



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**POLIPLOIDIZACIÓN *in vitro* POR MUTAGÉNESIS  
QUÍMICA EN GULUPA (*Passiflora edulis* Sims) Y  
SU MONITOREO MEDIANTE TÉCNICAS  
CITOGÉNÉTICAS.**

**Laura Yissel Rengifo Coronel  
Código: 190412**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Departamento de Biología  
Maestría en Ciencias Biología  
Bogotá, Colombia  
2013

# **POLIPLOIDIZACIÓN *in vitro* POR MUTAGÉNESIS QUÍMICA EN GULUPA (*Passiflora edulis Sims*) Y SU MONITOREO MEDIANTE TÉCNICAS CITOGENÉTICAS**

**Laura Yissel Rengifo Coronel**

Código: 190412

Tesis o trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:  
**Magister en Ciencias – Biología – Línea Genética**

Directora:

Marta Lucía Bueno Angulo

Bióloga, Msc. Profesor Asociado – Departamento de Biología

Facultad de Ciencias

Universidad Nacional de Colombia

Línea de Investigación:

Genética

Grupo de Investigación:

Grupo de Identificación Cromosómica UN

Universidad Nacional de Colombia

Facultad, de Ciencias – Departamento de Biología

Bogotá, Colombia

2013

*A mi mamá por darme todo el amor y el apoyo posible para alcanzar todos mis sueños, a mi papá por estar siempre cuando lo he necesitado, a mis hermanas por ser la perfecta compañía para la vida.*



## **Agradecimientos**

A la profesora Marta Lucía Bueno por su constante apoyo y consejo no solo para la realización de éste proyecto sino para la vida. Muchas gracias profe por estos años en los que me ha ayudado a ser cada día una mejor bióloga y una mejor persona.

Al grupo de citogenética, Samantha Martínez, Camila Robayo, Angela Vergara y al semillero por tanto apoyo, paciencia y compañía. Gracias por hacer más fácil y divertido el trabajo en el laboratorio.

A la Fundación para la Promoción de la Investigación y la Tecnología del Banco de la República, por apoyar financieramente la realización de la presente propuesta.

A las personas que nos colaboraron con la obtención de las muestras de gúlpula para la realización de los ensayos.

Al profesor Xavier Marquínez por brindarnos todo su apoyo y constante retroalimentación para lograr alcanzar los objetivos propuestos.

A la Universidad Nacional de Colombia – Sede Bogotá por permitirme realizar todos mis sueños y cumplir mis metas.



## Resumen

La gulupa (*Passiflora edulis* Sims o *Passiflora edulis f. edulis* Sims) pertenece al género *Passiflora*, género el cual ostenta el tercer renglón de exportación de frutas en Colombia. Debido al poco conocimiento que se tiene sobre el mejoramiento de la gulupa, para los productores ha sido difícil adaptarse a trabajar con ésta especie y por lo tanto la gran mayoría de los cultivares son prácticamente silvestres. Es por ésta razón que se ha vuelto una prioridad realizar investigaciones en aspectos como las estrategias de reproducción, manejo para cultivos comerciales y manipulación genética que permitan obtener variedades con rendimientos más altos y resistentes a los patógenos más comunes que sirvan como alternativas a mediano y largo plazo para los productores.

En Colombia no se han realizado programas de fitomejoramiento de gulupa, ni se han registrado variedades, por lo que la producción es susceptible de ser mejorada (Ocampo *et al.*, 2007). Para tal fin, la inducción química de poliploides se ha planteado como una opción viable, ya que ésta metodología ha sido ampliamente utilizada por los agricultores para mejorar características relacionadas con resistencia a enfermedades, tolerancia a condiciones extremas o variaciones fenotípicas en tamaño, color, forma, etc. en vegetales de interés agronómico (Nimura *et al.*, 2008). Es por ésta razón que para la realización de éste trabajo se buscó generar estados poliploides de gulupa a través del empleo de sustancias que causan el arresto de la mitosis como la colchicina y la orizalina. Se evaluó la eficiencia de la inducción de formas poliploides en las plántulas de gulupa cultivadas *in vitro* empleando métodos, citogenéticos, citométricos y/o morfológicos que permitieron llegar a plántulas poliploides que posteriormente puedan ser evaluadas en campo y que tengan la posibilidad de aumentar la productividad y calidad de la gulupa.

Se generaron en total 8 plántulas tetraploides con los tratamientos y se pudo establecer la eficacia de orizalina para la producción de poliploides (10% tetraploides) mientras que colchicina tiende a ser muy tóxica para los explantes (3.3% tetraploides).

**Palabras clave: Passiflora, Poliploidía, Mutagénesis, Colchicina, Orizalina.**

## **Abstract**

The purple passion fruit (*Passiflora edulis Sims* or *Passiflora edulis Sims f. edulis*) belongs to the genus *Passiflora* which boasts the third most important fruit exports in Colombia, Nevertheless even after decades of conventional production, for the producers, it has been difficult to adapt to working with this species and therefore the vast majority of cultivars are practically wild. To improve production research is necessary on the following areas: reproductive strategies, crop management and genetic manipulation to may obtain varieties with higher yields and resistance to the most common pathogens that may serve as medium and long term alternatives for producers.

In Colombia there are no gulupa breeding programs and no varieties have been recorded, so the production is likely to be improved. To this end the chemical induction of polyploidy has emerged as a viable option, since this method has been widely used by farmers to improve disease resistance, tolerance to extreme conditions or phenotypic variations in size, color, shape etc. in plants of agronomic interest (Nimura *et. al.*, 2008). The present study was intended to generate polyploid gulupa forms through the use of substances that cause the arrest of mitosis, as colchicines and oryzalin. The efficiency of the induction of polyploid forms in seedlings of gulupa cultured *in vitro* was evaluated using cytogenetical, cytometrical and/or morphological methods. In a subsequent phase of research polyploid seedlings can be evaluated in the field for increase the productivity and quality of gulupa.

In total, eight tetraploid plantlets were generated with the treatments. Oryzalin was found to be an efficient agent for the induction of polyploids (tetraploid 10%) whereas colchicine tends to be very toxic to the explants (3.3% tetraploid).

**Keywords: Passiflora, Polyploidy, Mutagenesis, colchicine, oryzalin.**

# Contenido

	Pág.
<b>Resumen .....</b>	<b>VII</b>
<b>Lista de figuras.....</b>	<b>XI</b>
<b>Lista de tablas .....</b>	<b>XII</b>
<b>Lista de Símbolos y abreviaturas.....</b>	<b>XIII</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>1</b>
<b>1. OBJETIVOS.....</b>	<b>4</b>
1.1    Objetivo general.....	4
1.2    Objetivos específicos.....	4
<b>2. SITUACIÓN ACTUAL DEL CONOCIMIENTO - MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>5</b>
2.1    Generalidades de gulupa ( <i>Passiflora edulis f. edulis Sims</i> ).....	5
2.2    Cultivo <i>in vitro</i> .....	7
2.3    Citogenética.....	11
2.3.1    Ciclo celular.....	11
2.3.2    Citogenética en plantas.....	13
2.3.3    Citogenética del Género <i>Passiflora</i> .....	17
2.4    Poliplodía en plantas.....	18
2.5    Citometría de Flujo.....	21
2.5.1    Fundamentos de la citometría de flujo.....	22
2.5.2    Citometría en plantas.....	26
2.6    Evaluación de cloroplastos en células acompañantes del estoma.....	29
<b>3. METODOLOGÍA .....</b>	<b>31</b>
3.1    Selección del material de trabajo.....	31
3.2    Rescate del embrión.....	32
3.3    Organogénesis.....	33
3.3.1    Determinación de la dosis letal 50 (DL50).....	33
3.4    Inducción de Poliploidía.....	34
3.5    Evaluación Citogenética del Nivel de Ploidía.....	36
3.5.1    Obtención de células metafásicas.....	36
3.5.2    Determinación de la hora mitótica de la planta.....	36
3.5.3    Análisis citogenético y determinación del cariotipo.....	38
3.6    Análisis Morfológico de poliploidización.....	38
3.7    Análisis por citometría de flujo.....	39
3.7.1    Preparación de núcleos en suspensión.....	39

---

3.7.2	Análisis citométrico de las células en suspensión.....	39
3.7.3	Estimación del contenido de ADN nuclear.....	40
3.8	Análisis estadístico.....	41
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>42</b>
4.1	Selección del Material de Trabajo y Rescate del embrión.....	42
4.1.1	Determinación de la dosis letal 50 (DL50).....	44
4.2	Organogénesis e inducción de poliploidía.....	45
4.2.1	Inducción de poliploidía.....	48
4.3	Evaluación Citogenética del Nivel de Ploidía.....	52
4.3.1	Determinación de la hora mitótica de la planta.....	54
4.3.2	Análisis citogenético y determinación del cariotipo.....	56
4.4	Análisis Morfológico de poliploidización.....	57
4.5	Análisis del Contenido de ADN en Núcleos por Citometría de Flujo.....	60
4.6	Resumen.....	64
<b>5.</b>	<b>Conclusiones y recomendaciones .....</b>	<b>67</b>
	<b>Bibliografía .....</b>	<b>69</b>

## Lista de figuras

	Pág.
<b>Figura 2.1</b> Características de la gulupa.....	6
<b>Figura 2.2</b> Fases del ciclo celular (Singh, 2003) .....	12
<b>Figura 2.3</b> Sistema fluídico (Modificado de Beckton-Dickinson).....	23
<b>Figura 3.1</b> Codificación de Clones.....	36
<b>Figura 4.1</b> Procedimiento para liberar el embrión .....	43
<b>Figura 4.2</b> Estructura de la plántula después de 3 semanas de crecimiento .....	46
<b>Figura 4.3</b> Formación anormal de brotes con BAP en el medio MB1 .....	48
<b>Figura 4.4</b> Comportamiento de los brotes tratados con colchicina (a) y orizalina (b) después de 3 semanas de crecimiento.....	50
<b>Figura 4.5</b> Tejido meristemático adecuado para el análisis cromosómico vista en 40X de un campo con células en interfase y metafases. ....	56
<b>Figura 4.6</b> Metafase con $2n= 2x=18$ cromosomas .....	57
<b>Figura 4.7</b> Cloroplastos observados A. Control con 4 cloroplastos, B. Colchicina B-7A, C. Orizalina C-4A.....	60
<b>Figura 4.8</b> Daños en los cloroplastos observados A.Colchicina D-4, B. Orizalina D-3.....	60
<b>Figura 4.9</b> Contenido de ADN en gulupa sin tratar.....	62

## Lista de tablas

	Pág.
<b>Tabla 3.1</b> Procedencia de las muestras trabajadas. ....	31
<b>Tabla 3.2</b> Medios de cultivo empleados para regeneración de plántulas a partir de yemas. .....	33
<b>Tabla 3.3</b> Tratamientos mutagénicos.....	35
<b>Tabla 3.4</b> Protocolos cosecha células en metafase a partir de ápices radicales. ....	37
<b>Tabla 4.1</b> Tasa de activación de los embriones obtenidos con los diferentes métodos ....	43
<b>Tabla 4.2</b> Medios para organogénesis probados y su efectividad .....	47
<b>Tabla 4.3</b> Clones obtenidos de cada uno de los tratamientos con los agentes mutagénicos. ....	51
<b>Tabla 4.4</b> Promedio de cloroplastos encontrados en las plántulas tratadas con colchicina y orizalina y análisis de varianza. ....	59
<b>Tabla 4.5</b> Clones de colchicina y orizalina analizados por citometría de flujo.....	63
<b>Tabla 4.6</b> Tasas de supervivencia por tratamientos y representatividad .....	65

## Lista de Símbolos y abreviaturas

### Abreviatura Término

---

AIA	Ácido Indol Acético
msnm	Metros sobre el nivel del mar
ANA	2,4-D, ácido naftalenacético
KIN	Kinetina
BAP	Bencilaminopurina
FITC	Isotiocinato de Fluoresceina
BE	Bromuro de Etidio
IP	Ioduro de Propidio
DAPI	4',6-Diamidino-2-Fenilindol, Dilactato
DS <sub>50</sub>	Dosis letal 50
MS	Medio Basal Murashige-Scoogh
MSM	Medio MS Modificado por Monteiro (2000)
AG3	Ácido Giberélico



# Introducción

La producción agrícola en Colombia es el componente más importante de la economía del país y gran cantidad de la misma se destina a la exportación, en donde las flores y los frutales son los productos más tradicionales. Recientemente se ha visto un aumento importante en la dinámica de comercialización de lo que se ha denominado la “canasta de frutas exóticas promisorias colombianas de vocación exportadora”. Entre estas frutas se encuentran el tomate de árbol, la feijoa, la pitahaya y la gulupa, los cuales han demostrado que tienen un mercado importante en el exterior, siendo la gulupa el tercer frutal de exportación luego del banano y de la uchuva. (Miranda *et al.*, 2009). Al ser Colombia un gran productor en donde la alta competitividad del sector se ha basado en la implementación de nuevas variedades y en la innovación en los procesos de producción (www.proexport.com.co; Documento 7309 y Docnews 8844), se ha planteado la necesidad de estudiar más a fondo las posibilidades de aumentar la capacidad tecnológica de los productores necesaria para la generación de nuevas variedades en las especies de interés agrícola.

La gulupa (*Passiflora edulis f. edulis*) hace parte de la familia Passifloraceae a la que pertenecen otros frutales de gran importancia como la curuba, la maracuyá y la granadilla. Es una planta con fruto tipo baya, color púrpura en el exterior y con gran cantidad de semillas en su interior recubiertas por la pulpa (similar a la granadilla)

característica de los frutos de este género. La pulpa es la parte más usada para preparaciones ya que posee un sabor y aroma bastante agradable para la culinaria. La gulupa se cultiva principalmente en los departamentos de Cundinamarca, Antioquia y Boyacá y se ha reportado que sólo en Cundinamarca hay aproximadamente 500 hectáreas de terreno cultivado con una productividad de 6000 toneladas al año (Benitez & Hoyos, 2009) de las cuales una gran cantidad se destina para la exportación a países como Canadá, España, Estados Unidos, entre otros.

Se ha visto que para los productores es difícil acceder al material de siembra de la gulupa (Miranda *et al.*, 2009) y hay pocas iniciativas en el sector productivo del país para tratar de establecer estrategias de mejoramiento y producción de nuevas variedades para el país con características deseables. Al ser un frutal promisorio se han realizado estudios para analizar el nivel de diversidad presente, pero a pesar de que se ha generado la inquietud, éste tipo de estudios siguen siendo escasos y existe la necesidad de aumentar el conocimiento con el fin de desarrollar estrategias que optimicen el uso y productividad, incrementando la oferta de semillas o plántulas mejoradas y bien caracterizadas, disponibles para el sector.

