

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA  
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

“DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ADECUADAS  
DE PRE-TRATAMIENTO FRÍO Y LA DOSIS ÓPTIMA DE  
RADIACIÓN GAMMA CO<sup>60</sup>, PARA REALIZAR CULTIVO *IN*  
*VITRO* DE MICROSPORAS AISLADAS DE MAÍZ DE LAS  
VARIEDADES INIAP-101 E INIAP-601.”

Previa a la obtención de Grado Académico o Título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

ELABORADO POR:

VÍCTOR HUGO ALMEIDA ARTEAGA

SANGOLQUÍ, 11 DE SEPTIEMBRE DEL 2009

# HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS

**ELABORADO POR:**

---

Víctor Hugo Almeida Arteaga.

**COORDINADOR DE LA CARRERA**

---

Ing. Rafael Vargas.

**SECRETARIO ACADÉMICO**

---

Ab. Vinicio Zabala.

Lugar y fecha: 11 de septiembre del 2009

## CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue realizado en su totalidad por el Sr. VÍCTOR HUGO ALMEIDA ARTEAGA como requerimiento parcial a la obtención del título de INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA.

11 de septiembre del 2009

---

Fecha

---

Msc. Mónica Jadán

---

Dra. Karina Proaño

## **DEDICATORIA**

A Dios todo poderoso,

A mi madre, por siempre haber confiado en mí,

A mi padre quien con su ejemplo me enseñó a ser un hombre de bien,

A mi hijo por ser mi fuerza y templanza,

A Margarita por apoyarme incondicionalmente.

Víctor Hugo Almeida Arteaga.

## AGRADECIMIENTO

En estas líneas quiero expresar mi gratitud a todos quienes de alguna manera, han contribuido a la realización de esta tesis.

A mis padres, por su apoyo incondicional en todas mis decisiones, por creer en mí y darme la oportunidad de realizarme en esta profesión que me encanta, porque con su ejemplo me han enseñado que con sacrificio y constancia uno puede alcanzar todos sus sueños. Vuestro esfuerzo ha hecho posible que haya llegado hasta aquí y que siempre quiera llegar más lejos. Son los mejores papás del mundo, los amo.

A mi amor Margarita, gracias por tu comprensión, paciencia y cariño durante todo este tiempo. Tú me has ayudado como nadie a superar todos los obstáculos que me he encontrado en el camino. Gracias por estar ahí todos los días linda, te adoro.

A mi hijo Mathias Francisco, porque desde el momento en que lo tuve en mis brazos por primera vez, mi vida tomo otro sentido y porque me ha enseñado a ver la vida con más sencillez y felicidad.

A mis hermanos: Nataly, Diana, Alexis y Cindy, por ser mis amigos, por hacerme pasar tan buenos ratos y porque a pesar de ser mis hermanos menores siempre están enseñándome algo.

A mi tío Abel y mi tía Adriana, por que si no fuera por su apoyo, tal vez nunca hubiera culminado mi carrera.

A mi Directora Msc. Mónica Jadán, Co-directora Dra. Karina Proaño y todos los demás maestros de la carrera, por los conocimientos compartidos en las aulas, los cuales fueron determinantes en la realización de este trabajo.

Al Dr. Eduardo Morillo y la Ing. Jacqueline Benítez, técnicos del INIAP, quienes me brindaron la oportunidad de realizar mi tesis en tan prestigiosa institución, me

guiaron y supieron compartir sus conocimientos para la culminación de esta investigación.

No puedo olvidarme de mis compañeros tesisistas en el INIAP: Mary, Mafer, Joha, Carlos, Paty, Pao, Caro, Vero y Analía con quienes compartimos alegrías y tristezas, logros y decepciones y que juntos apoyándonos hicimos más agradable el día a día.

A todos Uds. MIL GRACIAS de todo corazón, que Dios los bendiga, porque han sido una bendición en mi vida.

Víctor Hugo Almeida Arteaga

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS .....	ii
CERTIFICACIÓN .....	iii
DEDICATORIA .....	iv
AGRADECIMIENTO .....	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS .....	vii
LISTADO DE TABLAS .....	x
LISTADO DE CUADROS .....	xii
LISTADO DE FIGURAS .....	xiii
LISTADO DE ANEXOS .....	xv
RESUMEN .....	xvi
ABSTRACT .....	xvii
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN .....	1
1.1    Formulación del problema .....	1
1.2    Justificación del problema .....	1
1.3    Objetivos de la investigación .....	2
1.3.1    Objetivo general .....	2
1.3.2    Objetivos específicos .....	2
1.4    Marco Teórico .....	3
1.4.1    Introducción .....	3
1.4.2    Desarrollo del gameto masculino en la antera .....	8

1.4.3	Cultivo <i>in vitro</i> de microsporas aisladas .....	10
1.4.4	Mutaciones mediante radiación .....	18
1.5	Sistema de hipótesis o pregunta de investigación .....	30
CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS .....		31
2.1	Participantes.....	31
2.2	Zona de estudio .....	31
2.2.1	Fase de campo .....	31
2.2.2	Fase de Laboratorio .....	31
2.3	Período de investigación.....	32
2.4	Diseño estadístico.....	32
2.5	Material vegetal.....	33
2.6	Procedimientos.....	34
2.6.1	Toma de muestras .....	34
2.6.2	Correlación entre la morfología de la planta y el estado de desarrollo de las microsporas.....	34
2.6.3	Determinación del estado de desarrollo de las microsporas .....	35
2.6.4	Esterilización de la panoja.....	38
2.6.5	Pre-tratamiento de las espigas .....	39
2.6.6	Aislamiento de las microsporas y separación por gradientes de concentración.....	41
2.6.7	IRRADIACIÓN DE LAS MICROSPORAS .....	46
2.6.8	Inducción de androgénesis .....	48
2.7	Análisis de datos .....	49



2.7.1	Evaluación del tiempo de pre-tratamiento frío .....	49
2.7.2	Efecto del PEG en el medio de inducción sobre la viabilidad de las microsporas .....	52
2.7.3	Determinación de la dosis letal media y dosis adecuada de radiación gamma con una fuente de Co <sup>60</sup> , para microsporas aisladas .....	53
CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		56
3.1	Toma de muestras .....	56
3.2	Correlación entre la morfología de la planta y el estado de desarrollo de las microsporas.....	57
3.3	Determinación del estado de desarrollo de las microsporas.....	60
3.4	Esterilización de la panoja .....	63
3.5	Pre-tratamiento de las espigas.....	64
3.6	Aislamiento de las microsporas y separación por gradientes de concentración.....	69
3.7	Medio de inducción de androgénesis .....	71
3.8	Irradiación de las microsporas .....	73
CAPITULO 4: CONCLUSIONES .....		79
CAPÍTULO 5: RECOMENDACIONES.....		81
CAPÍTULO 6: BIBLIOGRAFÍA.....		82

## LISTADO DE TABLAS

<b>Tabla 2.1</b>	Medio de pre-tratamiento de las anteras de maíz.....	40
<b>Tabla 2.2</b>	Medio de aislamiento de microsporas de maíz.....	42
<b>Tabla 2.3</b>	Medio de inducción de microsporas de maíz .....	44
<b>Tabla 2.4</b>	Dosis y tiempos de exposición a radiación con la fuente de Co <sup>60</sup> de la CEEA.....	48
<b>Tabla 2.5</b>	Tratamientos de evaluación del tiempo de pre-tratamiento a 7 °C.....	50
<b>Tabla 2.6</b>	Evaluación de la presencia de PEG en el medio de inducción sobre la viabilidad de las microsporas.....	52
<b>Tabla 2.7</b>	Tratamientos para la determinación de la dosis letal media y dosis adecuada de radiación de las microsporas.....	54
<b>Tabla 3.1</b>	Número de panojas usadas en los tratamientos de la investigación.....	56
<b>Tabla 3.2</b>	Uso de dos referencias: No. De hojas completas que la planta posee vs. edad de la planta, para cosechar panojas en estado adecuado de desarrollo.....	58
<b>Tabla 3.3</b>	Estados de desarrollo de las microsporas de una misma panoja.....	62
<b>Tabla 3.4</b>	Porcentajes de microsporas viables durante el pre-tratamiento frío a 7 °C en medio MMA .....	64
<b>Tabla 3.5</b>	Análisis de varianza, en el cual se comparan las diferencias en los porcentajes de viabilidad con relación a las dos variedades I-101 e I-601 .....	65
<b>Tabla 3.6</b>	Análisis de varianza, en el cual se comparan las diferencias en los porcentajes de viabilidad con relación a los periodos de tiempo evaluados de 1, 3, 5, 7, 9 y 11 días.....	66

<b>Tabla 3.7</b>	Diferencias significativas al evaluar el porcentaje de viabilidad de las microsporas con relación al tiempo de pre-tratamiento – prueba de Games Howell.....	67
<b>Tabla 3.8</b>	ANOVA factorial del porcentaje de viabilidad con respecto a la dosis y al tiempo de evaluación. ....	73
<b>Tabla 3.9</b>	Resultados de la prueba de Tukey al comparar los porcentajes de viabilidad en el primer día después de la radiación .....	74
<b>Tabla 3.10</b>	ANOVA que relaciona las variedades usadas en los tratamientos de irradiación con el porcentaje de viabilidad.....	76

## LISTADO DE CUADROS

<b>Cuadro 1.1</b>	Cuadro de la mutagénesis usando microsporas aisladas in vitro .....28
<b>Cuadro 1.2</b>	Cuadro del desarrollo de líneas mutantes usando mutagénesis en semillas y sistemas doble haploides .....29

## LISTADO DE FIGURAS

<b>Figura 1.1</b>	Estructura de la inflorescencia masculina o panoja del maíz.....	5
<b>Figura 1.2</b>	Fotografía de una espiguilla de maíz .....	6
<b>Figura 1.3</b>	Estructura de la antera de maíz .....	7
<b>Figura 1.4</b>	Diagrama esquemático del desarrollo de las microsporas de maíz .....	10
<b>Figura 1.5</b>	Diagrama esquemático del desarrollo normal de una microspora .....	11
<b>Figura 1.6</b>	Gráfico de mortalidad de células expuestas a radiación .....	25
<b>Figura 2.1</b>	a. Planta de I-601 lista para la cosecha de la panoja b. hoja bandera envolviendo la panoja.....	33
<b>Figura 2.2</b>	Planta de maíz en estado de desarrollo V9 .....	35
<b>Figura 2.3</b>	Proceso de esterilización de la panoja con alcohol al 70 %.....	36
<b>Figura 2.4</b>	Panoja en donde se diferencia la separación de ápice, medio y base. ....	36
<b>Figura 2.5</b>	Cajas Petri conteniendo los trozos de la panoja de maíz. ....	37
<b>Figura 2.6</b>	Tinción de las microsporas, para observar su estado de desarrollo.....	37
<b>Figura 2.7</b>	Extracción de las espiguillas, para luego colocarlas en medio de pre- tratamiento .....	39
<b>Figura 2.8</b>	Microsporas colocadas sobre la solución de maltosa 21%. ....	43
<b>Figura 2.9</b>	Tubos falcon balanceados y listos para centrifugar.....	43
<b>Figura 2.10</b>	Banda de microsporas viables y precipitado de microsporas muertas .....	44
<b>Figura 3.1</b>	Morfología de una planta de maíz del híbrido I-601 en estado de desarrollo V9.....	59
<b>Figura 3.2</b>	Fotografías de microsporas de maíz en estado uninucleado temprano .....	61
<b>Figura 3.3</b>	Gráfico de las medias del porcentaje de viabilidad de las microsporas con respecto a los días de pre-tratamiento a 7 °C en medio MMA. ....	68

<b>Figura 3.4</b>	Evaluación de la presencia de PEG en el medio de inducción en microsporas de la variedad I-101.....	71
<b>Figura 3.5</b>	Evaluación de la presencia de PEG en el medio de inducción en microsporas de la variedad I-601.....	71
<b>Figura 3.6</b>	Fotografía de microsporas que tiene respuesta androgénica y debido a esto han aumentado su tamaño a prácticamente el doble. ....	72
<b>Figura 3.7</b>	Curvas del porcentaje de viabilidad de las microsporas de la variedad I-101 con respecto al tiempo .....	75
<b>Figura 3.8</b>	Curvas del porcentaje de viabilidad de las microsporas de la variedad I-601 con respecto al tiempo .....	75
<b>Figura 3.9</b>	Curva de supervivencias a la radiación gamma Co60 de las microsporas aisladas de maíz de las variedades I-101 e I-601.....	77

## LISTADO DE ANEXOS

<b>ANEXO 1</b>	Equipo básico para un laboratorio de cultivo in vitro de microsporas aisladas .....	92
<b>ANEXO 2</b>	Formulación básica de los medios de inducción más utilizados en cultivo in vitro de microsporas aisladas.....	94
<b>ANEXO 3</b>	Medio de inducción de callo para maíz .....	95
<b>ANEXO 4</b>	Medio de regeneración de plantas de maíz .....	96
<b>ANEXO 5</b>	Abreviaciones importantes en cultivo in vitro de microsporas .....	97
<b>ANEXO 6</b>	Tabla de tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ) de los radioisótopos más importantes. ....	98

## RESUMEN

Esta investigación estudió los efectos de la duración del pre-tratamiento frío, la osmolaridad del medio de inducción y la exposición a diferentes dosis de radiación gamma sobre la viabilidad de las microsporas de las variedades de maíz INIAP-101 e INIAP-601; como base para establecer un protocolo de cultivo *in vitro* de microsporas aisladas e inducción de mutaciones para variedades de maíz desarrolladas por el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias.

Los resultados obtenidos indican que para estas dos variedades de maíz el máximo tiempo de pre-tratamiento a 7 °C en medio MMA es de 7 días, mayor tiempo de exposición a bajas temperaturas causa un deceso de 65 a 70 % de las microsporas.

Al evaluar la viabilidad de las microsporas aisladas en medio de inducción YP modificado (Zheng *et al.*, 2003a) durante un periodo de 7 días, se comprobó que el porcentaje de viabilidad era muy bajo, al añadir PEG 4000 al 21 % en el medio, la viabilidad de las microsporas aumento considerablemente, y además se pudieron observar respuestas androgénicas positivas en algunas microsporas.

Una de las mayores aplicaciones del cultivo *in vitro* de microsporas aisladas, es combinarlo con inducción de mutagénesis. Por esta razón y como primer paso para obtener un protocolo, la viabilidad de microsporas que recibieron diferentes dosis de radiación gamma  $\text{Co}^{60}$  fue evaluada durante un período de 7 días y se estableció que la dosis optima de radiación gamma para estas dos variedades de maíz es 15 Gy.



## ABSTRACT

This investigation studied the effects of the cold pre-treatment duration, osmolarity of the induction medium and the exposition to different doses of gamma radiation on the viability of the microspores of the varieties of corn INIAP-101 and INIAP-601; as base to establish a protocol of *in vitro* isolated microspores culture and induction of mutations for varieties of corn developed by “Instituto Nacional Autonomo de Investigaciones Agropecuarias”.

The results indicate that for both varieties of corn the maximum time of pre-treatment to 7 °C in MMA medium is of 7 days, more time of exposition to low temperatures cause the death of 65 to 70% of microspores.

The evaluation of isolated microspores viability on induction modified YP medium (Zheng *et al.*, 2003a) during a period of 7 days, showed that the percentage of viability was very low, when adding 21 % of PEG 4000 in the medium, the microspore viability increase considerably, and positive androgenic answers could also be observed in some microspores.

One of the biggest applications of *in vitro* isolated microspores culture is to combine it with mutant induction. For this reason and such as first step to obtain a protocol, the viability of microspores that received different doses of gamma radiation  $\text{Co}^{60}$  was evaluated during a period of 7 days and it established that the best dose of gamma radiation for these two varieties of corn was 15 Gy.

# CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

## 1.1 Formulación del problema

La creación de nuevos híbridos de maíz (*Zea mays* L.) requiere del desarrollo de líneas puras por repetidas autopolinizaciones. El generar líneas puras mediante mejoramiento convencional no sólo requiere de mucho tiempo, sino que también afecta el vigor, el rendimiento y aumenta la susceptibilidad de las plantas a enfermedades y plagas (Chahal & Gosal, 2002). Estos inconvenientes dificultan la labor del fitomejorador, encarecen costos y alargan el tiempo necesario para generar líneas promisorias de maíz, que finalmente derivarán en híbridos comerciales.

El cultivo *in vitro* de microsporas aisladas es una herramienta biotecnológica que puede solucionar estos problemas, ya que se pueden obtener plantas haploides (Dodds & Roberts, 1985), las cuales mediante técnicas de doblaje de cromosomas generan plantas doble haploides (DH) (Kasha & Maluszynski, 2003). Éstas plantas son 100 % homocigotas y se obtienen en sólo un ciclo, reduciendo considerablemente el tiempo y los recursos necesarios para desarrollar nuevos híbridos de maíz (Chahal & Gosal, 2002; Kasha & Maluszynski, 2003;). Además, el origen unicelular de las estructuras derivadas del cultivo *in vitro* de microsporas aisladas, hace que esta sea una atractiva herramienta para la aplicación de mutagénesis inducida (Obert *et al.*, 2005).

## 1.2 Justificación del problema

Algunos factores críticos como la viabilidad de las microsporas y su preciso estado de desarrollo justo antes de comenzar la inducción de androgénesis deben ser establecidos (Gaillard *et al.*, 1991). Especialmente si estas microsporas son expuestas a radiación, ya que la radiación afecta tanto la respuesta androgénica como la viabilidad de las microsporas. Por esta razón, es necesario realizar estudios iniciales sobre la sensibilidad de las microsporas al agente mutagénico que después se usará en tratamientos a gran escala. Los resultados de las pruebas de sensibilidad son mostrados en una curva de mortalidad como el reflejo del efecto de cada tratamiento en términos de viabilidad de microsporas (MacDonald, *et al.*, 1991).

La aplicación de radiación gamma como agente mutagénico sobre las microsporas aisladas presenta algunas ventajas con relación a los métodos tradicionales de mutagénesis convencional (Szarejko, 2003). Los mutantes producidos son 100% homocigóticos, por ende son muy útiles para encontrar genotipos raros producidos por la radiación, especialmente en el caso de caracteres recesivos, ya que éstos no quedan enmascarados por los alelos dominantes (Maluszynski, *et al.*, 1996; Szarejko, 2003;). Además, se reduce considerablemente la producción de quimeras, siempre y cuando la mutación se realice antes de la primera división mitótica de la microspora, es decir en estado uninucleado (Szarejko, 2003).

En el presente trabajo se investigó los efectos de la duración del pre-tratamiento frío, la osmolaridad del medio de inducción y la exposición a radiación gamma sobre la viabilidad de las microsporas; como base para establecer un protocolo de cultivo *in vitro* de microsporas aisladas e inducción de mutaciones.

### **1.3 Objetivos de la investigación**

#### **1.3.1 Objetivo general**

Determinar las mejores condiciones de pre-tratamiento frío y la dosis óptima de radiación gamma para realizar cultivo *in vitro* de microsporas aisladas de las variedades de maíz INIAP-101<sup>1</sup> e INIAP-601<sup>2</sup>.

#### **1.3.2 Objetivos específicos**

- Identificar mediante microscopía de luz el estado uninucleado de las microsporas de maíz.
- Establecer un método eficiente para separar microsporas de maíz viables y no viables.

---

<sup>1</sup> INIAP-101: Variedad de maíz suave de la Sierra, desarrollada por el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP).

<sup>2</sup> INIAP-601: Híbrido de maíz duro de la Costa, desarrollado por el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP).

- Determinar el método óptimo de pre-tratamiento que se puede aplicar a las microsporas de maíz de las variedades INIAP-101 e INIAP-601.
- Identificar la dosis óptima de radiación gamma  $Co^{60}$ , para microsporas de maíz de las variedades INIAP-101 e INIAP-601.

## **1.4 Marco Teórico**

### **1.4.1 Introducción**

El maíz (*Zea mays* L.) es uno de los cultivo de mayor relevancia en todo el mundo, debido a que se cultiva a nivel mundial en condiciones extremadamente diferentes y por ser el cultivo con mayor tasa de crecimiento. A pesar del continuo incremento en su producción, la demanda de maíz es cada día mayor, desde el año 2003 la demanda mundial ha crecido rápidamente debido principalmente al aumento del consumo en países en desarrollo y a la elaboración de etanol a base de esta gramínea (Büter, 1997; Maizar, 2006; FAO, 2007; Agrodigital, 2008).

En Ecuador la producción de maíz también está creciendo, en los últimos tres años la producción de maíz amarillo duro, el más cultivado en el país, ha aumentado de 299048 TM a 445000 TM (SICA, 2007). Además, el gobierno actual está empeñado en aumentar la producción de este cereal para evitar depender de la importación de este producto, el cual se ha encarecido por la tendencia mundial a utilizarlo como biocombustible (El Universo, 2008).

Para poder enfrentar el aumento en la demanda de este cereal, es necesario no sólo expandir el área de producción si no también aumentar el rendimiento en los cultivos. La mejor forma de conseguirlo es mediante el desarrollo y utilización de híbridos de alto rendimiento (Duvick, 1999).

La creación de híbridos de maíz mediante mejoramiento convencional es un proceso que tarda mucho tiempo. El primer y más largo paso es desarrollar líneas puras,

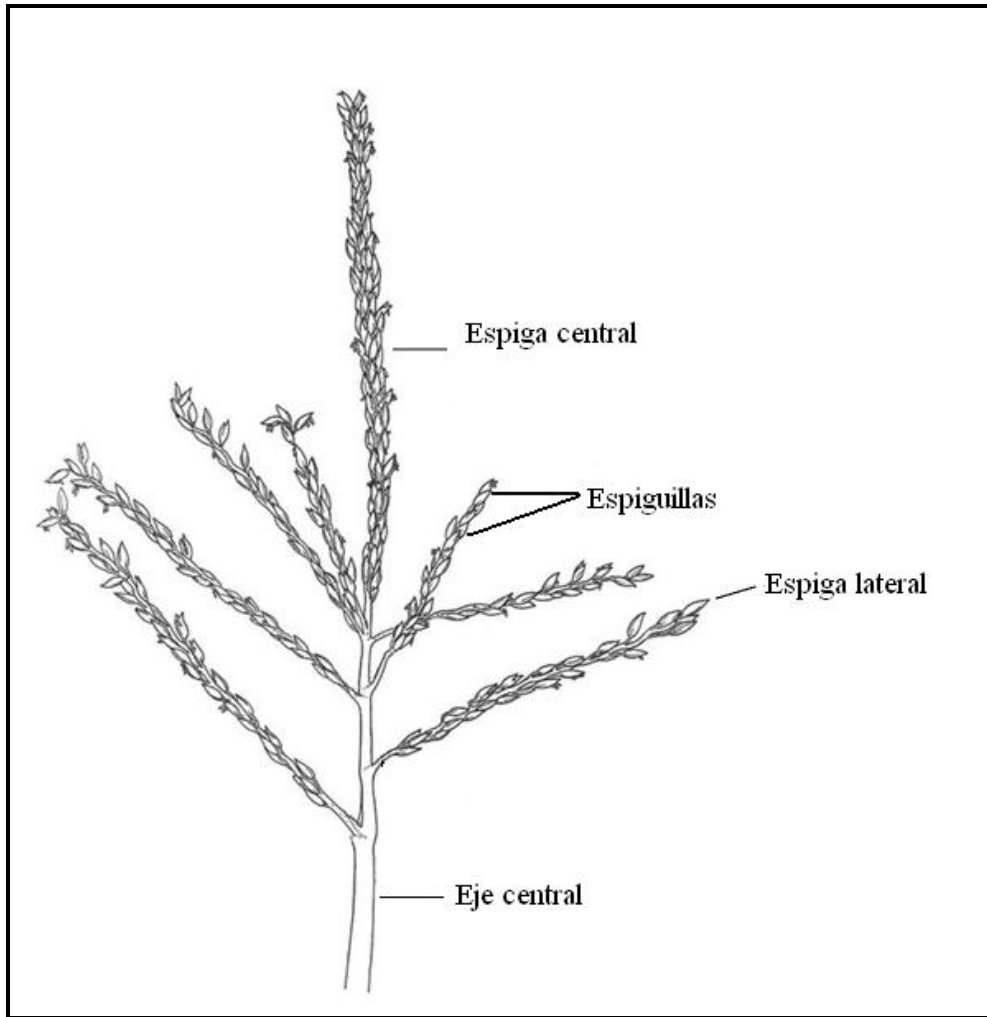
este proceso tarda alrededor de siete ciclos o más, durante este periodo se realizan las primeras selecciones de características agronómicas y habilidad combinatoria. Después se realizan cruces y se hacen pruebas de campo durante unos 3 a 4 periodos más. Esto significa que para desarrollar un nuevo híbrido de maíz se necesitan de 6 a 10 años aproximadamente (Chávez, 1995; Büter, 1997; Chahal & Gosal, 2002).

