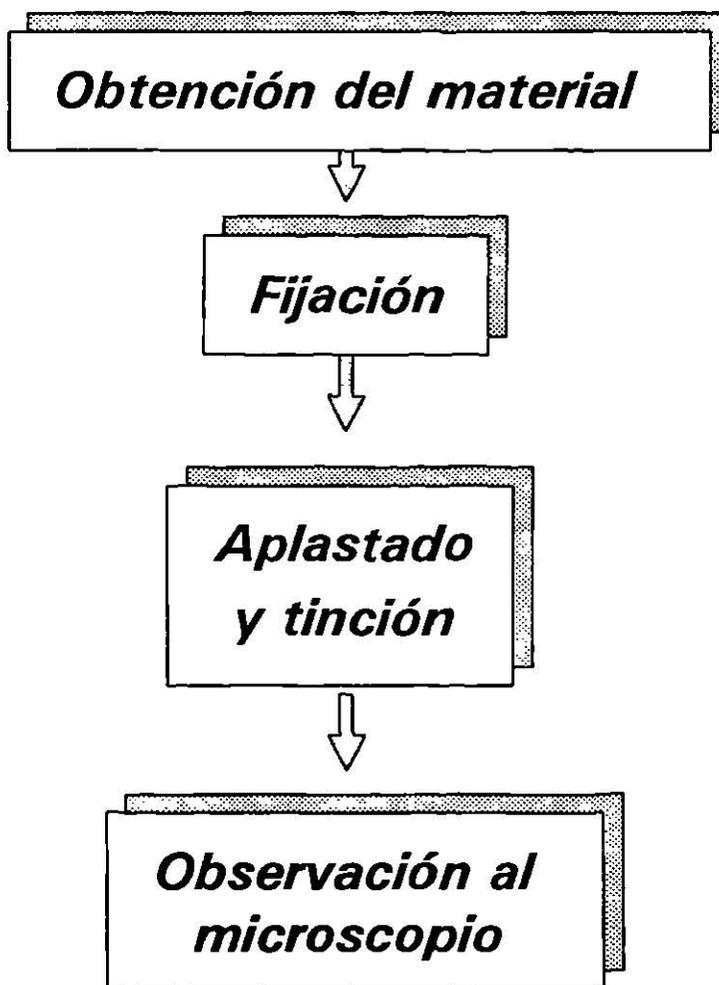
- B) Matar y fijar el material en mezclas fijadoras específicas para cromosomas.
- C) Disectar el material para obtener las partes apropiadas, principalmente anteras.
- D) Aplastar anteras para extraer y teñir las células en división meiótica; o bien teñir las anteras para después aplastarlas y así extraer los microsporocitos ya teñidos.
- E) Observar al microscopio.

4.1.1 Obtención del material.

El material para estudiar las divisiones meióticas debe colectarse antes de las 10 AM y en algunas plantas, como en las Poaceae (gramíneas), antes de las 8 AM durante los meses de verano. En algunos casos las divisiones meióticas pueden encontrarse a cualquier hora del día o de la noche, aunque lo más frecuente es que se den durante la mañana o al caer la tarde (Curtis, 1981).

En algunas plantas la actividad meiótica se realiza únicamente durante ciertas horas del día o de la noche. Un buen muestreo confirmará lo anterior y durante el proceso se encontrará que la meiosis se lleva a cabo a diferentes horarios, lo que hará necesario que se realicen pruebas de fijación a distintas horas, con el fin de captar el momento de mayor actividad meiótica (Hernández, 1990).

Fig. 5 Esquema general de las operaciones básicas para el estudio de cromosomas meióticos



4.1.2 Fijación

Una fijación es un tratamiento químico o físico efectuado sobre células vivas y que permite practicar posteriormente ciertas manipulaciones, con un mínimo de daño para las estructuras celulares (Durand, 1971).

Se puede definir la fijación como el proceso de preservación de la organización morfológica y del contenido químico del componente celular que se desea observar al microscopio (Curtis, 1981). Básicamente encontramos dos tipos de fijación, la química y la física; la primera es la más utilizada.

4.1.2.1 Fijación por tratamiento químico

La fijación por tratamiento químico se lleva a cabo sumergiendo las células en líquidos que se llaman fijadores (Durand, 1971).

Las principales funciones que tienen los líquidos utilizados, son las de matar y fijar a los tejidos; o sea, detener el proceso de vida sin que se distorsionen dichos tejidos, además de hacerlos lo suficientemente firmes para su manejo. Una de las operaciones más críticas en el procesamiento de tejidos es la muerte del citoplasma (Hernández, 1990).

