

NOTA

ESTUDIOS CITOGENÉTICOS DE ESTRUCTURAS EMBRIOGÉNICAS Y PLÁNTULAS REGENERADAS DE ONOTO¹

Claret C. Michelangeli de Clavijo*, Ada M. Medina M.**,
Paola I. Artioli G.*** y Jonás Mata**

RESUMEN

En la actualidad se cuenta con un protocolo de regeneración de plántulas de onoto, *Bixa orellana* L., mediante la embriogénesis somática (ES) a partir del cultivo de anteras, el cual ha sido probado eficientemente en varios genotipos. Con la finalidad de determinar si las plántulas obtenidas eran haploides, o si había ocurrido una duplicación espontánea de los cromosomas, se realizaron estudios citogenéticos a embriones normales y anormales, así como a plántulas cultivadas *in vitro* y plantas aclimatadas regeneradas por esta técnica en umbráculo. Se describen los procesos de prefijación, fijación, hidrólisis y tinción más eficientes para cada uno de los materiales evaluados. Las observaciones citológicas realizadas mostraron que fueron haploides (n=8 cromosomas), percibiéndose una gran estabilidad en el número cromosómico en las diferentes fases evaluadas. Estos estudios ponen en evidencia la importancia de obtener información relevante sobre la estabilidad genética que permitiría establecer protocolos con el uso de agentes mutagénicos (colchicina) en programas de mejoramiento en onoto donde se pretenda obtener plantas dihaploides ciento por ciento homocigotas, mediante la técnica de ES a partir del cultivo de anteras.

Palabras Clave: *Bixa orellana* L.; cultivo de anteras; haploide.

1 Financiado por Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (FONACIT) bajo el proyecto S1 97001619

* Directora del Centro de Investigaciones en Biotecnología Agrícola (CIBA) Apdo. 4579. Maracay 2101. estado Aragua. Venezuela.

** Profesores. Universidad Central de Venezuela (UCV). Facultad de Agronomía. Instituto de Genética. Apartado postal 4579. Maracay 2101. Aragua. Venezuela.

*** Auxiliar docente, CIBA. Apdo. 4579. Maracay 2101, estado Aragua. Venezuela.

RECIBIDO: junio 01, 2005.

NOTA

CYTOGENETIC STUDIES OF ANNATO EMBRYOGENIC STRUCTURES AND REGENERATED PLANTLETS

Claret C. Michelangeli de Clavijo*, Ada M. Medina M.**,
Paola I. Artioli G.*** y Jonás Mata**

SUMMARY

At this time, a protocol for regeneration of plantlets through somatic embryogenesis from annatto, *Bixa orellana* L., anthers has been efficiently achieved in different genotypes. In order to verify if plantlets obtained were haploid or if spontaneous chromosome duplication had occurred, cytogenetic studies were made on normal and abnormal embryos, as well as on *in vitro* cultivated and acclimatized plants regenerated by this technique in the greenhouse. A description of the most efficient processes of prefixation, fixation, hydrolysis and dyeing for each genetic material evaluated is presented. According to mitotic countings, they were all haploids (n=8 chromosomes), showing great stability in chromosome number at different phases. These studies indicate the importance of obtaining relevant information on genetic stability in order to establish protocols using mutagenic agents such as colchicine in breeding programs where dihaploids annatto plants are to be obtained by means of somatic embryo techniques from anther culture.

Key Words: *Bixa orellana* L.; anther culture; haploid.

1 Financiado por Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (FONACIT) bajo el proyecto S1 97001619.

* Directora del Centro de Investigaciones en Biotecnología Agrícola (CIBA) Apdo. 4579. Maracay 2101. estado Aragua. Venezuela.

** Profesores. Universidad Central de Venezuela (UCV). Facultad de Agronomía. Instituto de Genética. Apartado postal 4579. Maracay 2101. Aragua. Venezuela.

*** Auxiliar docente, CIBA. Apdo. 4579. Maracay 2101, estado Aragua. Venezuela.

RECIBIDO: junio 01, 2005.