A esto se suma la disminución del rendimiento y vigor de las plantas durante las autopolinizaciones, aumentando así su susceptibilidad a plagas y enfermedades (Chahal & Gosal, 2002). En las variedades de maíz suave (ampliamente cultivadas en la Sierra Ecuatoriana) esta disminución de vigor es más evidente, ya que la depresión debido a una sola autofecundación es de alrededor del 45 % (Caicedo *et al.*, 2004).

Antes de entrar a ver en que consiste el cultivo de microsporas aisladas es preciso revisar la morfología de la inflorescencia del maíz y el desarrollo del grano de polen en la antera, porque estos conceptos permitirán una mejor comprensión técnica de este tema.

#### **1.4.1.1 Estructura de la inflorescencia masculina del maíz**

La inflorescencia masculina o panoja se desarrolla en el punto de crecimiento apical en el extremo superior de la planta. Inicialmente, la inflorescencia masculina tiene primordios de flores bisexuales; durante el proceso de desarrollo los primordios de gineceos en la inflorescencia apical abortan y queda entonces sólo la inflorescencia masculina, la cual se desarrolla desde un eje central que corresponde a una prolongación del tallo de la planta. En los dos tercios superiores de dicho eje se desarrolla una espiga, bajo la cual se originan varias ramificaciones finas de aspecto plumoso que corresponden a espigas laterales. Tanto en la espiga central como en las laterales se originan espiguillas, éstas siempre se producen en pares, siendo una pedicelada y la otra sésil (Fig. 1.1), cada espiga puede llegar a tener hasta 30 o 40 espiguillas (Ripusudan *et al.*, 2001).



**Figura 1.1** Estructura de la inflorescencia masculina o panoja del maíz (modificado de Gramene home, 2009).

En cada espiguilla hay dos antecios, más conocidos como florecillas, una de ellas se denomina flor superior debido a que su trío de anteras se encuentra en un estado de desarrollo más avanzado que el de la otra, la cual se denomina flor inferior (Fig. 1.2). Las dos están separadas por dos glumas: la lemma o gluma inferior y la pálea o gluma superior, (Ripusudan *et al.*, 2001).

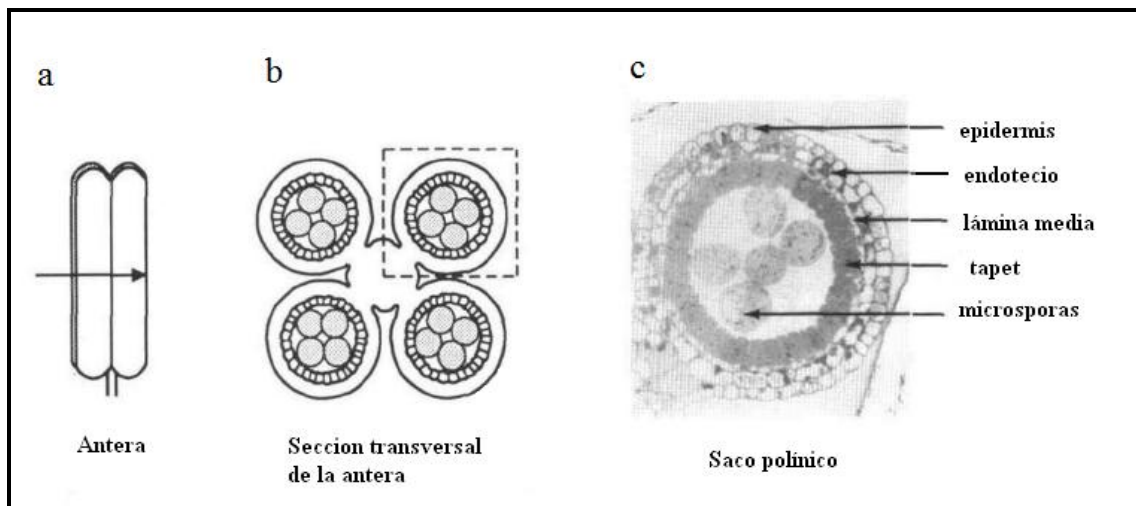


**Figura 1.2** Fotografía de una espiguilla de maíz, cada espiguilla contiene una flor superior (derecha) y una inferior (izquierda), cada una de las cuales tiene tres anteras. Las anteras de la flor superior e inferior se encuentran aproximadamente en estado uninucleado tardío y estado uninucleado medio respectivamente (Skibbe, *et al.* 2008).

#### **1.4.1.2 Estructura de la antera y del grano de polen del maíz**

##### La antera

Las anteras del maíz están compuestas por dos tecas, cada una de las cuales esta formada por dos sacos polínicos, los cuales a su vez están formados por una pared y una cavidad que contiene a las microsporas. La pared a su vez esta formada por cuatro capas que encierran a las microsporas: la epidermis, el endotecio, la lámina media y el tapet (Fig. 1.3) (Bedinger, 1992).



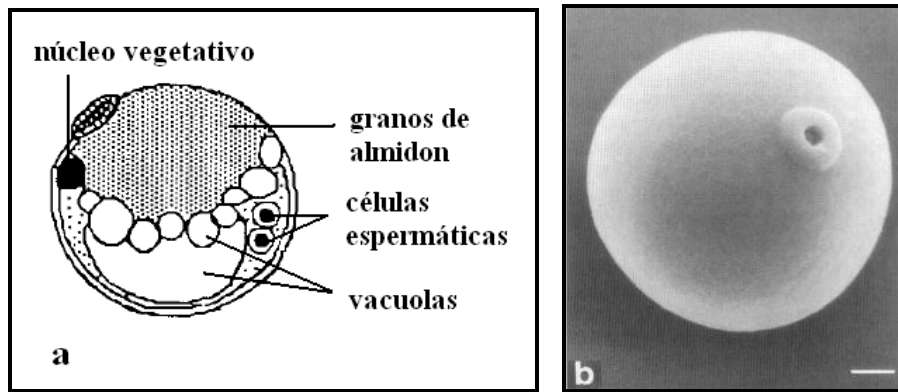
**Figura 1.3** Estructura de la antera de maíz. (a) Diagrama de la antera, la flecha indica el corte transversal en (b). (b) Diagrama del corte transversal de la antera, el recuadro indica un saco polínico. (c) Una microfotografía de un saco polínico, identificando las diferentes capas de la pared de la antera (modificado de Bedinger, 1992).

El tapet es la capa adyacente a las microsporas y juega un rol muy importante en el desarrollo de las mismas, ya que cumple muchas funciones como: nutrir a las microsporas, liberar a las microsporas jóvenes de la pared dura que encierra a las tétradas, justo después de terminada la meiosis y la producción de precursores para la formación de la pared exterior del polen (Bedinger, 1992).

### Grano de polen

El polen o gameto masculino del maíz una vez terminado su desarrollo, es una estructura trinuclear; tiene una célula vegetativa, dos células generativas y numerosos granos de almidón (Fig. 1.4a). Su gruesa pared tiene dos capas, la exina y la intina. La exina es una capa muy dura que no solo le confiere al grano de polen su forma (Fig. 1.4b), sino que también le brinda resistencia para el momento en que es liberado al ambiente para polinizar. A causa de las diferencias de desarrollo entre las florecillas superiores e inferiores en las espiguillas masculinas y la maduración asincrónica de las espigas, el polen cae continuamente de cada espiga por un período de una semana o más (Ripusudan *et al.*, 2001).





**Figura 1.4** (a) Estructura interna de una microspora de maíz (modificado de Bedinger, 1992). (b) Microfotografía de un grano de polen de maíz, donde se puede apreciar su forma esférica y el poro (Bedinger, 1992).

#### 1.4.2 Desarrollo del gameto masculino en la antera

En la inflorescencia masculina del maíz, los sacos polínicos albergan células diploides denominadas células madres del polen (PMC<sup>3</sup>), las cuales están envueltas cada una en una pared callosa de  $\beta$ -1,3 glucan, ésta pared aísla las PMC de otras células somáticas (Fig. 1.4a) (Bedinger, 1992). Después de la meiosis, cada célula madre del polen forma dos células con la mitad del número total de cromosomas, formándose así dos microsporocitos secundarios haploides. Enseguida éstos sufren una división mitótica dando origen a dos células más, también haploides. Así por cada célula madre se forman cuatro células haploides, las cuales todavía están envueltas en la pared callosa de  $\beta$ -1,3 glucan. A este conjunto de cuatro células haploides se le denomina tétrada (Fig. 1.4b) (Núñez *et al.*, 1989; Schreiber & Dresselhaus, 2003).

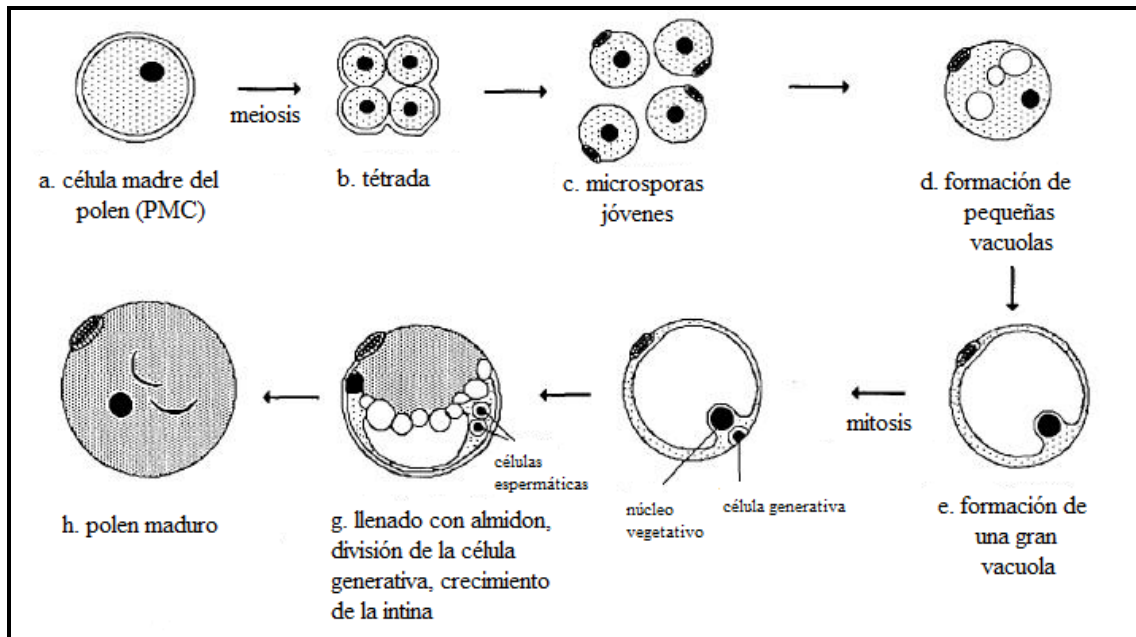
Posteriormente, la pared callosa de  $\beta$ -1,3 glucan se disuelve y libera los cuatro microsporocitos (Fig. 1.4c), que ahora pasan a llamarse microsporas. Las cuatro jóvenes microsporas crecen rápidamente por alrededor de 5 días, iniciándose el estado uninucleado que comprende 3 etapas: uninucleado temprano, cuando la pared externa o exina empieza a sintetizarse y el núcleo se encuentra ubicado en el centro de la microspora; uninucleado medio, cuando el núcleo empieza a migrar al perímetro de la célula hasta una posición opuesta al poro y se sintetizan pequeñas vacuolas (Fig. 1.4d)

<sup>3</sup> PMC: Pollen Mother Cells

que luego se fusionan y forman una gran vacuola, dando paso de esta manera al estado uninucleado tardío, en este estado de desarrollo, el núcleo, localizado en el costado de la microspora se presenta agigantado y listo para iniciar la mitosis (Fig. 1.4e) (Núñez *et al.*, 1989).

Aproximadamente cinco días después de la meiosis la división asimétrica llamada mitosis de la microspora ocurre, produciendo dos células: una célula grande llamada célula vegetativa, la cual encierra una pequeña célula en su citoplasma llamada célula generativa (Fig. 1.4f). En alrededor del 70% de las especies de plantas, el estado binucleado del polen se da en las anteras, y la segunda división mitótica de la célula generativa tiene lugar después de la polinización, cuando el tubo polínico ya está creciendo. En maíz es diferente, la segunda división mitótica se da dentro de las anteras. Esta división forma dos células espermáticas (Fig. 1.4g), cuya principal función es realizar la doble fecundación una vez que la microspora haya terminado su maduración (Fig. 1.4h) (McCormick, 1993).

Por otro lado, la célula generativa forma el tubo polínico que crece hacia el gameto femenino (saco embrionario) para liberar las dos células espermáticas necesarias para la doble fecundación (Schreiber & Dresselhaus, 2003).

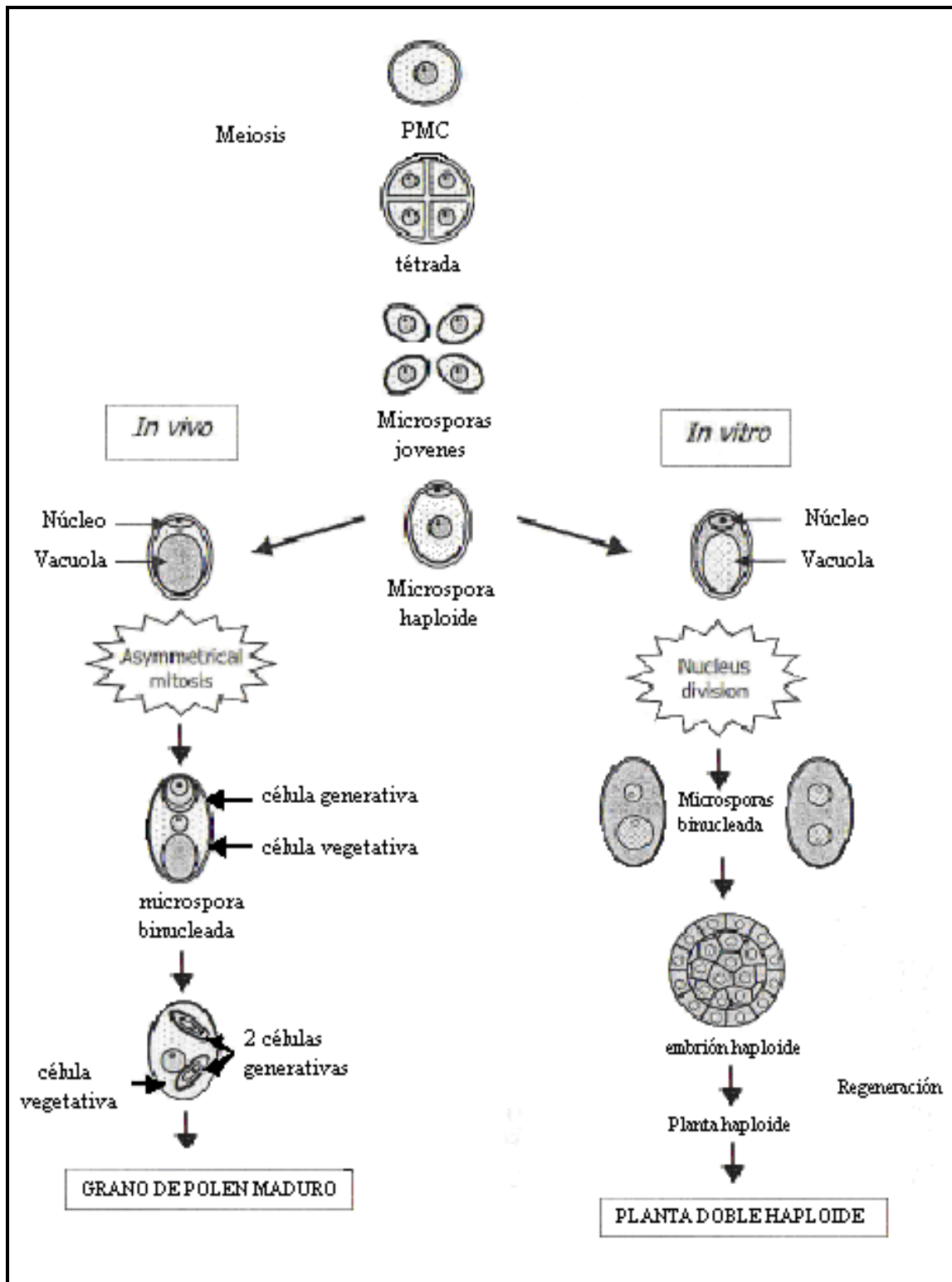


**Figura 1.5** Diagrama esquemático del desarrollo de las microsporas de maíz (*Zea mays* L.) (Modificado de Bedinger, 1992).

### 1.4.3 Cultivo *in vitro* de microsporas aisladas

La aplicación de ciertas condiciones experimentales como bajas temperaturas (Coumans *et al.*, 1989; Pescitelli *et al.*, 1990; Gaillard *et al.*, 1991; Büter, 1997; Szarka *et al.*, 2001; Zheng, *et al.*, 2003a; Obert *et al.*, 2005) y estrés por inanición usando un azúcar inerte como el manitol, pueden enmascarar el desarrollo gametofítico normal e inducir la expresión de genes específicos del desarrollo esporofítico (Szarka *et al.*, 2001), y así forzar a las microsporas a cambiar su desarrollo normal por un desarrollo esporofítico llamado androgénesis (Fig. 1.5). Durante este proceso, la microspora desarrolla callos y/o embriones haploides, los cuales en condiciones óptimas de cultivo pueden generar plantas haploides (Coumans *et al.*, 1989).

Las plantas haploides mediante técnicas de doblaje de cromosomas pueden generar plantas doble haploides (DH) (Kasha & Maluszynski *et al.*, 2003). Las cuales son 100% homocigotas y fértiles, por lo que pueden ser ampliamente utilizadas en programas de mejoramiento genético (Büter, 1997).



**Figura 1.6** Diagrama esquemático del desarrollo normal de una microspora (izquierda) y del desarrollo esporofítico, al que puede ser forzada la misma microspora en el laboratorio, para producir plantas haploides (derecha), (Bedinger, 1992).

#### **1.4.3.1 Antecedentes del cultivo *in vitro* de microsporas aisladas**

En 1922, se descubrió la generación espontánea de haploides. Actualmente son más de cien las especies vegetales capaces de producirlos *in vivo*. Sin embargo, la frecuencia con la cual se producen es muy baja, con valores que van de 0,001 a 0,01 % (Polci, P., Conti, V. y Miranda, R., 2004).

En 1966, Guha y Maheshwari descubrieron que las anteras de *Datura innoxia* generaban plantas haploides al ser cultivadas *in vitro*. Este proceso, confirmado posteriormente por Nitsch y Nitsch (1969) en tabaco, fue el inicio de la producción *in vitro* de plantas haploides (Polci, P., Conti, V. y Miranda, R., 2004).

Los primeros intentos para establecer el cultivo de microsporas aisladas de maíz fue realizada por Nitsch en 1977, donde sólo se consiguieron estructuras multicelulares, esto no detuvo las investigaciones y en 1989 se reportaron los primeros éxitos de regeneración de plantas de maíz desde microsporas aisladas (Büter, 1997). Desde entonces muchas mejoras se han hecho para aumentar la respuesta androgénica de las microsporas (Nägeli *et al.*, 1999; Obert *et al.*, 2000; Szarka *et al.*, 2001; Goralski *et al.*, 2002; Zheng *et al.*, 2003a).

#### **1.4.3.2 Factores que afectan la viabilidad y la respuesta androgénica de las microsporas durante el cultivo *in vitro***

##### Genotipo permisible y genotipo recalcitrante

Genotipos permisibles son todos aquellos genotipos que responden de una manera favorable a la manipulación y al ambiente del cultivo *in vitro*, produciendo callos y/o embriones los cuales son capaces de regenerar plantas, más específicamente, plantas fértiles (Büter, 1997).

Un genotipo recalcitrante es todo lo contrario, es aquel que no resiste las condiciones *in vitro* y por tanto no produce o tiene una pobre producción de callos y/o embriones friables (Büter, 1997). Esto se debe a que casi todos los procesos fisiológicos

que se dan en el cultivo *in vitro* son controlados por genes, y la inducción de androgénesis no es la excepción. Hay estudios que señalan que el cambio del desarrollo gametofítico a un desarrollo esporofítico es controlado por genes (Barloy *et al.*, 1989; Barnabás *et al.*, 1998; Obert *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2007), Beaumont, Rocheford y Widholm (1995) identificaron seis regiones cromosómicas que están asociadas con la capacidad de inducir estructuras de tipo embrionario a partir de microsporas durante la androgénesis.

El maíz es considerada una planta recalcitrante tanto para cultivo de anteras como para cultivo de microsporas aisladas, ya que sólo pocos genotipos tienen respuesta androgénica (Barnabás *et al.*, 1998; Obert *et al.*, 1998; Obert *et al.*, 2005).

#### Condiciones de crecimiento de las plantas donadoras

La calidad de las plantas donadoras es un factor crítico, que subsecuentemente afectará el rendimiento en el cultivo *in vitro* de microsporas. Se han encontrado diferencias en la eficiencia de la respuesta androgénica entre plantas que vienen de campo y de invernadero y también en plantas que han sido cultivadas en diferentes estaciones climáticas en campo (Barloy & Beckert, 1993).

Condiciones desfavorables en genotipos de maíz permisibles al cultivo *in vitro* de anteras produjo una pobre respuesta al cultivo (Büter, 1997). Por lo que es recomendable estandarizar las condiciones de crecimiento de las plantas donadoras tanto como sea posible, para de esta manera no afectar la respuesta androgénica de las microsporas y tener resultados reproducibles (Barloy & Beckert, 1993). Una buena forma de hacerlo es utilizando cámaras de crecimiento o invernaderos con control de temperatura (Büter, 1997).

Las mejores condiciones de crecimiento para una planta de maíz que será utilizada para cultivo *in vitro* de microsporas son temperaturas día/noche de 25-30/18-20 y fotoperíodos de 16 a 18 horas, producida por lámparas de sodio altamente presurizado (Coumans *et al.*, 1989; Gaillard *et al.*, 1991; Büter, 1997; Szarka *et al.*, 2001; Zheng, *et*

*al.*, 2003a). Sin embargo en estudios previos se reportó efectos beneficiosos al reducir la temperatura (18-15 °C) antes de cosechar las panojas (Büter, 1997).

Claramente existen relaciones entre el genotipo, las condiciones de cultivo de las plantas donadoras, el pre-tratamiento y las condiciones del cultivo *in vitro* que deben ser establecidas para cada genotipo (Büter, 1997).

#### Estado de desarrollo de las microsporas al iniciar el cultivo

Para poder inducir Androgénesis es muy importante que las microsporas se encuentren en un estado de desarrollo adecuado al momento de ingresar al cultivo, este estado puede ser de uninucleado temprano a uninucleado tardío (Coumans *et al.*, 1989; Gaillard *et al.*, 1991; Szarka *et al.*, 2001; Obert *et al.*, 2005). Dentro de estos estados de desarrollo las microsporas pueden cambiar su desarrollo normal por un desarrollo esporofítico (Coumans *et al.*, 1989).

#### Pre-tratamiento frío

La aplicación de bajas temperaturas, generalmente 7 °C, a las panojas de maíz, antes de iniciar el cultivo es esencial para una eficiente respuesta androgénica *in vitro* de las microsporas de maíz (Coumans *et al.*, 1989; Pescitelli *et al.*, 1990; Gaillard *et al.*, 1991; Szarka *et al.*, 2001; Obert *et al.*, 2005).

El pre-tratamiento frío es muy variado en cuanto al tiempo de su aplicación, con periodos que van desde los 7 hasta los 28 días, dependiendo de la variedad o genotipo que se use (Coumans *et al.*, 1989; Pescitelli *et al.*, 1990; Gaillard *et al.*, 1991; Büter, 1997; Szarka *et al.*, 2001; Zheng, *et al.*, 2003a; Obert *et al.*, 2005), sin embargo no es muy conveniente extender el pre-tratamiento por mucho tiempo, ya que las microsporas pueden pasar a un estado de desarrollo más avanzado que el óptimo para que exista respuesta al cultivo *in vitro* (Büter, 1997) y también porque la viabilidad de las microsporas puede verse afectada por una prolongada exposición a bajas temperaturas,

por lo que es de vital importancia determinar un período de tiempo adecuado de pre-tratamiento frío para cada variedad o genotipo.

### Medio de pre-cultivo

Colocar a las espigas en un medio específico durante el pre-tratamiento frío aumenta la respuesta androgénica de las microsporas, este medio de pre-tratamiento tiene como principal característica la sustitución de un azúcar metabolizable por una no-metabolizable como el manitol (Cistué *et al.*, 2003), más un inductor químico de androgénesis, usualmente el 2-HNA (2-hidroxinicotinic acid) (Zheng *et al.*, 2003a). Este inductor cambia el desarrollo gametofítico normal de la microspora a un desarrollo esporofítico (Zheng *et al.*, 2003a; Liu *et al.*, 2002).