La poliploidización química, mecanismo ya bastante conocido por los agricultores pero poco empleado al ser una técnica *in vitro*, ofrece la oportunidad de lograr cambios en el nivel de ploidía a corto plazo y regenerar múltiples plantas portadoras de ese nivel de ploidía con características mejoradas, empleando sustancias químicas que inhiben la mitosis como la Colchicina y la Orizalina. En la naturaleza se han visto series poliploides generadas espontáneamente en las que se encuentran niveles de ploidía 2x, 3x, 4x, 5x, etc, siendo las formas impares 3x, 5x etc. las que presentan baja fertilidad y características poco deseables, por lo que al realizar un tratamiento químico *in vitro* se

hace indispensable la evaluación en el nivel de ploidía inducido. Para la evaluación de los estados poliploides se han empleado técnicas citológicas como la citometría de flujo, la citogenética y la caracterización morfológica de las células acompañantes del estoma las cuales fueron empleadas en este estudio ya que son de alta confiabilidad y rapidez, permitiendo la continuación de la propagación de plántulas poliploides estables para su evaluación y establecimiento en la fase de campo y producción.

La poliploidización ha sido una estrategia ampliamente empleada en otros frutos, originando variedades más productivas, con mayor vigor, mayor tamaño general, resistencia o tolerancia a las plagas más comunes, y frutos más grandes, con mayor concentración de jugos y resistencia al transporte para la comercialización. Por la importancia de esta especie como fruto de exportación tanto en su forma entera como de sus subproductos (extractos de fruta para jugos y dulce), se espera que la inducción de poliploidías constituya una herramienta eficaz en el mejoramiento de la especie para los productores.

En este proyecto se generaron estados poliploides de gulupa a través del empleo de sustancias que causan el arresto de la mitosis como la colchicina y la orizalina, evaluando la eficiencia de la inducción de formas poliploides en las plántulas cultivadas *in vitro*, empleando métodos citogenéticos, citométricos y/o morfológicos, que permitieron llegar a plántulas que puedan ser evaluadas en campo y que tengan la posibilidad de aumentar la productividad y calidad de la gulupa.

# 1.OBJETIVOS

## 1.1 Objetivo general

Inducir clones poliploides en material *in vitro* de gulupa (*Passiflora edulis f. edulis* Sims) sometido a poliploidización química e implementar las técnicas citológicas para la determinación del nivel de ploidía inducido.

## 1.2 Objetivos específicos

- Estandarizar las técnicas *in vitro* para la obtención de hipocótilos a partir de los embriones primarios que será el material sobre el cual se inducirá la poliploidía.
- Inducir la mutagénesis química de los hipocótilos con colchicina y orizalina en diferentes concentraciones.
- Valorar el nivel de ploidía en diferentes tejidos (raíz/hojas) en las plántulas obtenidas después de los tratamientos, mediante técnicas citogenéticas y citometría de flujo.
- Valorar morfológicamente el nivel de ploidía a través del número de cloroplastos por célula en estomas del mesófilo de las hojas.

## 2. SITUACIÓN ACTUAL DEL CONOCIMIENTO - MARCO TEÓRICO

### 2.1 Generalidades de gulupa (*Passiflora edulis f. edulis Sims*)

La familia Passifloraceae pertenece al orden Malphigiales; dicho orden se encuentra dividido en dos tribus: la tribu Pariopsae, distribuida principalmente en África y que comprende 6 géneros, y la tribu Passiflorae que se encuentra ampliamente distribuída en América representada por 11 géneros (Yockteng & Nadot, 2004). De los géneros presentes en América, el más grande es el género *Passiflora*, descrito por primera vez por Linneo en 1735 describiendo inicialmente 22 especies, y que gracias a estudios posteriores ha ampliado sus representantes estimándose en la actualidad aproximadamente 530 especies y reconociéndose una amplia variabilidad y diversificación en *Passiflora*. En Colombia la familia Passifloraceae se encuentra ampliamente representada con aproximadamente 165 especies de las cuales 22 especies, pertenecientes al género *Passiflora*, producen frutos muy importantes y promisorios en la economía del país. Entre éstas se encuentran la curuba, la granadilla, la badea y la gulupa. (Ocampo *et al.*, 2007). La gulupa cuenta con un amplio mercado para exportación ya que la prefieren por su aroma y por su sabor más dulce que el del maracuyá (Isaacs, 2009) posicionándose dentro de los frutales más importantes para el país.

La gulupa se establece en regiones que van de los 1800 y 2400 msnm de los departamentos de Cundinamarca, Boyacá, Huila, Quindío y Tolima ya que crece mejor en los climas subtropicales en donde la temperatura varía de 14°C a 24°C. (Fonseca-Trujillo *et al.*, 2009).

La gulupa se caracteriza por ser una enredadera trepadora leñosa que puede alcanzar los nueve metros de longitud en condiciones climáticas favorables, aunque su período de vida no supera por lo general la década. Su tallo es rígido y leñoso; presenta hojas alternas de gran tamaño, perennes, lisas y trilobuladas, de color verde oscuro. La flor es solitaria, hermafrodita, blanca en su cara superior, con bandas transversales de color púrpura en la parte basal lo que la hace una flor bastante exótica. (Figura 2.1) Posee frutos de color verde al inicio y púrpura cuando alcanza su plena maduración. (Francis, 2009). Las semillas son negras y aplanadas con la testa muy dura lo que dificulta su manejo *in vitro*. Los frutos pueden ser consumidos tanto frescos como procesados en jugos, helados y mermeladas entre otros. Adicionalmente la gulupa es una buena fuente de calcio, fibra, fósforo, hierro, magnesio, potasio, carbohidratos y vitaminas A, C y B12, (Corporación Colombia Internacional, 2007)

**Figura 2.1** Flor y fruto de gulupa



## 2.2 Cultivo *in vitro*

El cultivo de tejidos *in vitro* comprende un grupo de técnicas mediante las cuales un explante se cultiva en un medio de estéril de composición química definida y en condiciones ambientales controladas (Roca & Mroginski, 1991). Dado que muchas veces las condiciones de cultivo *ex vitro* de una planta en especial se puede complicar, ya sea por los requerimientos nutricionales que tienen o por que las condiciones ambientales no se pueden controlar de la manera deseada, el cultivo *in vitro* se convierte en una alternativa bastante adecuada para superar dichos inconvenientes.

Un cultivo *in vitro* se basa en:

- Esterilidad
- Tipo del explante
- Medios de cultivo
- Condiciones ambientales para la incubación

Para mantener la esterilidad en los procedimientos se debe contar con los equipos y las herramientas necesarias como cabinas de flujo laminar, autoclaves, etc. Permitiendo que todos los elementos que se trabajen mantengan la característica de asepsia.

El explante es parte de un tejido u órgano de una planta con el que se puede regenerar un nuevo individuo que comparte las mismas características de la planta inicial, por el proceso conocido como clonación. Esta posibilidad hace que muchas de las características deseables (tamaño de frutos, resistencia a plagas, etc) que se encuentran en una pequeña cantidad de individuos se puedan mantener y reproducir para tener una población de individuos con dichas características, mucho más grande. (Chaturvedi *et al.*,

2007). Los explantes pueden provenir de hojas, tallos, meristemos, entrenudos, cotiledónes, etc. Dependiendo del tejido a trabajar se puede requerir diferentes tratamientos para regenerar un nuevo individuo, haciendo indispensable el conocimiento de las necesidades de las plantas en los medios de cultivo para que cumplan con la función de suplir todos los nutrientes que lleven a un cultivo *in vitro* exitoso de clones. La generación de dichos clones se puede realizar de forma directa o indirecta. La generación de órganos o embriones de forma indirecta se da a través de la formación de callo mientras que la directa es sin la presencia de callo durante la organogénesis. El callo es el crecimiento de células desdiferenciadas en una alta proporción; para luego permitir la formación del órgano o del embrión que se buscan (Azcon-Bieto, 1993). Este proceso no es muy recomendable cuando se busca tener clones idénticos al original debido a que los callos pueden llegar a producir una gran variabilidad conocida como variación somaclonal y que se puede estimular mediante la incorporación errónea de nutrientes, hormonas, vitaminas y factores de crecimiento al medio de cultivo.

Todos los medios de cultivo empleados deben mantener un equilibrio en una serie de factores como los reguladores de crecimiento, pH, nutrientes minerales, que son responsables de que se dé un buen funcionamiento en el metabolismo, producción de proteínas, reacciones enzimáticas, etc. (Monteiro *et al.*, 2000). Los medios de cultivo deben cumplir entonces con proveer a la planta con fuentes de carbono accesibles, minerales, vitaminas, sustancias reguladoras del crecimiento y un agente gelificante que permita la estabilidad física de la planta. (Roca & Mroginski, 1991)

La fuente de carbono es vital en el cultivo *in vitro* ya que son muy pocos los cultivos de éste tipo que presentan autotrofía, siendo los carbohidratos las principales fuentes de

éste elemento. La glucosa y la sacarosa pueden ser manejadas con gran facilidad y se han establecido como los principales carbohidratos para éste fin aunque también se pueden emplear manosa, galactosa y maltosa de las que su uso puede ser menos favorable.

Los minerales más importantes para un cultivo *in vitro* son el nitrógeno y el potasio, pero que deben ser complementados por fósforo, calcio, magnesio y azufre. Pedroso y Pais (1995) determinaron que modificando las concentraciones de Ca, C, O, K, Na, P, Fe, S, y Mg la morfogénesis de las plántulas *in vitro* de *Camellia japonica*, no se llevaba a cabo. Es por esta razón que es importante conocer los requerimientos de las especies a manejar en cultivo con el fin de proporcionar los requerimientos adecuados para su crecimiento.

En cuanto a las vitaminas y a los reguladores de crecimiento el manejo de estos puede ser tan variado como la cantidad de especies de plantas que se deseen emplear en cultivo *in vitro*. Generalmente la cantidad de vitaminas no son tan grandes debido al contenido endógeno que las plantas pueden presentar (Roca & Mroginski, 1991). Los reguladores de crecimiento son las hormonas necesarias para ayudar en el crecimiento y diferenciación del explante. Las hormonas más empleadas son las del tipo auxinas con el ácido indol acético (AIA), 2,4-D, ácido naftalenacético (ANA), entre otras, las cuales estimulan la división celular y producen alargamiento además de que ayudan con el fototropismo celular y las tipo citocininas, hormonas esenciales en el accionar de varios procesos vinculados al crecimiento y desarrollo de las plantas (promueven división celular, iniciación de brotes, organogénesis y androgénesis, demoran o retrasan la

senescencia, activan yemas laterales en dormancia) (Squeo & Cardemil, 2007). Las citocininas más empleadas son la kinetina (KIN) y la Bencilaminopurina (BAP).

Los cultivos deben mantenerse en unas condiciones ambientales adecuadas para permitir el crecimiento de las plántulas. Es por esto que la temperatura y el foto período deben ser regulados al establecer el plan de trabajo. El foto período es muy importante ya que muchos procesos de las plantas van a estar regulados por el ciclo circadiano. El foto período más recomendado es el de 16 horas luz y 8 horas oscuridad con una radiación especial dada por tubos fluorescentes de luz día que emiten entre 20 a 50  $\mu\text{mol} \times \text{m}^2/\text{s}$  con una temperatura que puede variar entre 25 a 28°C dependiendo de la especie. (Gonzalez *et al.*, 2001)

La mayoría de estudios sobre el cultivo *in vitro* en el género *Passiflora* se han llevado a cabo en varios tejidos de maracuyá (Trevisan & Januzzi, 2005; Monteiro *et al.*, 2000) en donde se ha buscado establecer los requerimientos de la especie y Monteiro (2000) propone un medio de cultivo solamente pensado para suplir los requerimientos de maracuyá (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*); medio que ha sido empleado con éxito por investigadores que se han enfocado en el cultivo de especies de éste género al ser plantas con necesidades muy similares. Guzzo y colaboradores (2004) analizaron medios de cultivo específicos para 30 especies de *Passiflora* y donde solo se logró regenerar clones de 13 especies de las 30 propuestas al principio. Para gulupa se han realizado varias aproximaciones al cultivo *in vitro* aunque más que todo para investigación y no para producción. El establecimiento de un cultivar *in vitro* de gulupa es una de las metas a largo plazo que se buscan con la especie para así mantener una gran cantidad de material con el que los cultivadores podrían trabajar.

## **2.3 Citogenética**

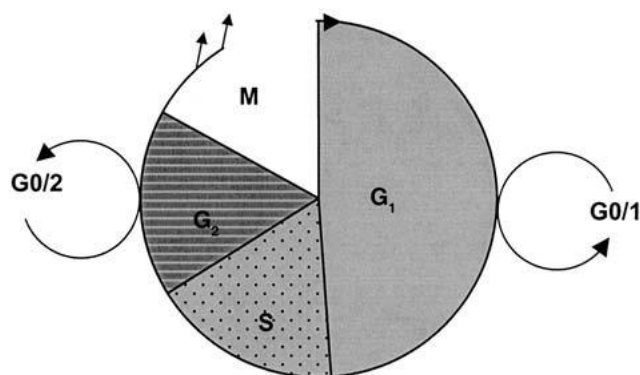
La citogenética es el estudio de la estructura, morfología y funcionamiento de los cromosomas en los organismos. Los cromosomas son las estructuras en las que el ADN se compacta durante la mitosis del ciclo celular y cada especie en el planeta tiene una forma de compactar el ADN característica que la logra diferenciar del resto de especies. Debido a las diferencias en la forma en la que se compacta el ADN en las células en división es posible analizar y definir las características cromosómicas de una especie y así conocer su complemento, el ciclo celular, y también permiten hacer inferencias taxonómicas y filogenéticas de las especies para aclarar una serie de problemas evolutivos (tanto generales como referidos al origen de determinados grupos). Es así que se manejan los marcadores cromosómicos y que se pueden identificar gracias a técnicas de bandeo tradicional en citogenética como Bando G (Heterocromatina), Bando C (Heterocromatina constitutiva-Centromérica), Bando NOR (Regiones Organizadoras Nucleolares). Estos marcadores cromosómicos son específicos para cada especie y dependiendo de las modificaciones en dichos marcadores se pueden generar clasificaciones taxonómicas de los individuos.

### **2.3.1 Ciclo celular.**

El ciclo celular es un proceso natural que ocurre en todos los organismos vivos. Consta de cuatro fases secuencialmente ordenadas en las cuales las células pasan de estar enfocadas en procesos metabólicos, a generar la síntesis de ADN para su posterior división y paso a células hijas (Dewitte & Murray, 2003). Cada una de estas fases es vital para el funcionamiento normal de los organismos.