Los líquidos fijadores pueden agruparse de acuerdo con las sustancias que los componen. Algunas fórmulas son inestables y deben utilizarse al instante; otras se elaboran

como soluciones concentradas, es decir, se hacen soluciones que por su característica estable pueden ser utilizadas durante mayores períodos. El tiempo necesario para la muerte y endurecimiento del material varía y se determina por el carácter del líquido usado, el volumen de la pieza individual y la resistencia del material a la penetración del reactivo (Hernández, 1990).

Un buen fijador para cromosomas debe cumplir con los siguientes requisitos (Curtis, 1981):

- a) Precipitar la cromatina para hacer visibles los cromosomas y favorecer su tinción;
- b) Penetrar rápidamente, con el objeto de matar instantáneamente el tejido y así fijar las diversas fases de la división celular;
- c) Evitar la autólisis y la descomposición.

De acuerdo a la imagen que producen, los fijadores se clasifican en básicos y ácidos. Los básicos son muy pocos. Los fijadores ácidos son los más comúnmente empleados en el estudio de cromosomas (García, 1977).

Los fijadores ácidos utilizados comúnmente para estudios cromosómicos son (Curtis, 1981):

- 1) La mezcla de Farmer. Se compone de tres partes de alcohol etílico absoluto y una parte de ácido acético glacial.
- 2) Mezcla de Carnoy. Se hace usando seis partes de alcohol

etílico absoluto, una parte de ácido acético glacial y tres partes de cloroformo.

Para conservar el material fijado en Farmer se debe eliminar el fijador lavándolo en varios cambios (dos o tres) de alcohol etílico al 70%, para después transferirlo de nuevo a alcohol etílico al 70%, con el que se conserva en refrigeración (Curtis, 1981).

La solución fijadora se debe hacer inmediatamente antes de usarla, ya que el acetato de etilo que se forma al hacer esta mezcla es causa de una mala fijación (Curtis, 1981).

El tiempo de fijación varía de sólo unos minutos hasta varios días, en función, principalmente, del material y del propósito por el cual se hace la preparación. Sin embargo para determinar el número de cromosomas, el período de fijación no es tan crítico y se puede extender a 24 horas (Curtis, 1981).

4.1.2.2 Fijación por tratamiento físico

El tratamiento físico generalmente empleado para la fijación es la congelación, se realiza por inmersión en un líquido a baja temperatura (nitrógeno líquido -196°C) o por expansión de gas carbónico comprimido (-60°C) cerca del material a fijar (Durand, 1971).

4.1.3 Aplastado de anteras

La mejor forma de estudiar el número, morfología y comportamiento de los cromosomas durante la meiosis es utilizar aplastados de anteras. Estos aplastados deberán mostrar células (microsporocitos) bien separadas y aplanadas, con los cromosomas bien teñidos y con el citoplasma lo más claro posible (Curtis, 1981).