INTRODUCCIÓN

En estudios recientes sobre la embriogénesis somática (ES) en onoto, *Bixa orellana* L., se demostró la capacidad de inducir callo y regenerar plantas a partir del cultivo de anteras (Michelangeli de Clavijo *et al.*, 2002a). Esto representa una herramienta muy útil ya que la producción de haploides y posterior generación de individuos homocigóticos en una sola generación permite acortar la duración de los programas de mejoramiento genético, comparado con las técnicas convencionales (Moraes-Fernandes *et al.*, 1999).

Mediante la homocigocidad, es posible la producción de híbridos F1 puros; además facilita al mejorador en los estudios de herencia y combinación de caracteres deseables, así como la distinción de mutaciones recesivas de forma inmediata, evitando la aparición de quimeras (Pierick, 1990). A través de la selección de individuos homocigotas se pueden desarrollar nuevas variedades con caracteres deseables como el incremento de la cantidad y calidad (color) del pigmento producido en las semillas de onoto, así como uniformidad en la cosecha, cápsulas indehiscentes y resistencia a plagas y enfermedades.

La mayoría de las plantas obtenidas por cultivo de anteras son haploides; sin embargo, en algunas especies ocurre una duplicación espontánea de los cromosomas en las primeras etapas de desarrollo de callo y de regeneración de la planta (Guo y Pulli, 2000; Roca *et al.*, 1991). En otros casos, para que ocurra el proceso de diploidización se requiere el uso de agentes mutagénicos como la colchicina, que inhibe la formación de microtúbulos y la migración polar de los cromosomas, lo que resulta en una célula con número cromosómico duplicado (Barnabás *et al.*, 1999; Redha *et al.*, 1998).

Adicionalmente, la variación somaclonal es un fenómeno general que pudiera surgir tras la regeneración de plantas a partir de una fase callosa como consecuencia de variaciones genéticas, por tanto puede exhibir caracteres fenotípicos o bioquímicos diferentes a los del material parental original. Tales cambios a veces resultan indeseables porque pueden asociarse con una inestabilidad cromosómica (Lindsey y Jones, 1992) o necesarios como fuente de nueva variabilidad para los programas de mejoramiento (Tabares *et al.*, 1991).

Por tanto, cuando se llevan a cabo investigaciones sobre morfogénesis *in vitro*, particularmente cuando éstas involucran una fase de callo o se

usan como explante tejidos de anteras y/o microsporas, sea con fines de mejoramiento o propagación, se hace necesario evaluar todo el proceso de desarrollo de embriones y plántulas para determinar su estabilidad. En consecuencia, es imprescindible conocer inicialmente el número cromosómico gametofítico de la especie bajo estudio y contar con protocolos de conteo de cromosomas que permitan comprobar la posible presencia de variaciones en el número cromosómico.

En tal sentido, en onoto se cuenta con estudios citogenéticos a partir de células madre de las microsporas en metafase I donde se confirmó el número cromosómico haploide de $n=8$ cromosomas (Michelangeli de Clavijo *et al.*, 2002b), pero se necesita información sobre la estabilidad de los ES obtenidos a partir de cultivo de anteras.

En la presente investigación se planteó como objetivo determinar el nivel de ploidía durante todas las fases de la ES a partir de cultivo de anteras hasta la regeneración de plantas de onoto; es decir, en ES, plántulas *in vitro* y plantas aclimatadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en el laboratorio de Cultivo de Tejidos y el Laboratorio de Citogenética del Centro de Investigaciones en Biotecnología Agrícola (CIBA), de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela. Se utilizaron ES (normales y anormales) y plantas de onoto obtenidas por cultivo de anteras en medio suplementado con ANA (4mg l^{-1}) y BA (2 mg l^{-1} ; Michelangeli de Clavijo *et al.*, 2002a y b), tanto en fase de plántula como aclimatada en invernadero, asegurando el estudio citogenético a lo largo de todas las fases involucradas en el proceso (embrión-planta).

Estudios citogenéticos

El procedimiento empleado para el estudio citogenético de los embriones (normales y anormales) consistió de una prefijación con solución saturada de paradichlorobenceno durante 2 horas, seguido de 3 lavados con agua destilada de 2 min cada uno, después una fijación con una solución de Carnoy (etanol 95%: ácido propiónico 3:1) a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 min y finalmente, 3 lavados de 5 min con etanol 70%.