El ciclo celular en todos los eucariotes se lleva a cabo en varias fases que dependen del proceso o procesos que esté llevando a cabo la célula (Figura 2.2)

**Figura 2.2** Fases del ciclo celular (Singh, 2003)



La fase G<sub>1</sub> es la fase en la que la célula tiene que integrar el metabolismo normal con un conjunto de señales necesarias para que pueda tomar la decisión de iniciar la duplicación del ADN y continuar con la siguiente fase (Dewitte & Murray, 2003). En este punto el contenido de ADN en la célula va a ser diploide (2C).

La fase S o de síntesis es en la que el contenido de ADN se incrementa gradualmente hasta el punto en el que tienen una copia exacta del genoma completo de la célula pasando de 2C a 4C (Omerod *et al.*, 2005; Singh, 2003). En la fase S es importante que la planta tenga todos los nutrientes necesarios para llevar a cabo una buena síntesis de ADN ya que si no se cumple con los requisitos necesarios es probable que la planta no realice la síntesis y se detenga en fase G<sub>1</sub>. Además los procesos de replicación del ADN dependen de los sistemas de reparación que se pueden ver notoriamente afectados en la ausencia de diferentes nutrientes en la planta.

Luego de la fase S se tiene la segunda fase de estabilización que es la G2 en la que la célula se encarga de producir las proteínas necesarias para el proceso de mitosis y además se inicia la reorganización del citoesqueleto para permitir el libre movimiento de los cromosomas (Dewitte & Murray, 2003). Es en este punto en donde se empiezan a desacoplar los diferentes organelos celulares haciendo que el paso a mitosis sea casi irreversible.

La mitosis es el proceso por el cual la información genética duplicada va a ser transmitida a las células hijas gracias a la división longitudinal exacta de cada cromosoma a través del centrómero que une a las cromátides hermanas y que luego van a ser repartidas de manera uniforme permitiendo la formación de dos células cuya información genética será idéntica. (Dewitte & Murray, 2003)

La mitosis está dividida a su vez en 5 pasos: profase, metafase, anafase, telofase y citoquinesis. De todos estos pasos el que interesa en los estudios citogenéticos es la metafase ya que es en este punto en el que el ADN va a presentar su grado máximo de compactación en los cromosomas y su estudio será mucho más fácil.

### **2.3.2 Citogenética en plantas**

Los análisis citogenéticos en plantas dependen de varios factores que pueden afectar considerablemente los resultados de los experimentos. Estos factores son principalmente el tipo de tejido que se usa, el ciclo circadiano de la planta y el procesamiento de la muestra para la obtención de cromosomas metafásicos.

Para la obtención de cromosomas metafásicos en plantas es necesario determinar el tejido que se empleará. Para citogenética preferiblemente se emplean los meristemos, ya sean radicales o apicales, ya que estos permiten tener una gran población de células que en la planta presentan la mayor tasa de división celular. Además de los meristemos se puede lograr obtener cromosomas metafásicos a partir de tejidos diferenciados, por protocolos de obtención de protoplastos. Los protoplastos son componentes vivos de las células vegetales que han pasado por un proceso en el que quedan solo rodeados por membrana plasmática (Roca & Mroginski, 1993) y que se pueden estimular para tener división en suspensión y obtener células en metafase, casi como los protocolos establecidos para las células de animales.

Además de seleccionar el tipo de tejido que se toma para realizar los análisis citogenéticos, también es importante considerar que en las plantas la división celular depende de su ciclo circadiano y por lo tanto el éxito de un análisis citogenético está condicionado por éste. La hora en la que la tasa de división celular se aumenta considerablemente es la hora mitótica y se establece por medio del análisis de los índices de fases de las células presentes en el tejido a lo largo de un ciclo diario. Entre más células hay en metafase y anafase más cerca se está de la hora mitótica. Se define como hora mitótica al cociente de la sumatoria del número de células en las diferentes fases de la mitosis sobre el número total de células observadas al microscopio bajo un campo de 40X. El aumento de la división en la hora mitótica se explica por el umbral de nutrientes y de agua que la planta necesita para suplir las necesidades en las rutas metabólicas estimulando la división de los ápices radiculares en los picos de mayor luz del día. (Rodríguez & Bueno, 2006).

Para lograr la obtención adecuada de cromosomas metafásicos a partir de tejidos vegetales se han descrito cuatro pasos principales que pueden variar dependiendo del tipo de planta que se esté manejando. Los cuatro pasos son:

- **Pretratamiento:** El pretratamiento se refiere a la interacción que hay entre las células de los tejidos en división con un agente antimitótico, es decir, en el pretratamiento lo que se busca es detener el ciclo celular en metafase para obtener cromosomas. En este paso se conocen varios agentes que pueden causar el arresto del ciclo celular específicamente en metafase, entre estos los más empleados son: 8-hidroxiquinolina, colchicina, exposición a agua con bajas temperaturas,  $\alpha$ -bromonaftaleno y para-diclorobenceno.

La colchicina y la 8-hidroxiquinolina evita la formación del huso mitótico al unirse a los dímeros de tubulina.

El pretratamiento con agua es empleado con mucho éxito en plantas con poca cantidad de pared celular y con cromosomas de grandes tamaños, mientras que el para-diclorobenceno se ha empleado y se recomienda más que todo en plantas con cromosomas de tamaño pequeño. (Singh, 2003)

En el trabajo con los diferentes pretratamientos se debe ser muy cuidadoso ya que todas las sustancias que se manejan para arrestar el ciclo celular son potencialmente tóxicas y pueden estimular la inducción de poliploidías a los análisis.

- **Fijación:** La función del fijador en los estudios citogenéticos es la de detener las células en el punto del ciclo que se desea sin causar hinchamiento, distorsión o encogimiento de los cromosomas (Singh, 2003). Además los componentes de la

solución fijadora limpian el citoplasma y estabiliza el ADN para su posterior tinción.

El fijador más empleado es el fijador Carnoy el cual es una mezcla entre etanol y ácido acético, que manejado a una temperatura de 4 °C permiten la deshidratación de la membrana celular y del citoplasma eliminando todo el “fondo” que puede causar interferencias con el análisis cromosómico.

- **Hidrólisis:** La principal diferencia entre las células animales y las vegetales es la presencia de la pared celular compuesta más que todo por celulosa y pectinas las cuales generan una barrera para la tinción y posterior análisis de los cromosomas. Es por esto que es necesario retirar dicha pared celular para así lograr el análisis adecuado del material cromosómico.

Para lograr eliminar la pared celular se pueden emplear varias técnicas pero las más usadas son la hidrólisis ácida con ácido clorhídrico a diferentes concentraciones y la hidrólisis enzimática en donde las principales enzimas a usar son la celulasa, pectinasa y la macerozima. Estos tratamientos se pueden emplear solos o en conjunto aunque dependen de las características de cada especie de planta (Talledo *et al.*, 1993)

- **Tinción:** Los tejidos que han pasado por los puntos anteriores del proceso pueden ser analizados gracias diferentes sustancias que permiten visualizar el ADN a través de un microscopio. Las tinciones más empleadas son el reactivo Feulgen, el colorante Giemsa y otros diluidos en ácido acético como el aceto-carmín o aceto-orceína que además complementan la fijación. Además de estas tinciones que colorean el ADN total, existe la posibilidad de realizar técnicas de bandeo

como la banda C, banda G, banda NOR y hasta técnicas moleculares como FISH que pueden brindar mas información sobre posición de marcadores cromosómicos y sobre posibles eventos cromosómicos (traslocaciones, deleciones, inversiones, etc.) en la evolución de las especies.

Para determinar los números cromosómicos en plantas hay dos simbolos a tener en cuenta: n y x. El símbolo n se utiliza más que todo para tres situaciones: n para identificar el número de cromosomas en los gametos, 2n para determinar el número cromosómico en células somáticas y 3n para caracterizar la cantidad de cromosomas en el endospermo. Mientras tanto x determina el número real de cromosomas en un estado de ploidía determinado (Gupta, 1995). Es así que si tenemos una planta que en sus células somáticas presenta un estado diploide de 20 cromosomas, éste se debe describir de la siguiente manera:  $2n=2x=20$ .

### **2.3.3 Citogenética del Género *Passiflora***

La citogenética del género *Passiflora* ha sido pobremente estudiada y sólo se conocen los números cromosómicos a partir de meristemos radicales de algunas especies (Souza *et al.*, 2008) que por el análisis de características cromosómicas, han permitido conocer que hay una gran variabilidad en el grupo. Las especies de *Passiflora* pueden ser repartidas en cuatro grupos cariológicos representados por  $x = 6$  (número básico ancestral para el género), 9, 10 y 12 (Melo & Guerra, 2003; Hansen *et al.*, 2006; Chiapero *et al.*, 2013)

Para *Passiflora edulis f. edulis* Sims, Janaki Ammal (1945) reporta su complemento cromosómico de  $2n=2x=18$  un número cromosómico bajo, ya que los complementos

cromosómicos de las especies del género van de  $2n=2x=12$  a 84 (Souza *et al.*, 2008). A pesar de tener la información correspondiente a la cantidad de cromosomas presentes en la especie no se han reportado hasta el momento ningún acercamiento a la caracterización morfológica y de composición de los cromosomas de la gulupa. Estas características son importantes al momento de realizar un análisis de estados poliploides ya que son la base del incremento en el número cromosómico.

## 2.4 Poliplodía en plantas

El término ploidía se refiere a la cantidad de cromosomas presentes en una célula de un organismo que constituye la cantidad de ADN con la que puede sobrevivir sin complicaciones (Singh, 2003). Al proceso de aumento en una relación aritmética entre los números cromosómicos en las células de los organismos se denomina poliploidización (Grant, 1989). Es así que se pueden tener organismos con uno o más juegos de cromosomas llegando a tener individuos haploides, diploides, tetraploides, y así sucesivamente. En las plantas se ha observado que la poliploidía ha jugado un papel muy importante en la especiación (Leitch & Bennett, 1997), reportándose que para las angiospermas aproximadamente del 30 al 35% de las especies que hoy conocemos se han generado por procesos de este tipo (Stebbins, 1950, 1971).

La poliploidización se puede dar por duplicación natural del número de cromosomas, endoduplicación o por inducción química, y se conocen como autopoliploides naturales o inducidos respectivamente; o por hibridación entre dos especies cercanas con diferentes números cromosómicos que para estabilizar el genoma realizan un proceso de poliploidización, conformando lo que se conoce como alopoliploidía.

Se ha visto una relación directa entre procesos de poliploidía en plantas y su evolución. Acercamientos al estudio del genoma completo de las angiospermas han demostrado que un evento de poliploidización antes de su divergencia de las monocotiledóneas virtualmente hace de todas las angiospermas, antiguas poliploides (Paterson *et al.*, 2004). También se ha reportado el caso del aumento en el genoma de un ancestro común de los pastos demostrando la importancia de la poliploidización en la historia evolutiva de las plantas (Adams & Wendel, 2005).

Para el género *Passiflora* se ha creído que varios procesos de auto y alopoliploidización se han llevado a cabo. Esto debido a la gran variación en números cromosómicos que van desde plantas que en estado diploide cuentan con un complemento de 12 cromosomas, hasta complementos cromosómicos de 84 (Souza *et al.*, 2008) que hacen pensar que para generar números cromosómicos tan altos ha sido necesario pasar por procesos de poliploidización en la historia evolutiva del género.

A parte de los procesos espontáneos de poliplodía en Passifloraceae también se han reportado esfuerzos por generar estados poliploides inducidos. Es así que Mohamed y colaboradores (1996) lograron regenerar plantas triploides de *Passiflora foetida* a partir de endospermo siendo el primer reporte para pasifloras y el inicio de la búsqueda para la generación de nuevas variedades de plantas a través de la poliploidización. Zhang y colaboradores (2000) siguieron la línea de Mohamed *et al.*, (1996) para poder llegar a inducir estados poliploides en *Passiflora edulis f. flavicarpa* y lograron regenerar callo a partir del endospermo formando plantas triploides que presentaron características bastantes llamativas para su producción en campo como el aumento en el tamaño de la

flor que fue claramente más llamativa que su forma diploide. Por otra parte trabajos como el de King e Irvine (2010) demuestran la importancia de la poliploidización en las pasifloras por aloploidía obtenida a partir de cruces entre especies cercanas logrando varias plantas tanto triploides como tetraploides y concluyen que las plantas tetraploides presentaron las características más promisorias. La base para estos resultados se fundamenta en que la meiosis en formas tetraploides es estable en la recombinación (formación de quiasmas) y en la segregación de los cromosomas a las células hijas, en tanto que en formas triploides puede darse la situación en que se segregue equivocadamente la información genética produciendo gametos no funcionales. (Singh, 2003). Es por esta razón que al inducir estados poliploides lo que se espera es generar tetraploides en especial, ya que en los hexaploides (triploides duplicados) u octaploides, se presenta el problema de la redundancia génica y de esta manera el silenciamiento de los genes cuyo producto se desea maximizar. Para lograr caracterizar adecuadamente los niveles de pliodía, La citogenética y la citometría de flujo han demostrado ser herramientas eficaces para este fin.

Además sustancias que causan el arresto de la mitosis en metafase como la Colchicina y la Orizalina han sido ampliamente trabajadas para generar estados poliploides. La colchicina evita la formación del huso mitótico al unirse con los dímeros de tubulina que al presentar esta conformación no se pueden polimerizar. Se han reportado gran cantidad de procesos de inducción de poliploides con colchicina, siendo un mecanismo bastante efectivo, pero también se ha visto que el empleo de la colchicina genera mucha quimerización y muerte del tejido con el que ha estado en contacto, por lo que la producción de plantas poliploides viables se disminuye en una gran proporción. (Rego *et al.*, 2009). Debido a que la colchicina tiene efectos tan negativos, el uso de la Orizalina y

de otros métodos de arresto mitótico se han empezado a utilizar generando mayores tasas de plántulas poliploides viables. La orizalina es un herbicida que a concentraciones adecuadas causa la despolimerización del huso con mayor eficacia permitiendo obtener mayor cantidad de células en estado poliploide.

## **2.5 Citometría de Flujo**

Aparte de los estudios citogenéticos, la citometría es una herramienta bastante empleada ya que representa un método efectivo y que puede ser empleado con mejores resultados en una gran cantidad de tejidos en comparación con la citogenética convencional. La ventaja de esta técnica es la posibilidad de analizar diferentes tejidos, a parte de los meristemos, la capacidad de producir un volumen grande de resultados en un tiempo reducido y el procesamiento de datos mediante un software especializado (Ollitrault-Sammarcelli *et al.*, 1994) que permite el fácil análisis de un gran número de células.