El 2-HNA, fue previamente identificado para aumentar la eficiencia de androgénesis cuando lo aplicaron sobre espigas, en cultivo de anteras de trigo (Konsak *et al.*, 2000). Este agente químico es absorbido por el sistema vascular del tallo de la espiguilla y transportado a la antera y dentro de la microspora (Liu *et al.*, 2002).

### Aislamiento de las microsporas de maíz

Varios métodos han sido desarrollados para aislar microsporas, pero solo pocos estudios han comparado las diferentes técnicas de aislamiento y cada uno de estos muestra resultados totalmente diferentes, haciendo difícil determinar si una técnica es más conveniente que otra (Büter, 1997).

Pescitelli y sus colaboradores compararon en 1990 el aislamiento de microsporas por maceración frente al aislamiento por licuado de anteras, el aislamiento por licuado fue menos estresante para las microsporas que presionándolas contra un tamiz, dando como resultado una producción 3 veces mayor de estructuras embrionarias. Por otro lado, en 1991 Gaillard reportó que mediante la técnica de licuado de anteras los porcentajes de microsporas viables eran menores que 75% y Büter en 1992 usando la técnica de licuado reportó viabilidad mayor al 90%. Las diferencias en estos resultados



son causadas por los diferentes genotipos usados como plantas donadoras o los distintos manejos en los equipos de aislamiento (velocidad, tiempo) (Büter, 1997).

A pesar de estas discrepancias el aislamiento de microsporas por licuado de anteras, espiguillas o trozos de panojas es el método más utilizado para aislar microsporas, no solo de maíz (Zheng *et al.*, 2003a) si no también de otras especies como: cebada (Davies, 2003; Kasha *et al.*, 2003a); trigo (Kasha *et al.*, 2003b; Zheng *et al.*, 2003b) y triticale (Pauk *et al.*, 2003).

Durante el aislamiento mecánico de las microsporas, compuestos líticos provenientes de los compartimentos celulares son liberados en el medio. Estos compuestos pueden tener efectos adversos sobre las microsporas aisladas por lo que es necesario usar un medio de aislamiento que mantenga constante el pH en 5.7-6.0, para prevenir la exposición de las células a ambientes externos ácidos (Büter, 1997).

El primer medio de aislamiento reportado para microsporas de maíz fue el de Gaillard (1991). En el cual la presión osmótica se mantiene con 6 % de sucrosa, después la sucrosa fue sustituida por manitol 0.3 M (Zheng *et al.*, 2003a) y se dieron más importancia a vitaminas como el biotín y el ácido ascórbico, así como también a aminoácidos como la prolina.

El tiempo y las condiciones del pre-tratamiento frío así como la manipulación durante el aislamiento, disminuyen la viabilidad de las microsporas. Además, muchas de las microsporas durante este tiempo pudieron avanzar a un estado de desarrollo más avanzado (estado binucleado), que el óptimo para iniciar el cultivo *in vitro* de microsporas. Por lo que es de vital importancia separar solamente las microsporas viables y en estado uninucleado antes de iniciar la inducción de androgénesis, ya que las microsporas muertas pueden hacer que el medio se torne tóxico y disminuir drásticamente la viabilidad del resto de microsporas (Obert *et al.*, 2000).

La centrifugación con gradientes de densidad permite separar a las microsporas viables y en estado uninucleado del resto de microsporas. Esto se debe a que las microsporas en estado uninucleado poseen una gran vacuola o múltiples vacuolas, que hacen que éstas tengan menor densidad que las microsporas muertas o en estados de desarrollo más avanzado.

Al tener menor densidad, estas microsporas flotan y forman una banda en la interface entre las dos soluciones. Los restos de anteras, microsporas muertas, dañadas y en estado binucleado, tienen mayor densidad y forman un pellet en el fondo del tubo (Zheng *et al.*, 2003b).

### Ambiente Gaseoso

La atmosfera gaseosa durante la inducción es un factor crítico para la viabilidad de las microsporas de maíz y su respuesta androgénica. Gaillard (1991) obtuvo baja producción de estructuras embrionarias cuando cultivó microsporas en cajas Petri de 60 x 15 mm completamente selladas. En cambio cuando cultivo en las mismas cajas de 60 x 15 mm sin tapa y colocadas dentro de una caja Petri grande de 140 x 20 mm junto a dos cajas de 60 x 15 mm (también sin tapa) conteniendo anteras, obtuvo una mejor respuesta androgénica. Resultados similares se obtuvieron en otros laboratorios usando diferentes genotipos como plantas donadoras (Büter, 1997).

Los niveles de etileno juegan un papel muy importante en la formación *in vitro* de callos friables de maíz (Vain *et al.*, 1989a) y también afecta la respuesta androgénica de las microsporas en otras especies, de hecho cierto nivel de etileno en la atmósfera de cultivo es requerida para una óptima respuesta androgénica (Biddington & Robinson, 1991; Evans & Batty, 1994), por el contrario un aumento desmedido en los niveles de etileno afecta el desarrollo de los callos, por lo que es necesario aplicar compuestos que inhiban la acción fisiológica del etileno, como por ejemplo el Nitrato de plata (Vain *et al.*, 1989b).

## Densidad de las microsporas durante la inducción

El número de microsporas por mililitro de medio afecta la disponibilidad de nutrientes y la acumulación de metabolitos en el medio de cultivo, por ende influye directamente sobre la viabilidad de las microsporas. La densidad óptima depende de la calidad del material donante (genotipo, condiciones de crecimiento de las plantas donantes, pre-tratamientos) así como también de las técnicas de aislamiento y separación aplicadas (Büter, 1997).

Durante los primeros días después de iniciado el cultivo de microsporas, muchas células mueren causando cambios en la osmolaridad y acumulación de sustancias tóxicas en el medio de cultivo, interrumpiendo de esta manera el desarrollo de las microsporas viables (Cho & Zapata, 1990; Obert *et al.*, 2000). Por el contrario las microsporas con desarrollo embrionario pueden producir y liberar compuestos que ayudan al desarrollo androgénico de microsporas que aún no se desarrollan (Büter, 1997).

La densidad típica en cultivo de microsporas de maíz va desde 6 hasta  $8 \times 10^4$  microsporas por ml (Coumans *et al.*, 1989; Pescitelli *et al.*, 1990; Gaillard *et al.*, 1991; Szarka *et al.*, 2001; Obert *et al.*, 2005). A densidades muy bajas no se observa desarrollo de microsporas de maíz, aun que el límite más bajo de este parámetro aún no ha sido definido para maíz (Büter, 1997).

### **1.4.4 Mutaciones mediante radiación**

#### **1.4.4.1 Introducción a la radiación ionizante**

Las reacciones químicas tradicionales ocurren como resultado de la interacción entre la valencia de los electrones alrededor del núcleo atómico. En 1896, Henri Becquerel, expandió el campo de la química para incluir los cambios nucleares cuando descubrió que el uranio emitía radiación. Poco después del descubrimiento de Becquerel, Marie Curie empezó a estudiar la radioactividad y completó el trabajo de Becquerel,

descubriendo que la radiación era proporcional a la cantidad de elementos radioactivos presentes y propuso que la radiación era una propiedad de los átomos (Aragón, 2008).

En comparación con las reacciones químicas, las reacciones nucleares comprenden cambios de energía enormes, esto se debe a la conversión de pequeñas cantidades de partículas nucleares en energía. Tal como lo estableció Albert Einstein, la energía es igual al producto de la masa por la velocidad de la luz. Dado que el valor de la velocidad de la luz es muy elevado, una pequeña cantidad de masa se puede transformar en una enorme cantidad de energía (Aragón, 2008).

La energía nuclear se puede liberar de dos formas: descontrolada, como en una explosión atómica o controlada, como en los reactores nucleares o como en los irradiadores que se usan en medicina, esterilizaciones o en inducciones de mutaciones (Paredes, 2008). De las dos formas de liberación de energía nuclear la que nos interesa y revisaremos a continuación es la forma controlada, ya que es esta la que se usa para inducir mutaciones en plantas (Novak & Brunner, 1992; Van Harten, 1998; Lönnig, 2005).

#### **1.4.4.2 Energía nuclear controlada**

##### Isótopos

El isótopo es una de las variedades de un átomo, que tiene el mismo número atómico, constituyendo el mismo elemento, pero que difieren en su número de masa. El número atómico ( $Z$ ) es equivalente al número de protones en el núcleo, y el número de masa ( $A$ ) es la suma de protones y neutrones del núcleo. Los isótopos de un mismo elemento, sólo difieren entre ellos en el número de neutrones que contienen (Van Harten, 1998).

En la naturaleza se encuentran dos isótopos de hidrógeno, el hidrógeno normal o ligero y el hidrógeno pesado (deuterio). El tercer isótopo, el tritio, es radiactivo y al igual que muchos isótopos es creado de forma artificial mediante bombardeo de blancos apropiados con neutrones (Paredes, 2008). Los isótopos son inestables debido a que

poseen un número mayor de neutrones que su forma más estable y para estabilizarse liberan energía en forma de radiación. Por esta razón, se los denomina también radioisótopos, los cuales se los obtiene de reactores atómicos (Van Harten, 1998). Entre los isótopos más comunes están:

- *Cesio 137 ( $Cs_{137}$ )*: Es un elemento metálico químicamente reactivo, blanco y blando. Es un metal alcalino. El Cs emite más energía que el radio y se usa en investigaciones medicinales e industriales, por ejemplo como isótopo trazador. Tiene una vida media de 30 años (Paredes, 2008).
- *Uranio 235 ( $U^{235}$ )*: Después del descubrimiento de la fusión nuclear, el uranio se convirtió en un metal estratégico. Al principio, su uso estaba restringido a la producción de armas nucleares. En 1954, se lo empezó a utilizar enriquecido con el isótopo 235 para el desarrollo de plantas nucleares (Wendt, 1955).
- *Cobalto 60 ( $Co^{60}$ )*: Es uno de los isótopos que se utiliza en la medicina. Fue un complemento muy importante de los Rayos X empleados en la clínica y también de las fuentes naturales de radiaciones como el radio y radiomensorio. Presenta sobre estos últimos un cierto número de ventajas: el cobalto radiactivo puede ser obtenido en la cantidad necesaria para los fines terapéuticos, es barato y fácil de manejar, porque no produce sustancias gaseosas de desintegración (Van Harten, 1998).

### Decaimiento radioactivo

En 1902, Frederick Soddy propuso la teoría que “la radioactividad es el resultado de un cambio natural de un isótopo de un elemento hacia un isótopo de un elemento diferente.” Las reacciones nucleares incluyen cambios en las partículas del núcleo de un átomo y por consiguiente causan un cambio en el átomo mismo. Todos los elementos más pesados que el bismuto (y algunos más livianos) exhiben una radioactividad natural y por consiguiente pueden decaer hacia elementos más livianos (Novak & Brunner, 1992). Al contrario que las reacciones químicas normales que forman moléculas, las reacciones nucleares resultan en la transmutación de un elemento en un isótopo diferente o en un elemento diferente (ya que el número de protones de un átomo define el elemento, por lo tanto un cambio de un protón resulta en un cambio de un átomo).

Hay tres tipos comunes de radiación y cambios nucleares, cada una de las cuales transforma al núcleo de distinta manera: alfa, beta y gamma (Paredes, 2008).

- Radiación alfa ( $\alpha$ ): Es la emisión de una partícula alfa del núcleo de un átomo. Una partícula alfa contiene 2 protones y 2 neutrones (similar a un núcleo He) (Van Harten, 1998).



Este tipo de radiación la emiten núcleos de elementos pesados situados al final de la tabla periódica ( $A > 100$ ). Estos núcleos tienen muchos protones y la repulsión eléctrica es muy fuerte, por lo que tienden a obtener  $N$  aproximadamente igual a  $Z$ , y para ello emite una partícula alfa. En el proceso se desprende mucha energía que se convierte en la energía cinética de la partícula alfa, es decir que estas partículas salen con velocidades muy altas. La radiación alfa no tiene mucho poder de penetración en la materia y con facilidad es detenida por una delgada capa de cualquier material, como papel, tela o incluso el aire (Paredes, 2008).

- *Radiación beta negativa ( $\beta^-$ )*: Si hay un exceso de neutrones (es decir, en el núcleo hay más neutrones que los que tienen los isótopos estables del elemento considerado), la situación se haría más estable si se pudiera emitir un neutrón. Sin embargo, lo más frecuente es que ese exceso de neutrones se equilibre mediante un mecanismo combinado que consiste en "transformar" al neutrón en un electrón y un protón (Van Harten, 1998).

El protón se conserva en el núcleo en tanto que se emiten dos partículas: el electrón y una partícula sin carga eléctrica y de masa muchísimo menor que la del electrón, el neutrino. Al electrón emitido en esta situación se lo denomina partícula beta negativa ( $\beta^-$ ).

El nuevo núcleo tiene, entonces, un neutrón menos y un protón más. Esto es más efectivo que la emisión del neutrón únicamente, ya que el núcleo no sólo pierde un

neutrón sino que gana además un protón, compensando mejor el exceso de neutrones (Van Harten, 1998).

- *Radiación beta positiva ( $\beta^+$ )*: Si hay un exceso de protones respecto de la línea de estabilidad en el núcleo se hace más estable a través de la transformación de un protón en un neutrón y un positrón (electrón con carga positiva), abandonando este último el átomo. Al positrón se lo llama partícula beta positiva ( $\beta^+$ ). El nuevo núcleo tiene, entonces, un protón menos y un neutrón más (Novak & Brunner, 1992).
- *Radiación gamma*: Un rayo gamma es una forma de radiación electromagnética de alta energía sin masa o carga. Ninguna partícula es emitida durante la radiación gamma, y por consiguiente la radiación gamma no causa en sí misma la transmutación de los átomos. Sin embargo, la radiación gamma es emitida generalmente durante, y simultáneamente, a la disminución radioactiva beta (Van Harten, 1998).

Los rayos gamma pueden traspasar fácilmente casi todos los materiales, y para detenerlos se utilizan gruesos bloques de plomo o incluso gruesas planchas de concreto (Paredes, 2008). Los rayos X, emitidos durante la disminución beta del cobalto-60, son un ejemplo común de la radiación gamma (Van Harten, 1998).

#### **1.4.4.3 Inducción de mutaciones**

Si bien el mejoramiento genético exige la variación genética de las características útiles para mejorar los cultivos, a menudo no se logra la variación deseada. En estos casos pueden emplearse agentes mutagénicos, como la radiación o algunos productos químicos, para inducir mutaciones y generar variaciones genéticas de las cuales puedan seleccionarse los mutantes deseados (Novak & Brunner, 1992).

La inducción de mutaciones ha resultado ser un método eficaz para lograr variaciones dentro de los diferentes cultivares, ya que ofrece la posibilidad de inducir características deseadas que no se pueden hallar en la naturaleza o se han perdido durante el proceso evolutivo (Ahloowalia & Maluszynski, 2001).

La inducción artificial de mutaciones por medio de la radiación ionizante data de principios del siglo XX, pero no fue hasta unos 30 años después que se demostró que estas transformaciones podían emplearse en el mejoramiento genético de plantas. En los intentos iniciales para inducir mutaciones en las plantas se utilizó fundamentalmente la técnica de rayos X: más tarde en los comienzos de la “era atómica”, se emplearon las radiaciones gamma y de neutrones, ya que estos tipos de radiación ionizante podían obtenerse fácilmente en los centros de investigación nuclear recientemente creados (Novak & Brunner, 1992; Lönnig, 2005).

Diferentes factores como: tipo de radiación, dosis de radiación y tipo de explante que se utiliza causan diferentes cambios en el material genético. Los mecanismos que causan estos cambios se dividen en tres clases principales: génicas o moleculares, cromosómicas y Cariotípicas o genómicas (Novak & Brunner, 1992).

Hay una tendencia actual a considerar como mutaciones en sentido estricto solamente las génicas, mientras que los otros tipos entrarían en el término de aberraciones cromosómicas. En este trabajo también sólo nos vamos a referir a las génicas, ya que son estas las que pueden dar características deseadas al material que se irradia (Lönnig, 2005).

### Mutaciones génicas

- *Sustitución de bases:* Se cambia una base por otra en el sistema de replicación. Las enzimas al copiar sobre el ADN molde, cometen un error y colocan una base equivocada. Las mutaciones génicas por sustitución de bases suelen clasificarse en dos grupos: transiciones, cuando se cambia una base púrica por otra base púrica o



una pirimidínica por otra pirimidínica; y las transversiones en las que se sustituye una púrica por una pirimidínica o viceversa. Las sustituciones provocan la alteración de un sólo triplete, no suelen ser perjudiciales a no ser que se forme un codón sin sentido o afecte a un aminoácido del centro activo de la proteína (Van Harten, 1998).

- *Adición y delección de bases:* Se suprime o se aumenta una base. Las mutaciones de adición y delección son más graves que las sustituciones porque todos los tripletes de bases estarán cambiados a partir del punto en el que se ha producido la mutación y por tanto el mensaje codificado será totalmente distinto (Van Harten, 1998).

Las mutaciones por pérdida o adición suelen producirse por un emparejamiento anómalo durante la replicación entre la hebra molde y la que se está sintetizando. A este fenómeno se le llama cambio de fase. Se trata de un deslizamiento de la hebra que se está formando sobre la hebra molde de forma que se originan bucles al volverse a emparejar. El crecimiento continúa y la mutación se manifiesta en la siguiente replicación (Van Harten, 1998).

Las secuencias repetidas suelen provocar cambios de fase y con ello adiciones o delecciones. Estas secuencias repetidas se suelen conocer con el nombre de "puntos calientes" por ser lugares mucho más mutables que otros (Van Harten, 1998).

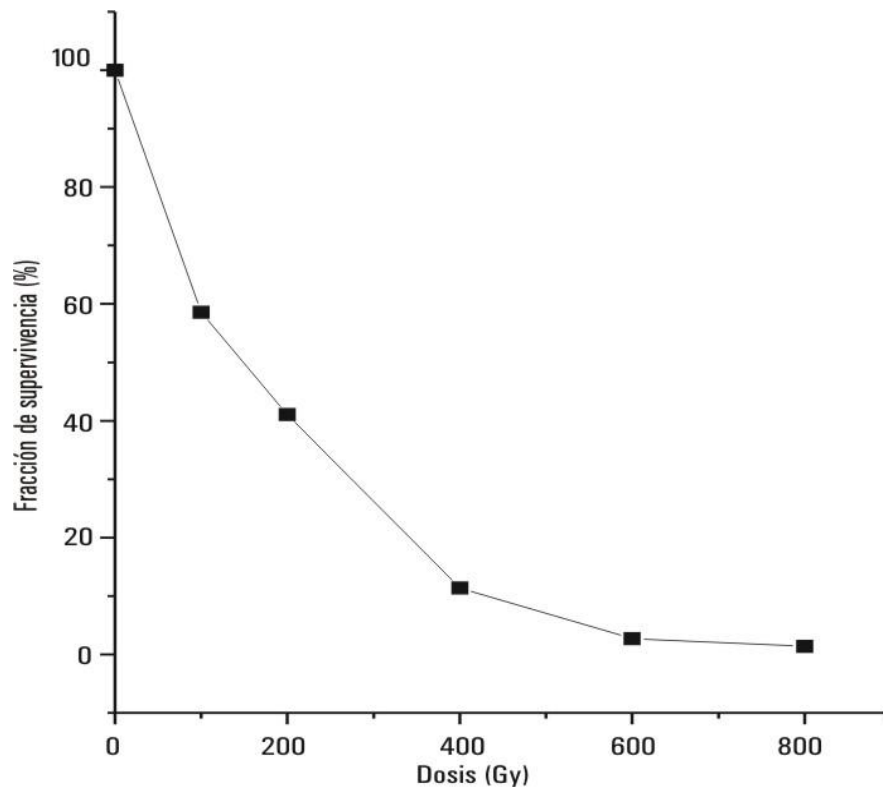
- *Transposición o translocación de bases:* Un segmento del ADN cambia de lugar. Es decir, se rompe un fragmento de molécula y se une después, pero en otro lugar. El desplazamiento de secuencias de la cadena nucleotídica provoca la aparición de nuevos tripletes lo que modificará el mensaje genético (Van Harten, 1998).

#### **1.4.4.4 Dosis Letal Media (DL<sub>50</sub>)**

Luego de la exposición a radiaciones ionizantes la proporción de células sobrevivientes o tasa de supervivencia (S) disminuye cuando la dosis aumenta. Las tasas

de supervivencia dependerán de la dosis, del sistema celular estudiado, y de las condiciones de estudio (Van Harten, 1998).

Según este modelo, existe una relación lineal inversa entre el logaritmo de la supervivencia y la dosis aplicada de radiación gamma (Moreno *et al.*, 2004). La cual resulta en una curva similar a la siguiente:



**Figura 1.7** Gráfico de mortalidad de células expuestas a radiación (Moreno *et al.*, 2004).

#### 1.4.4.5 Mutagénesis convencional del Maíz

En la mutagénesis convencional de semillas (ampliamente utilizada en programas de mejoramiento de maíz), la selección de mutantes normalmente comienza en la generación  $M_2$ , dicha selección no se puede hacer en la generación  $M_1$  debido a la estructura quimérica que pueden presentar estas plantas y también porque no se distinguen a todos los genotipos recesivos mutantes en esta generación (Szarejko, 2003). Sin embargo Maluszinsky *et al.*, (2001) recomendó posponer esta selección a la

generación  $M_3$ , especialmente si el objetivo de la mutagénesis es encontrar caracteres cualitativos como rendimiento, resistencia a enfermedades, a estrés abióticos o mejor calidad del fruto. Esto debido a que el tratamiento puede causar más de un evento mutagénico en las células que contribuye a la formación de los gametos, por lo que la mutación deseada podría verse enmascarada por otra no deseada (Lönnig, 2005).

Además las pruebas de homocigocidad no se pueden realizar en la misma generación en la que se seleccionan los mutantes, por lo que es necesaria una generación más. Como mínimo se necesitan de 3 a 4 generaciones para aislar una línea mutante homocigota mediante mutagénesis convencional de semillas (Szarejko, 2003; Lönnig, 2005).

#### **1.4.4.6 Mutagénesis en maíz con líneas doble haploides**

La combinación de sistemas doble haploides e inducción de mutaciones puede acortar la selección de mutantes (revisada en el numeral anterior) a tan sólo la mitad del tiempo, esto se debe a que este sistema presenta las siguientes ventajas:

- Los mutantes pueden ser seleccionados en la primera generación, ya que todas las características se expresan en el genotipo. Los genes recesivos no se pueden enmascarar porque tanto alelos dominantes como recesivos son los mismos, debido a la alta homocigocidad de estas plantas (Szarejko, 2003).
- Las líneas mutantes seleccionadas en base a su fenotipo son genéticamente fijas y no segregan en la progenie. Además, el porcentaje de formación de quimeras es muy bajo por lo que la frecuencia de mutantes es mucho mayor en la generación  $M_2$  (Szarejko, 2003).

Hay dos formas diferentes para combinar la mutagénesis con los sistemas haploides (Maluszynski *et al.*, 1996). Una, aplicando mutagénesis sobre las células haploides

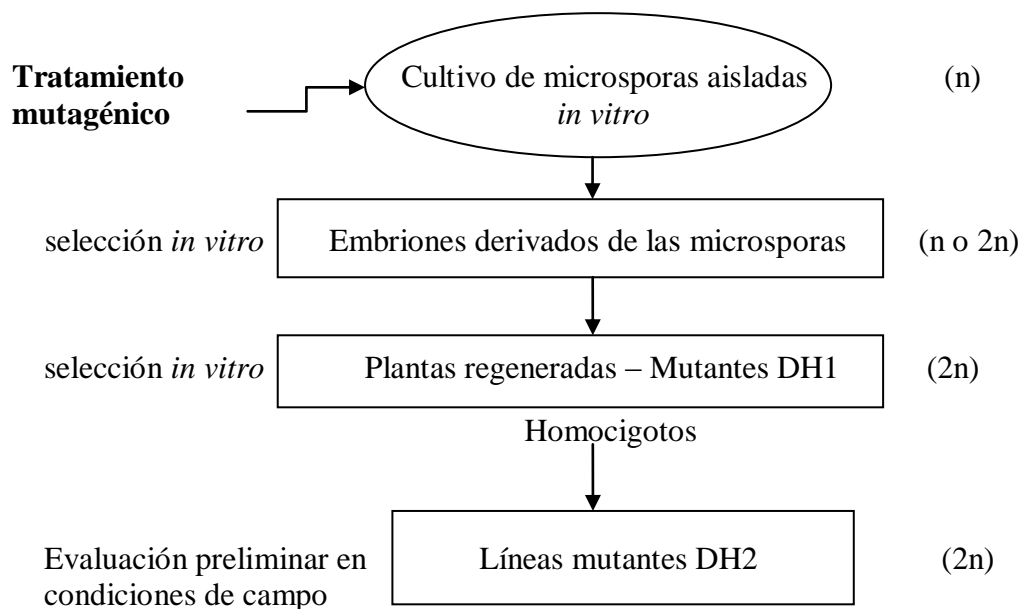
(microsporas) cultivadas *in vitro*. Y la otra, es usar las microsporas de plantas M<sub>1</sub> originarias de semillas tratadas con algún agente mutagénico, como material donante para cultivo de anteras o microsporas. En ambos casos, los mutantes son obtenidos de células haploides que acarrean alguna mutación (Szarejko, 2003).

