



Título del artículo.

Cultivo de anteras en jitomate (*Solanum lycopersicum*).

Título del artículo en idioma inglés.

Crop of anthers in tomato (*Solanum lycopersicum*)

Autores.

Noe Alarcón Cruz
Juan Porfirio Legaria Solano

Referencia bibliográfica:

MLA

Alarcón Cruz, Noe, Juan Porfirio Legaria Solano. "Cultivo de anteras en jitomate (*Solanum lycopersicum*)".
Tlamati 9.1, 2018: 11-14. Print.

APA

Alarcón Cruz, N., Legaria Solano, J. P. (2018). Cultivo de anteras en jitomate (*Solanum lycopersicum*).
Tlamati, 9(1), 11-14.

ISSN: 2007-2066.

Publicado el 30 de Junio del 2018

© 2018 Universidad Autónoma de Guerrero

Dirección General de Posgrado e Investigación

Dirección de Investigación

TLAMATI, es una publicación trimestral de la Dirección de Investigación de la Universidad Autónoma de Guerrero. El contenido de los artículos es responsabilidad exclusiva de los autores y no refleja de manera alguna el punto de vista de la Dirección de Investigación de la UAGro. Se autoriza la reproducción total o parcial de los artículos previa cita de nuestra publicación.



Cultivo de anteras en jitomate *Solanum lycopersicum*

Noé Alarcón Cruz¹
Juan Porfirio Legaria Solano^{1*}

¹Universidad Autónoma Chapingo, Departamento de Fitotecnia. Carretera México-Texcoco Km 38.5, Texcoco de Mora, México. C. P. 56230. Tel: (+52) 595 9521616

*Autor de correspondencia
legarias.juan@yahoo.com

Resumen

La presente investigación se realizó con el propósito de explorar la posibilidad de obtener plantas haploides, que puedan ser utilizadas en el mejoramiento genético, para lo cual se estableció una metodología básica para el cultivo *in vitro* de anteras de jitomate. Se probó el medio de cultivo líquido Murashige y Skoog, así como las concentraciones de: 0.0, 0.3, 1.0, 3.0 de ANA y Kinetina. La formación de embriones fue posible después de siete semanas, en el medio con las concentraciones de 0.3 y 0,3 mg l⁻¹ de ANA y Kinetina respectivamente, con una tasa de respuesta de embriogénesis a partir de anteras del 56%.

Palabras clave: *Solanum sp.*, haploides, medio de cultivo (MS), reguladores del crecimiento, cultivo de tejidos

Abstract

This study aims to explore a possibility for obtaining haploids plants which could be used in genetic improvement. A basic methodology was established for *in vitro* cultivation of tomato anthers. Medium liquid culture Murashige and Skoog was tested; as well as concentrations of: 0.0, 0.3, 1.0, 3.0 of ANA and Kinetina. Embryo formation was possible after seven weeks in this way with concentrations of 0.3 and 0,3 mg l⁻¹ of ANA and Kinetina respectively, with a rate of response of embryogenesis from anthers of 56 %.

Keywords: *Solanum sp.*, haploid, crop medium (MS), growth regulators, tissue cultivation

Como citar el artículo:

Alarcón Cruz, N. y Legaria Solano, J. P. (2018). Cultivo de anteras en jitomate *Solanum lycopersicum*. *Tlamati*, 9(1), 11-14.

Introducción

El cultivo de anteras es una de las técnicas más sencillas para obtener callo, embriones y plantas haploides derivadas de las microsporas en un tiempo relativamente corto. La duplicación de cromosomas de las plantas haploides mediante la aplicación de colchicina en las etapas tempranas del desarrollo permite obtener dihaploides, los cuales pueden ser utilizados para producir líneas isogenéticas en una o dos generaciones, mientras que a través de los métodos convencionales de mejoramiento se requieren numerosos ciclos de autofecundación para obtenerlas (Hurtado y Merino, 1987).