La citometría de flujo parte de la generación de una suspensión de partículas (perlas, bacterias, células, etc.) marcada con un fluorocromo específico para el diseño del experimento, las cuales van a pasar por un láser y dependiendo de la intensidad en la emisión generada se podrán determinar características tan variadas como el tamaño, la complejidad (granulosidad), contenido de ADN entre otras, de las partículas.

### **2.5.1 Fundamentos de la citometría de flujo**

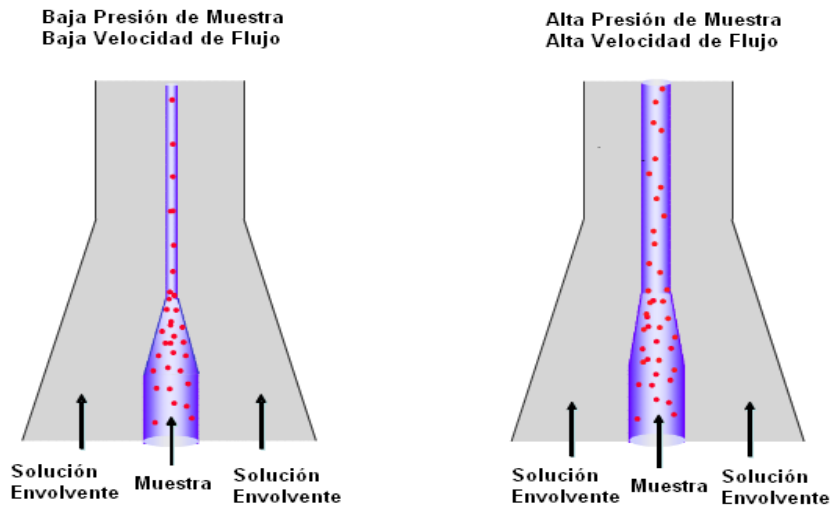
La citometría de flujo nace ante la posibilidad de caracterizar poblaciones celulares en suspensión a través de la absorbancia de luz UV en los espectrofotómetros. Estos antecesores del citómetro de flujo eran difíciles de manejar y las medidas generadas en

los mismos no eran confiables llevando a su desuso. Esto causó que la medida de la absorbancia pasara a un segundo plano para darle paso a la medición directa de la emisión de fluorescencia de las moléculas que componen las partículas en suspensión. Es hacia 1953 que aparece el primer registro del uso de un citómetro de flujo principalmente para la detección de bacterias en cultivos celulares (Rosland-Taylor, 1953) y por la efectividad demostrada por estos primeros ensayos se abrió la puerta una gran cantidad de aplicaciones en las ciencias básicas.

Al pasar de los años los equipos de citometría de flujo se han perfeccionado aumentando la confiabilidad y la rapidez de los ensayos. Pero a pesar de los avances un citómetro de flujo se basa en tres sistemas que no han cambiado con el paso del tiempo. Estos tres sistemas son el fluídico, el óptico y el electrónico.

- **Sistema Fluídico**

Es el sistema en el cual se mantienen las partículas en suspensión y permite que las mismas sean dirigidas hasta el punto de enfoque. El sistema fluídico consiste en dos columnas de fluido que alimentan la cámara continuamente y que son reguladas por variaciones en la presión de ingreso a la misma. (Figura 2.3)

**Figura 2.3** Sistema fluídico (Modificado de Beckton-Dickinson).

Las dos columnas de fluido se conocen como la columna envolvente y la columna de muestra. La primera es una solución isotónica que mantiene una velocidad y presión constante, generando un flujo laminar estable y sin turbulencias que causen la mezcla entre el fluido envolvente y la muestra, ya que la muestra debe pasar en medio de la columna envolvente y dirigirse hasta el punto en el cual las partículas serán analizadas. A este flujo laminar se le conoce como “enfoque hidrodinámico” (Ormerod *et al.*, 2005). El enfoque hidrodinámico permite enviar las partículas ordenadamente hasta el punto de encuentro entre el sistema óptico y el fluídico haciendo que sólo una de las partículas sea analizada por vez.

El controlar las presiones de los fluidos en la cámara es muy importante ya que una presión alta en la muestra puede aumentar errores en los análisis. La presión con la que entra la muestra al sistema puede ser graduada dependiendo de la cantidad de eventos que se deseen registrar en un periodo de tiempo determinado (un evento es el contacto entre la partícula y el láser). Si se desean muchos eventos es necesario establecer una

presión de la muestra alta para que la misma presione el fluido envolvente permitiendo el paso de varias partículas a la vez pero cuando se permite el paso de muchas partículas en un espacio de tiempo muy corto se puede permitir el paso de cúmulos de partículas las cuales serán leídas como un solo evento y que unidas van a emitir una fluorescencia mayor a la que emitirían solas. Estos errores se pueden corregir cuando la muestra ingresa a la cámara con una presión baja haciendo que las partículas pasen ordenadamente de a una en una.

- **Sistema Óptico**

El sistema óptico es más complejo que el fluídico ya que en este se tienen varios elementos importantes para su funcionamiento: El láser, prismas y filtros. Cada uno de estos tres elementos son característicos y dependen de los fabricantes y de las exigencias de los investigadores.

Hay varios tipos de láseres que son empleados dependiendo del fluorocromo que esté marcando las partículas a estudiar. Es así que es necesario conocer las longitudes de onda en las que se excitan y emiten los fluorocromos que se van a manejar en los ensayos. Los fluorocromos más empleados son el Bromuro de Etidio (BE), el Ioduro de Propidio (IP), DAPI, Hoechst 11325, FITC, Spectrum Green, Spectrum Orange, entre otros.

En los equipos más usados solo se tiene un laser verde para los fluorocromos que están en un rango de 532nm de excitación, pero en equipos más especializados se cuenta con láser rojo de 640nm y laser UV o violeta de 450nm ([www.millipore.com](http://www.millipore.com)) ampliando las posibilidades de uso de diferentes fluorocromos.

Los prismas interactúan permitiendo el paso de la fluorescencia emitida por los fluorocromos, a los filtros de recolección, lo cuales van a reconocer las diferentes longitudes de onda que hayan sido emitidas por el fluorocromo y seleccionándose de esta manera las longitudes de onda específicas para el ensayo.

- **Sistema Electrónico**

Los pulsos de luz emitida y de fluorescencia son tomados por el sistema electrónico y son transformados en pulsos eléctricos. (Dolezel & Bartos, 2005). Esto ocurre gracias a la presencia de un fotodetector en cuya superficie llega la luz y genera un estímulo que se traduce en una pequeña corriente eléctrica. Esta corriente es luego pasada a un amplificador de dicha señal en la que la amplitud del pulso eléctrico es proporcional al número de fotones que alcanzaron el fotodetector (Ormerod *et al.*, 2005) haciendo que la medición de la señal eléctrica sea correlacionable con la emisión de la fluorescencia de la partícula en suspensión.

En este punto lo único que hace falta es el procesamiento y evaluación de las señales lo cual es realizado por diferentes programas computacionales que dependen del equipo que se emplee. Cada fabricante tiene su propio programa para caracterizar los diferentes análisis pero que en general se basan en el mismo tipo de resultados: los histogramas de puntos o de picos, en los cuales se suman cada uno de los eventos captados por el sistema citométrico.

Es importante el manejo que se lleve a cabo de los umbrales de los histogramas ya que estos son los que determinarán lo que se debe analizar y lo que se toma como errores o

detritos. Se puede analizar si la presión de la muestra, es decir el flujo de las partículas, fue adecuada o si se tienen acumulaciones que afectan el resultado de la prueba. De ser así es posible volver a realizar el ensayo con nuevas condiciones. Los umbrales de los histogramas son importantes ya que estos causan el aumento o disminución del coeficiente de variación (%CV). El %CV es una medida que se toma a partir del cociente entre la desviación estándar y la medida de los picos generados en el análisis de la fluorescencia. En este orden de ideas, entre menor sea el CV, más exacta será la medida. Se tiene estimado que el CV debe estar por el orden de 2% al 5% para asumir que la medida es confiable. (Dolezel & Bartos, 2005).

### **2.5.2 Citometría en plantas**

La citometría de flujo originalmente fue empleada en diagnósticos médicos pero luego se vio su potencial uso en la estimación de tamaños de genomas de diferentes especies y del análisis de sus ciclos celulares (Singh, 2003). El descubrimiento de las técnicas fluorescentes de tinción específica para las moléculas de ADN (como la incorporación de Bromuro de Etidio (BE)) hicieron de la citometría de flujo la herramienta por excelencia para caracterizar la cantidad de ADN presente en una célula. Estos análisis han permitido determinar, para muchas especies tanto de plantas como de animales, el Valor-C. El Valor-C es, según Swift (1950), la cantidad de ADN presente en una célula haploide. (Dolezel & Bartos, 2005).

Se ha observado que las especies tienen diferentes Valores-C que puede ayudar en la diferenciación taxonómica de las mismas pero además, que estas diferencias entre los valores del contenido de ADN en las células no tiene que ver con la complejidad de los organismos (Paradoja del valor-C) (Dolezel & Bartos, 2005). Gracias a estas

características los estudios del contenido de ADN en las células de las especies tanto animales como vegetales ha tenido mucho interés en la comunidad científica. En la actualidad hay varios proyectos para determinar el valor-C en plantas pero las aplicaciones del estudio de este valor, puede ser útil en el mejoramiento de plantas cuando se modifica el contenido de ADN en un organismo.

La citometría en plantas al igual que otras técnicas que involucran el análisis celular se enfrentan una muy importante barrera: La pared celular. El primer acercamiento al uso de la citometría de flujo fue llevado a cabo por Heller en 1973 en donde se tiñeron con BE núcleos de *Oryza sp.* para determinar su contenido de ADN demostrando la posibilidad de realizar análisis en tejidos vegetales. (Dolezel & Bartos, 2005). Pero fue a mediados de los ochentas cuando se trabajó de verdad en la posibilidad de obtener suspensiones celulares a partir de diferentes tejidos eliminando la pared celular y extrayendo de manera exitosa núcleos para el análisis citométrico.

Esto se logró por el uso de diferentes soluciones para el aislamiento nuclear. Estas permiten obtener núcleos intactos en suspensión para el análisis. Las soluciones deben cumplir con tres puntos: 1. asegurar la estabilidad de los núcleos a través del experimento, 2. proteger el ADN de la degradación y 3. facilitar la tinción. Para cumplir con la estabilidad del ADN se emplean agentes quelantes que evitan que las nucleasas puedan actuar rompiendo el ADN, además el pH debe controlarse y mantenerse entre 7 y 8. El uso de detergentes enzimáticos como el Tritón X-10 o el Tween 20 libera los núcleos, los separa de los cloroplastos, elimina los restos de citoplasma y disminuye los agregados entre núcleos y entre núcleos y detritos. (Loureiro *et al.*, 2006).

De todas las soluciones de lisis la más recomendada ha sido la propuesta por Otto en 1990 en la que se usan dos soluciones: la solución Otto I compuesta por ácido cítrico a una concentración de 100 mM y 0,5% de Tween 20 en un pH de 2.3 que permite una extracción limpia de los núcleos a procesar; y la solución Otto II la cual cuenta con un estabilizador para el ADN y tiene un pH de 8.9 contrarrestando la acidez de Otto I (Dolezel & Bartos, 2005). Se ha trabajado con esta solución debido a que al parecer el ácido cítrico mejora la accesibilidad a la cromatina homogeneizándola lo cual elimina las diferencias en las intensidades de tinción en las poblaciones de núcleos de una misma planta.

Para determinar el Valor-C de una población celular se mide según la ecuación 1:

$$2C(\text{Contenido ADN célula diploide}) = \frac{\text{Intensidad media del pico G0/G1 planta problema} \times 2C_{\text{ADN estándar}}}{\text{Intensidad media G0/G1 estándar}} \quad (1)$$

Es importante notar que la citometría, al contrario de lo que hace el análisis microscópico de cromosomas, es una técnica comparativa que no mide directamente los niveles de ploidía sino que compara muestras con estándares conocidos de cantidad de ADN para determinar cierto nivel de ploidía. (King & Irvine, 2010). Esto hace de la citometría una herramienta de bastante ayuda cuando se sospecha diferencias en la ploidía de una planta. Pero como lo que se busca es comparar una cantidad de ADN presente en una población celular con otra que debe ser conocida, es muy importante establecer bien qué control se va a emplear para establecer las condiciones del ensayo. Se conoce que 1 picogramo de ADN equivale aproximadamente a  $0.978 \times 10^9$  pares de bases (Dolezel et

*al.*, 2003) por lo que las mediciones generadas por la citometría se pueden equivaler a la cantidad de pares de bases presentes en una célula.

Para el género *Passiflora* se sabe que así como hay gran variación fenotípica, también hay una gran variación en el tamaño de los genomas entre las especies. (Souza *et al.*, 2004). Esta variabilidad ha permitido el realizar las primeras aproximaciones con citometría de flujo, reportando para 9 especies del género un contenido de ADN en un rango de 1.83pg para *Passiflora suberosa* L., hasta 5.36pg para *Passiflora quadrangularis*. (Souza *et al.*, 2004). En este mismo trabajo se determinó para gulupa un contenido de ADN de 3.16pg pero que no ha sido revisado ni confirmado lo cual es recomendable ya que se ha visto que se puede presentar una gran variación entre ensayos, entre investigadores, en regiones geográficas o entre laboratorios dependiendo de los elementos que se empleen en cada ensayo.

## **2.6 Evaluación de cloroplastos en células acompañantes del estoma**

Uno de los efectos más inmediatos del aumento del genoma en un individuo es el incremento en el tamaño de sus células con respecto a las de sus progenitores diploides (Gregory, 2005). En plantas las células acompañantes del estoma y los granos de polen son los más empleados para determinar el nivel de ploidía debido a que ambos son significativamente más grandes en los poliploides que en los diploides.

Se ha demostrado que hay una correlación establecida entre el número de cloroplastos y el nivel de ploidia en las plantas. Esto debido a que la replicación del ADN nuclear

prepara el camino para la reproducción del cloroplasto y gracias a esto la cantidad de ADN nuclear es fundamental para garantizar la continuidad de los cloroplastos en las sucesiones de células meristemáticas. (Butterfass, 1995)

Por la facilidad de obtención del tejido y de la confiabilidad de la técnica el análisis de la cantidad de cloroplastos presentes en los estomas es una metodología eficaz y rápida para estimar el nivel de ploidia por lo que ha sido empleada para detectar formas tetraploides en papas (Cardi *et al.*, 1993), melones (Compton *et al.*, 1996) y maracuyá (Rego *et al.*, 2009)

## 3.METODOLOGÍA

### 3.1 Selección del material de trabajo

La obtención del material se realizó con diferentes productores de gulupa en el departamento de Cundinamarca y Tolima y además se trabajaron semillas de frutos comercializados en plazas de mercado de Cajicá.