4.2 Técnicas de Fijación y Tinción

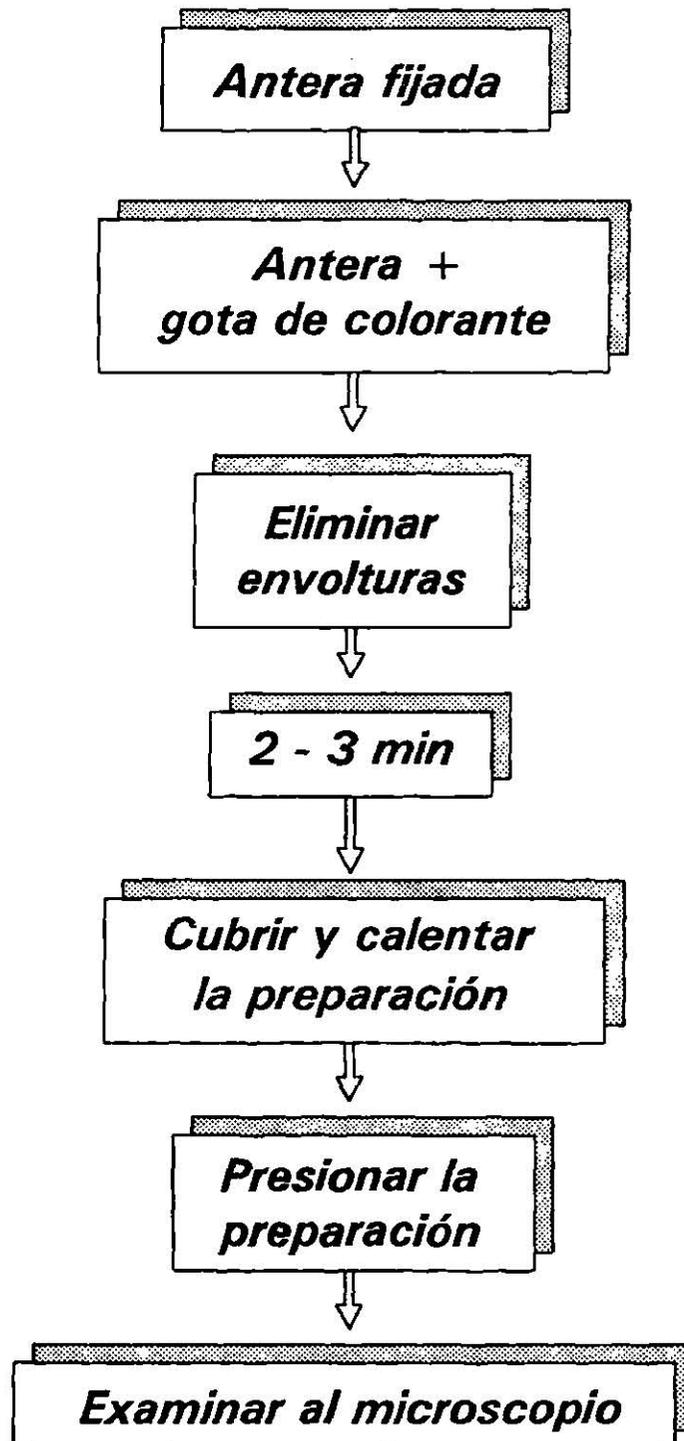
4.2.1 Método de frotis con carmín-propiónico:

Este método se recomienda para el estudio de cromosomas en material fresco o previamente fijado. Es un método muy rápido, pues combina la fijación y coloración de los tejidos en un mismo proceso (Hernández, 1990) (Fig. 6).

Procedimiento

- 1.- Las anteras (frescas o fijadas en Carnoy o Farmer) se colocan en un portaobjetos al que se agrega una gota de solución colorante. Con un escalpelo se cortan las anteras por la mitad y con la punta del mismo se presiona sobre ellas para extraer la masa de microsporocitos. Las envolturas de las anteras se extraen con unas pinzas de disección.
- 2.- Los microsporocitos se dejan teñir por espacio de 2 a 3 minutos, sin cubrir la preparación con el cubreobjetos.
- 3.- Se coloca cuidadosamente un cubreobjetos sobre la

Fig. 6 Método de frotis con carmín-propiónico
(Hernández, 1990)



gota de colorante con los esporocitos; se calienta la preparación haciéndola pasar sobre la flama de una lámpara de alcohol, y se presiona muy suavemente, sin movimientos laterales, sobre un papel filtro o toalla de papel absorbente.