Para el proceso de tinción, se procedió a colocar los embriones sobre un portaobjeto al que se le añadió una gota de carmín propiónico 2%. Seguidamente, se pasó sobre la llama de un mechero, evitando su ebullición y eliminando el colorante con un papel secante; este proceso se repitió 3 veces consecutivas. Nuevamente se agregó una gota de colorante, presionando la masa embriogénica con una vara de vidrio. Con la ayuda de una pinza se extrajo el exceso de tejido, se añadió otra gota de colorante, colocándose en el cubreobjeto, retirando el exceso del mismo y sellándolo de forma semipermanente con esmalte transparente para uñas.

En el caso de plántulas obtenidas por cultivo de anteras, se realizó una prefijación de las hojas igual a la descrita para masa embriogénica. Seguidamente, fue efectuada la fijación con ácido cítrico 0,1 N en buffer citrato de sodio pH 4,4-4,8 a 60 °C por 15 min, seguido de 3 lavados de 2 min con Buffer citrato de sodio. Posteriormente se realizó una hidrólisis con ácido clorhídrico 1 N a 60 °C por 7 min y 3 lavados con agua destilada de 3 min cada uno.

Para el montaje se cortaron trocitos de hoja con la ayuda de un bisturí, los cuales fueron aplastados suavemente con la vara de vidrio, agregando una gota de ácido acético 45% para después cubrirlo con cubreobjeto. El cubreobjeto fue removido con hielo seco, realizando un pase rápido en etanol 95%, para luego dejarse en la estufa a 60 °C por 2 h. Finalmente se procedió a la incubación con hidróxido de potasio (KOH) 0,07 N, un lavado con Buffer fosfato de Sorensen pH 6,8 y secado en estufa a 55 °C por 24 h. La tinción se llevó a cabo con Giemsa 10% en Buffer fosfato de Sorensen pH 6,8, un pase rápido en etanol 95% y montaje permanente con Euparal.

En el caso de las plantas regeneradas por esta técnica y aclimatadas en umbráculo, se realizó una prefijación con 8-Hidroxiquinolina 0,03% durante 2 h, seguido de 3 lavados de 5 min con agua destilada. La fijación se realizó con Carnoy (etanol 98% : ácido acético glacial 3:1) a 60 °C por 15 min, seguido de Etanol 70% (3 lavados de 5 min cada uno). A continuación, se realizó una hidrólisis similar a la efectuada en plántulas; pero, pasando los trocitos de lámina foliar por una malla de 6 µm de diámetro con el fin de retirar restos de tejido y dejar sólo las células, esto debido a la mayor consistencia de los mismos. Seguidamente se centrifugó a 10 000 rpm durante 20 min, eliminando el sobrenadante, recogiendo el pellet en un portaobjeto con una gota de ácido acético 45%, para ser colocado el cubreobjeto. La remoción de éste se hizo con

hielo seco y un pase breve en etanol 95%, dejándose sobre plancha a 38 °C durante 24 h. Los procesos de incubación y tinción fueron realizados de forma similar al anterior.

Los registros fotográficos se realizaron con un microscopio óptico y cámara digital, adosada a una computadora para la obtención de imágenes digitales con un aumento máximo de 1 600x.

Se efectuaron una serie de estudios preliminares con colchicina para evaluar su efecto como agente de duplicación cromosómica en explantes de callo embriogénico y ES, probándose diferentes concentraciones (100 y 500 mg l⁻¹) añadidas al medio de cultivo previamente esterilizada con filtro milipore y dos tiempos de exposición (48 y 72 h). Estos estudios representan sólo un inicio en las investigaciones con colchicina como agente de duplicación cromosómica en onoto ya que no existen trabajos previos en el área, por tanto se presenta un análisis general descriptivo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante todo el proceso de ES a partir de cultivo de anteras hasta la regeneración de plantas de onoto en umbráculo no hubo evidencia de variación somaclonal ni de duplicación espontánea de los cromosomas. Las observaciones citogenéticas realizadas en ES normales y anormales, así como en plántulas obtenidas mediante el cultivo de anteras y plantas regeneradas por esta técnica mostraron que fueron haploides, tomando en cuenta que el número cromosómico gametofítico de la especie es n=8 cromosomas.