En 1964, Guha y Maheshwari descubrieron que el polen de *Datura innoxia* podía ser modificado en su crecimiento normal hacia la formación de embriones, por el simple hecho de cultivarlo intacto dentro de la antera. Desde entonces, la formación de plantas se ha logrado directamente vía androgénesis o indirectamente vía callo, en cerca de 200 especies, principalmente de las familias Solanaceae, Gramineae y Cruciferae (Bajaj, 1983).

El proceso de androgénesis es afectado por numerosos factores, entre los que destacan el genotipo y estado fisiológico de la planta donadora, la etapa de desarrollo de las microsporas, el pre tratamiento de las anteras y la composición del medio de cultivo, entre otros. Como consecuencia de lo anterior, la principal dificultad en el cultivo de anteras y polen en la mayoría de las especies estudiadas, es la baja frecuencia de plantas producidas (Chu, 1982; Bajaj, 1983). Según Sunderland y Dunwell (1977), algunas Solanáceas presentan androgénesis en un medio basal simple con vitaminas y concentraciones bajas de sacarosa (2-5 %), la adición de reguladores de crecimiento puede inhibir la respuesta *in vitro* u originar la formación de callo. Además, la etapa de desarrollo de las microsporas más adecuadas para el cultivo de anteras es la de microspora uninucleada, obteniéndose también buenos resultados con microsporas antes, durante o después de la primera mitosis.

En poblaciones de plantas regeneradas a partir de anteras cultivadas, no sólo se llega a obtener haploides, también es común la formación de no haploides (incluyendo diploides, poliploides y aneuploides). Tanto en especies

que muestran embriogénesis directa, como en aquellas que producen callo (Chu, 1982; Bajaj, 1983).

Segun Segui-Simarro y Nuez (2007), al realizar el cultivo de anteras de jitomate con meiocitos inmaduros, obtuvieron callos que mediante organogénesis regeneran a planta completa. No obstante, la eficiencia de este sistema es baja. Además, se observa mixoploidía en los callos, fenómenos de fusión nuclear de meiocitos y la aparición de regenerantes de origen somático en un número significativo. Por lo que el objetivo del presente trabajo es determinar la mejor concentración de reguladores de crecimiento combinados, que promuevan la formación de embriones a partir de anteras con el propósito de permitir a corto y mediano plazo el uso de dihaploides en un programa de mejoramiento genético por hibridación.

Materiales y métodos

El material vegetal utilizado consistió en botones de jitomate que se encontraban cerrados sin flores, ya que en ese momento no existió polinización, haciendo posible encontrar las anteras estériles. Los botones se desinfectaron con detergente 'mastween' 20ml, después se pasaron por hipoclorito de sodio al 20% durante 15 minutos y finalmente se lavaron con agua destilada estéril. En la campana de flujo laminar se realizaron los cortes para facilitar la obtención de anteras y una vez realizada la extracción de las anteras, se procedió a sembrar cuatro anteras por cada tubo con medio líquido en un puente de Heller.

El medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) (MS) incluye las sales inorgánicas al 100% y suplementado con los componentes inorgánicos, vitaminas (tiamina-HCl 0.4 mg/litro⁻¹), myoinositol 100 mg/litro⁻¹ y sacarosa 30 g/litro⁻¹. El pH se ajustó a 5.7+0.1. Se utilizaron botones florales de plantas de jitomate cultivadas en invernadero y las anteras se mantuvieron siempre durante el sembrado en una solución antioxidante para disminuir el efecto de obscurecimiento u oxidación, misma que contenía ácido cítrico 150 mg.litro⁻¹, ácido ascórbico 100 mg.litro⁻¹. Posteriormente, se incubaron bajo luz artificial.

Los factores en estudio fueron:

Reguladores de crecimiento (véase tabla 1): (Citocinina) Kinetina ; (Auxina) ANA.

Evaluación del crecimiento de embriones en (cm).

En los experimentos se utilizó un diseño experimental completamente al azar con 4 repeticiones. Las variables evaluadas fueron altura y diámetro de los embriones utilizando un vernier.