#### Inducción de mutaciones en microsporas aisladas *in vitro*

Una vez estandarizado el protocolo, el cultivo de microsporas aisladas es el mejor sistema para la aplicación de mutagénesis y selección (Szarejko, 2003). Cuando se emplea el cultivo de microsporas para inducir mutagénesis se debe tomar en consideración algunos hechos importantes:

- El tratamiento de inducción de mutagénesis se aplica en microsporas que se encuentran en estado uninucleado, esto es generalmente justo después del aislamiento (cuadro 1.1), ya que si el tratamiento mutagénico se aplica después que la microspora sufre su primera división mitótica la planta haploide o doble haploide regenerada puede ser una quimera y/o un heterocigoto (Chen *et al.*, 1984; Kasha *et al.*, 2001).
- La aplicación de tratamientos mutagénicos a las microsporas en cultivo, puede bajar drásticamente su viabilidad y su respuesta androgénica, por esta razón es necesario hacer estudios de sensibilidad al agente mutagénico, antes de usarlo en tratamientos a gran escala (MacDonald *et al.*, 1991).
- Las microsporas no son las únicas células haploides que pueden ser usadas para tratamientos mutagénicos, también se pueden usar inflorescencias inmaduras como por ejemplo espiguillas o primordios, óvulos o anteras. En todos estos casos la dosis del agente mutagénico debe ser ajustado de acuerdo a la sensibilidad del material a ser usado en el tratamiento (Szarejko, 2003).

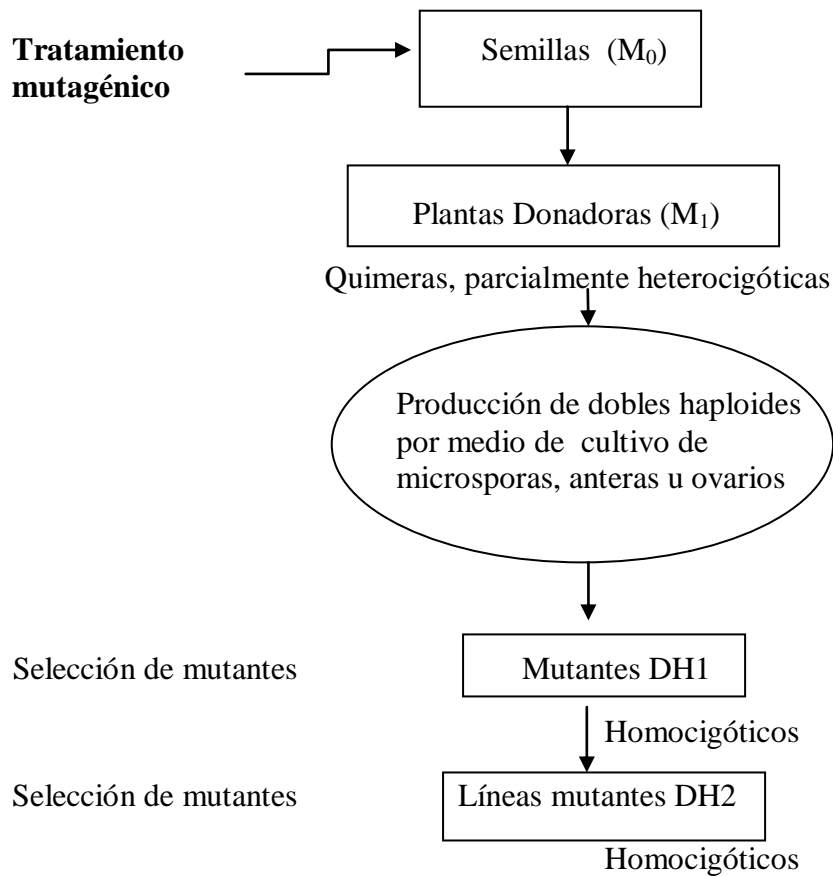
**Cuadro 1.1** Cuadro de la mutagénesis usando microsporas aisladas *in vitro*  
(Modificado de Szarejko, 2003).



#### Inducción de mutaciones en gametos de plantas $M_1$

Otra aplicación para inducir mutaciones en sistemas doble haploides es omitir el paso de mutagénesis *in vitro*. En esta aplicación plantas  $M_1$  obtenidas de semillas previamente tratadas con algún agente mutagénico, son usadas como material donador para el cultivo de haploides *in vitro* (Cuadro 1.2). Sin embargo, cuando alguien utilice este sistema para inducir mutaciones debe tomar en cuenta las siguientes ventajas y limitaciones:

**Cuadro 1.2** Cuadro del desarrollo de líneas mutantes usando mutagénesis en semillas y sistemas doble haploides (Modificado de Szarejko, 2003).



- La aplicación de mutagénesis sobre semillas en lugar de microsporas, permite aumentar la dosis del agente mutagénico, aumentando así el número de eventos mutagénicos posibles. Sin embargo, la formación de quimeras en M<sub>1</sub> aumenta por lo que la eficiencia de formación de mutantes haploides disminuye (Szarejko, 2003).
- Las dosis que se aplican a las semillas para obtener plantas donadoras, están dentro de los rangos que se utilizan para las semillas en tratamientos convencionales, por lo que si se cuenta con esta información puedes ahorrar mucho tiempo y recursos. Es importante examinar el efecto sobre la viabilidad de los gametos en las plantas

M<sub>1</sub> que se generan de las semillas tratadas con estas dosis (Maluszynski *et al.*, 1996).

- Los tratamientos aplicados a semillas tendrán relativamente bajos efectos sobre las células somáticas, por lo que es muy conveniente utilizar esta metodología para genotipos o especies que tengan baja respuesta androgénica, o no exista registros de cultivo de células haploides (Szarejko, 2003).
- El número de plantas usadas como donadoras para esta técnica debe ser muy grande para poder suplir el bajo número de microsporas que contengan una mutación, al contrario del otro método en el que pocas plantas pueden suplir un gran número de microsporas para hacer tratamientos mutagénicos *in vitro* (Maluszynski *et al.*, 1996).

### 1.5 Sistema de hipótesis o pregunta de investigación

**Hipótesis nula 1:** Mientras más tiempo de exposición al pre-tratamiento frío menor es la viabilidad de las microsporas de maíz de las variedades INIAP-101 e INIAP-601.

**Hipótesis nula 2:** La dosis letal media para microsporas de maíz es 20 Gy.

## **CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1 Participantes**

Esta investigación se realizó en su mayoría en las instalaciones del Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Departamento Nacional de Biotecnología (DNB) del INIAP. La irradiación de las microsporas de maíz se efectuó en los laboratorios de la Comisión Ecuatoriana de Energía Atómica (CEEA), bajo el auspicio de la Agencia Internacional de Energía Atómica (IAEA) y el Programa Nacional de Maíz del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP).

Los colaboradores científicos del proyecto fueron: Msc. Mónica Jadan (directora), Dra. Karina Proaño (Codirectora), Ing. Agr. Jacqueline Benítez (Técnica DNB), Ing. MCs. Carlos Yáñez (Jefe del Programa de Maíz), Dr. Eduardo Morillo (Jefe DNB) e Ing. Jair Zea (técnico CEEA).

### **2.2 Zona de estudio**

#### **2.2.1 Fase de campo**

Las plantas de maíz que se usaron como material donante para esta investigación fueron sembradas en la granja experimental de Tumbaco del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP).

#### **2.2.2 Fase de Laboratorio**

El cultivo *in vitro* de microsporas aisladas se realizó en el laboratorio de cultivo de tejidos del Departamento de Biotecnología en la Estación Experimental Santa Catalina (EESC) del INIAP, ubicada en la parroquia Cutuglagua, cantón Mejía, provincia de Pichincha.

En este laboratorio, la temperatura promedio es de 28 °C  $\pm$  2 y la humedad relativa en los cuartos de cultivo es de 70 %, se manejan fotoperíodos de 16 horas luz con una intensidad lumínica de 3000 lux.



La irradiación de las microsporas aisladas de maíz se realizó en el laboratorio de irradiación de material vegetal de la Comisión Ecuatoriana de Energía Atómica (CEEA), ubicada en la parroquia Aloag, cantón Mejía, provincia de Pichincha.

### **2.3 Período de investigación**

El tiempo invertido en esta investigación fue 1 año y 3 meses.

### **2.4 Diseño estadístico**

En la presente investigación tres experimentos diferentes fueron completados y analizados estadísticamente. El primer experimento fue diseñado para medir el efecto del tiempo de pre-tratamiento frío a 7°C con medio MMA (Zheng *et al.*, 2003a) sobre la viabilidad de las microsporas, en dicho experimento se asignaron tratamientos con un Diseños Completamente al Azar (DCA), a cajas Petri de 100 mm que contenían de 100 a 180 espiguillas. El análisis de varianza fue realizado sobre el porcentaje de microsporas viables después de aplicados los tratamientos.

El segundo experimento involucró el cultivo de microsporas aisladas en medio de inducción YP modificado (Zheng *et al.*, 2003a) vs. El mismo medio pero añadido 21 % de PEG 4000 (Polyethylene glycol 4000) (Ilic-Grubor *et al.*, 1998; Szarka, 2002), se asignaron tratamientos con un DCA a cajas Petri que contenían microsporas aisladas en una densidad de 70000 microsporas por ml. El análisis de varianza fue realizado sobre el porcentaje de microsporas viables después de aplicados los tratamientos.

En el tercer experimento se estableció una dosis adecuada de irradiación para microsporas aisladas de maíz, mediante una curva de dosis letal media, de igual manera los tratamientos se asignaron a cajas Petri con un DCA y los datos se analizaron en una curva, que se estableció como una relación lineal inversa entre el logaritmo de la supervivencia y la dosis aplicada de radiación gamma.

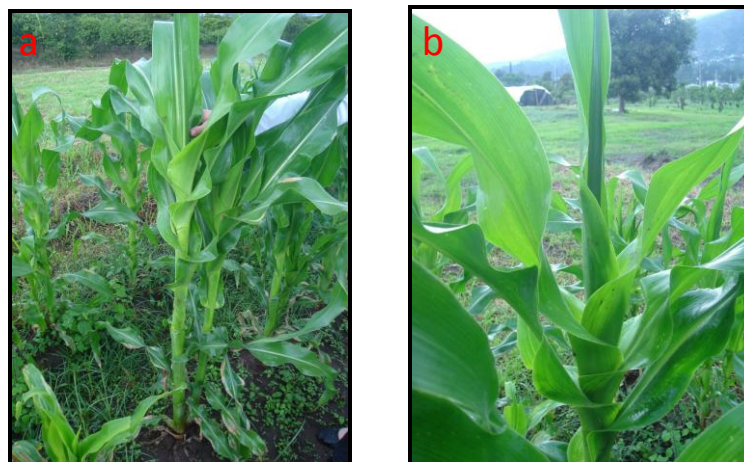
## 2.5 Material vegetal

En la presente investigación se utilizaron el híbrido de maíz amarillo duro I-601 y la variedad de maíz blanco I-101.

El híbrido I-601, fue desarrollado por el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) y es hoy en día el híbrido nacional más cultivado por los agricultores de maíz de la costa Ecuatoriana. Por otro lado, I-101 también desarrollado por INIAP tiene una característica muy particular de precocidad, es decir su ciclo de cultivo es mucho más corto que el de otras variedades de maíz.

Las plantas que se usaron como material vegetal donante fueron cultivadas en campo, en la granja experimental de Tumbaco del INIAP. Se realizaron regadíos semanalmente y se hicieron dos fertilizaciones con urea, la primera al momento de la siembra y la segunda 45 días después.

Las panojas se cosechan cuando todavía no emergen de la hoja bandera (Fig.1a y 1b), cuando la mayoría de las microsporas están en estado uninucleado temprano a uninucleado medio de su desarrollo.



**Figura 2.1** a. planta de I-601 lista para la cosecha de la panoja, b. hoja bandera envolviendo la panoja

## **2.6 Procedimientos**

### **2.6.1 Toma de muestras**

Para recolectar las panojas que se usarán como material donante, realizar un corte 2 ó 3 nudos por debajo del ápice de la planta, luego remover todo el follaje excepto las dos o tres hojas más próximas a la panoja, cortar las puntas de estas hojas unos 3 cm más largas que la panoja y colocar las muestras en un frasco con agua destilada, de tal manera que la base de la panoja tome contacto con el agua.

Una vez recogidas todas las panojas que se llevaran al laboratorio, envolverlas una por una con papel absorbente, previamente humedecido con agua destilada y luego cubrirlas con una hoja de papel aluminio. Finalmente, colocar las panojas en un “cooler” a 10 °C, para llevarlas hasta el laboratorio.

### **2.6.2 Correlación entre la morfología de la planta y el estado de desarrollo de las microsporas**

Es muy importante que las microsporas se encuentren en un estado adecuado de su desarrollo al momento del cultivo *in vitro*, para que después puedan enmascarar su desarrollo gametofítico normal y empiecen un desarrollo esporofítico. Para ello es necesario establecer, para cada variedad, una relación entre el estado de desarrollo del polen y la morfología de la planta, ya que no todas las variedades se desarrollan igual y las condiciones de crecimiento como fertilización, temperatura y cantidad de luz también influyen, acelerando o retrasando el desarrollo de las microsporas.

Para establecer esta relación, tomar panojas de plantas en diferentes estadios de desarrollo, con la metodología que se describió en el apartado 2.6.1, marcar cada panoja con un código que después pueda identificar a que estado de desarrollo de la planta corresponde. Un buen referente para determinar el estado de desarrollo de la planta es el número de hojas completas que ésta posee, entendiéndose por hojas completas aquellas en las que se puede observar el collar completamente desarrollado (Ritchie, 1993), así si la planta tiene seis hojas completas, el estado de desarrollo de la planta será V6; si la

planta tiene ocho hojas completas, el estado será V8; si la planta tiene nueve hojas completas, el estado será V9 (Fig. 2.2) y así sucesivamente.

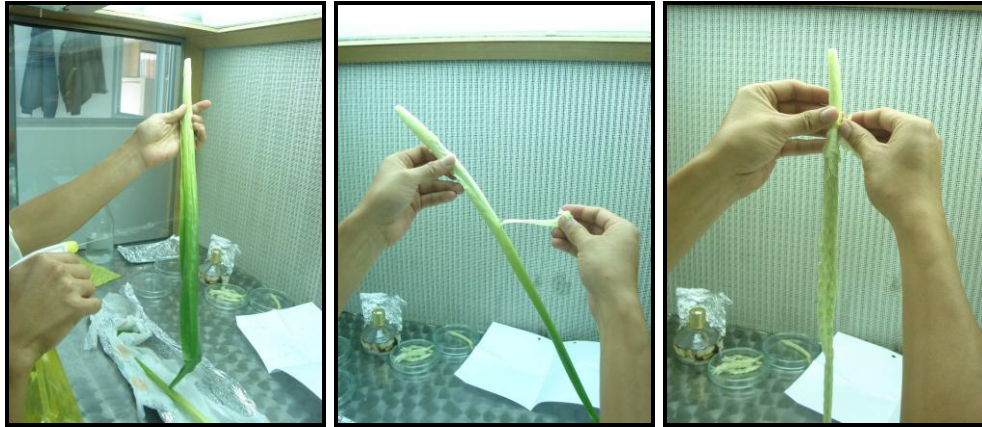


**Figura 2.2** Planta de maíz en estado de desarrollo V9 (Ritchie, 1993)

Otro referente que se puede usar es la edad de la planta, para ello se hace un registro del día de siembra y el día de cosecha de la panoja, de tal manera que se puede establecer el número de días al cual la panoja fue recogida.

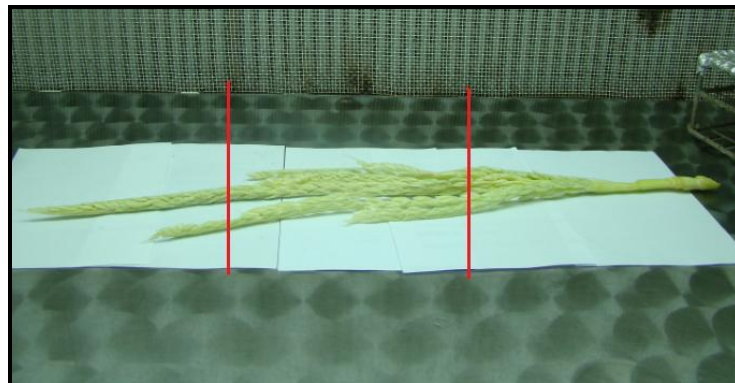
### **2.6.3 Determinación del estado de desarrollo de las microsporas**

En una cámara de flujo laminar, retirar el papel aluminio y el papel absorbente y luego esterilizar las hojas que envuelven a la panoja aspergeando alcohol al 70 %, retirar este follaje hoja por hoja realizando aspersiones con alcohol hasta que la panoja quede totalmente descubierta (Fig. 2.3).



**Figura 2.3** proceso de esterilización de la panoja con alcohol al 70 %.

Luego cortar trozos de la panoja y separarlos en grupos del ápice, medio y base de la panoja, tal como se muestra en la figura 2.4, esto es muy importante ya que las microsporas del ápice de la panoja suelen estar en un desarrollo más avanzado que las de la base o el medio de la panoja.



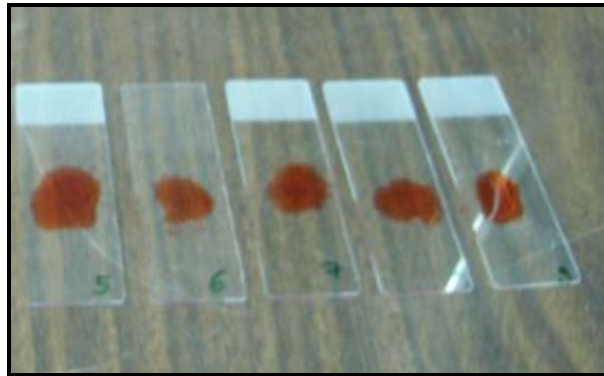
**Figura 2.4** panoja en donde se diferencia la separación de ápice, medio y base.

Después colocar los trozos en cajas Petri de 60 mm (Fig. 2.5), separando como ya se menciono antes base, medio y ápice de la panoja y con ayuda de una jeringuilla esterilizada, colocar 3 ml de agua destila en cada caja Petri que contiene los trozos de la panoja, para evitar que se sequen.



**Figura 2.5** Cajas Petri conteniendo los trozos de la panoja de maíz.

Tomar al azar dos ó tres espiguillas de cada caja Petri y de estas espiguillas tomar, nuevamente al azar, tres o cuatro antera, luego teñir las anteras con una gota de colorante carmín acético 2% y con ayuda de una varilla de vidrio presionar suavemente las anteras para permitir la salida de las microsporas, finalmente con una pinza extraer los restos de anteras, tratando de dejar sólo las microsporas (Fig. 2.5).



**Figura 2.6** tinción de las microsporas, para observar su estado de desarrollo.

Después de 20 minutos aproximadamente colocar el cubre objeto y observar al microscopio óptico con un aumento de 40x, para de esta manera distinguir las características que presentan las microsporas y así determinar el estadio de desarrollo de las mismas, cabe anotar que no todas las microsporas se encuentran en un mismo estado de desarrollo por lo que se toma como referencia el de la mayoría. Finalmente, escoger las cajas en las que las microsporas están en estado uninucleado temprano y uninucleado medio y proseguir con la esterilización.

- **Preparación de la solución de Acetocarmin al 2%**

El procedimiento que a continuación se describe es para un volumen de 25 ml de acetocarmin al 2%

- **Solución de ácido acético al 45 % (50 ml)**

En una Sorbona, colocar un poco de agua destilada en un matraz aforado de 50 ml, luego cuidadosamente añadir 22.5 ml de ácido acético glacial y finalmente aforar cuidadosamente con agua destilada. Tapar herméticamente y guardar a 7 °C.

- **Solución de acetocarmin**

Pesar en una balanza de precisión 0.5 g de colorante carmín, con ayuda de una Sorbona calentar en un vaso de precipitados unos 20 ml de ácido acético al 45 % cuidando que esta solución no hierva, poco a poco añadir el carmín y mecer continuamente hasta que el carmín se haya diluido, filtrar la solución y finalmente aforarla a 25 ml. Guardar esta solución en un frasco oscuro, herméticamente sellado y en refrigeración.

#### **2.6.4 Esterilización de la panoja**

En un frasco autoclavado colocar las partes de la panoja seleccionadas, verter una solución de hipoclorito de sodio al 1,5 % hasta que los trozos de la panoja queden totalmente sumergidos en esta solución, luego añadir 2 o 3 gotas de Tween 20, serrar el frasco y agitarlo continuamente por 20 minutos.

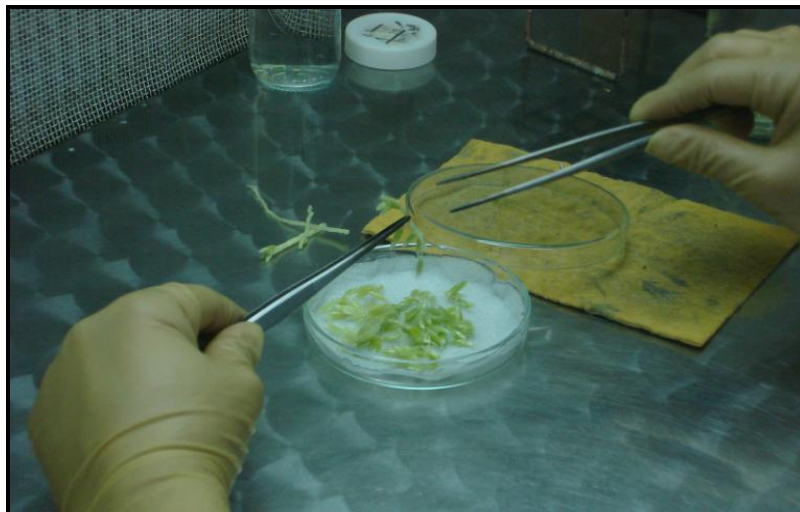
Finalmente, aplicar tres lavados, de 5 minutos cada uno, con agua destilada y autoclavada, con el fin de remover los restos de hipoclorito de sodio.



### 2.6.5 Pre-tratamiento de las espigas

Una vez realizados los lavados, los trozos de la panoja quedan en el frasco totalmente empapados, esto es muy conveniente, ya que una vez aislados, los explantes pueden perder mucha agua y en un ambiente totalmente húmedo como en el que ahora se encuentran, pueden ser guardados incluso hasta el día siguiente, sin que la viabilidad de las microsporas se vea afectada.

Con el ayuda de un par de pinzas, extraer uno de los trozos de panoja del frasco y colocarlo sobre un trozo de papel bond blanco previamente autoclavado, dejarlo reposar por aproximadamente 30 segundos, con el fin de que el exceso de agua que esta en las espiguillas sea absorbido por el papel, también se puede usar papel absorbente. Una vez que el exceso de agua haya sido absorbido, separar una por una las espiguillas, tal como se muestra en la figura 2.6.



**Figura 2.7** Extracción de las espiquillas, para luego colocarlas en medio de pre-tratamiento

Separadas todas las espiquillas, colocarlas en cajas Petri de 100 mm que contengan 15 ml de Medio de Pre-tratamiento (Tabla 2.1). Repetir el mismo procedimiento con cada uno de los trozos de panoja.



**Tabla 2.1** Medio de pre-tratamiento de las anteras de maíz.

<i>Componentes del medio</i>	<i>Concentración (mg/L)</i>
KCL	1492
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	246
CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	148
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2
KI	0,5
MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	8
ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,3
FeNaEDTA	56
Manitol	54.700
ácido ascórbico	50
2-HNA	100
Ácido nicotínico	10
pH	5,7-6,0

En cada caja Petri debe haber entre 100 y 180 espiguillas aproximadamente, todo depende de la variedad ya que las espiguillas de I-101 son mucho más grandes que las de I-601. Finalmente sellar las cajas Petri con parafilm, rotularlas y colocarlas en oscuridad y refrigeración a 7 °C, por un periodo de 1 a 11 días.