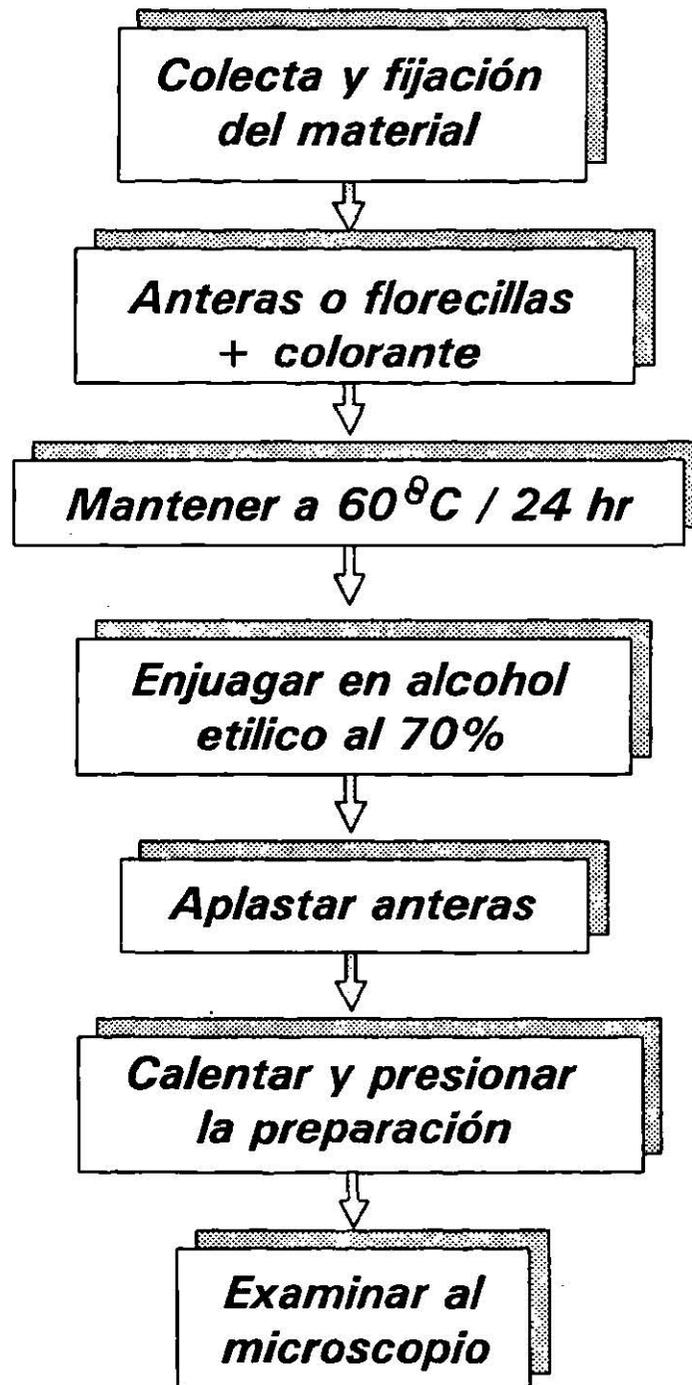
- 4.- Se examina la preparación con el microscopio.
- 5.- Si se obtienen resultados deseados, se procede a sellar la preparación, en forma temporal o definitiva, según se desee.

4.2.2 Procedimiento con carmín de Snow (Curtis, 1981)

(Fig. 7):

- a) Colectar y fijar el material en Farmer por uno o dos días.
- b) Decantar el fijador y eliminar sus restos con dos o tres cambios de alcohol etílico al 70%, dejando el material al menos una hora en cada cambio.
- c) Con la ayuda de una aguja de disección y de un escalpelo, se extraen varias anteras del botón floral o florecillas de la inflorescencia, se meten en un recipiente con una cantidad de colorante, que es dos a tres veces la que se necesita para cubrir el material. Tapar el recipiente y meterlo en una estufa a 60°C durante toda la noche. Esto no causa daño. Algunos materiales pueden necesitar 24, 48 o más horas en el colorante.

Fig. 7 Procedimiento con carmín de Snow
(Curtis, 1981)



- d) Las anteras se enjuagan con alcohol etílico al 70%. Se preparan aplastados, sólo que con ácido acético al 45% en lugar de acetocarmin.
- e) Diferenciar calentando cuidadosamente la preparación sobre la flama de una lámpara de alcohol.
- f) Colocar la preparación entre papel toalla o papel filtro y ejercer presión suave sobre el cubreobjeto con un tapón de hule, con el propósito de separar y aplanar adicionalmente las células.
- g) Examinar al microscopio.

4.3 Soluciones Colorantes

En el microscopio óptico las células se ven vacías, esto es, los cromosomas son poco visibles a causa de poseer una densidad muy similar con el citoplasma circundante. Por tal motivo, se hace necesario teñir los cromosomas a fin de que sean visibles en el microscopio óptico (García, 1977).

4.3.1 Preparación del colorante Carmín (Hernández, 1990):

Se pesa un gramo de colorante carmín y se disuelve en 100 cc de ácido propiónico (o acético) al 45% con agua destilada y se pone a hervir a fuego lento (de preferencia se pone a hervir primero la solución ácida y cuando empieza la ebullición se agrega el colorante teniendo cuidado de que éste no salpique). Se enfría y se filtra. La solución colorante se debe guardar bajo refrigeración. El ácido

propiónico puede ser substituido por ácido acético glacial a la misma concentración.

4.3.2 Preparación del colorante Carmín de Snow (Curtis, 1981):

Agregar 4 g de carmín (colorante certificado) y 1 ml de HCl concentrado a 15 ml de agua destilada. Mezclar bien y hervir suavemente por diez minutos mientras se agita. Enfriar. Agregar 95 ml de alcohol etílico al 85% y filtrar. Guardar el colorante en una botella con tapón de vidrio.