Resultados

Al realizar la técnica de cultivo de anteras inmaduras se observaron diferencias en todos los tratamientos, principalmente en la ausencia y presencia de formación de embriones sanos, aunque no todos de manera vigorosa. Posteriormente durante el análisis estadístico se planteó la hipótesis de igualdad de medias de tratamientos.

En el análisis la Pr>F tuvo un valor de 0.0001. Esto indica que al menos uno de los tratamientos a base de reguladores de crecimiento produjeron diferencias altamente significativas (P<.01, en este caso $\alpha=0.0001$), por lo que se procede a realizar una prueba de comparación de sus valores medios.

En la salida de SAS, se encontraron diferencias entre



Figura 1. Crecimiento de embriones de jitomate (T2) en el puente de Heller.

Tabla 1. Tratamientos con reguladores del crecimiento

Tratamiento	Kinetina	ANA	Tapa
T1	0.0	0.0	AMARILLA
T2	0.3	0.3	ROSA
T3	1.0	1.0	ROJA
T4	3.0	0.3	AZUL

las medias, y el tratamiento T2 (véase tabla 2) fue superior a todos los tratamientos.

Discusión

El propósito principal de este trabajo fue diferenciar los efectos en la respuesta que presentaba el cultivo de anteras, a diferentes concentraciones de dos reguladores del crecimiento. Es por ello que se evaluaron cuatro tratamientos obteniendo al menos uno con muy buena respuesta a la formación de embriones, siendo los tratamientos dos seguido posteriormente el tres (véanse figuras 1 y 2) coincidiendo con lo reportado por Nitsch (1977), quien menciona que la composición hormonal del medio es determinante para la iniciación de formación de embriones en el cultivo de anteras. Así mismo, Dunweli (1976) reporta que para controlar la androgénesis, es crucial la caracterización citológica y bioquímica de las etapas muy tempranas de la evolución de los granos de polen, a saber: la microesporogénesis, la ocurrencia de la división igual de las microesporas, la formación proembrionica, y el desarrollo de los embriones.

También, otro factor importante se refiere a las condiciones fisiológicas de la planta madre. Las anteras deben tomarse de flores producidas durante el inicio de la floración de la planta (Sunderland, 1971). Se ha tenido una gran producción de embriones a partir de plantas donadoras que crecieron bajo condiciones de alta intensidad luminosa en días cortos (Dunweli, 1976). Por lo tanto, particularmente creemos que todos los factores anteriormente mencionados coinciden con los resultados y que cada uno de ellos aporta en gran medida en el éxito de la producción de embriones.

Por otro lado, también se observó oxidación de anteras en los tratamientos uno y cuatro y este consistió en una aparición de un color marrón en el tejido de las anteras, designándose como oxidación. Las anteras que presentaron oxidación perdieron su turgencia y su color verde en los primeros días en el cultivo, adquiriendo finalmente una coloración marrón. Según Bidwell (1979), los cambios de coloración en el tejido son típicos de una respuesta al daño, en esta reacción está involucrada la enzima polifenol oxidasa, la cual oxida a los fenoles, produciendo quinonas, compuestos tóxicos e insolubles de color marrón. Además,



Figura 2. Crecimiento de embriones de jitomate con menor vigor (T3)

Tabla 2. Diferencias entre las medias.

TUKEY	AGRUPAMIENTO	MEDIA	N	TRAT
	A	1.07500	4	2
	B	0.77500	4	3
C	B	0.57500	4	4
C		0.42500	4	1

Medias con diferente letra dentro de columnas indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba de Tukey a una $P=0.05$