Es recomendable envolver las cajas Petri en papel aluminio, de esta manera nos aseguramos que la temperatura se distribuya bien y también damos a las cajas condiciones de completa oscuridad.

Para determinar el tiempo adecuado de pre-tratamiento frío en medio MMA, en estas dos variedades de maíz se evaluó el porcentaje de viabilidad de las microsporas a los 1, 3, 5, 7 y 9 días de aplicado dicho tratamiento. Para lo cual se siguieron los siguientes pasos.

Llevar a una cámara de flujo laminar 4 cajas Petri pre-tratadas, retirar con mucho cuidado el papel aluminio y luego, una por una abrir las cajas Petri y verificar si existe o no contaminación, si existe contaminación rechazar la caja.

Con ayuda de una pinza esterilizada tomar al azar 8 espiguillas de cada caja y colocarlas en pares sobre 4 porta objetos.

Extraer las anteras de las espiguillas y colocarlas sobre los portaobjetos, luego escoger también al azar de tres a cuatro anteras y con estas repetir los pasos de tinción descritos en 2.6.3 (determinación del estado de desarrollo de las microsporas).

#### **2.6.6 Aislamiento de las microsporas y separación por gradientes de concentración**

Después de aplicado el pre-tratamiento de inducción de androgénesis, llevar las cajas Petri de 100 mm que contiene las espiguillas a una cámara de flujo laminar, abrir una por una las cajas y verificar que no estén contaminadas, si alguna estuviera contaminada es inmediatamente rechazada.

Con la ayuda de una pinza sacar de la caja Petri aquellas espiguillas que están de color café (oxidadas), ya que en ellas no hay microsporas viables, luego con una nueva pinza transpasar el resto de espiguillas a un frasco de licuadora de 500 ml (frasco pequeño). Colocar entre 350 y 400 espiguillas y suspenderlas en 150 ml de medio de aislamiento (Tabla 2.2).

**Tabla 2.2** Medio de aislamiento de microsporas de maíz

<i>Componentes del medio</i>	<i>Concentración (mg/L)</i>
ácido ascórbico	50
biotin	0,1
ácido nicotínico	10
Prolina	100
manitol	54.700
pH	5,7-6,0

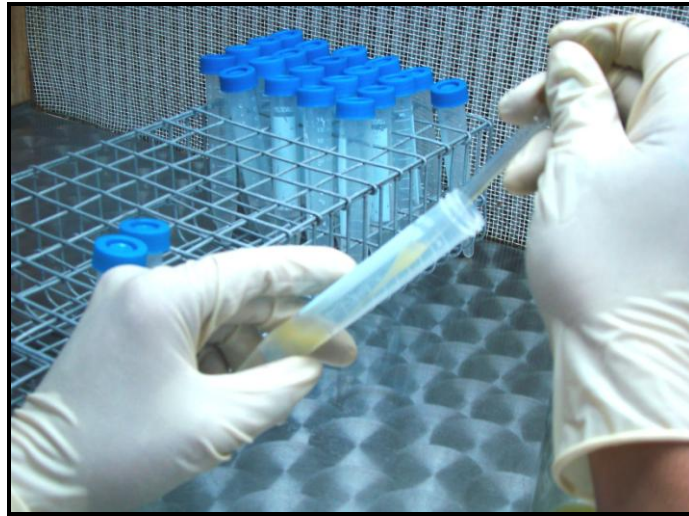
Licuar las espiguillas a baja velocidad por 10 segundos, apagar y dejar reposar 30 segundos, luego licuar por 10 segundos más a velocidad media y hacer una nueva pausa de 30 segundos, por ultimo licuar a alta velocidad por 10 segundos más.

Para separar las microsporas de los trozos de anteras generados en el licuado, se filtra el licuado a través de un tamiz de 100 um, aquí las microsporas pasan a través del tamiz y son recolectadas en un frasco, mientras que los trozos de anteras grandes quedan retenidos en el tamiz. Luego verter la suspensión de microsporas, anteriormente recogida, sobre un tamiz de 50 um, esta vez las microsporas quedan retenidas en el tamiz, mientras que el medio y los trozos de basura pequeños pasan a través del tamiz.

Lavar tres veces las microsporas retenidas en el tamiz de 50 um, con 5 ml de solución 0.3 M de manitol (pH 5.8), luego resuspender las microsporas aisladas en 10 ml de medio de aislamiento.

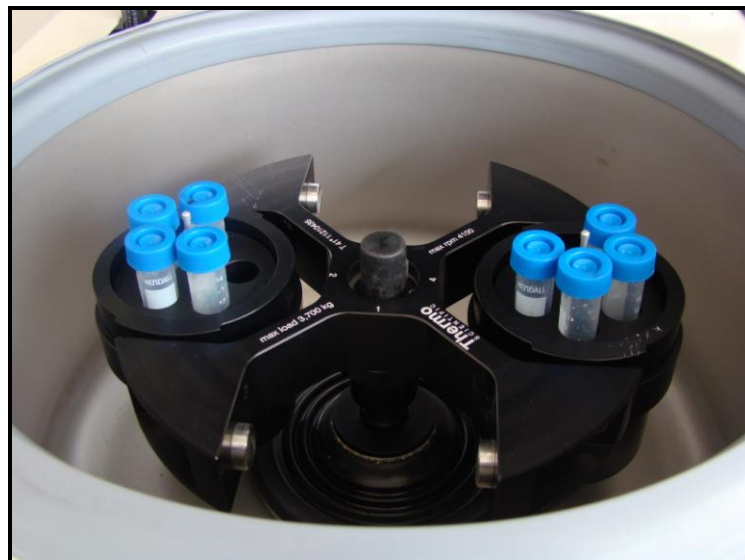
En tubos falcon de 15 cm colocar 3 ml de una solución de maltosa al 21%, después con ayuda de una pipeta Pasteur colocar cuidadosamente sobre la solución de maltosa,

la solución de manitol que contiene las microsporas (Fig. 2.7), serrar y sellar los tubos falcon para llevarlos a centrifugar.



**Figura 2.8** microsporas colocadas sobre la solución de maltosa 21%.

Balancear y centrifugar los tubos a 850 rpm por 2.5 minutos (Fig. 2.8). Las microsporas viables y en estado uninucleado forman una o dos bandas en la interfase entre las dos soluciones, mientras que la basura y las microsporas muertas o en estado binucleado se precipitan al fondo (Fig. 2.9).



**Figura 2.9** Tubos falcon balanceados y listos para centrifugar.



**Figura 2.10** banda de microsporas viables y precipitado de microsporas muertas

Regresar los tubos a la cámara de flujo laminar y recoger con una pipeta Pasteur o una jeringuilla las microsporas viables, resuspenderlas en medio de inducción (Tabla 2.3) y con ayuda de un hemacitometro ajustar la densidad a 70000 microsporas por ml aproximadamente.

**Tabla 2.3** Medio de inducción de microsporas de maíz.

<i>Componentes del medio</i>	<i>Concentración (mg/L)</i>
<i>sales macro</i>	
KNO <sub>3</sub>	2500
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	165
CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	176
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	510
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	370

<b><i>Sales micro</i></b>	
ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	1.5
KI	0,8
MnSO <sub>4</sub> x 4H <sub>2</sub> O	4.4
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1.6
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0,0125
CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O	0,0125
CoCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	0,0125
<b><i>Sales de hierro</i></b>	
Na <sub>2</sub> EDTA	37,3
FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	27,8
<b><i>Otros componentes</i></b>	
Glicina	2
Ácido nicotínico	0.5
L-prolina	400
Tiamina HCL	0.5
Asparagina	15
Sucrosa	50000
Maltosa	70000
Glutamina	125
Kinetina	0.4
2,4-D	1.2
PAA	1
PEG 4000 <sup>4</sup>	210000
<b>pH</b>	<b>5,8</b>

<sup>4</sup> PEG 4000 es la única variante que se probó en medios de inducción, como un regulador de la presión osmótica

Una vez ajustada la densidad de las microsporas, con una jeringuilla esterilizada, colocar 3 ml de la suspensión en cajas Petri de 60 mm, Luego colocar tres de estas cajas, sin sellar, en un contenedor plástico más grande (recipientes plásticos para microondas) y sellar este contenedor con parafilm. Este procedimiento se hace con el fin de dar a las microsporas un mejor ambiente gaseoso.

En la presente investigación se evaluó la viabilidad de las microsporas aisladas en dos medio de inducción, donde la única diferencia era la presencia o ausencia de PEG 4000 (Polyethylene glycol 4000), para lo cual se tomaron muestras a 1, 3, 5 y 7 días de haber sido aisladas las microsporas, usando la siguiente metodología.

Con ayuda de una jeringuilla transpasar las microsporas aisladas a un tubo falcon de 15 ml, centrifugar a 850 rpm por 2 minutos, después de la centrifugación las microsporas forman un pelet en el fondo del tubo, extraer el medio y con ayuda de un aza tomar muestras del pelet de microsporas y colocarlas sobre diferentes porta objetos finalmente teñir las microsporas con acetocarmin al 2%, observar y contabilizar el número de microsporas viables.

#### **2.6.7 Irradiación de las microsporas**

La irradiación de las microsporas se tiene que realizar inmediatamente después del aislamiento, para que la mutación se dé antes de la primera división mitótica de la androgénesis.

Ya que las microsporas van a salir fuera de las condiciones asépticas del laboratorio, las cajas tienen que estar bien selladas con parafilm. Si el sitio donde se va a realizar la irradiación del material esta lejos del laboratorio, es recomendable transportar las cajas Petri bajo condiciones de baja temperatura (10 °C), ya que las microsporas entran en estado de letargo y no inician androgénesis.

El primer paso para irradiar con una fuente radioactiva, es calcular la tasa de dosis que en ese momento tiene la fuente, con la siguiente formula:

$$D = D_0 \cdot e^{-\lambda \cdot t}$$

Donde:

$$\lambda = \frac{\ln 2}{t_{1/2}}$$

$(t_{1/2})$  = tiempo de vida media del radioisótopo de la fuente

D = tasa de dosis actual

$D_0$  = tasa de dosis inicial

t = tiempo transcurrido desde que  $D_0$  fue registrada,

Todos los parámetros que se necesitan para calcular la tasa de dosis son conocidos, ya que el tiempo de vida media de los radioisótopos esta registrado en tablas (Anexo 4), la  $D_0$  es un parámetro que viene registrado al momento de adquirir la fuente radioactiva, en conjunto con la fecha en la que se tomó ese dato, por ende el tiempo transcurrido también es un factor conocido

Una vez calculada la tasa de dosis actual, la cual se expresa generalmente en Gray por unidad de tiempo, lo único que tenemos que hacer es aplicar una simple regla de tres para calcular que tiempo de exposición se necesita para dar la dosis que se requiere. Para la presente investigación se aplicaron los siguientes periodos de tiempo



**Tabla 2.4** dosis y tiempos de exposición a radiación con la fuente de  $\text{Co}^{60}$  de la CEEA.

Fecha	dosis	tiempo
15 de mayo del 2009	5	36 seg.
19 de mayo del 2009	10	57 seg.
22 de mayo del 2009	15	1,28 min.
22 de mayo del 2009	20	1,71 min.

Una vez determinados los tiempos, colocar las cajas Petri que contienen las microsporas en la cámara del irradiador y programar el tiempo de exposición, para dar la dosis deseada, finalmente llevar las microsporas de vuelta al laboratorio.

#### **2.6.8 Inducción de androgénesis**

Una vez aplicadas las dosis de radiación, llevar las microsporas de vuelta al laboratorio y en una cámara de flujo laminar, retirar el parafilm de las cajas Petri. Con el fin de dar a estas microsporas una atmosfera gaseosa adecuada, no sellamos las cajas y las colocamos en grupos de tres, dentro de un recipiente plástico para microondas. Finalmente, sellamos este recipiente con parafilm y lo guardamos a 28 °C en obscuridad.

Para evaluar el efecto de la radiación sobre la viabilidad de las microsporas de maíz de estas dos variedades, se tomaron muestras a 1, 3, 5 y 7 días después de la irradiación y se contó el número de microsporas viables, con la siguiente metodología

En una cámara de flujo laminar abrir las cajas petri que contiene las microsporas irradiadas, con una jeringuilla esterilizada extraer 1 ml de microsporas y colocarlas en un tubo falcón de 5ml también esterilizado, tapar el tubo.

Una vez extraídas todas las muestras con este procedimiento, llevar los tubos a centrifugar a 805 rpm por 2.5 minutos, retirar el sobrenadante y con un aza esterilizada tomar muestras de las microsporas y colocarlas sobre un portaobjeto, teñir las muestras con acetocarmin 2 % durante 30 min. Y observar al microscopio.

## **2.7 Análisis de datos**

Para evaluar estadísticamente los diferentes tratamientos que se aplicaron a las microsporas, se tomaron muestras significativas de cada unidad experimental y los resultados fueron expresados como porcentajes de viabilidad ya que es prácticamente imposible evaluar a todas las microsporas. Adicionalmente los resultados fueron expresados como porcentajes de viabilidad de las microsporas.

Para cumplir con los objetivos de esta investigación, tres experimentos se analizaron estadísticamente y aquí se detalla todos los aspectos que se tomaron en cuenta para el análisis de datos como: los factores en estudio, los tratamientos aplicados, las unidades experimentales y los métodos utilizados para el análisis estadístico de los datos.

### **2.7.1 Evaluación del tiempo de pre-tratamiento frío**

#### **2.7.1.1 Factores en estudio**

Para la etapa de la determinación de las condiciones óptimas de pre-tratamiento frío se toman en cuenta las siguientes variables.

#### Variedades de maíz (V)

V<sub>1</sub> = Variedad de maíz suave de la Sierra (INIAP -101)

V<sub>2</sub> = Híbrido de maíz duro de la Costa (INIAP -601)

### Días de pre-tratamiento (D)

$D_1 = 1$  día

$D_2 = 3$  días

$D_3 = 5$  días

$D_4 = 7$  días

$D_5 = 9$  días

### **2.7.1.2 Tratamientos.**

Resultan de la combinación de los factores en estudio (tabla 2.5).

**Tabla 2.5** Tratamientos de evaluación del tiempo de pre-tratamiento a 7 °C

<b>Símbolo</b>	<b>Código</b>	<b>Tratamiento</b>
$T_1$	$V_1 \times D_1$	Espigas de la variedad de maíz suave de la Sierra (INIAP-101) colocadas en medio de pre-tratamiento a 7 °C por 1 día.
$T_2$	$V_1 \times D_2$	Espigas de la variedad de maíz suave de la Sierra (INIAP-101) colocadas en medio de pre-tratamiento a 7 °C por 3 días.
$T_3$	$V_1 \times D_3$	Espigas de la variedad de maíz suave de la Sierra (INIAP-101) colocadas en medio de pre-tratamiento a 7 °C por 5 días.
$T_4$	$V_1 \times D_4$	Espigas de la variedad de maíz suave de la Sierra (INIAP-101) colocadas en medio de pre-tratamiento a 7 °C por 7 días.
$T_5$	$V_1 \times D_5$	Espigas de la variedad de maíz suave de la Sierra (INIAP-101) colocadas en medio de pre-tratamiento a 7 °C por 9 días.
$T_6$	$V_2 \times D_1$	Espigas del híbrido de maíz duro de la Costa (INIAP-601) colocadas en medio de pre-tratamiento a 7 °C por 1 día.

T <sub>7</sub>	V <sub>2</sub> X D <sub>2</sub>	Espigas del híbrido de maíz duro de la Costa (INIAP-601) colocadas en medio de pre-tratamiento a 7 °C por 3 días
T <sub>8</sub>	V <sub>2</sub> X D <sub>3</sub>	Espigas del híbrido de maíz duro de la Costa (INIAP-601) colocadas en medio de pre-tratamiento a 7 °C por 5 días
T <sub>9</sub>	V <sub>2</sub> X D <sub>4</sub>	Espigas del híbrido de maíz duro de la Costa (INIAP-601) colocadas en medio de pre-tratamiento a 7 °C por 7 días
T <sub>10</sub>	V <sub>2</sub> X D <sub>5</sub>	Espigas del híbrido de maíz duro de la Costa (INIAP-601) colocadas en medio de pre-tratamiento a 7 °C por 9 días

### 2.7.1.3 Unidad experimental

La unidad experimental para evaluar el tiempo de pre-tratamiento a 7 °C esta conformada por 1 caja Petri que contiene de 100 a 180 espiguillas.

### 2.7.1.4 Análisis estadístico

Los tratamientos fueron asignados a cada unidad experimental con un DCA (Diseño Completamente al Azar) en arreglo factorial 5 x 2 con 25 observaciones por tratamiento.

**Cuadro 2.1** Esquema de Análisis de Varianza para la evaluación del tiempo de pre-tratamiento a 7 °C.

<b>Fuente de Variación</b> (F de V)	<b>Grados de Libertad</b> (G L)
<b>Total</b>	250
<b>Tratamientos</b>	9
Variedades de Maíz (V)	1
Días de pre-tratamiento (D)	4
V X D	4
<b>Error Experimental</b>	241

## 2.7.2 Efecto del PEG en el medio de inducción sobre la viabilidad de las microsporas

### 2.7.2.1 Factores en estudio

Para evaluar la presencia de PEG en el medio de inducción se tomaron en cuenta las siguientes variables.

#### Variedades de maíz (V)

V<sub>1</sub> = Variedad de maíz suave de la Sierra (INIAP -101)

V<sub>2</sub> = Híbrido de maíz duro de la Costa (INIAP -601)

#### Medio de inducción (M)

M<sub>1</sub> = Medio de inducción sin PEG

M<sub>2</sub> = Medio de inducción con PEG al 21%

### 2.7.2.2 Tratamientos

Resultan de la combinación de los factores en estudio (Tabla 2.6).

**Tabla 2.6** Evaluación de la presencia de PEG en el medio de inducción sobre la viabilidad de las microsporas.

Símbolo	Código	Tratamiento
T <sub>1</sub>	V <sub>1</sub> X M <sub>1</sub>	Espigas de la variedad de maíz suave de la Sierra (INIAP-101) colocadas en medio de inducción sin PEG.
T <sub>2</sub>	V <sub>1</sub> X M <sub>2</sub>	Espigas de la variedad de maíz suave de la Sierra (INIAP-101) colocadas en medio de inducción con 21 % de PEG.
T <sub>3</sub>	V <sub>2</sub> X M <sub>1</sub>	Espigas del híbrido de maíz duro de la Costa (INIAP-601) colocadas en medio de inducción sin PEG
T <sub>4</sub>	V <sub>2</sub> X M <sub>2</sub>	Espigas del híbrido de maíz duro de la Costa (INIAP-601) colocadas en medio de inducción con 21 % de PEG.

### 2.7.2.3 Unidad experimental

La unidad experimental para evaluar la presencia de PEG en el medio de inducción esta conformada por 1 caja Petri que contiene 3 ml de una suspensión de microsporas a una densidad de 70000 microsporas por ml..

### 2.7.2.4 Análisis estadístico

Los tratamientos fueron asignados a cada unidad experimental con un DCA (Diseño Completamente al Azar) en arreglo factorial 2 x 2 con 25 observaciones por tratamiento.

**Cuadro 2.2** Esquema de Análisis de Varianza para la evaluación del tiempo de pre-tratamiento a 7 °C.

<b>Fuente de Variación</b> (F de V)	<b>Grados de Libertad</b> (G L)
<b>Total</b>	100
<b>Tratamientos</b>	3
Variedades de Maíz (V)	1
Días de pre-tratamiento (D)	2
V X D	2
<b>Error Experimental</b>	97

### 2.7.3 Determinación de la dosis letal media y dosis adecuada de radiación gamma con una fuente de Co<sup>60</sup>, para microsporas aisladas

#### 2.7.3.1 Factores en estudio

Para determinar la dosis letal media y dosis adecuada de radiación sobre la viabilidad de las microsporas se tomaron en cuenta las siguientes variables.

### Variedades de maíz (V)

V<sub>1</sub> = Variedad de maíz suave de la Sierra (INIAP -101)

V<sub>2</sub> = Híbrido de maíz duro de la Costa (INIAP -601)

### Dosis de radiación (D)

D<sub>1</sub> = 0 Gy

D<sub>2</sub> = 5 Gy

D<sub>3</sub> = 10 Gy

D<sub>4</sub> = 15 Gy

D<sub>5</sub> = 20 Gy

### **2.7.3.2 Tratamientos**

Resultan de la combinación de los factores en estudio (Tabla 2.7).

**Tabla 2.7** Tratamientos para la determinación de la dosis letal media y dosis adecuada de radiación de las microsporas.

<b>Símbolo</b>	<b>Código</b>	<b>Tratamiento</b>
T <sub>1</sub>	V <sub>1</sub> X D <sub>1</sub>	Microsporas de la variedad de maíz suave de la Sierra (INIAP-101) sin exposición a radiación gamma
T <sub>2</sub>	V <sub>1</sub> X D <sub>2</sub>	Microsporas de la variedad de maíz suave de la Sierra (INIAP-101) expuestas a 5 Gy de radiación gamma
T <sub>3</sub>	V <sub>1</sub> X D <sub>3</sub>	Microsporas de la variedad de maíz suave de la Sierra (INIAP-101) expuestas a 10 Gy de radiación gamma
T <sub>4</sub>	V <sub>1</sub> X D <sub>4</sub>	Microsporas de la variedad de maíz suave de la Sierra (INIAP-101) expuestas a 15 Gy de radiación gamma

T <sub>5</sub>	V <sub>1</sub> X D <sub>5</sub>	Microsporas de la variedad de maíz suave de la Sierra (INIAP-101) expuestas a 20 Gy de radiación gamma
T <sub>6</sub>	V <sub>2</sub> X D <sub>1</sub>	Microsporas del híbrido de maíz duro de la Costa (INIAP-601) sin exposición a radiación gamma
T <sub>7</sub>	V <sub>2</sub> X D <sub>2</sub>	Microsporas del híbrido de maíz duro de la Costa (INIAP-601) expuestas a 5 Gy de radiación gamma
T <sub>8</sub>	V <sub>2</sub> X D <sub>3</sub>	Microsporas del híbrido de maíz duro de la Costa (INIAP-601) expuestas a 10 Gy de radiación gamma
T <sub>9</sub>	V <sub>2</sub> X D <sub>4</sub>	Microsporas del híbrido de maíz duro de la Costa (INIAP-601) expuestas a 15 Gy de radiación gamma
T <sub>10</sub>	V <sub>2</sub> X D <sub>5</sub>	Microsporas del híbrido de maíz duro de la Costa (INIAP-601) expuestas a 20 Gy de radiación gamma

### 2.7.3.3 Unidad experimental

La unidad experimental para evaluar la viabilidad después de la radiación esta conformada por 1 caja Petri que contiene 3 ml de una suspensión de microsporas a una densidad de 70000 microsporas por ml.

### 2.7.3.4 Curva de viabilidad

Para determinar la dosis letal media y dosis adecuada se realizara análisis y curvas de supervivencia con el programa estadístico SPSS.



## CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1 Toma de muestras

Se cosecharon en total 146 panojas de *Zea mays*, de las cuales 5 fueron rechazadas por motivos de contaminación y 33 porque el estado de desarrollo de la panoja no era el adecuado. Las 108 restantes, 64 de la variedad I-101 y 44 del híbrido I-601, se utilizaron en los tratamientos de evaluación del pre-tratamiento frío en medio MMA, valoración del medio de inducción y determinación de la dosis óptima de radiación gamma  $Co^{60}$  para microsporas de maíz de estas dos variedades, tal como se muestra en la Tabla 3.1.

**Tabla 3.1** Número de panojas usadas en los tratamientos de evaluación del pre-tratamiento frío en medio MMA, valoración del medio de inducción y determinación de la dosis óptima de radiación gamma  $Co^{60}$  para microsporas de maíz de la variedad I-101 y del híbrido I-601.

	TRATAMIENTOS			<b>TOTAL</b>
	Pre-tratamiento frío	Medio de inducción	Inducción de mutaciones	
No. de panojas de I-101	6	20	38	<b>64</b>
No. de panojas de I-601	6	15	23	<b>44</b>
<b>TOTAL:</b>	<b>12</b>	<b>35</b>	<b>61</b>	<b>108</b>

Las cosechas se hicieron en diferentes fechas debido a que se pretendía evaluar el tiempo de pre-tratamiento en medio MMA y para no alterar los resultados se evitó introducir panojas que hubieran estado en refrigeración 3 o más días sin medio de pre-cultivo MMA. Zheng y sus colaboradores (2003a) mencionan que al guardar las panojas en condiciones desfavorables antes del pre-tratamiento frío puede alterar la viabilidad de las microsporas.