**Tabla 3.1** Procedencia de las muestras trabajadas.

PROCEDENCIA
Finca Las Brisas – Villa Rica (Tolima)
Finca La Cajita – Villa Rica (Tolima)
Tena (Cundinamarca)
Plaza de mercado Cajicá (Cundinamarca)

Un total de 200 semillas de varios frutos de gulupa fueron tomadas de cada uno de los puntos de muestreo y se llevaron a las instalaciones del laboratorio de cultivo de tejidos vegetales en donde las semillas fueron liberadas por acción mecánica del arilo y dejadas secar al sol por 2 días.

### 3.2 Rescate del embrión

Las semillas obtenidas fueron hidratadas y desinfectadas según los protocolos de desinfección establecidos en el laboratorio con lavados sucesivos de las semillas sumergiéndolas en Iodopovidona al 2% durante 20 minutos e Hipoclorito de Sodio al 2% por otros 20 minutos. Se realizaron 3 lavados en agua destilada estéril para ser trabajados en cabina de flujo laminar, manteniendo las condiciones de esterilidad.

Para la obtención del embrión completo sin endospermo se realizaron varios procedimientos:

1. Raspado lateral de la testa con cuchilla para luego levantar una de las capas de la misma. Al retirar la testa queda expuesto el endospermo que recubre el embrión y que por medio de raspado es eliminado hasta dejar al embrión libre.
2. Corte en la parte terminal de la semilla con el fin de liberar el micrópilo del embrión y que el mismo entre en contacto con el medio más fácilmente manteniendo testa y endospermo completos.
3. Siembra de la semilla completa.

Para cada uno de los tres tratamientos se sembraron 5 semillas en cada frasco con 4 repeticiones cada una (total de 20 semillas por proceso) y se tomaron datos del tiempo de respuesta en recipientes de vidrio con 10 ml de medio MS (Murashige & Skoog, 1962)

suplementado con ácido giberélico al 1% (Ag3), 0,3% peso/volumen de sacarosa, 50 mg/L de inositol y 8 g/L de agar. Los medios de cultivo se ajustaron a pH de 5.7-5.8 y se esterilizaron a 121°C con 15 lb. de presión durante 15 minutos. Las plantas germinadas, luego de 2 a 3 semanas se utilizaron como fuente de explantes para la organogénesis. Al principio se trabajan 10 semillas por localidad muestreada y se analizan las respuestas y las características citológicas de las plántulas sin diferencias por lo que se siguen trabajando indiferenciadamente.

### 3.3 Organogénesis

Para generar clones a partir de las plántulas obtenidas del rescate del embrión, se sembraron 4 hipocótilos por frasco en el medio establecido por Monteiro y colaboradores (2000) para *Passiflora* (MSM) con variaciones en los contenidos de hormonas según los protocolos establecidos por el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales del departamento de biología de la universidad, para la inducción de organogénesis directa (ver tabla 3.2).

**Tabla 3.2** Medios de cultivo empleados para regeneración de plántulas a partir de hipocótilos.

<b>MB1</b>	<b>MB2</b>	<b>MT1</b>	<b>MT2</b>
MSM+0.3ppm BAP	MSM+0.5ppm BAP	MSM+0.5ppmTDZ+ 4% AGNO <sub>3</sub>	MSM+0.25ppmTDZ+ 4% AGNO <sub>3</sub>

### 3.3.1 Determinación de la dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>)

Tanto la colchicina como la orizalina son elementos tóxicos para las células, por lo que es necesario determinar la concentración adecuada para los experimentos. La determinación de la dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>) es un procedimiento basado en la sensibilidad del tejido expuesto a un elemento externo. Se debe determinar la dosis que causa un 50% de reducción del crecimiento vegetativo del material tratado (DL<sub>50</sub>) cuando es comparado al control en el primer ciclo después del tratamiento (Predieri & Zimmerman, 2001) Tanto para colchicina como para orizalina se comparó la tasa de supervivencia y capacidad regenerativa de los explantes cultivados con relación al control en 10 concentraciones crecientes (Predieri, 2001). (ver tabla 3.3)

**Tabla 3.3** Determinación de la DL<sub>50</sub>

TRATAMIENTOS COLCHICINA	TRATAMIENTOS ORIZALINA
A → 5 µM	A → 5 µM
B → 10 µM	B → 10 µM
C → 20 µM	C → 15 µM
D → 40 µM	D → 20 µM
E → 80 µM	E → 25 µM
F → 160 µM	F → 30 µM
G → 320 µM	G → 35 µM
H → 640 µM	H → 40 µM
I → 1280 µM	I → 45 µM
J → 2560 µM	J → 50 µM

Las dosis de los tratamientos fueron seleccionados en niveles más bajos a la DL<sub>50</sub> para cada uno de los agentes inductores.

### 3.4 Inducción de Poliploidía

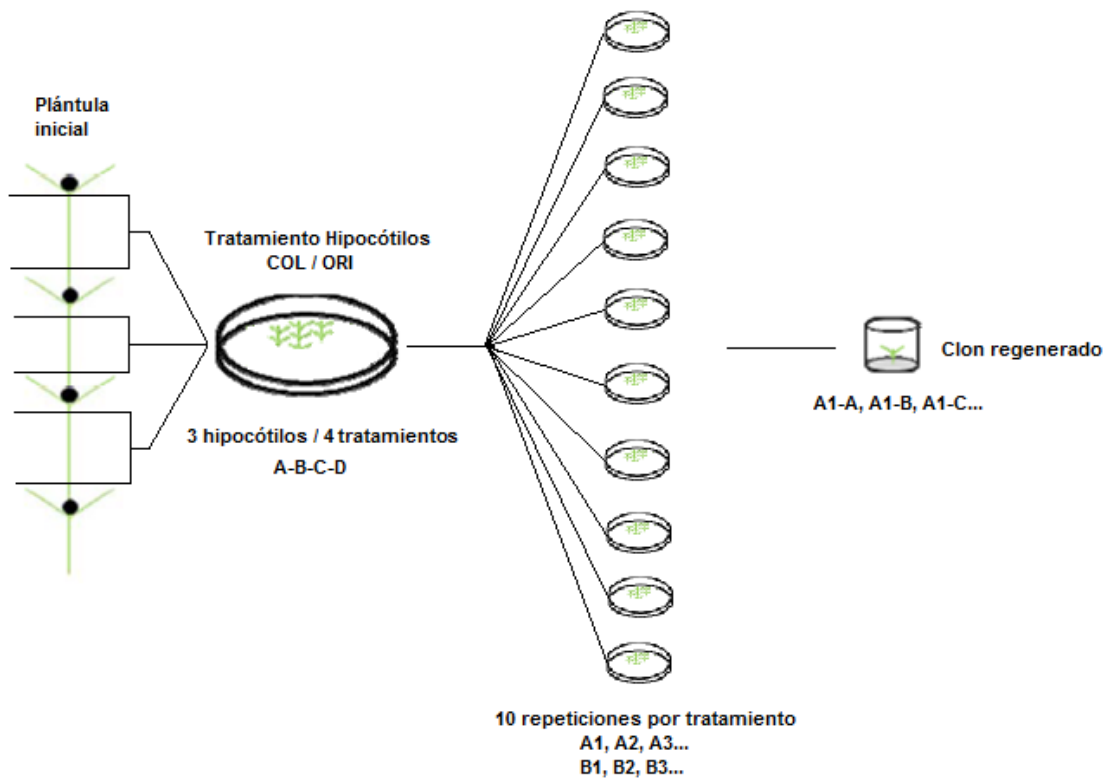
El medio con el mejor crecimiento fue seleccionado y de las plántulas con aproximadamente dos a tres semanas de crecimiento se tomaron segmentos de 10 mm que fueron cultivados sobre frascos con medio para inducir poliploidización. Dichos medios incluyeron: sales MSM (Monteiro *et al.*, 2000), vitaminas de Gamborg, 0.25 ppm/L de TDZ, 4mg/L de  $AGNO_3$  y 8 g/L de agar (medio MT2); junto con diferentes tratamientos de los agentes mutagénicos que se presentan en la tabla 3,4:

**Tabla 3.4** Tratamientos mutagénicos.

TRATAMIENTOS COLCHICINA	TRATAMIENTOS ORIZALINA
A → 25 $\mu$ M	A → 5 $\mu$ M
B → 50 $\mu$ M	B → 15 $\mu$ M
C → 100 $\mu$ M	C → 25 $\mu$ M
D → 200 $\mu$ M	D → 35 $\mu$ M

Las soluciones de Colchicina (Sigma®) y Orizalina (Phyto Technologies Laboratories®) fueron esterilizadas por filtración a través de filtros Millex de Millipore® de tamaño de poro de 0.22 $\mu$ m y añadidas al medio de cultivo antes de gelificación siguiendo la metodología empleada por Rego (2011); el control negativo no incluyó agentes despolicimerizantes de microtúbulos (colchicina u orizalina). Para el experimento se manejaron 10 réplicas con 3 hipocótilos cada una.

Los cultivos se mantuvieron a 25 °C y a un régimen de 16 horas luz, ocho horas oscuridad e irradiación por tubos fluorescentes con luz día que emiten entre 20 a 50  $\mu$ mol x  $m^2/s$ . Después de 15 días, los explantes fueron transferidos a recipientes con el mismo medio MT2 sin agentes antimitóticos y los clones regenerados fueron codificados como se observa en la figura 3.1:

**Figura 3.1** Codificación de Clones

### 3.5 Evaluación Citogenética del Nivel de Ploidía.

De las plántulas regeneradas de cada uno de los puntos de muestreo se realizó el análisis cromosómico para así determinar si había diferencias entre los complementos cromosómicos de las plantas de cada lugar y luego se compararon los complementos encontrados con los clones tratados después de 6 meses de crecimiento de los mismos.

### 3.5.1 Obtención de células metafásicas:

Se siguió el protocolo establecido por Rodríguez y Bueno (2006) con algunas modificaciones establecidas mediante la evaluación de varios protocolos (Tabla 3.5). Se procedió a tratar los ápices radiculares con colchicina a una concentración de 0.5% por un periodo de 3 horas para detener la división celular y así detener la formación del huso acromático para encontrar células en metafase. Luego de las 3 horas se fijaron las células con solución Carnoy (Etanol: ácido acético) y se dejaron en el fijador a 4°C hasta el momento que iban a ser procesadas.

**Tabla 3.5.** Protocolos cosecha células en metafase a partir de ápices radicuales.

PROCESO	ELEMENTO	CONCENTRACIÓN	TIEMPO DE EXPOSICIÓN	FUENTE
Pretratamiento	Colchicina	0.25%	3h	Rodríguez & Bueno, 2006
		0.5%	3h*	
	8-Hidroxiquinolina	0.003M	5h*	Souza <i>et al.</i> , 2003.
Fijación	Carnoy etanol 100% y ácido acético 96%	3:1	24h	Rodríguez & Bueno, 2006
Hidrólisis	HCL	1N	20'	Souza <i>et al.</i> , 2003.
	HCL	5N	30'*	
	HCL + ENZIMAS	1N Celulasa 2% Pectinasa 1% Macerozima 1%	42°C x 10' 37°C x 10'	Souza <i>et al.</i> , 2010. *
	HCL + ENZIMAS	5N Celulasa 1.5% Pectinasa 0.5% Macerozima 0.5%	42°C x 10' 37°C x 10'	Rodríguez & Bueno, 2006 *
Tinción	Schiff	----	30'	Rodríguez & Bueno, 2006
Squash	Aceto-Orceína	----	12'*	Rodríguez & Bueno, 2006
	Ácido acético	45%	---	Guerra, 1983

\*Modificación al protocolo propuesto

Al menos 50 células fueron examinadas por cada ápice y al menos 3 ápices fueron preparados por cada planta.

### 3.5.2 Determinación de la hora mitótica de la planta.

Se realizaron cortes del tejido meristemático radical para estimar el Índice Mitótico (IM) de cada hora durante el periodo comprendido entre las 7am y las 2pm hora en la que se ha establecido una mayor probabilidad de encontrar la hora de mayor división celular en plantas expuestas a un fotoperiodo de 16/8 (Fukui & Nakayama, 1996). El IM parcial es el cociente de la sumatoria del número de células en las diferentes fases de la mitosis sobre el número total de células observadas al microscopio bajo un campo 40X en una hora determinada. (Ecuación 1)

$$\text{IMp (\%)} = \text{N}^{\circ} \text{ células de cada fase} / \text{N}^{\circ} \text{ total de células} * 100 \quad (1)$$

Luego se determinó el índice mitótico (IM), que consistió en la sumatoria de los índices mitóticos de las fases parciales (Ecuación 2).

$$\text{IM (\%)} = \text{IM p} + \text{IM m} + \text{IM a} \quad (2)$$

Donde p = profase, m = metafase, y a = anafase

### **3.5.3. Análisis citogenético y determinación del cariotipo:**

Se tomaron Microfotografías usando un microscopio AXIOPHOT de ZEISS® acoplado a una cámara digital Jenoptik® y al software Lucia Cytogenetics® (Versión 2.5). Se fotografiaron las células más representativas y se digitalizaron para guardar el registro fotográfico.

## **3.6 Análisis Morfológico de poliploidización**

Se comparó la densidad estomática de las plantas diploides y poliploides tomando secciones de hojas jóvenes completamente extendidas en el envés y bajo microscopio en 100x se determinó la cantidad de cloroplastos presentes en las células acompañantes del estoma para al menos 100 células.

## **3.7 Análisis por citometría de flujo.**

### **3.7.1 Preparación de núcleos en suspensión.**

Para la suspensión celular se tomó el protocolo establecido por Souza (2004) el cual a su vez es una modificación al protocolo de extracción de núcleos establecido por Otto en 1990 y que fue adaptado por Dolezel y Bartos (2005) a la citometría de flujo en plantas.

Se tomó a las 4pm una cantidad de aproximadamente 17mg de tejido (de 3 hojas jóvenes diferentes) de cada uno de las plántulas regeneradas y se cortó en pequeños pedazos que luego pasaron por una solución buffer de lisis (Otto 1) frío, la cual va a liberar las

células de la pared celular. Este buffer está compuesto por ácido cítrico 0.1M y 0.5% de Tween 20. Luego las células se dejaron incubando a 4°C por 20 minutos en constante agitación para filtrar la solución por una membrana de nailon de tamaño de poro de 50µm para permitir el paso individual de las células y disminuir el error generado por detritos. Las células fueron marcadas con la solución Otto 2 compuesta por Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 0.4M y Ioruro de Propidio (IP= 50µg/ml) para permitir su lectura por el citómetro. (Singh, 2003)

### **3.7.2 Análisis citométrico de las células en suspensión.**

Las células en suspensión se analizaron por medio de un citómetro de flujo BD FACSCanto (BD Biosciences, San José, CA), con un láser de 488-nm, provisto de un muestreador de alto rendimiento (HTS). La fluorescencia se midió con un filtro de paso de 585 o 426 nm. Para permitir que una sola célula fuera medida cada vez se estableció un flujo lento para evitar los inconvenientes de una medición errónea o de falsos positivos. (ADN de dos células diploides = tetraploide).