en el caso de los reguladores de crecimiento es importante mencionar que los únicos tratamientos que promovieron la respuesta in vitro de las anteras fueron los tratamientos dos y tres, estos se caracterizaron por tener concentraciones de 0.3 y 1.0 para ambos reguladores de crecimiento en los tratamientos respectivos. La principal respuesta obtenida fue la formación de embriones de las anteras en ambos tratamientos. En las figuras 1 y 2 se muestra la respuesta de las anteras de jitomate en el medio (MS) líquido con diferentes concentraciones de auxinas y citocininas. Puede verse que la formación de embriones fue muy variable en los diferentes tratamientos, excepto en los tratamientos dos y tres, los cuales parecen ser los más adecuados para inducir a la formación de embriones en las anteras. Por lo que se concluyó que los dos reguladores de crecimiento auxina y citocinina da mejor respuesta a concentraciones bajas, (0.3 mg/litro), para inducir la androgénesis de las anteras de jitomate. Esta información coincide con lo mencionado anteriormente por Sunderland y Dunwell (1977), donde señalan que la respuesta es igual en otras especies de Solanaceas.

Partiendo de lo anterior, los tratamientos uno y cuatro se consideraron como tejido dañado y las anteras que no sufrieron oxidación adquirieron una coloración verde, aumentando de tres a seis veces el tamaño de crecimiento de los embriones en los tratamientos tres y dos respectivamente. Así mismo, puesto que el cultivo de anteras seguirá considerándose el método potencialmente más eficaz y accesible para crear plantas haploides. Si se quiere desarrollar aún más el cultivo de anteras como una técnica usual de mejoramiento, es necesario abordar dos serias limitaciones siendo estas: la fuerte dependencia genotípica, y el escaso número de plantas regeneradas. Además, urge lograr que el cultivo de anteras sea accesible a otras especies cultivadas. También se debe prestar atención a estudios

comparativos del comportamiento tanto de líneas derivadas del cultivo de anteras, como de líneas generadas de manera convencional.

Conclusiones

Se logró establecer una metodología preliminar para el cultivo in vitro de anteras de jitomate, obteniéndose plantas en siete semanas en cultivo in vitro. El medio de cultivo más adecuado fue el que presentaba las concentraciones de reguladores de crecimiento de 0.3 y 0.3 mg/L de ANA y Kinetina respectivamente.

Durante la evaluación del crecimiento de los embriones con el mejor tratamiento se alcanzó a los 6.2 cm y la tasa de respuesta a la formación de embriones fue del 56%.

Referencias

- Bajaj, Y. P. S. (1983). In vitro production of haploids, En D.A. Evans, W. R. Sharp, P. V. Ammirato y Y. Yamada (Eds). *Handbook of plant cell culture. Vol. 1*. New York. USA. McMillan Pub. Co. 228-287.
- Bidwell, R. G. S. (1979). *Plant Physiology*. New York. USA. McMillan Pub. Co. 128-129.
- Chu, C.C. (1982). Haploids in plant improvement. En I. K. Vasil, W. R. Scowcroft y K. J. (Eds.). *Plant Improvement and Somatic Cell Genetics*. Florida, USA. Academic Press Inc. 12-158
- Dunwell, M. (1976). A comparative study of environmental and developmental factor which influence embryo induction and growth in cultured anthers of *Nicotiana tabacum*. *Environmental and Experimental Botany*, 16, 109-118.
- Guha, S.C., y Maheshwar, S.C. (1964). In vitro production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature*, 204, 497.
- Hurtado, M. D. V. y Merino M. M. E. (1987). *Cultivo de tejidos vegetales*. México. MEX. Ed. Trillas. 229.
- Nitsch, C. (1977). Culture of isolated microspore. En J. Reinert, y Y. P. S. Bajaj. Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture. Berlín, GER. Springer-Verlagpags. 268 -276.
- Seguí-Simarro, J. M. y Nuez, F. (2007). Embryogenesis induction, callogenesis, and plant regeneration by in vitro culture of tomato isolated microspores and whole anthers. *Journal of Experimental Botany*, 58, 1119-1132.
- Sunderland, N. y Dunwell, J. M. (1977). Anther and pollen culture. En H. E. Stree (Ed.). *Plant Tissue and Cell culture*. California, USA. University of California Press. 223-265.
- Sunderland, N. (1971). Anther culture: a progress report. *Science Progress Journal*, 59, 527-549.