### **3.2 Correlación entre la morfología de la planta y el estado de desarrollo de las microsporas**

Es muy importante establecer para cada variedad o híbrido una relación que nos indique en que momento debemos cosechar las panojas para que la mayoría de microsporas estén en un correcto estado de desarrollo.

En la presente investigación se estableció una relación entre la edad de la planta y el correcto estado de desarrollo de las microsporas (uninucleado temprano). Las panojas de la variedad I-101 se recogieron después de 55 a 60 días de sembradas las semillas y las del híbrido I-601 se recogieron de 63 a 70 días después de haber sido sembradas. Estas referencias no fueron muy útiles, ya que proporcionaron resultados muy irregulares y un gran porcentaje de panojas (44.4%) no estaban en el estado de desarrollo adecuado y fueron rechazadas (Tabla 3.2).

Por esta razón se procedió a establecer una correlación entre la morfología de la planta y el estado de desarrollo de las microsporas (Zheng *et al*, 2003a), usando como referencia el número de hojas completas que la planta posee (Ritchie, 1993).

Tanto para la variedad I-101 como para el híbrido I-601, los estados de desarrollo de la planta en el que la mayoría de las microsporas estaban en estado uninucleado temprano y uninucleado medio, fueron los estados V8 y V9 de desarrollo, es decir cuando la planta presenta 8 y 9 hojas completas respectivamente (Fig. 3.1). Este referente fue muy útil ya que el 93.6 % de las panojas recolectadas estaban en el estado adecuado de desarrollo (Tabla 3.2).

**Tabla 3.2** Uso de dos referencias: No. De hojas completas que la planta posee vs. Edad de la planta, para cosechar panojas en estado adecuado de desarrollo es decir que la mayoría de microsporas estén en estado uninucleado temprano.

			Panoja en un incorrecto estado de desarrollo	Panoja en un correcto estado de desarrollo	Total
Referencia:	No. de hojas completas	No. De panojas	5	73	78
		% de referencia	6,4%	93,6%	100,0%
	edad de la planta	No. De panojas	28	35	63
		% de referencia	44,4%	55,6%	100,0%

La mayoría de investigaciones (Pace *et al.*, 1987; Coumans *et al.*, 1989; Büter, 1997; Nageli *et al.*, 1999; Obert *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2002; Obert & Barnabas, 2004; Obert *et al.*, 2005;), establecen que las panojas deben ser cosechadas antes de que emerjan de la hoja bandera. Sin embargo, tal como lo pudimos comprobar en la presente investigación, ésta es una referencia muy ambigua ya que se pueden cosechar panojas con microsporas muy tiernas o incluso con microsporas muy maduras.

Para evitar estos errores, algunos autores (Genovesi & Yingling, 1994; Petolino & Jones. 1986; Pretova *et al.*, 1993;) recomiendan tomar 2 o 3 espiguillas como muestras de cada panoja antes de cosecharla y llevarlas al laboratorio para establecer mediante tinción el estado de desarrollo de las microsporas. Sin embargo, éste no es un procedimiento muy práctico si se tiene decenas de panojas.



**Figura 3.1** Morfología de una planta de maíz del híbrido I-601 en estado de desarrollo V9. Esta planta presenta el correcto estado de desarrollo para cosechar la panoja.

Autores como Gaillard *et al*, 1991 y Szarka *et al*, 2001 establecen una relación entre el estado de desarrollo de las microsporas y la edad de la planta, mediante este referente se evita tomar muestras de cada planta antes de cosechar la panoja y simplemente se cosechan las panojas en el tiempo establecido. Este procedimiento también se aplicó en esta investigación, estableciéndose que las plantas de I-101 deben ser cosechadas entre 55 a 60 días después de haber sido sembradas y las de I-601 después de 63 a 70 días, estos resultados concuerdan con los de Gaillard, quien estableció cosechar las panojas a 55 o 56 días de haber sido sembradas y también con los de Szarka quien estableció tiempos de 60 a 78 días. Sin embargo, como se puede ver en la Tabla 3.2, esta referencia dio resultados muy irregulares con nuestro material.

Estas diferencias se dieron principalmente porque las plantas no tuvieron condiciones de crecimiento regulares como en los trabajos anteriormente mencionados, en los cuales las plantas fueron cultivadas en invernaderos o cámaras de crecimiento, con condiciones de luz y temperatura controladas. En lugar de ello, las plantas fueron

sembradas en campo donde las condiciones físicas como temperatura, cantidad de luz, lluvia y disponibilidad de nutrientes no son las mismas para todas las plantas y peor aún si se hacen siembras en diferentes meses del año, como se hizo en la presente investigación.

Todas estas variables, imposibles de controlar en campo, hacen que no todas las plantas se desarrollen igual, acelerando o retrasando el desarrollo de las microsporas y generando así irregularidades en el estado de desarrollo de la panoja al momento de la cosecha (Büter, 1997).

Zheng y sus colaboradores (2003a) recomiendan establecer una relación entre la morfología de la planta y el estado de desarrollo de las microsporas, por lo que se estableció dicha relación con el estado vegetativo de la planta. Los estados vegetativos de la planta de maíz están definidos por el número de hojas completas que la planta posee y son un buen referente para saber el estado de desarrollo fisiológico de la planta y por ende de la panoja (Ritchie, 1993).

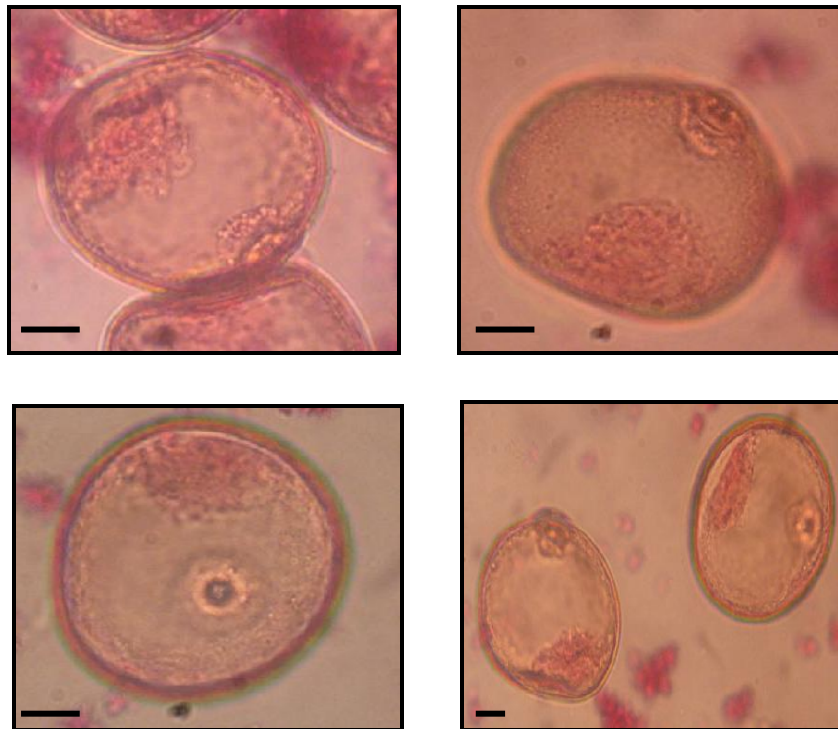
Al revisar los valores de la Tabla 3.2 se puede ver claramente que el número de hojas completas que la planta posee es un referente mucho más confiable que la edad de la planta para cosechar panojas con microsporas en un correcto estado de desarrollo. Esto se debe a que al usar la morfología individual de la planta (número de hojas completas que la planta posee) como referente para la cosecha de las panojas, ya no importan las diferencias en desarrollo que existen entre plantas, porque ahora se toma como referencia un factor que se relaciona directamente con el desarrollo de cada planta y por ende con el desarrollo de cada panoja (Ritchie, 1993).

### **3.3 Determinación del estado de desarrollo de las microsporas**

El correcto estado de desarrollo con que las microsporas inician el cultivo *in vitro*, es un factor muy importante para inducir androgénesis. En este estudio, las microsporas fueron cosechadas en estado uninucleado temprano y uninucleado medio, de esta

manera al terminar el pre-tratamiento frío e iniciar la fase de inducción, las microsporas quedan en estado uninucleado tardío, el cual es el ideal para iniciar un desarrollo esporofítico (Barnabás., *et al* 1987; Pretova *et al.*, 1993; Szarka *et al.*, 2001; Obert *et al.*, 2005).

La determinación del estado de desarrollo del polen se hizo mediante tinción con acetocarmin y se estableció que la concentración y el tiempo más adecuado para teñir los núcleos de las microsporas de maíz, es de 2%, durante aproximadamente 20 min. (Fig. 3.2).



**Figura 3.2** Fotografías de microsporas de maíz en estado uninucleado temprano. Este estado de desarrollo se identifica por la posición opuesta del núcleo con el poro, el núcleo muestra un intenso color rojo (barras = 10 micrones).

Otro aspecto que se tomó en cuenta para extraer las microsporas en un correcto estado de desarrollo, es la posición de las espiguillas dentro de la panoja (Tabla 3.3). En este estudio se llegó a determinar que las microsporas de una panoja de maíz difieren su

estado de desarrollo de acuerdo a la posición que ocupan en la panoja, siendo las microsporas del ápice las más maduras y las de la base las más tiernas.

**Tabla 3.3** Estados de desarrollo de las microsporas de una misma panoja. Las microsporas fueron separadas en tres grupos: microsporas del ápice de la panoja, microsporas del medio de la panoja y microsporas de la base de la panoja

Sección de la panoja		Estado de desarrollo de las microsporas				Total
		uninucleado temprano	uninucleado o medio	uninucleado tardío	Binucleado	
Ápice	No. De microsporas	2	32	342	203	579
	Porcentaje	0,3%	5,5%	59,1%	35,1%	100%
Medio	No. De microsporas	66	279	126	161	632
	Porcentaje	10,4%	44,1%	19,9%	25,5%	100%
Base	No. De microsporas	124	392	38	8	562
	Porcentaje	22,1%	69,8%	6,8%	1,4%	100%
						<b>1773</b>

Como se puede notar en la Tabla 3.3 se dividieron a las panojas en tres secciones, con el fin de facilitar la identificación de las espiguillas con microsporas en estado uninucleado temprano y uninucleado medio. De estas tres secciones las anteras con un mayor porcentaje de microsporas que estaban en estado uninucleado temprano y uninucleado medio al momento de la cosecha eran las de la base y del medio de la panoja y fueron las que se tomaron en cuenta para el pre-tratamiento.

Los procedimientos citológicos son los más utilizados para identificar el estado de desarrollo de las microsporas (Coumans *et al.*, 1989; Pescitelli *et al.*, 1990; Gaillard *et al.*, 1991; Szarka *et al.*, 2001), de todos estos métodos, el más simple y rápido es la tinción con acetocarmin, por lo que es ampliamente usado en investigaciones de cultivo

de microsporas de maíz (Zheng *et al.*, 2003a; Obert *et al.*, 2005) y también de otros cereales (Liu *et al.*, 2002; Cistue *et al.*, 2003; Kasha *et al.*, 2003). Sin embargo, la concentración y el tiempo con la que se tiñen las microsporas es un dato que no se especifican en estas investigaciones, por lo que se probaron diferentes combinaciones de tiempos y concentraciones.

Concentraciones menores a 2% como 0.5% y 1% no tiñen bien el núcleo de las microsporas de maíz y no se puede identificar con claridad el estado de desarrollo de la microspora, mientras que con concentraciones mayores como 2.5% y 3% no se registraron mejoras significativas en la diferenciación del núcleo. Por otro lado, tiempos menores que 30 minutos a una concentración 2%, no diferenciaban muy bien al núcleo y tiempos mayores, tampoco producían mejoras en cuanto a la diferenciación del núcleo.

En la presente investigación se corroboraron los resultados obtenidos en arroz por Afza y sus colaboradores (2000), ya que se determinó que no todas las microsporas de una misma panoja están en el mismo estado de desarrollo, estableciéndose que las microsporas del ápice están en un estado de desarrollo más avanzado que las del medio y la base de la panoja.

### **3.4 Esterilización de la panoja**

Para esterilizar las panojas de maíz se han usado diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio que van desde 0.6% (Coumans *et al.*, 1989) hasta 6% (Obert *et al.*, 2005). En este estudio se probaron diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio, desde 1% hasta 6% y se determinó que la concentración adecuada de hipoclorito de sodio para esterilizar la superficie de las espiguillas era de 1.5 %, agregando 1 gota de tween 20 por cada 50 ml de solución.

A pesar de que la concentración de hipoclorito de sodio no es muy alta con relación a la usada por Obert y sus colaboradores (2005), el porcentaje de contaminación durante



el pre-tratamiento es mínimo, probablemente esto se debe a la presencia del detergente tween 20, el cual ayudó a romper la tensión superficial de la solución desinfectante y permitió que ésta tomara mayor contacto con la superficie de las espiguillas y la desinfección sea más efectiva.

### 3.5 Pre-tratamiento de las espigas

La aplicación de bajas temperaturas, antes de iniciar el cultivo *in vitro*, aumentan la respuesta androgénica de las microsporas (Pescitelli *et al.*, 1990; Gaillard *et al.*, 1991). El tiempo de exposición a este pre-tratamiento frío es un factor que varía mucho en cada investigación, con periodos que van desde 5 hasta 28 días (Coumans *et al.*, 1989; Pescitelli *et al.*, 1990; Gaillard *et al.*, 1991; Büter, 1997; Szarka *et al.*, 2001; Zheng, *et al.*, 2003a; Obert *et al.*, 2005), esta variación se debe a factores como: genotipo, temperatura y metodología. No obstante, no es muy conveniente extender por mucho tiempo este pre-tratamiento, ya que esto puede afectar la viabilidad de las microsporas (Büter, 1997).

En la presente investigación se estudió el efecto de la duración del pre-tratamiento frío en medio MMA a 7°C sobre la viabilidad de las microsporas de la variedad I-101 y del híbrido I-601. Para lo cual se hicieron conteos de microsporas viables y no viables a 1, 3, 5, 7, 9 y 11 días de haber iniciado el pre-tratamiento (Tabla 3.4).

**Tabla 3.4** Porcentajes de microsporas viables durante el pre-tratamiento frío a 7 °C en medio MMA. Los datos fueron tomados en microsporas de las dos variedades y en periodos de 1, 3, 5, 7, 9 y 11 días de pre-tratamiento.

		Porcentaje de viabilidad durante el pre-tratamiento frío					
		1 día	3 días	5 días	7 días	9 días	11 días
variedad	I-101	97,17%	88,33%	73,34%	62,43%	35,12%	10,80%
	I-601	95,01%	86,52%	70,84%	57,47%	30,76%	8,50%

Los porcentajes del conteo de microsporas viables, expuestos en la Tabla 3.4 muestran que el pre-tratamiento en medio MMA afecta la viabilidad de las microsporas de estas dos variedades de maíz y que dicho pre-tratamiento no puede ser extendido por un tiempo mayor de 11 días, donde más del 90% de las microsporas están muertas.

Al comparar los porcentajes de microsporas viables entre la variedad I-101 y el híbrido I-601 (Tabla 3.4), podemos notar que los valores son prácticamente similares. Esto se comprobó estadísticamente mediante un análisis de varianza (Tablas 3.5).

**Tabla 3.5** Análisis de varianza, en el cual se comparan las diferencias en los porcentajes de viabilidad con relación a las dos variedades I-101 e I-601

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	2736,989	1	2736,989	2,965	0,085
Intra-grupos	1106024,305	1198	923,226		
Total	1108761,295	1199			

El estadístico  $F$  expuesto en la Tabla 3.5 es un coeficiente que refleja la varianza poblacional, esta varianza esta basada en la variación entre grupos (Inter-grupos) y en la variación que pudiera darse dentro de los grupos (Intra-grupos). El valor de  $F$  en la tabla es de 2.965, valor mayor que 1, lo cual nos indica que existe una pequeña variación y el valor de 2736,989 (media cuadrática inter-grupos) el cual es mayor que 923,226 nos indica que esta variación es intergrupala. Sin embargo, el valor del nivel crítico del estadístico  $F$  (sig.) es mayor que 0.05 lo cual nos indica que esta variación no es significativa y que se puede aceptar la hipótesis de igualdad de medias, es decir que los valores de viabilidad de las microsporas de I-101 no presentan variaciones significativas con las de I- 601.

Por otro lado, al realizar el análisis de varianza para evaluar el porcentaje de viabilidad de las microsporas respecto al tiempo transcurrido, se determinó que existen diferencias significativas en los diferentes periodos establecidos en la investigación. (Tablas 3.6).

**Tabla 3.6** Análisis de varianza, en el cual se comparan las diferencias en los porcentajes de viabilidad con relación a los periodos de tiempo evaluados de 1, 3, 5, 7, 9 y 11 días.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	1093587,363	5	218717,473	17210,349	,000
Intra-grupos	15173,931	1194	12,708		
Total	1108761,295	1199			

El valor del estadístico  $F$  en la Tabla 3.6 es un valor mucho mayor que 1 y nos indica que existe una enorme varianza poblacional, la cual esta basada en la variación intergrupala, como podemos ver en la columna de medias cuadráticas. El valor del nivel crítico (Sig.) en la Tabla 3.6, es menor que 0.05, lo cual corrobora estadísticamente que existen diferencias en los porcentajes de viabilidad a 1, 3, 5, 7, 9 y 11 días de pre-tratamiento.

Con los datos que se muestran en la Tabla 3.6 sabemos que existen diferencias significativas en los grupos establecidos por el tiempo de pre-tratamiento, pero no sabemos donde en concreto están estas diferencias. Para determinar en donde están estas diferencias realizamos la prueba de Games Howell (Tabla 3.7)

**Tabla 3.7** Diferencias significativas al evaluar el porcentaje de viabilidad de las microsporas con relación al tiempo de pre-tratamiento. – prueba de Games Howell.

**Comparaciones múltiples**

Variable dependiente: porcentaje de viabilidad de las microsporas  
Games-Howell

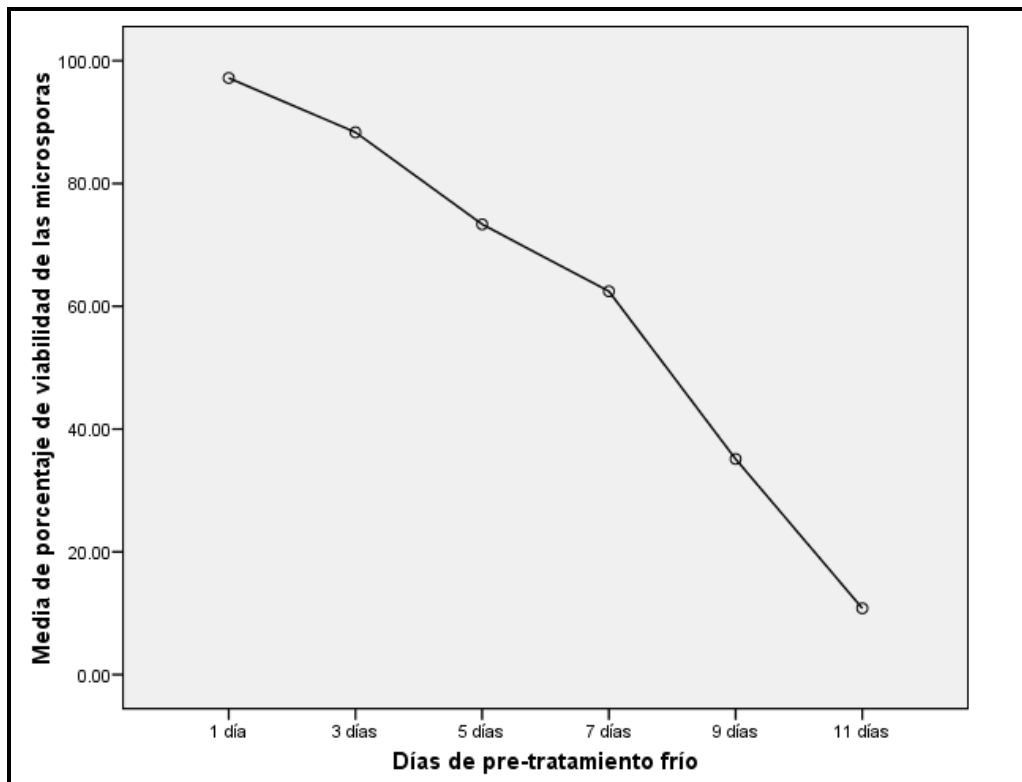
(I) Días de pre-tratamiento frío	(J) Días de pre-tratamiento frío	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
1 día	3 días	8,66813*	,36198	,000	7,6290	9,7073
	5 días	24,00040*	,22657	,000	23,3513	24,6494
	7 días	36,13438*	,30667	,000	35,2546	37,0141
	9 días	63,15250*	,33339	,000	62,1958	64,1093
	11 días	86,44401*	,26248	,000	85,6916	87,1964
3 días	1 día	-8,66813*	,36198	,000	-9,7073	-7,6290
	5 días	15,33227*	,38048	,000	14,2411	16,4235
	7 días	27,46625*	,43298	,000	26,2261	28,7064
	9 días	54,48437*	,45230	,000	53,1891	55,7797
	11 días	77,77588*	,40290	,000	76,6213	78,9305
5 días	1 día	-24,00040*	,22657	,000	-24,6494	-23,3513
	3 días	-15,33227*	,38048	,000	-16,4235	-14,2411
	7 días	12,13398*	,32830	,000	11,1931	13,0749
	9 días	39,15211*	,35339	,000	38,1390	40,1652
	11 días	62,44361*	,28746	,000	61,6202	63,2670
7 días	1 día	-36,13438*	,30667	,000	-37,0141	-35,2546
	3 días	-27,46625*	,43298	,000	-28,7064	-26,2261
	5 días	-12,13398*	,32830	,000	-13,0749	-11,1931
	9 días	27,01812*	,40938	,000	25,8457	28,1905
	11 días	50,30963*	,35404	,000	49,2956	51,3237
9 días	1 día	-63,15250*	,33339	,000	-64,1093	-62,1958
	3 días	-54,48437*	,45230	,000	-55,7797	-53,1891
	5 días	-39,15211*	,35339	,000	-40,1652	-38,1390
	7 días	-27,01812*	,40938	,000	-28,1905	-25,8457
	11 días	23,29151*	,37742	,000	22,2102	24,3728
11 días	1 día	-86,44401*	,26248	,000	-87,1964	-85,6916
	3 días	-77,77588*	,40290	,000	-78,9305	-76,6213
	5 días	-62,44361*	,28746	,000	-63,2670	-61,6202
	7 días	-50,30963*	,35404	,000	-51,3237	-49,2956
	9 días	-23,29151*	,37742	,000	-24,3728	-22,2102

\*. La diferencia de medias es significativa al nivel .05.

Las dos primeras columnas de la Tabla 3.7 muestran las posibles combinaciones dos a dos entre los niveles, que en este caso son los días de pre-tratamiento, a continuación están las diferencias de medias del número de microsporas viables, el error típico de las medias, que en toda esta tabla es menor que 1 y nos indica que las diferencias de las medias esta efectivamente basadas en la varianza inter-grupal, el nivel crítico, el cual para todas las comparaciones es 0, lo cual nos dice que todos los grupos son estadísticamente diferentes y los valores máximos y mínimos de la diferencias de

medias, nos revelan que efectivamente la varianza es entre medias y no debido a otros factores.

Como se puede ver en la Tabla 3.7 todos los niveles presentan diferencias significativas y forman seis grupos diferentes. Al graficar las respectivas medias de estos seis grupos podemos observar que la disminución de viabilidad más drástica se da a partir de los 7 días (Fig. 3.3). Por lo que se determinó que el pre-tratamiento frío en medio MMA a 7 °C para las variedades I-101 e I-601 se lo realizará por un periodo máximo de 7 días.



**Figura 3.3** Gráfico de las medias del porcentaje de viabilidad de las microsporas con respecto a los días de pre-tratamiento a 7 °C en medio MMA.

Al comparar nuestros resultados con otras investigaciones (Gaillard et al., 1991; Szarka et al., 2001; Obert et al., 2005) vemos que los tiempos de pre-tratamiento son

más largos que el establecido en esta investigación. Por otro lado, Pescitelli y sus colaboradores en 1989 obtuvieron porcentajes de viabilidad mucho más bajos que los obtenidos en este estudio con periodos de tiempo similares.

Las diferencias en los resultados se deben al procedimiento que se realice para el pre-tratamiento. En las investigaciones en las que los tiempos de pre-tratamiento son más largos se realizó el pre-tratamiento con panojas completas, en la presente investigación se usan espiguillas, mientras que Pescitelli y sus colaboradores en 1989 usaron microsporas aisladas. Es obvio que la supervivencia de las microsporas esta relacionada con el estrés producido por el nivel de aislamiento de las microsporas, por lo que las microsporas aun conectadas a la panoja a pesar de que no están en un medio pueden vivir más tiempo.