### **3.7.3 Estimación del contenido de ADN nuclear.**

Una muestra control de maracuyá amarilla (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) con contenido de ADN diploide conocido (2C ADN = 3.19pg) (Souza *et al.* 2004) se utilizó para ajustar el canal de fluorescencia y establecer el contenido de ADN diploide. De cada una de las muestras, se obtuvo el histograma de fluorescencia en el software FACSDIVA que opera el citómetro FACScanto de la unidad de citometría de flujo, y fue que comparado con el

control y analizado en el software FCS Express 4 Flow Cytometry® para obtener los histogramas finales. Se determinó el nivel de ploidía de cada uno de los ensayos y la medición del contenido de ADN se lleva a cabo mediante la ecuación 1:

$$2C_{\text{(Contenido ADN célula diploide)}} = \frac{\text{Intensidad media del pico G0/G1 planta problema}}{\text{Intensidad media G0/G1 estándar}} \times 2C_{\text{ADN estándar pg}} \quad (1)$$

Se obtuvieron medidas en picogramos de ADN que luego fueron transformadas en pares de bases presentes en el genoma.

Se manejaron coeficientes de variación para el pico G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> entre 4 y 5%.

### 3.8 Análisis estadístico

Se determinó si las diferencias encontradas entre las plántulas tratadas y los controles eran significativas realizando un análisis de varianza (ANOVA) con el programa Statgraphics Centurion XVI.I® de todas las muestras para cada uno de los estudios citológicos realizados.

## **4.RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

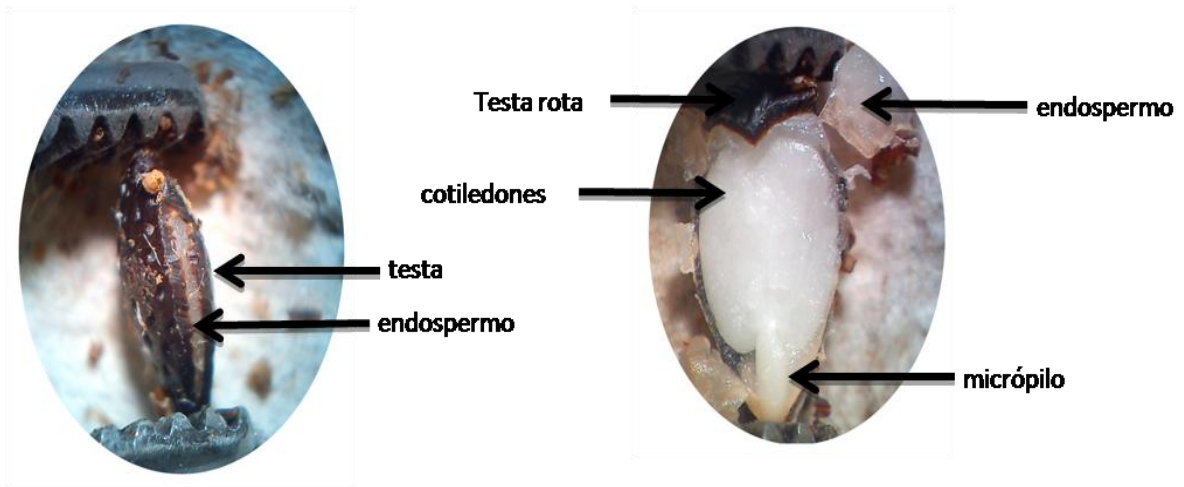
### **4.1 Selección del Material de Trabajo y Rescate del embrión**

Las semillas obtenidas de los 4 diferentes puntos de muestreo fueron sembradas *in vitro* para determinar la eficiencia de los métodos de extracción del embrión. Se trabajaron 10 semillas por localidad muestreada y se determinaron las respuestas y las características citológicas de las plántulas regeneradas y no se encontraron diferencias significativas entre las localidades por lo que se trabajaron como una unidad indiferenciada.

De los tres procedimientos se determinó que el más rápido y efectivo fue el de rescate de embrión limpio por medio de la eliminación de la testa y del endospermo (Figura 4.1) con una activación del 100% de los embriones a los 7 días de haber sido sembrados (tabla 4.1) resultados que contrastan con la baja activación detectada en las semillas completas y/o en el corte del micrópilo.

**Tabla 4.1** Tasa de activación de los embriones obtenidos con los diferentes métodos

Procedimiento	Cantidad de embriones sembrados	Cantidad de embriones activos	Tiempo (días)
Raspado de la testa	20	20	7
Corte en micrópilo	20	10	15
Semilla completa	20	7	21

**Figura 4.1** Procedimiento para liberar el embrión

La activación de todos los embriones se debió posiblemente a que la interacción entre el embrión y el medio es directa, lo cual no ocurre cuando el embrión está protegido por la testa y el endospermo haciendo mucho más lento el proceso de activación del embrión. Además el procedimiento de corte de la testa para liberar solo el micrópilo puede llevar a inconvenientes ya que el tamaño de la semilla al ser tan reducido aumenta la posibilidad de dañar parte del micrópilo, haciendo que el embrión quede completamente inservible.

Los embriones activos se dejaron en el medio para que crecieran y llegaran a un tamaño promedio de 3 a 4 centímetros de largo para poder obtener hipocótilos de buen tamaño

que pasaran a la organogénesis. Luego de la activación de los embriones se observó que las plántulas presentaban clorosis en sus hojas debido a la posible falta de nutrientes por lo que se modificaron las proporciones de nutrientes en el medio MS según lo reportado por Monteiro y colaboradores (2000). Este medio modifica el MS basal de Murashige y Skoog (1962), al aumentar las concentraciones de fósforo, Calcio, Magnesio, azufre, Hierro, Manganeso, Cobre, Sodio y EDTA, con una disminución en la concentración de Zinc y eliminación de Cloro e Inositol, estableciendo así un medio que es específico para pasifloras con el que se observó un mejor crecimiento de las plántulas y bajas tasas de clorosis, por lo que a partir de ese momento se trabajó con el medio MSM (Monteiro *et al.*, 2000).

#### **4.1.1 Determinación de la dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>)**

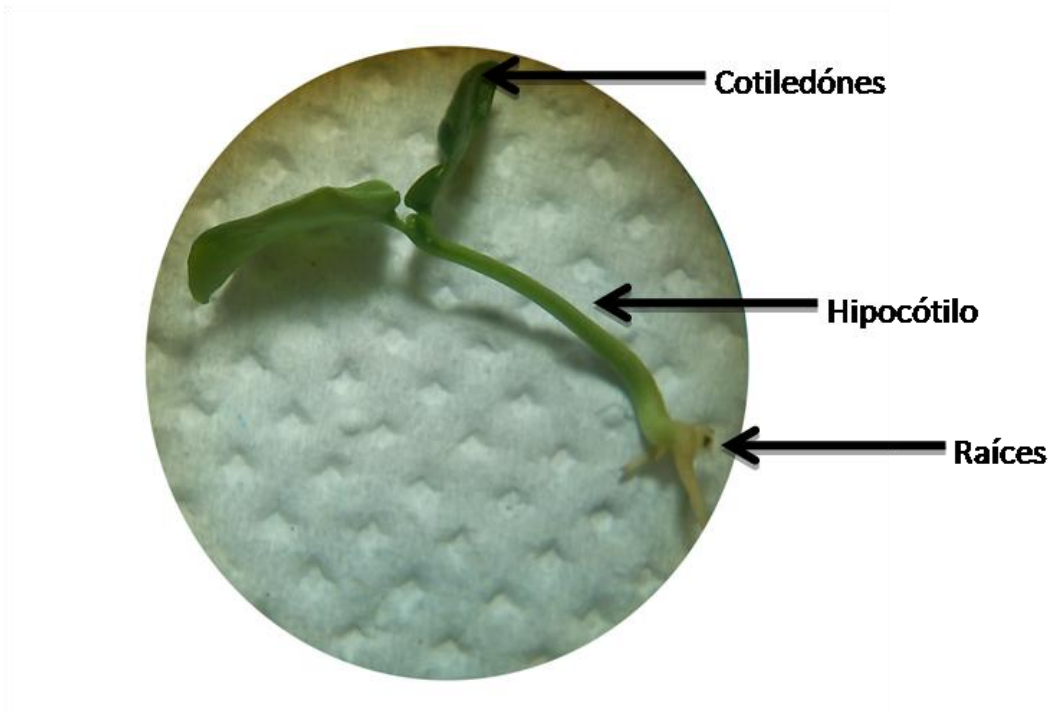
De los dos agentes empleados el más conocido es la colchicina ya que su uso en el cultivo *in vitro* para producir poliploides se remonta a principios del siglo pasado (Dermen, 1940) pero la orizalina ha venido ganando espacio en los trabajos de poliploidización en plantas ya que ha demostrado ser un agente anti-mitótico bastante eficiente que contrarresta muchos de los efectos negativos que la colchicina puede llegar a presentar por su toxicidad y porque además presenta una mayor afinidad a los microtúbulos de las plantas. (Dolezel *et al.*, 1994).

Al poner en contacto los hipocótilos con las diferentes concentraciones de colchicina y orizalina fue seguido el desarrollo de las muestras por 15 días donde se observó una baja gradual de la supervivencia a medida que las concentraciones de los tóxicos se incrementaban. La DL<sub>50</sub> (50% de los hipocótilos vivos), se determinó en la concentración

de 320  $\mu\text{M}$  para colchicina mientras que para orizalina se presentó en 45  $\mu\text{M}$  (Tabla 3.3). A partir de estos datos se establecieron los 4 tratamientos a estudiar (Tabla 3.4) con concentraciones sub-letales para probar en la inducción de poliploides de 25 a 200  $\mu\text{M}$  para colchicina y de 5 a 35  $\mu\text{M}$  para orizalina. Se ha visto que las concentraciones de colchicina son más altas con respecto a las empleadas por orizalina, esto se debe la alta afinidad de la orizalina por la tubulina (Ascough *et al.*, 2008 ), por lo que sus concentraciones son bajas, en tanto que por la baja permeabilidad de la pared a la colchicina, se requiere tiempos más prolongados de exposición y concentraciones más altas de colchicina para los tratamientos, como ya se había observado en los ensayos citogenéticos para la acumulación de metafases.

## 4.2 Organogénesis e inducción de poliploidía

Después de 2 a 3 semanas de crecimiento las plántulas (Figura 4.2) con un tamaño de hipocótilos favorable, fueron trasladadas a medios de organogénesis con diferentes citocininas con el fin de establecer el mejor tratamiento para la producción de clones a partir de hipocótilos. En los dos primeros medios (MB1 y MB2) se usó 6-bencilaminopurina (BAP) y para los segundos (MT1 y MT2) la citocinina 1-fenil-3-(1,2,3-tiadiazol-5-il)-urea (TDZ) y nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ).

**Figura 4.2** Estructura de la plántula después de 3 semanas de crecimiento

Se observó que los hipocótilos expuestos a los medios trabajados con BAP (MB1 y MB2) la producción de callo fue muy marcada. La formación de callo aumenta la posibilidad de tener variabilidad somaclonal en las plántulas regeneradas, lo cual no es benéfico para el objetivo de esta investigación. Dicha variación es originada por la aparición de eventos mutacionales como consecuencia de las nuevas condiciones ambientales que impone el cultivo *in vitro* (Perera *et al.*, 2010) y que activan la expresión de enzimas inducidas por estrés, elementos transponibles, y otros productos, llevando a la desorganización de las funciones normales de las células (Bairu *et al.*, 2011). Para el caso en el que se desea obtener una línea clonal “pura” a partir de un individuo en especial lo mejor es evitar estas variaciones.

Dado que los medios con BAP presentaron una gran cantidad de formación de callo, se trabajó con TDZ, una citocinina artificial que ha demostrado ser muy efectiva en la

organogénesis directa. TDZ es considerado uno de los inductores más potentes en la formación de nuevos brotes o embriones somáticos tanto en plantas leñosas como herbáceas (Huetteman & Preece 1993 cit. en Squeo & Cardemil, 2007). Se ha asociado el TDZ con el nitrato de plata el cual ayuda a bajar los niveles de etileno en el medio. El etileno es una hormona gaseosa que al trabajar en frascos de cultivo cerrados, se puede acumular y afectar la regeneración de explantes colaborando con la formación de callo. (Biddington, 1992). Al trabajar con esta citocinina se bajó la proporción en la proliferación de tejido indiferenciado haciendo del TDZ junto con el  $\text{AgNO}_3$  una buena opción para la organogénesis directa.

Además de la formación de callo el tiempo de regeneración con BAP fue muy largo (3 meses) comparado con el tratamiento llevado a cabo con TDZ y nitrato de plata que tuvo una tasa de regeneración del 50% y un tiempo de 1 mes y medio para la obtención de clones viables. (Tabla 4.2)

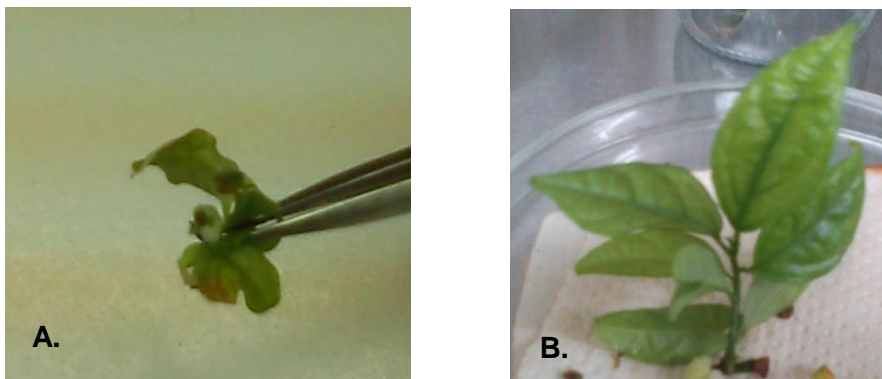
**Tabla 4.2** Medios para organogénesis probados y su efectividad

MEDIO	TRATAMIENTO	#HIPOCÓTILOS SEMBRADOS	# DE PLÁNTULAS REGENERADAS
MB2	MSM+0.5%BAP	56	10 (Mucha formación de callo)
MB1	MSM+0.3%BAP	56	9 (poca elongación-arrosetados)
MT1	MSM+0.5ppmTDZ+ 4%AGNO3	56	16
MT2	MSM+0.25ppmTDZ+4%AgNO3	56	28

Tanto el tiempo de formación de clones como el tipo de crecimiento fueron evaluados ya que no todas las plántulas regeneradas con BAP mostraron un crecimiento ideal presentando formas arrosetadas sin separación evidente en los entrenudos. (Figura 4.3)

mientras que la elongación con TDZ fue la esperada. Esto ya ha sido reportado en tomate en donde se observó que el BAP a ciertas concentraciones puede inhibir fuertemente la elongación de brotes (Bakrim *et al.*, 2007) y en *Arabidopsis thaliana* en donde se reporta que posiblemente la inhibición de brotes y de raíces con BAP tiene que ver con la interacción de dicha hormona con el etileno (Cary *et al.*, 1995).