En la Figura 1 se muestra la regeneración de plantas haploides de onoto durante algunas de sus fases: masa embriogénica; **a)** plántula *in vitro*; **b)** y planta de onoto aclimatada en umbráculo; **c)**, asimismo, se presentan células en metafase mostrando el número haploide (n=8 cromosomas) en ES aglomerados (anormales); **d)**, ES normales; **e)**, plántula *in vitro*; **f)** y planta aclimatada en umbráculo; **g)**, estos estudios demuestran la estabilidad en el número cromosómico durante todas las fases de la ES a partir de cultivo de anteras, hasta la regeneración de plantas de onoto.

En relación a los estudios citológicos preliminares con colchicina, los explantes de callo embriogénico mostraron células en división activa, isodiamétricas, citoplasma denso y pared celular definida (Figura 2); lo que parece indicar que se trata de células embriogénicas. Por lo tanto,

bajo las condiciones de este estudio la presencia de colchicina en el medio aparentemente no afectó el desarrollo de los ES. En el caso de las células provenientes de los ES, los resultados fueron similares a los de callo embriogénico.

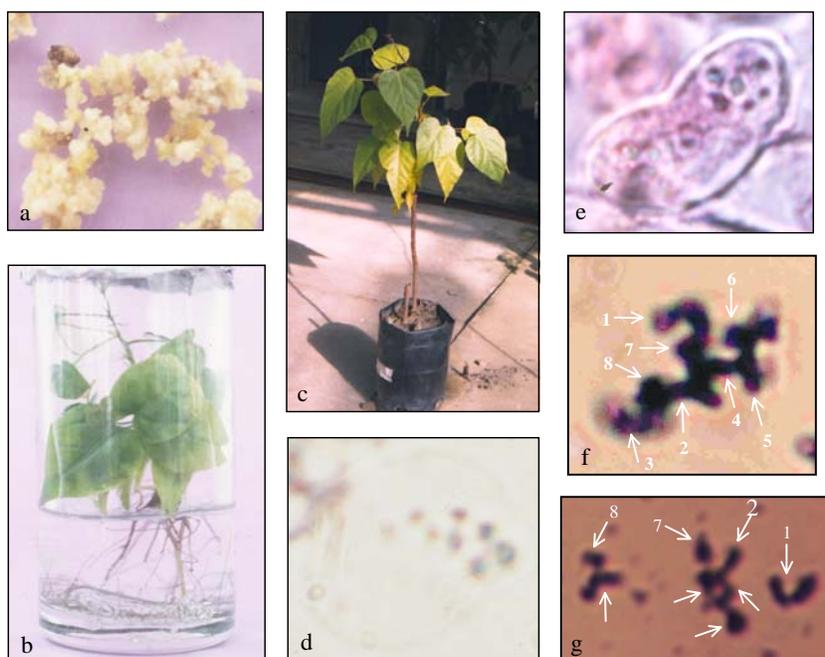


FIGURA 1. Regeneración de plantas haploides de onoto obtenidas por cultivo de anteras; **a)** Masa de embriones en diferentes estados de desarrollo; **b)** Plántula haploide a los 90 días de cultivo en medio básico $\frac{1}{2}$ MS; **c)** Planta de onoto aclimatada en umbráculo; **d)** Cromosomas ($n=8$) en embriones somáticos aglomerados teñidos con carmín propiónico 2% (1 600X); **e)** Cromosomas ($n=8$) en embriones somáticos normales teñidos con carmín propiónico 2% (1 000X); **f)** Cromosomas ($n=8$) en lámina foliar de plántula cultivada *in vitro* teñidas con Giemsa 10% (500X); **g)** Cromosomas ($n=8$) en lámina foliar de plantas aclimatadas en umbráculo teñidas con Giemsa 10% (200X). Las flechas señalan los diferentes cromosomas en su condición haploide.