### **3.6 Aislamiento de las microsporas y separación por gradientes de concentración**

Algunos procedimientos para aislar microsporas de maíz han sido desarrollados a lo largo de los años, por ejemplo, presionando las anteras con la ayuda de una varilla de vidrio (Pescitelli *et al.*, 1989), licuando trozos de anteras (Coumans *et al.*, 1989), pulverizando espiguillas (Gaillard *et al.*, 1991), licuando espiguillas (Szarka *et al.*, 2001) e incluso licuando anteras aisladas (Obert *et al.*, 2005) y todos han dado resultados muy buenos, especialmente los más recientes.

En esta investigación se aislaron microsporas, licuando espiguillas y licuando anteras aisladas, estos procedimientos arrojaron un alto porcentaje de microsporas viables (aprox. 80% de microsporas viables). Después del aislamiento se procedió a separar, por medio de centrifugación con gradientes de concentración, las microsporas viables que estaban en estado uninucleado tardío del resto de microsporas.

En una investigación anterior (Obert *et al.*, 2005) se comparó el licuado de espiguillas con el licuado de anteras, y se reportó un mayor porcentaje de microsporas viables al aislar las microsporas desde anteras previamente aisladas. Sin embargo, en

nuestra investigación no se registraron diferencias en el porcentaje de viabilidad entre estos dos métodos, la única diferencia fue que el método de licuado de espiguillas es menos laborioso y por ende requiere de menor tiempo que el licuado de anteras aisladas, por lo que se decidió aplicar dicho método para aislar todas las microsporas que se usaron en la presente investigación.

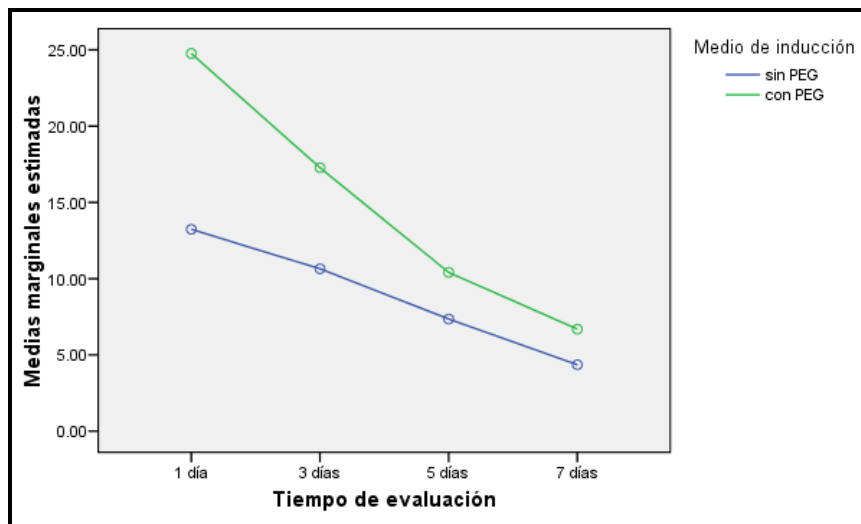
La separación por gradientes de concentración, es una técnica que nos permite separar microsporas viables de no viables y en diferentes estados de desarrollo (Gaillard *et al.*, 1991; Szarka *et al.*, 2001), esto es muy importante, ya que permite empezar la inducción de androgénesis con un alto porcentaje de microsporas viables y además en el correcto estado de desarrollo para que puedan inducir androgénesis.

Cuando Gaillard y sus colaboradores adaptaron en 1991, la separación de microsporas por centrifugación con gradientes de concentración, se utilizaron 4 gradientes, en cambio en este estudio se usaron tan solo dos gradientes, lo cual hace de esta técnica mucho más rápida de realizar e incluso más económica.

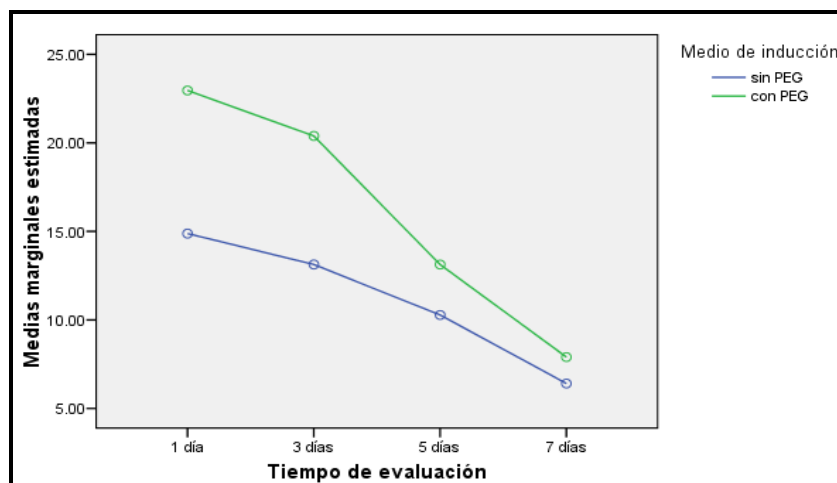
La densidad de microsporas en el medio de inducción es un factor que afecta mucho la viabilidad y respuesta androgénica de las microsporas, la densidad para microsporas aisladas de maíz es entre 60000 y 80000 microsporas por ml (Gaillard *et al.*, 1991; Szarka *et al.*, 2001; Obert *et al.*, 2000; Obert *et al.*, 2005; Zheng *et al.*, 2003a ). En el presente estudio se decidió establecer un valor estándar aproximado de densidad, el cual fue de 70000 microsporas por ml. Para obtener aproximadamente esta densidad se debe mezclar 1 volumen de la suspensión de microsporas con 3 volúmenes de medio de inducción, claro que esta relación talvez no sea una constante para otras investigaciones, pero establecer una relación de esta naturaleza ayuda mucho para más o menos saber el volumen de medio que debo añadir para obtener la densidad de microsporas que se requiere.

### 3.7 Medio de inducción de androgénesis

Se evaluó el porcentaje de microsporas viables de las dos variedades en medio de inducción YP modificado (Zheng, 2003a) y los resultados fueron muy bajos para I-101 e I-601. Para aumentar la viabilidad se añadió PEG 4000 al 21% en el medio, lo cual le dio mayor estabilidad osmótica y por ende aumento la viabilidad de las microsporas tanto de I-101 (Fig. 3.4) como las de I-601(Fig. 3.5)



**Figura 3.4** Evaluación de la presencia de PEG en el medio de inducción en microsporas de la variedad I-101. La evaluación se realizó 1, 3, 5 y 7 días después de que las microsporas han sido colocadas en este medio.



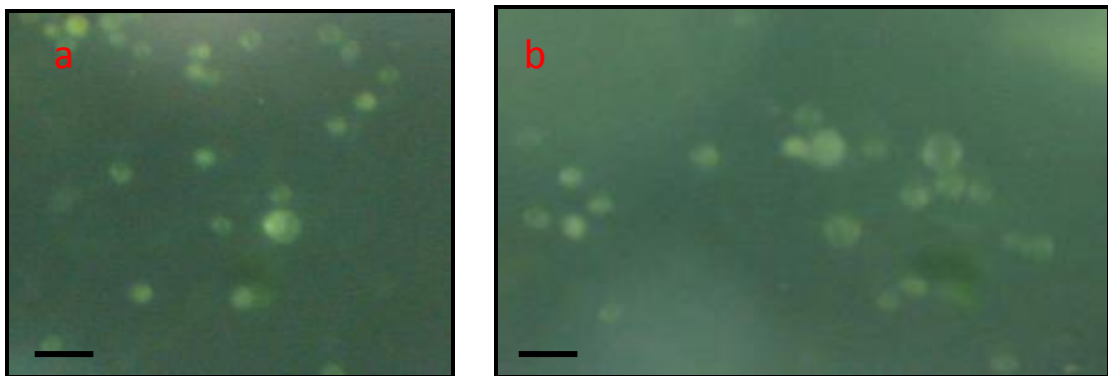
**Figura 3.5** Evaluación de la presencia de PEG en el medio de inducción en microsporas de la variedad I-601. La evaluación se realizó 1, 3, 5 y 7 días después de que las microsporas han sido colocadas en este medio.



En los gráficos 3.4 y 3.5 se presentaron a manera de curvas los porcentajes de viabilidad de las microsporas aisladas de la variedad I-101 e I-601 respectivamente. Como se puede apreciar en los gráficos la presencia de PEG (curva verde) a una concentración del 21% mantiene un mayor porcentaje de viabilidad en las microsporas, que el medio YP modificado por Zheng.

La diferencia entre los dos medios es mayor en los primeros días y va disminuyendo conforme pasan los días, esto se debe a la acumulación de sustancias tóxicas que producen las microsporas muertas (Obert *et al.*, 2005).

El aumento del PEG en el medio de cultivo no solo aumento la viabilidad de las microsporas, si no que también produjo el hinchamiento de algunas microsporas (Fig. 3.6a y b). El aumento del tamaño de las microsporas es una señal de inducción de androgénesis, pero no asegura que estas microsporas después desarrollen estructuras embrionarias (Obert *et al.*, 2005).



**Figura 3.6** Fotografía de microsporas que tiene respuesta androgénica y debido a esto han aumentado su tamaño a prácticamente el doble (barra=100  $\mu$ m).

El PEG se ha utilizado en estudios de cultivo *in vitro* para fusión de protoplastos (Kao *et al.*, 1974), transformación de protoplastos (Koop & Kofer, 1995) y desarrollo de tubo polínico (Schreiber & Dresselhaus, 2003). El Uso de este polímero no se ha reportado en cultivo *in vitro* de microsporas de maíz, por lo que se piensa que a pesar

de que la respuesta androgénica de las microsporas (hinchamiento) fue en un bajísimo porcentaje, el aumento de la viabilidad y la presencia de ésta respuesta indican que el PEG podría ser un muy buen agente que ayude a mantener la osmolaridad del medio y además ayudar a inducir androgénesis en maíz.

### 3.8 Irradiación de las microsporas

Se evaluó la viabilidad de microsporas a dosis de 0, 5, 10, 15 y 20 Grays de radiación, tanto de la variedad I-101 como del híbrido I-601, durante un período de 7 días, para lo cual se realizó un análisis factorial de varianza (Tabla 3.8) y se determinó que la viabilidad de las microsporas variaba con relación a la dosis aplicada y a los días de evaluación.

**Tabla 3.8** ANOVA factorial del porcentaje de viabilidad con respecto a la dosis y al tiempo de evaluación.

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	Gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	17391,864 (a)	19	915,361	750,196	0,000
Intersección	40000,659	1	40000,659	32783,06	0,000
dosis	5096,713	4	1274,178	1044,269	0,000
días	11614,460	3	3871,487	3172,928	0,000
dosis * días	680,691	12	56,724	46,489	0,000

a R cuadrado = ,977 (R cuadrado corregida = ,975)

Al revisar los valores de la Tabla 3.8 se puede ver por los valores del estadístico  $F$  y del valor del nivel crítico (Sig.) que existen diferencias significativas en la viabilidad de las microsporas tanto para la dosis como para el tiempo de evaluación. Para saber donde están las diferencias realizamos la prueba de Tukey (Tabla 3.9).

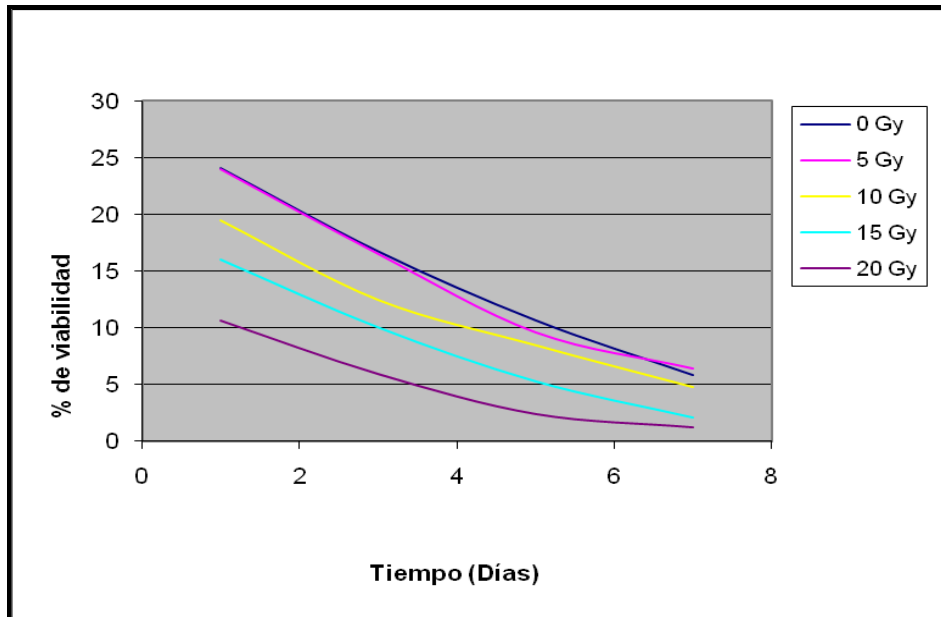
**Tabla 3.9** Resultados de la prueba de Tukey al comparar los porcentajes de viabilidad en el primer día después de la radiación, donde se muestran 4 grupos estadísticamente distintos para la viabilidad de las microsporas con relación a las dosis de radiación gama aplicadas.

Dosis de radiación gamma	N	Subconjunto formados por la prueba de Tukey en base a los porcentajes de viabilidad tomados en el primer día después de la radiación			
		2	3	4	1
20 Gy	72	4,7609			
15 Gy	72		8,1291		
10 Gy	72			10,7968	
5 Gy	72				14,4662
0 Gy	72				14,5520
Significación		1,000	1,000	1,000	,990

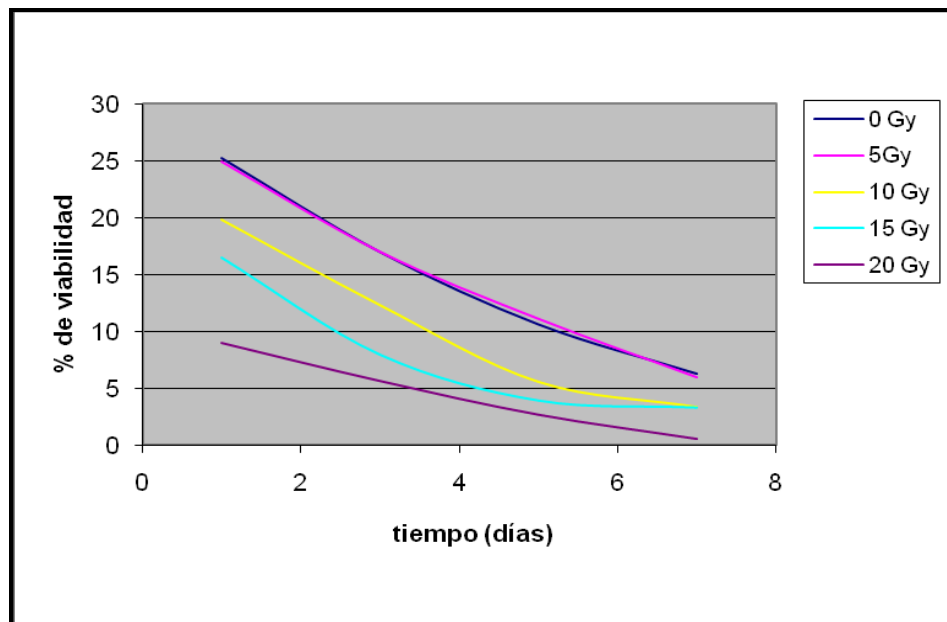
Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

En la Tabla 3.9, se puede ver que entre los testigos y las cajas a las cuales se les aplicó una dosis de 5 Grays de radiación, no existía variabilidad significativa. Esto se dio porque esta dosis no fue lo suficientemente fuerte como para causar algún tipo de efecto sobre la viabilidad de las microsporas (Van Harten, 1998). Por otro lado en las dosis de 10, 15 y 20 Gy si existe variación, lo que indica que en estos niveles ya existen cambios importantes a nivel molecular, por esta razón se da la muerte celular (Van Harten, 1998).

Se realizó también una prueba de Tukey para los días de evaluación, la cual reflejó que existen diferencias significativas en cuanto al tiempo en el que se evaluó la viabilidad. Dichos resultados están expresados para cada variedad en las Figuras 3.6 y 3.7 respectivamente.



**Figura 3.7** Curvas del porcentaje de viabilidad de las microsporas de la variedad I-101 con respecto al tiempo. Cada curva representa una dosis de radiación gamma  $\text{Co}^{60}$  aplicada a las microsporas aisladas



**Figura 3.8** Curvas del porcentaje de viabilidad de las microsporas de la variedad I-601 con respecto al tiempo. Cada curva representa una dosis de radiación gamma  $\text{Co}^{60}$  aplicada a las microsporas aisladas

En las figuras 3.6 y 3.7 se puede ver claramente el efecto tanto de la dosis de radiación gamma que se aplicó a las microsporas como del tiempo transcurrido. Al

revisar la forma de las curvas se puede ver que las curvas que corresponden a las dosis de radiación son prácticamente similares al testigo (0 Gy), lo que quiere decir que la reducción de la viabilidad con respecto al tiempo es más un efecto del aislamiento que de la propia radiación.

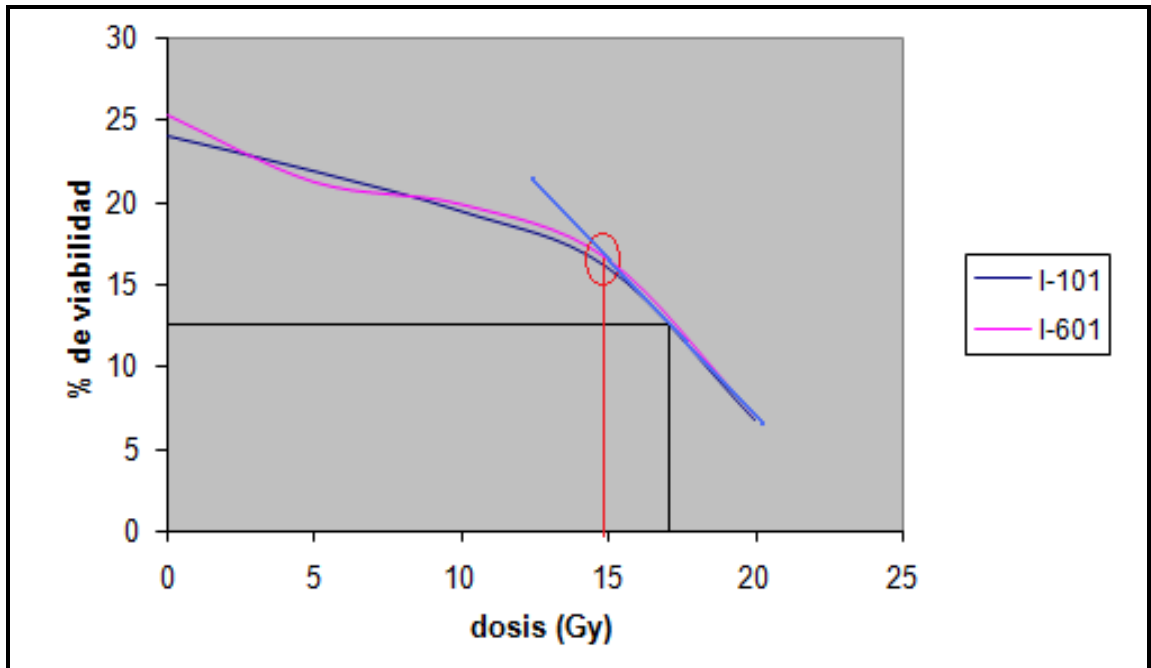
Al realizar un análisis de varianza unifactorial con respecto a la variedad, se determinó que no existen diferencias significativas en el porcentaje de viabilidad (Tabla 3.8)

**Tabla 3.10** ANOVA que relaciona las variedades usadas en los tratamientos de irradiación con el porcentaje de viabilidad.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	5,188	1	5,188	0,104	0,747
Intra-grupos	17801,531	358	49,725		
Total	17806,719	359			

El valor del nivel crítico (Sig.) en la Tabla 3.10, es un valor mayor que 0.05, lo cual nos dice que los datos de las dos variedades estudiadas son estadísticamente iguales. El valor del estadístico  $F$  muestra un valor menor que 1, lo que nos quiere decir que hay variabilidad pero que esta es intra-grupal, esto lo podemos comprobar al comparar los valores de las medias cuadráticas, en los cuales la media cuadrática intra-grupal es mucho mayor que la inter-grupal. La variación intra-grupal que presenta la Tabla 3.10 se explica por las grandes diferencias que existen en los porcentajes de viabilidad en los diferentes tiempos en los que se tomaron los datos, es decir 1, 3, 5, 7 y 9 días.

Para asegurarse que la dosis de radiación cause mutaciones en el ADN de las microsporas se calcula la dosis óptima de radiación, la cual es una dosis un tanto menor que la DL50. La dosis letal media se calcula mediante una curva de sobrevivencia (Fig. 3.8).



**Figura 3.9** Curva de supervivencias a la radiación gamma Co60 de las microsporas aisladas de maíz de las variedades I-101 e I-601, en esta curva están señaladas también la DL<sub>5</sub> Determinación de la dosis adecuada de radiación.

Para calcular la DL50 se identificó la mitad del porcentaje que inició el proceso de irradiación, que en este caso fue de 12.5. Una vez identificado este punto trazamos una recta paralela al eje X esta que intercepte la curva de viabilidad, en ese punto se traza una recta perpendicular, señalando la dosis letal media, que en este caso fue de 17 Gy.

Una vez calculada la DL50 se procede a determinar una dosis menor a está, un criterio que a menudo se toma para determinar la dosis adecuada, es identificar el codo de la curva de sobrevivencia, que no es mas que el lugar donde la tasa de crecimiento es mayor, para definir el codo de la curva trazamos una recta paralela a la sección de la curva donde el decrecimiento de la viabilidad es prácticamente lineal (línea azul del grafico 3.8), el codo es el lugar donde dicha recta y las curvas se separan.

En el gráfico 3.8 se señala dicho codo con una circunferencia de color rojo, y con una línea paralela al eje Y se señala la dosis adecuada, que en este estudio esta muy

cercana a 15 Gy, por lo que la dosis adecuada para microsporas de maíz de las variedades I-101 e I-601 se estableció en 15 Gy.

## CAPITULO 4: CONCLUSIONES

- Un buen referente para cosechar las panojas en un estado de desarrollo adecuado, es el número de hojas completas que la planta posee. Para la variedad I-101 y el híbrido I-601 los estados de desarrollo adecuados son V8 y V9, en estos estados las microsporas se encuentran en estado de desarrollo uninucleado temprano y uninucleado medio.
- El tiempo máximo de pre-tratamiento a 7 °C y en medio MMA para las dos variedades (I-101 e I-601) es de 7 días.
- Las microsporas en estado de desarrollo uninucleado medio expuestas a un pre-tratamiento frío en medio MMA por 7 días, maduran hasta el estado de desarrollo uninucleado tardío, El cual es el estado más recomendado para inducir androgénesis.
- El estado de desarrollo de las microsporas y la viabilidad de las mismas se puede identificar mediante tinción con acetocarmin al 2% por 30 minutos.
- El estado de desarrollo de las microsporas dentro de una misma panoja de maíz no es el mismo. Las microsporas del ápice están más viejas que las del medio y la base de la panoja.
- La desinfección de panojas de maíz cultivadas en campo se realiza usando una solución de hipoclorito al 1.5% añadiendo 2 gotas de Tween 20 por 20 minutos. De esta manera nos aseguramos eliminar cualquier hongo o bacteria que pudiera estar adherido al explante y no afectamos a la viabilidad de las microsporas.



- la centrifugación con gradientes de sucrosa al 21% y manitol 0.3 M, separa microsporas viables y en estado uninucleado del resto de microsporas que están en un estado de desarrollo más avanzado o que están muertas.
- Los datos analizados estadísticamente en esta investigación muestran que la duración del pre-tratamiento, la osmolaridad del medio de inducción y la dosis de radiación aplicada, influyen enormemente en el porcentaje de viabilidad de las microsporas de maíz de la variedad I-101 y del híbrido I-601 cultivadas *in vitro*.
- El 21% de PEG en el medio de inducción, aumenta la osmolaridad en este medio, ayudando a mantener un mayor porcentaje de viabilidad en las microsporas y dándoles mejores condiciones para inducir androgénesis.
- La dosis adecuada de radiación gamma para microsporas de maíz de la variedad I-101 e I-601 es de 15 Gy.
- El efecto de la radiación sobre la viabilidad de las microsporas es inmediato y no presenta reacciones a lo largo de 7 días, al menos en lo que respecta con la viabilidad.