**Figura 4.3** **A.** Formación anormal de brotes con BAP en el medio MB1, **B.** Brote normal con TDZ



Los buenos resultados encontrados con el medio MT2 llevaron a escogerlo para el trabajo para iniciar los tratamientos con colchicina y orizalina según el protocolo presentado por Rego y colaboradores (2009) para maracuyá modificado para gulupa debido a que se observaron deficiencias demostradas por la presencia de clorosis con los suplementos establecidos para maracuyá.

### 4.2.1 Inducción de poliploidía

En este punto fue importante determinar la manera en la que las células iban a estar expuestas a los agentes anti-mitóticos ya que la efectividad de estos compuestos en el cultivo *in vitro* depende en la concentración aplicada, la duración del tratamiento y la penetración del compuesto. (Ascough *et al.*, 2008). La forma en la que se agrega el

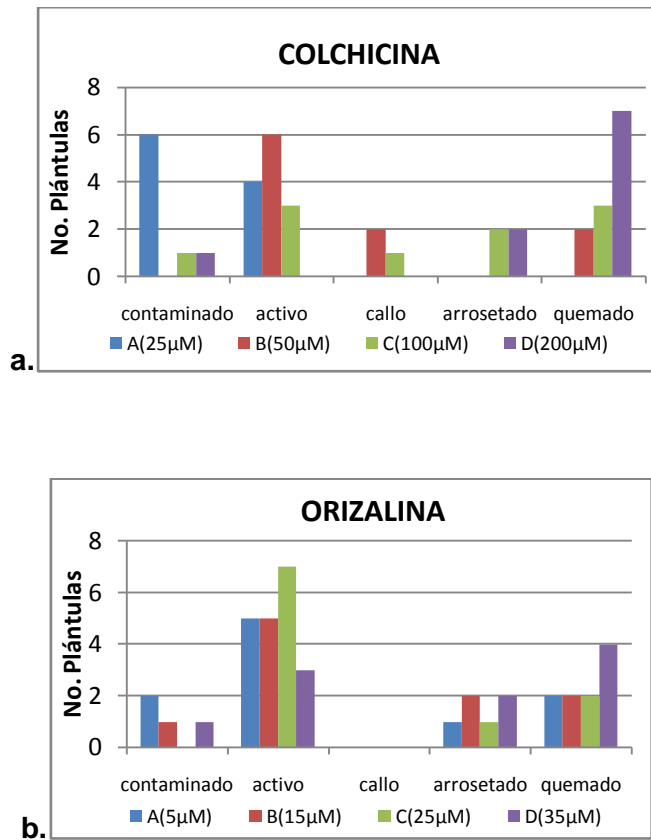
agente anti-mitótico puede variar dependiendo del investigador. Se tienen reportes en papa en el que el agente se agregaba por goteo directo a las muestras por medio de un papel de filtro incrustado en el explante después de haber sido sembrado (Alam *et al.*, 2011). Pero se ha determinado que la penetración de los agentes anti-mitóticos puede ser más eficiente y menos tóxica por medio de la incorporación de los mismos directamente al medio de cultivo antes de sembrar los tejidos a exponer. (Rego *et al.*, 2009)

Los explantes tratados con los agentes anti-mitóticos fueron sembrados en medio MT2 sin colchicina u orizalina y monitoreados en su crecimiento por tres semanas después haber sido liberados. El tipo de crecimiento fue caracterizado dependiendo de la presencia o ausencia de callo y de la capacidad de regeneración de plántulas para cada uno de los tratamientos. Los resultados se observan en la Figura 4.4 las cuales demuestran que la capacidad de regeneración de explantes disminuye al aumentar la concentración de agente anti-mitótico tanto para colchicina como para orizalina.

En colchicina se observa un aumento en la toxicidad al presentarse mayor cantidad de explantes quemados en el tratamiento con 200  $\mu\text{M}$  y en orizalina se observó un comportamiento similar con la concentración de 35  $\mu\text{M}$ , lo cual era de esperarse debido a la cercanía a la  $DL_{50}$ , aunque este no se vio tan marcado como en colchicina. Se observó, además formación de callo en los tratamientos B (50 $\mu\text{M}$ ) y C (100 $\mu\text{M}$ ) con colchicina mientras que en los tratamientos con orizalina no se observó este tipo de crecimiento. Esto se relaciona con la desorganización que causa la colchicina en las células en división al aumentar la proporción de núcleos irregulares y formación de micronúcleos (Ascough *et al.*, 2008) que pueden llevar a la proliferación de células anormales.

Con ambos agentes se registró la mayor cantidad de brotes regenerados en los tratamientos B (colchicina = 50 $\mu$ M y orizalina = 15  $\mu$ M) y C (colchicina = 100 $\mu$ M y orizalina = 25  $\mu$ M) los cuales corresponden a las concentraciones que pueden causar menos daño a las células pero que tienen, a su vez, mayor probabilidad de generar poliploides.

**Figura 4.4** Comportamiento de los brotes tratados con colchicina (a) y orizalina (b) después de 3 semanas de crecimiento.



Después de obtener los brotes de los hipocótilos de las plántulas tratadas, se dejaron crecer por un periodo de 6 meses eliminando los hipocótilos quemados, contaminados y con callo. Para los análisis posteriores de los niveles de poliploidía generados con los

diferentes protocolos propuestos, se emplearon solamente los brotes activos y arrosados

La tabla 4.3 presenta los clones regenerados después de 6 meses de crecimiento y que fueron evaluados para determinar su nivel de ploidía-

**Tabla 4.3** Clones obtenidos de cada uno de los tratamientos con los agentes mutagénicos.

COLCHICINA		ORIZALINA	
<b>A = 25<math>\mu</math>M</b>	A2	<b>A = 5<math>\mu</math>M</b>	A2-B
	A5		A2-A
	A3		A5
<b>B = 50<math>\mu</math>M</b>	B2-A	<b>B = 15<math>\mu</math>M</b>	B2-A
	B2-B		B2-B
	B3		B3
	B4		B4-B
	B5		B7-A1
	B6		B7-A2
	B7-B		B9-A
	B7-A		B10-A
<b>C = 100<math>\mu</math>M</b>	C2-A	<b>C = 25<math>\mu</math>M</b>	C2-B
	C2-B		C2-A
	C4		C4-B
<b>D = 200<math>\mu</math>M</b>	C6		C4-A
	D4		C5-A
			C6-A
			C8-A
			C9-A
			C9-B1
			C9-B2
		C10-A	
		<b>D = 35<math>\mu</math>M</b>	D1-A
			D1-B
			D3

Para cada uno de los tratamientos se sembraron 3 hipocótilos dando un total de 120 hipocótilos sembrados por agente mutagénico y 6 meses después de haber sido sembrados se contó con un total de 16 clones para colchicina y de 25 clones para orizalina. Dicho comportamiento demuestra una vez más que la posibilidad de obtener clones sanos a partir de colchicina disminuye notoriamente haciendo de orizalina un mejor agente para la obtención de clones viables.

Estos clones fueron empleados para la caracterización morfológica, citogenética y citométrica de su nivel de ploidía.

### 4.3 Evaluación Citogenética del Nivel de Ploidía

La evaluación citogenética se inicio desde las 37 plántulas obtenidas con los procedimientos de activación de los embriones. Estas plántulas son consideradas como el nivel basal para las evaluaciones citogenéticas. Adicionalmente proveyeron el material inicial para la estandarización de los protocolos reportados para la obtención de cromosomas metafásicos en vegetales.

De los tratamientos empleados para la obtención de células metafásicas, el más eficiente fue la combinación entre los protocolos presentados por Rodríguez y Bueno (2006) junto con el propuesto por Souza y colaboradores (2003) para *Passiflora*.

**-Pretratamiento:** Al analizar los resultados obtenidos con el uso de los diferentes pretratamientos el más efectivo fue el de colchicina 0.5% por 3 horas ya que el tratamiento realizado con colchicina al 0.25%, no alcanzaba a penetrar en las células y se observó una gran cantidad de células en anafase, demostrando de ésta manera que la

capacidad de la colchicina para generar metafases analizables depende del tiempo y de la concentración, haciendo que concentraciones bajas no sean eficientes para detener la formación de huso acromático.

El pretratamiento con hidroxiquinolina mostró cromosomas pegajosos característica típica del uso de esta sustancia en la obtención de células en metafase (Singh, 2003) y que hace el análisis mucho más complejo al no poderse determinar con certeza la separación de los cromosomas.

**-Hidrólisis:** El tratamiento con ácido clorhídrico ha sido el más empleado en el análisis cromosómico del género *Passiflora*. Hay diferentes reportes en los que la concentración y la temperatura en la que se maneja varía, pero para éste caso se empleó una concentración de 5N a 42°C por 30 minutos ya que cuando se trabajó a bajas concentraciones con los demás tratamientos se observó una gran cantidad de pared presente en las células lo que hace difícil el análisis de las metafases y la dispersión de las células en la lámina. Los tratamientos llevados a cabo con enzimas proteolíticas degradaron el tejido meristemático por lo que no se pudo obtener metafases por medio de éste protocolo.

La efectividad del ácido clorhídrico se basa en su capacidad de degradar las sales peptídicas de la lamela media en la pared celular, facilitando la separación de las células y además colabora al fijador Carnoy en el aclaramiento del citoplasma (Valladolid *et al.*, 2004) contribuyendo a la dispersión tanto de las células meristemáticas como de sus cromosomas para el análisis.

**-Tinción y dispersión celular (squash):** Cuando se trata el ADN con el colorante Schiff se busca generar la reacción de Feulgen en la cual la hidrólisis ácida llevada a cabo en el paso anterior causa la separación de las bases dejando expuesto el que se denomina

como residuo apurínico y que va a reaccionar con el reactivo Schiff (Rodríguez *et al.*, 1997) tiñendo el ADN. Debido a la degradación de la pared celular en el tejido meristemático, la entrada del reactivo de Schiff es mucho más eficiente y permite visualizar el meristemo con mayor facilidad para poder realizar el corte del mismo para su análisis.

Para separar las células en la lámina se trabajaron dos tratamientos uno con ácido acético según lo propuesto por Guerra (1983) en donde el ácido acético contribuye a diluir con mayor eficacia la lamela media que puede que no se haya eliminado con la hidrólisis pero se observó que con éste tratamiento las células se deshidrataban con mucha rapidez lo cual afectaba la dispersión de los cromosomas en la lámina.

Se trabajó con mejores resultados el protocolo establecido por Rodríguez y Bueno (2006) en donde la dispersión de las células se llevó a cabo con una contratinción de Aceto-Orceína que además de ayudar a la dispersión de las células, tiñe suavemente el citoplasma permitiendo la diferenciación de cada una de las células con respecto a las células circundantes.

#### **4.3.1 Determinación de la hora mitótica de la planta.**

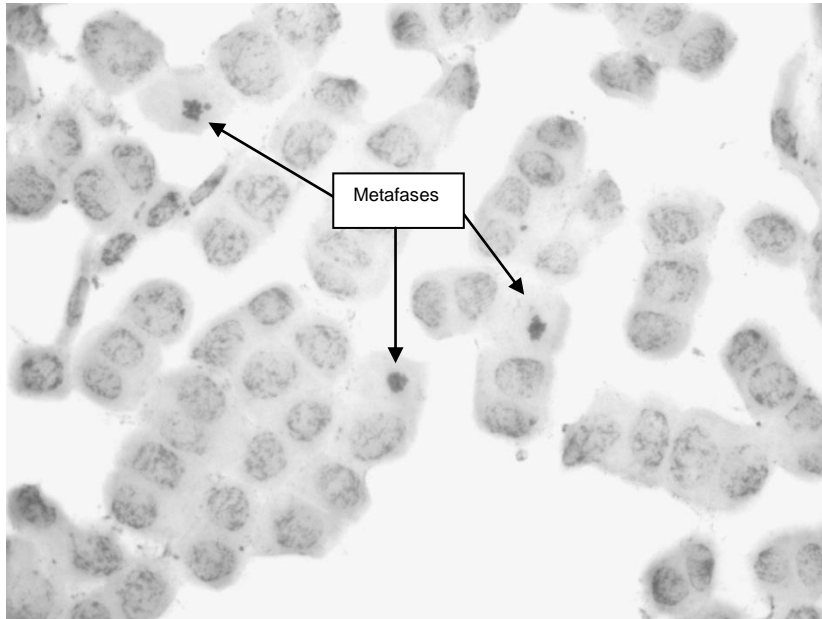
Luego de establecido cuál era el mejor protocolo para la obtención de células meristemáticas se procedió a establecer el momento del día en el que el tejido presentaba la mayor tasa de división. Se encontró que a las 12:15m el índice mitótico fue de 45% haciendo que los análisis realizados posteriormente se trabajaran a esa hora.

A pesar de encontrar la hora mitótica a las 12:15m se observaron diferencias cuando el regulador del foto período se vio afectado por un daño, obligando a un cambio en las horas de luz/oscuridad a las que estaban expuestas las plántulas. Al iniciar el trabajo el foto período se encontraba regulado a 12 horas luz y 12 horas oscuridad y la hora mitótica se determinó entre las 12m y la 1pm, mientras que después de modificar el foto período a 16 horas luz y 8 horas oscuridad, la hora mitótica se ubicó entre las 10-11am. Dichos cambios han sido reportados en varios trabajos (Gonzalez *et al.*, 2001) en los que queda demostrado como el foto período regula la división celular. Esta situación se ha explicado porque la división depende la absorción de nutrientes y agua que van a ser necesitados por la planta para sus rutas metabólicas (Rodríguez & Bueno, 2006) haciendo entonces, que en los puntos de mayor luz se aumente la mitosis en los tejidos meristemáticos.