4.4 Resultados del Estudio.

Al realizar las observaciones en preparaciones temporales la técnica con carmín de Snow produjo tinción acentuada tanto en cromosomas como en citoplasma por lo que fue difícil discernir entre ambas estructuras, por consecuencia no fue posible distinguir las fases de la meiosis. Por otra parte los resultados indicaron que la técnica con carmín-propionico produjo mejor tinción y contraste sobre todo en los cromosomas (Fig. 8). Esto es importante puesto que permitirá al momento de efectuar los trabajos de cultivos de anteras, verificar previo a la siembra, la fase meiótica de las microsporas en los botones seleccionados.



Fig. 8 Microfotografía de microsporas en metafase II. Obsérvese la nitidez en la tinción de cromosomas que hace que se distingan del citoplasma. La técnica utilizada es la descrita por Hernández (1990).

5.- BIBLIOGRAFIA

- Allard, R.W. 1967. Principios de la Mejora Genética de las Plantas. 1ª Edición. Ediciones Omega S.A. Barcelona, España. pp 218-219.
- Bajaj, Y.P.S. 1983. In vitro production of haploids. In: Handbook of Plant Cell Culture. Macmillan, New York. Edited by D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato and Y. Yamada. pp 246-260.
- Campos M., L. 1971. Influencia de dos Sistemas de Poda en el Cultivo de Tomate (Lycopersicum esculentum Mill) en Espaldera. Tesis de Licenciatura, Facultad de Agronomía. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Curtis P., J. 1981. Manual para la Elaboración de Preparaciones Cromosómicas en Plantas. 1ª Edición. Universidad Autónoma de Chapingo. Chapingo, México. pp 22-23, 39-43.
- Dodds, J.H. and L.W. Roberts. 1982 Anther and pollen culture. In: Experiments in Plant Tissue Culture. First Published. Cambridge University Press. Printed in United States of America. pp 127-130.
- Dunwell, J.M. 1985. Haploid Cell Cultures. in Plant Cell Culture. 1ª Edición. Edited by R.A. Dixon. IRL Press. Washington, D.C. pp 21-35.
- Gresshoff, P.M. and C.H. Doy. 1972. Development and Differentiation of Haploid Lycopersicum esculentum (Tomato) Planta (Berl.) 107, 161-170.
- Hernández S., M. 1990. Manual de Laboratorio. Citología y citogenética. 1ª Edición. Editorial Trillas, México D.F. pp 44, 68-69.
- Jaramillo, J. and W.L. Summers 1991. Dark-Light Treatments Influence Induction of Tomato Anther Callus. Hort Science 26(7):915-916.

- Maroto B., J.V. 1986. Horticultura Herbácea Especial. 2ª Edición. Ediciones Mundi-prensa. Madrid, España. pp 351-352.
- McGregor, S.E. 1976. Insect Pollination of Cultivated Crop Plants. Agricultural Research Service. United States Department of Agriculture. Washington, D.C. pp 357-359.
- Nitsch, C. 1981. Production of Isogenic Lines: Basic Technical Aspects of Androgenesis. In Plant Tissue Culture. Edited by T.A. Thorpe. Academic Press, Inc. Printed in the United States of America. pp 241-250.
- Ochoa A., N. 1985. Cultivo de Anteras. En: Fundamentos Teóricos-prácticos de Cultivo de Tejidos Vegetales. Editado por V. M. Villalobos A. Laboratorio de Biotecnología, Centro de Genética. Colegio de Postgraduados, Chapingo, México. pp 107-109.
- Ortega R., M. 1986. Nuevo Método de Mejoramiento Genético del Tabaco. Agro-síntesis. pp 25-26, 28-29.
- Reinert, J. and Y.P.S. Bajaj 1977. Anther Culture: Haploid Production and Its Significance. In: Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue, and Organ Culture. Edited by Reinert, J. and Y.P.S. Bajaj. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg New York. pp 255-257.
- Roca, W.M., V.M. Nuñez y K. Mornan. 1991. Cultivo de Anteras y Mejoramiento de Plantas. En: Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Editado por William M. Roca y Luis A. Mroginski. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. pp 272-290.
- Sánchez S., D. 1980. La Flora del Valle de México. Sexta edición. Editorial Herrero. México. pp 344-345.
- Willcox, M.C., S.M. Reed., J.A. Burns and J.C. Wynne. 1991. Effect of microspore stage and media on anther culture of peanut (*Arachis hypogaea* L.). Plant Cell and Organ Culture. 24: 25-28.

BIBLIOTECA Agronomía U.A.N.I.

11706