## CAPÍTULO 5: RECOMENDACIONES

El cultivo *in vitro* de microsporas aisladas de maíz requiere de condiciones de crecimiento muy estrictas para las plantas donadoras, por lo que es recomendable que para futuras investigaciones se usen plantas que sean cultivadas en condiciones homogéneas, como las que brinda un invernadero con control de luz y temperatura o una cámara de crecimiento.

Para consolidar mejor el protocolo desarrollado, se debería evaluar respuesta androgénica de las microsporas, pero con genotipos probados, que tengan respuesta androgénica y luego intentar con las variedades de interés agronómico.

La osmolaridad en los medios de cultivo es un factor que afecta tanto la viabilidad como la respuesta androgénica de las microsporas, en la presente investigación se usaron manitol, PEG y maltosa para mantener constante la osmolaridad en los medios de cultivo, pero de todos ellos solo se evaluó el PEG. Es necesario evaluar diferentes concentraciones tanto de manitol, maltosa e incluso de PEG y también otros compuestos que sirvan para mantener la osmolaridad del medio como el Ficoll 400.

Con el fin de combinar, mutagénesis con sistemas haploides *in vitro* es recomendable probar la otra técnica, en la que se usan las microsporas de plantas M1, originarias de semillas tratadas con radiación. Por medio de esta técnica se elimina la mortalidad de las microsporas en cultivo a causa de la irradiación.

## CAPÍTULO 6: BIBLIOGRAFÍA

- Afza, R., Shen, M., Zapata, F., Xie, J., Fundi, H., Lee, K., Bobadilla, E., Kodym, A. (2000). Effect of spikelet position on rice anther culture efficiency. Plant Science, 153, 155-159.
- Agrodigital.com, La web del campo. (2008). La producción mundial de maíz se podría incrementar en un tercio en los próximos años. Extraído el 27 de Febrero, 2009, de <http://www.agrodigital.com/PIArtStd.asp?CodArt=59789>
- Ahloowalia, B., Maluszynski, M. (2001). Induced mutation – A new paradigm in plant breeding. Euphytica, 118, 167-173.
- Aragón, J. (2008). Radiación nuclear. Extraído el 3 de Junio, 2009, de: [http://www.alejandria.ws/Archivos/SColectivo/Radiacion\\_nuclear\\_biofisica.pdf](http://www.alejandria.ws/Archivos/SColectivo/Radiacion_nuclear_biofisica.pdf)
- Barloy, D., Beckert, M. (1993). Improvement of regeneration ability of androgenetic embryos by early anther transfer in maize. Plant cell, tissue and organ culture, 33, 45-50
- Barloy, D., Denis, L., Beckert, M. (1989). Comparison of the aptitude of anther culture in some androgenic doubled haploid maize lines. Maydica, 34, 303-308.
- Barnabás, B., Szyndy, T., Orosz, A., Obert, B., Kovács, G. (1998) Studies on the recent problems of homozygote doubled haploid plant production from anther culture of maize (*Zea mays* L.) Acta agron. Hung., 46, 217-224.
- Beaumont, V., Rocheford, T., Widholm, J. (1995). Mapping the anther culture response genes in maize (*Zea mays* L.). Genome, 38, 968-975.

- Bedinger, P. (1992). The remarkable biology of pollen. The plant cell, 4, 879-887
- Biddington, N., Robinson, H. (1991). Ethylene production during anther culture of Brussel sprouts (*Brassica oleracea* var. *gemmifera*) and its relationship with factors that affect embryo production. Plant Cell Tiss. Organ Cult., 25, 169-177.
- Büter, B. (1992). Einflussfaktoren der *in vitro* Haploidinduktion bei *Zea mays*. Ph.D. Thesis No. 9725, Swiss Federal Institute of technology (ETH), Zürich, Switzerland.
- Büter, B. (1997). *In vitro* haploid production in maize. Jain, S., Sopory, S. and Veilleux, R. (Eds.). In vitro Haploid Production in Higher Plants. (pp. 37-66). Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Caicedo M. (2004). Situación actual del cultivo del maíz en Ecuador. Barandiarán, M; Chávez, A; Sevilla, R; Narro, T (eds). XX Reunión Latinoamericana de Maíz. Lima, Perú.
- Chahal, G.S. & Gosal, S.S. (2002). Principles and Procedures of Plant Breeding. Biotechnological and Conventional Approaches. Harrow, UK: Alpha Science International Ltd.
- Chávez, J.L. (1995). Mejoramiento de plantas 2: Métodos específicos de plantas alogamas. Mexico: Trillas.
- Chen, C., Kasha, K., Marsolais, A. (1984). Segmentation patterns and mechanisms of genome multiplication in culture microspores of barley. Can.J.Genet.Cytol., 26, 475-483.

- Chen, X., Cistué, L., Muñoz, M., Sanz, M., Romagosa, I., Castillo, A., Vallés, M. (2007). Genetic Markers for Doubled Haploid response in Barley. Euphytica, 158, 287–294.
- Cho, M., Zapata, F. (1990). Plant regeneration from isolated microspores of Indica rice. Plant Cell Physiology, 31, 881-885
- Cistué, L., Vallés, M., Echávarri, J., Sanz y A. Castillo. (2003). Barley anther culture. Maluszynski, M., Kasha, K., Forster, B. Szarejko, I. (Eds.). Doubled Haploid Production in Crop Plants. (pp. 95-102). London: Kluwer Academic Publishers.
- Coumans, M., Sohota, S., Swanson, E. (1989). Plant development from isolated microspores of *Zea mays* L. Plant Cell Reports, 7, 618-621.
- Davies, P. (2003). Barley isolated microspore culture (IMC) method. Maluszynski, M., Kasha, K., Forster, B. Szarejko, I. (Eds.). Doubled Haploid Production in Crop Plants. (pp. 49-52). London: Kluwer Academic Publishers.
- Dodds, J.H. & Roberts, L.W. (1985). Experiments in Plant Tissue Culture. Cambridge, U.S.A: Cambridge Univ. Press.
- Duvick, D.N. (1999). Heterosis: Feeding People and Protecting Natural Resources In: The Genetics and Exploitation of heterosis in Crop. Madison Wisconsin, USA: American Society of Agronomy, Inc. Crop Science Society of America.
- El Universo. (2008). Ecuador busca aumentar la producción de maíz. Consultado el 13 de abril 2008. Disponible en: <http://www.eluniverso.com/2007/10/16/0001/9/DCFDB50E674F45F88D437E7B9A03F5D5.aspx>

- Evans, J., Batty, N. (1994). Ethylene precursors and antagonists increase embryogenesis of *Hondeum vulgare* L. anther culture. Plant Cell Reports, 13, 676-678.
- FAO, sala de prensa. (2007). Los precios del trigo alcanzan niveles récord. Extraído el 02 de abril, 2009. Disponible en: <http://www.fao.org/newsroom/eS/news/2007/1000674/index.html>
- Gaillard, A., Vergne, P., Beckert, M. (1991). Optimization of maize microspore isolation and culture conditions for reliable plant regeneration. Plant Cell Reports, 10, 55-58.
- Goralski, C., Lafite, C., Bouazza, L., Mathys-Rochon, F., Przywara, I. (2002). Influence of sugar on isolated microspore development in maize (*Zea mays* L.). Acta Biol. Cracow. Bot., 44, 203-212.
- Gramene home. (2009). Maize illustrations. Extraído el 22 de mayo, 2009, de [http://www.gramene.org/species/zea/maize\\_illustrations.html](http://www.gramene.org/species/zea/maize_illustrations.html)
- Ilic-Grubor, K., Attree, S., Fowke, L. (1998). Induction of microspore-derived embryos of *Brassica napus* L. with polyethylene glycol (PEG) as osmoticum in a low sucrose medium. Plant cell reports, 17 (5), 329-333.
- Kao, K., Constabel, F., Michayluk, M., Gamborg, O. (1974). Plant protoplast fusion and growth of intergeneric hybrid cells. Planta, 120, 215-227.
- Kasha, K. & Maluszynski, M. (2003). Production of doubled haploids in crop plants. An introduction. Maluszynski, M., Kasha, K., Forster, B. Szarejko, I.(Eds.). Doubled Haploid Production in Crop Plants. (pp. 1-4) London: Kluwer Academic Publishers.

- Kasha, K., Hu, T., Oro, R., Simion, E., Shim, Y. (2001). Nuclear fusion leads to chromosome doubling during manitol pretreatment of barley (*Hordeum vulgare* L.) microspores. J.Exp.Bot., 52(359), 1227-1238.
- Kasha, K., Simion, E., Miner, M., Letarte, J. Hu, T. (2003b). Haploid wheat isolated microspore cultura protocol. Maluszynski, M., Kasha, K., Forster, B. Szarejko, I. (Eds.). Doubled Haploid Production in Crop Plants. (pp. 77-82). London: Kluwer Academic Publishers.
- Kasha, K., Simion, E., Oro, R., Shim, Y. (2003a). Barley isolated microspore culture protocol. Maluszynski, M., Kasha, K., Forster, B. Szarejko, I. (Eds.). Doubled Haploid Production in Crop Plants. (pp. 43-47). London: Kluwer Academic Publishers.
- Konzak, C., Polle, E., Liu, W., Zheng M. (2000). Methods for generation doubled-haploid plants. Published international patent application. PCT/US99/19498.
- Koop, H., Kofer, W., (1995). Plastid transformation by polyethylene glycol treatment of protoplasts and regeneration of transplastomic tobacco plants. Potrykus, I., Spangenberg, G. (Eds.). Gene transfer to plants. (pp 75-82). Verlag: Springer.
- Liu, W., Zheng, M., Polle, E., Konzak, C. (2002). Highly Efficient Doubled-Haploid Production in Wheat (*Triticum aestivum* L.) via Induced Microspore Embryogenesis. Crop Sci., 42, 686–692.
- Lönnig, W. (2005). Mutation breeding, evolution, and the law of recurrent variation. Recent Res. Devel. Genet. Breeding., 2: 45-70.
- MacDonald, M., Ahmad, I., Menten, J., Ingram, D. (1991). Plant Mutation Breeding For Crop Improvement. Haploid culture and *in vitro* mutagenesis (UV

light, X-rays and gamma rays) of rapid cycling Brassica napus for improved resistance to disease. Vol.2. (pp.129-138) Viena: IAEA.

- Maizar – Asociación maíz argentino. (2006). Comienza la era del maíz. Extraído el 06 de Enero, 2009, de <http://www.maizar.org.ar/vertext.php?id=224>
- Maluszynski, M., Szarejko, I., Maluszynski, J. (2001). Induced mutations in wheat. Bonjean, A., Angus, W. (Eds.). The World Wheat Book. (939-977) Londres: Lavoisier Publishing.
- Maluszynski, M., Szarejko, I., Sigurbjornsson, B. (1996). Haploid and Mutation Techniques. Jain, S. Sopory, S. and Veilleux, R. (Eds.). In vitro Haploid Production in Higher Plants. Vol.1. (pp. 67-93). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- McCormick, S. (1993). Male gametophyte development. Plant Cell, 5, 1265-1275.
- Moreno, D., Fuentes, J., Sanchez, A., Bahuja, L., Prieto, E. (2004). Conversión y reversión génica en Saccharomyces cerevisiae. Un modelo para el estudio del daño producido por radiación gamma. Rev. Cubana Invest. Biomed., 23 (2), 80-86.
- Nägeli, M., Schmid, J., Stamp, P., Büter, B. (1999). Improved formation of regenerable callus in isolated microspore culture of maize: impact of carbohydrates, plating density and time of transfer. Plant Cell Reports, 19, 177-184.
- Nageli, M., Schmid, J., Stamp, P., Buter, B. (1999). Improved formation of regenerable callus in isolated microspore culture of maize: impact of carbohydrates, plating density and time of transfer. Plant Cell Reports, 19, 177-184.
- Novak F., Brunner, H. (1992). Plant breeding: Induced mutation technology for crop improvement. IAEA bulletin, 4: 25-33.



- Núñez, Roca y Martínez. (1989). Cultivo de anteras en el mejoramiento del arroz. Colombia: Ed. Colombia S.A.
- Obert, B., Barnabás, B. (2004). Colchicine induced embryogenesis in maize. Plant Cell Tissue and Organ Culture, *77*, 283-285.
- Obert, B., Orosz, Á., Kovács, G., Barnabás, B. (1998). Study of the androgenic capacity in crosses between highly androgenic exotic DH lines and recalcitrant commercial inbreds in maize anther culture. Novény-termeles, *47*, 473-481.
- Obert, B., Pretová, A., Büter, B., Schmid, J. (2000). Effect of different saccharides on viability of isolated microspores and androgenic induction in *Zea mays*. Biol. Plant, *43*, 125-128.
- Obert, B., Szabó, L., Mityko, J., Pretová, A., Barnabás, B. (2005). Morphological events in cultures of mechanically isolated maize microspores. In vitro cell. Dev. Biol.-Plant, *41*, 775-782.
- Pace, G., Reed, J., Ho, L. Fahey, J. (1987). Anther culture of maize and the visualization of embryogenic microspores by fluorescent microscopy. Theor. Appl. Genet., *73*, 863-869.
- Paredes, L. (1998). Usos pacíficos de la energía nuclear. Disponible en: [http://www.sre.gob.mx/dgomra/opanal/41%20TT/41TT\\_L\\_Paredes.pdf](http://www.sre.gob.mx/dgomra/opanal/41%20TT/41TT_L_Paredes.pdf)
- Pauk, J., Mihály, R., Monostori, T., Puolimatka, M. (2003). Protocol of triticale (*x Triticosecale* Wittmack) microspore culture. Maluszynski, M., Kasha, K., Forster, B. Szarejko, I. (Eds.). Doubled Haploid Production in Crop Plants. (pp. 129-134). London: Kluwer Academic Publishers.

- Pescitelli, S., Johnson, C., Petolino, J. (1990). Isolated microspore culture of maize; effect of isolation technique, reduced temperature and sucrose level. Plant Cell Reports, 8, 628-631.
- Polci, P., Conti, V. y Miranda, R. (2004). Métodos para acelerar programas de mejoramiento e identificación varietal. Echenique, V., Rubinstein, C., Mroginski, L. (Eds.). Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. (pp. 135-148). Buenos Aires, Argentina: INTA.
- Pretova, A., de Ruijter, N., van Lammeren, A., Schel, J. (1993) Structural observations during androgenic microspore culture of the 4c1 genotype of *Zea mays* L. Euphytica, 65, 61-69.
- Riousudan, L., Granados, G., Lafitte, R., Violic, A. (2001). El maíz en los trópicos: mejoramiento y producción. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/003/x7650s/x7650s00.html>
- Ritchie, S. (1993). How a corn plant development. Special report No 48. Iowa State University of Science and Technology. Disponible en: <http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/library/maize/www.ag.iastate.edu/departments/agronomy/corngrows.html>
- Schreiber, D. & Dresselhaus, T. (2003). *In vitro* pollen germination and transient transformation of *Zea mays* and other plant species. Plant molecular biology report, 21, 31-41.
- Schreiber, D., Dressefhaus, T. (2003). *In vitro* pollen germination and transient transformation of *Zea mays* and other plant species. Plant molecular biology reporter, 21, 31-41.

- SICA. (2008). Maíz y avicultura. Extraído el 10 de abril, 2008, de: <http://www.sica.gov.ec/cadenas/maiz/index.html>
- Skibbe, D., Wang, X., Borsuk, L., Asholock, D., Nettleton, D., Schnable, P. (2008). Floret-specific differences in gene expression and support for the hypothesis that tapetal degeneration of *Zea mays* L. occurs *via* programmed cell death. Journal of Genetics and Genomics, 35, 603-616.
- Szarejko, I. (2003). Doubled haploid mutant production. Maluszynski, M., Kasha, K., Forster, B. Szarejko, I.(Eds.). Doubled Haploid Production in Crop Plants. (pp. 351-362). London: Kluwer Academic Publishers.
- Szarejko, I. (2003). Doubled haploid mutant production. Maluszynski, M., Kasha, K., Forster, B. Szarejko, I. (Eds.). Doubled Haploid Production in Crop Plants. (pp. 351-361). London: Kluwer Academic Publishers.
- Szarka B, (2002), Production of microspore derived plants and somatic hybrids from maize genotypes. Ph.D. diss. Agricultural Biotechnology centre, Gödöllő. Hungria.
- Szarka, B., Devenyi, M., Morreos, S. (2001). Fertile maize lines obtained from isolated microspores. Euphytica, 122, 53-60.
- Vain, P., Flament, P., Soudain, P. (1989a). Role of Ethylene in Embryogenic Callus Initiation and Regeneration in *Zea mays* L. J. Plant Physiology, 135, 537-540.
- Vain, P., Yean, H., Flament, P. (1989b). Enhancement of production and regeneration of embryogenic type II callus in *Zea mays* L. by AgNO<sub>3</sub>. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 18, 143-151.

- Van Harten, A. (1998). Mutation breeding: Theory and practical applications. Cambridge, USA: Cambridge Univ. Press.
- Wendt, G. (1955). La energía nuclear y su utilización con fines pacíficos. Saint Georges, Paris: Union typographique.
- Zheng M., Liu, W., Weng, Y., Polle, E., Konzak, C. (2003b). Production of doubled haploids in wheat (*Triticum aestivum* L.) through microspore embryogenesis triggered by inducer chemicals. Maluszynski, M., Kasha, K., Forster, B. Szarejko, I. (Eds.). Doubled Haploid Production in Crop Plants. (pp. 83-94). London: Kluwer Academic Publishers.
- Zheng M., Weng Y., Sahibzada, R., Konzak C. (2003a). Isolated microspore culture in maize (*Zea mays* L.), production of doubled-haploids *via* induced androgénesis. Maluszynski, M., Kasha, K., Forster, B. Szarejko, I. (Eds.). Doubled Haploid Production in Crop Plants. (pp. 95-102). London: Kluwer Academic Publishers.

## ANEXO 1

### Equipo básico para un laboratorio de cultivo in vitro de microsporas aisladas

- Cámara de flujo laminar
- Incubadora con control automático de temperatura, rangos de temperatura de 4–60°C.
- Centrifuga con control automático de tiempo y velocidad, con rotor que retenga tubos falcon de 15 y 50 ml.
- Licuadora con velocidad variable (MC- 2 Waring – Fisher Scientific )
- Vaso de acero inoxidable para la licuadora (MC-2 Waring – Fisher Scientific)
- Tapa para el vaso (autoclavable) (MC-2 Waring – Fisher Scientific)
- Micropipetas de 100 ul, 1ml, 5ml
- Puntas para las micropipetas
- Cedazos de acero inoxidable con apertura de 100 um, 50 um y 38 um
- Cajas Petri autoclavables: 60x15 mm (100 cajas), 35x15 mm (100 cajas), 100x20mm (50 cajas).
- pH metro eléctrico
- Balanza de precisión
- Probetas: 1000 ml, 500 ml, 100 ml, 25 ml
- Tubos falcon esterilizados de: 15 ml (100 tubos)y 50 ml (50 tubos)

- Autoclave
- Frascos de vidrio con tapa autoclavable (200 frascos)
- Magnetic hot/stirring plate & Magnetic stirring bars (diferentes tamaños)
- 2 pinzas, 2 mangos de bisturí y 1 tijera de acero inoxidable (por persona)
- Microscopio o microscopio invertido
- Hemacitometro
- Unidad para esterilización por filtración

## ANEXO 2

### Formulación básica de los medios de inducción más utilizados en cultivo *in vitro* de microsporas aisladas

Ingredientes (mg/l)	N6 (Chu 1981)	YP (Ku et al. 1981)	Zheng 14 (Ting et al. 1981)	6M1 (Miao 1980)	6N1 (Genovesi unpubl.)
<i>Macro sales</i>					
KNO3	2830	2500	3000	2022	2022
NH4NO3	-	165	-	-	-
(NH4)2SO4	463	-	150	-	-
NH4H2PO4	-	-	-	384	384
CaCl2.2H2O	166	176	150	294	166
KH2PO4	400	510	600	272	-
MgSO4 x 7 H2O	185	370	450	246,48	185
<i>micro sales</i>					
MnSO4 x 4H2O	4,4	4,4	10	22,3	4,4
ZnSO4 x 7H2O	1,5	1,5	2	8,6	1,5
H3BO3	1,6	1,6	3	6,2	1,6
KI	0,8	0,8	0,75	0,83	0,8
-	-	-	0,0025	0,0025	-
CoCl2 x 6H2O	-	-	0,0025	0,0025	-
Na2MoO4 x 2H2O	-	-	0,25	0,25	-

### ANEXO 3

#### Medio de inducción de callo para maíz

<b>6N1-TGR-P4 (MADURACIÓN DE CALLO)</b>				
Fecha de Preparación =				
N° de Cajas Petri =		50		
Volumen/Caja Petri (ml) =		30		
Volumen Total a Preparar (ml) =		1500		
STOCK	REACTIVOS		Concent. Medio (mg/L)	Cantidad Extraer
	Nombre	Stock [ppm]		
	KNO <sub>3</sub>	----	2,022g	3,033 g. Pesar
Macronutrientes	NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	----	384mg	576 mg. Pesar
	MgSO <sub>4</sub>	----	90.4mg	135,6 mg. Pesar
	KI	2000	0,8	ml del 0,6 Stock
Micronutrientes	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2000	1,6	ml del 1,2 Stock
	MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	2000	3,33	ml del 2,50 Stock
	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2000	1,5	ml del 1,13 Stock
FeEDTA	Na <sub>2</sub> EDTA	Stock	37,3	15 ml del
	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	C	27,8	Stock C
Sales	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	----	165.88mg	248,82 mg. Pesar
	Thiamina HCl	100	1	ml del 15 Stock
Vitaminas	Acido Nicotinico	100	0,5	ml del 7,5 Stock
	TIBA	1000	1	ml del 1,5 Stock
Hormonas	Acido Abscisico	100	0,05	ml del 0,75 Stock
Prolina		----	400mg	600 mg. Pesar
Sucrosa		----	120mg	180 mg. Pesar
KOH		----	pH 5,7- 5,8	----
Carbón Activado		----	5g	7,5 g. Pesar
Gelrite		----	2g	3 g. Pesar



## ANEXO 4

### Medio de regeneración de plantas de maíz

Medios según "RICE ANTHOR CULTURE" Chu, C.C. 1978. "Proceedings of sumposis on Plant Tissue Culture"pp.43-50			
MEDIO MURASHIG-SKOOG			
Stock	Reactivos	Concentración en el medio ( mg/L )	Concentración en el Stock ( g/L )
A	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	165
	KNO <sub>3</sub>	1900	190
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	17,0
B	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370	44,0
C	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440	37,0
E	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27,8	2,78
	Na <sub>2</sub> EDTA	37,5	3,73
D	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	0,62
	MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	16,9	1,69
	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	10,6	1,06
	KI	0,83	0,083
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,25	0,025
	CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0,025	0,0025
	CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0,025	0,0025
F	Thiamina HCl	0,1	0,01
	Myo-Inositol	100	10,0
HORMONAS	Piridoxina HCl	0,5	0,05
	Glicina	2,0	0,2
	Acido Nicotínico	0,5	0,05
SUCROSA = 20g/L                      GELRITE= 1.5g/L pH= 6.8			

## ANEXO 5

### Abreviaciones importantes en cultivo *in vitro* de microsporas

<b>2-HNA</b>	2-Hydroxynicotinic acid
<b>ABA</b>	Absciscic acid
<b>BA (BAP)</b>	6-Benzylaminopurine
<b>DH</b>	Doubled haploid(s)
<b>Dicamba</b>	3,6-Dichloro-2-methoxybenzoic acid
<b>DMSO</b>	Dimethyl sulphoxide
<b>EDTA</b>	Ethylenediaminetetraacetic acid
<b>EI</b>	Ethyleneimine
<b>ELS</b>	Embryo-like structure
<b>EMS</b>	Ethyl methanesulfonate
<b>GA</b>	Gibberelic acid
<b>IAA</b>	Indole-3-acetic acid
<b>IBA</b>	Indole-3-butric acid
<b>NAA</b>	1-Naphtalenacetic acid
<b>PAA</b>	Phenylacetic acid
<b>Picloram</b>	4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid
<b>TIBA</b>	2,3,5-Triiodobenzoic acid

## ANEXO 6

Tabla de tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ) de los radioisótopos más importantes.

Isótopo	$t_{1/2}$	Partículas emitidas
Cobre - 64	12.7 horas	Beta, gamma
Yodo - 131	8.065 días	Beta, gamma
Fósforo - 32	14.3 días	Beta
Cobalto - 60	5.26 años	Beta, gamma
Carbono - 14	5730 años	Beta
Plutonio - 242	$3.79 \times 10^5$ años	Alpha
Uranio - 238	$4.51 \times 10^9$ años	Alpha