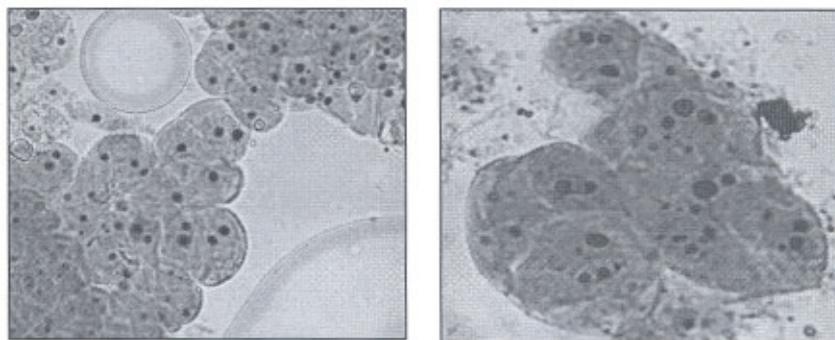


FIGURA 2. Callos embriogénicos de onoto expuestos al agente mutagénico colchicina.

En el trabajo no se evidenció duplicación cromosómica (Figura 2), indicando que las concentraciones de colchicina utilizadas fueron bajas o el tiempo de exposición a la misma fue corto. En consecuencia, se deberán continuar realizando estudios con colchicina en callos embriogénicos para seguir evaluando su efecto como agente de duplicación cromosómica, tomando en cuenta factores como concentración y tiempo de exposición, entre otros.

Una vez lograda la diploidización, las plantas entrarían en un programa de mejoramiento con el fin de desarrollar nuevos genotipos de onoto con caracteres deseables, tales como: incremento de la cantidad y calidad del pigmento producido en las semillas, uniformidad en la cosecha, cápsulas indehiscentes y resistencia a plagas y enfermedades, entre otras. De esta manera se formarían poblaciones de donde se podrían ofrecer al agricultor materiales sobresalientes para la siembra.

BIBLIOGRAFÍA

BARNABÁS, B., B. OBERT and G. KOVÁCS. 1999. Colchicine, an efficient genome doubling agent for maize (*Zea mays* L.) microspores cultured in anthero. *Plant Cell Reports* 18: 858-862.

GUO, Y. and S. PULLI. 2000. Isolated microspore culture and plant regeneration in rye (*Secale cereale* L.). *Plant Cell Reports* 19:875-880.

LINDSEY, K. y M. JONES. 1992. Biotecnología vegetal agrícola. Editorial Acribia, SA. Zaragoza, España. 275 p.

MICHELANGELI de CLAVIJO, C., P. ARTIOLI y A. MEDINA. 2002a. Embriogénesis somática en onoto. *Agronomía Trop.* 52(4):523-541.

MICHELANGELI de CLAVIJO, C., A. MEDINA, P. ARTIOLI y J. MATA. 2002b. Microsporogénesis y microgametogénesis de onoto (*Bixa orellana* L.). *Acta Científica Venezolana* 53:171-175.

MORAES-FERNANDES, M., A. STIVAL, S., PATUSSI et M. FERRARI. 1999. Haplodiploidização: genética y mejoramiento. **In:** Cultura de tejidos e transformação genética de plantas. Volume 2. Antonio Carlos Torres, Linda Styer Caldas y José Amauri Buso, eds. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. pp. 613-650.

PIERICK, R. 1990. Cultivo *in vitro* de plantas superiores. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. España.

REDHA, A., T. ATTIA, B. BÜTER, S. SAISINGTONG, P. STAMP and J. SCHMID. 1998. Improved production of doubled haploids by colchicine application to wheat (*Triticum aestivum* L.) anther culture. *Plant Cell Reports* 17:974-979.

ROCA, W., V. NÚÑEZ y K. MORNAN. 1991. Cultivo de anteras y mejoramiento de plantas. **In:** Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Wiliam Roca y Luis Mroginski editores. CIAT, Colombia. 969 p.

TABARES, E., J. PACHÓN y W. ROCA. 1991. Variación somaclonal y su aplicación al mejoramiento de cultivos. **In:** Cultivo de tejidos en la agricultura. W. Roca y L. Mroginski (eds). Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Colombia. 969 p.