Debido a que cada especie planta posee características específicas de composición en la pared celular, membrana y citoplasma es necesario estandarizar la mejor técnica por lo que se probaron las diferentes técnicas resumidas en la tabla 3.5 las cuales son para otras especies pero que se adaptaron para el trabajo en gulupa.

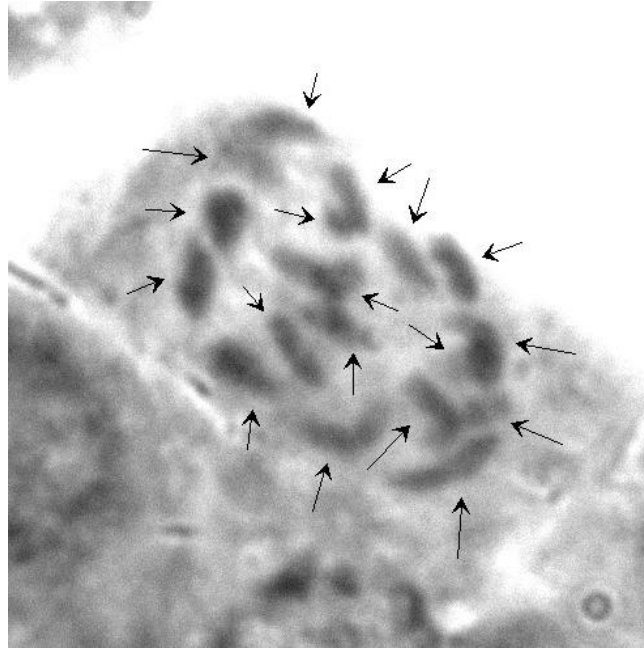
Luego de establecer la hora mitótica y el mejor método para la obtención de cromosomas adecuados para su análisis, en la Figura 4.5 se observa el resultado del tratamiento escogido para la obtención de tejido meristemático libre de pared celular y con las células en un solo plano gracias al aplastamiento realizado que liberó las células del tejido.

**Figura 4.5** Tejido meristemático adecuado para el análisis cromosómico vista en 40X de un campo con células en interfase y metafases.



#### 4.3.2 Análisis citogenético y determinación del cariotipo:

De acuerdo a los análisis realizados en las plántulas control de gulupa se observó un complemento cromosómico de  $2n=18$  (Figura 4.6), lo cual concuerda con lo reportado en la literatura por Mayeda (1997), Souza (2008) y Rego (2009). Dicho complemento cromosómico no varió en las plántulas regeneradas de los puntos muestreados lo cual permitió trabajar con las plántulas aleatoriamente para el tratamiento con los agentes anti-mitóticos.

**Figura 4.6** Metafase con  $2n= 2x=18$  cromosomas

A pesar de lograr determinar el complemento cromosómico en las metafases de los controles, no fue posible reproducirlo en las plántulas tratadas con los agentes anti-mitóticos ya que se bloqueó el crecimiento de raíces *in vitro*. Esta situación ha sido reportada en plántulas tratadas de maní (Wetzstein & Baker, 1993), soya (Bucheim *et al.*, 1989) y *Populus spp.* (Michler & Bauer, 1991 cit. en Rey *et al.*, 2002) y que se ha asociado a la formación de paracristales que dañan la estructura de las células en la raíz (Karagiannidou *et al.*, 1995). Dichos paracristales consisten en complejos de tubulina-colchicina/orizalina u otro agente anti-mitótico que modifican la estructura normal de las células en división haciendo que pequeñas vacuolas y vesículas de Golgi queden atrapados dentro del nucleoplasma de núcleos multilobulados formados por inestabilidad del ADN y que llevan a la pérdida total de las células en división de los meristemos (Eleftheriou & Bekiari, 2000).

Dicho bloqueo se ha contrarrestado disminuyendo el tiempo en los tratamientos con agentes anti-mitóticos (Thompson, 2010) pero que pueden llevar a una disminución en la

probabilidad de generar poliploides. Ante dicha situación se trabajó la caracterización de las plantas tratadas por medio de la caracterización de los cloroplastos en las células acompañantes del estoma y la determinación citométrica del contenido de ADN en los núcleos de las plantas tratadas.

#### **4.4 Análisis Morfológico de poliploidización:**

El análisis de estomas para determinar la poliploidización inducida en plántulas ha sido reconocido como un método simple, rápido, no dañino con el material y que puede llegar a tener una precisión de detección de poliploides del 90% (Cohen & Yao, 1996 cit. en Ascough *et al.*, 2008) por lo que se analizaron 100 células para cada plántula regenerada obteniendo un promedio de cloroplastos por célula acompañante. Para los controles se encontró un promedio de 5.4 cloroplastos por célula acompañante. Los resultados para colchicina y orizalina se presentan en la tabla 4.4.

**Tabla 4.4** Promedio de cloroplastos encontrados en las plántulas tratadas con colchicina y orizalina y análisis de varianza.

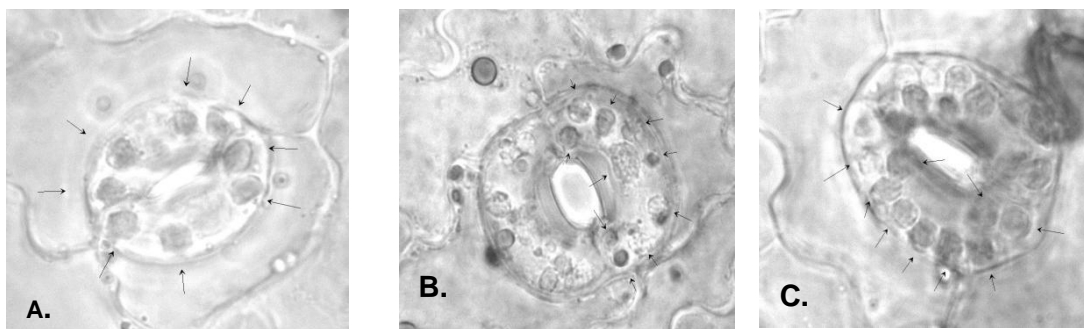
COLCHICINA		MEDIA	VARIACIÓN	ORIZALINA		MEDIA	VARIACIÓN
A = 25 $\mu$ M	A2	3,84	*-1,84	A = 5 $\mu$ M	A2-B	6,60	*-1,20
	A5	4,44	*-1,24		A2-A	6,46	*-1,06
	A3	4,36	*-1,32		A5	7,92	*-2,52
B = 50 $\mu$ M	B2-A	6,30	*-1,88	B = 15 $\mu$ M	B2-A	5,48	-0,08
	B2-B	5,20	0,48		B2-B	---	---
	B3	6,16	-0,48		B3	5,22	0,18
	B4	5,82	-0,14		B4-B	8,80	*-3,40
	B5	6,52	*-0,84		B7-A1	7,28	*-1,88
	B6	4,86	*0,82		B7-A2	7,04	0,24
	B7-B	6,22	*-3,92		B9-A	8,88	*-3,48
C = 100 $\mu$ M	B7-A	9,70	*-0,54	B10-A	5,30	0,1	
	C2-A	5,88	-0,20	C = 25 $\mu$ M	C2-B	5,84	-0,44
	C2-B	5,02	*0,66		C2-A	6,70	*-1,30
	C4	6,26	*-0,58		C4-B	7,82	*-2,42
C6	6,74	*-1,06	C4-A		8,44	*-3,04	
D = 200 $\mu$ M	D4	---	---		C5-A	7,80	*-2,40
					C6-A	7,48	*-2,08
					C8-A	7,24	*-1,84
					C9-A	6,12	*-0,72
					C9-B1	5,34	0,06
					C9-B2	6,10	*-0,70
				C10-A	8,24	*-2,84	
				D = 35 $\mu$ M	D1-A	4,88	0,52
					D1-B	8,98	*-3,58
					D3	---	---

\* Diferencias significativas en el número de cloroplastos presentes en las células acompañantes del estoma (p-valor F test <0,05) con respecto a los controles.

Los promedios obtenidos variaron entre 4.88 y 8.98 cloroplastos por célula en orizalina y para colchicina variaron entre 9.70 y 3.84. Para cada uno de los tratamientos (Figura 4.7) se hizo un análisis de varianza de muestras múltiples en el programa Statgraphics

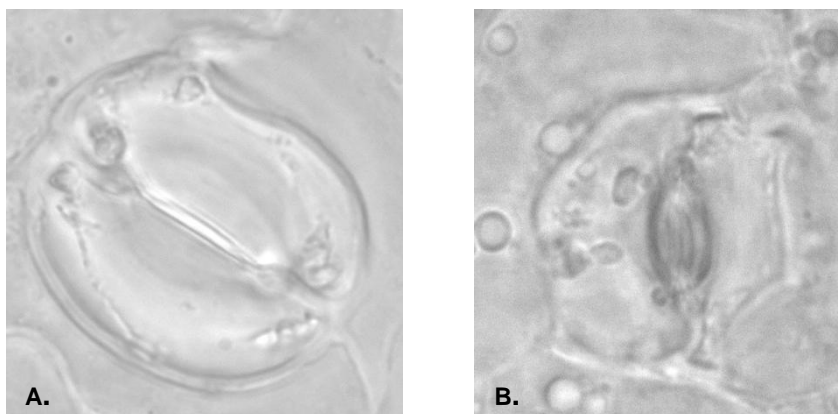
Centurion XVI.I® en donde se determinó si las medias encontradas fueron significativamente diferentes de los controles con un nivel de confianza del 95,0%.

**Figura 4.7** Cloroplastos observados A. Control con 4 cloroplastos, B. Colchicina B-7A con 10 cloroplastos, C. Orizalina C-4A con 10 cloroplastos



De los tratamientos D (colchicina, 200µM y orizalina 35µM) para ambos agentes anti mitóticos no se logró conseguir una medición confiable de la cantidad de cloroplastos presentes, debido a que perdieron su conformación probablemente por la toxicidad de los agentes. (Figura 4.8)

**Figura 4.8.** Daños en los cloroplastos observados A. Colchicina D-4, B. Orizalina D-3



De las plántulas analizadas se observó que los controles al ser comparados con los cloroplastos presentes en las plántulas sobrevivientes del tratamiento con orizalina se encontró que 7 plántulas no presentaron diferencias significativas en el contenido de

cloroplastos, por lo que se asume que en ellas no ocurrió la poliploidización. Mientras que para colchicina de los 16 clones, 4 no presentaron diferencias significativas con el control en tanto que en las otras doce (12) si. En los clones con el tratamiento A (colchicina, 25 $\mu$ M y orizalina 5 $\mu$ M), hubo diferencia estadísticamente significativa con respecto a los controles pero por debajo del valor medio de cloroplastos presentes. Estos resultados, muestran claramente que el tratamiento no fue efectivo para establecer poliploidía, pero si causó alguna inestabilidad en el ADN que llevó a tener menos cloroplastos que en las plántulas controles. Al poseer su propio ADN, en su génesis, los cloroplastos llevan a cabo la división independientemente de la célula. Por lo que la presencia de agentes citotóxicos como los empleados en este estudio, pueden inducir mutaciones, que modifican la génesis de los cloroplastos.

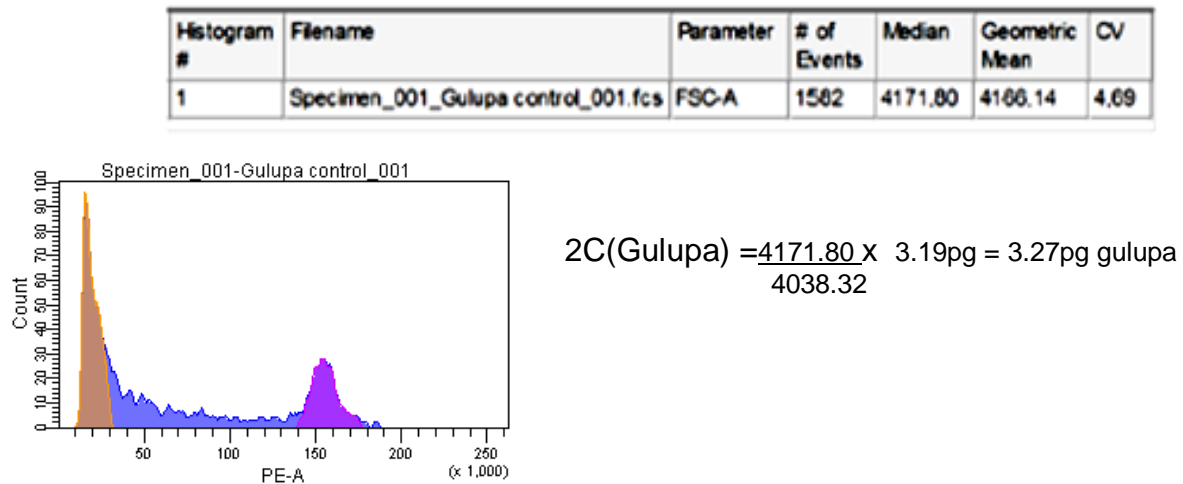
Al observar las medias se determina que las plántulas tetraploides son 8 para orizalina (A5, B4-B, B9-A, C5-A, C4-B, C10-A, C4-A, D1-B) y una para colchicina (B7-A) (ver tabla 4.4); el resto de las plántulas regeneradas a pesar de presentar diferencia estadística significativa posiblemente representen formas triploides o haploides de gulupa, que tienen poco interés desde el punto de vista de selección de clones útiles en bioprospección de la especie.

## **4.5 Análisis del Contenido de ADN en Núcleos por Citometría de Flujo:**

La obtención de núcleos aislados para el análisis citométrico se llevó a cabo según los protocolos trabajados por Souza colaboradores (2004) y se tomó como control la maracuyá amarilla, de la cual se reporta un contenido de ADN de  $2C \text{ ADN} = 3.19\text{pg}$

(Souza *et al.* 2004) Como ya se había reportado el contenido de ADN de Maracuyá se pudo calcular el contenido de las plántulas controles y clones de gulupa (ver figura 4.9). Para los ensayos citométricos es importante establecer como ADN estándar, un genoma conocido y que tenga un tamaño similar al de la planta problema a analizar (Dolezel & Bartos, 2005)

**Figura 4.9** Obtención del contenido de ADN en controles de gulupa por medio de la intensidad media medida por citometría de flujo.



Se determinó para las gulupas de la población inicial, un contenido de ADN de 3.27pg con un coeficiente de variación (%CV) de 4.69. En este punto el CV tiene una gran importancia debido a que éste valor va a determinar la efectividad del ensayo, entre más alto el CV, mayor la probabilidad de presentar datos erróneos. Según Dolezel y Bartos (2005) el valor del CV cuantifica la precisión de la medida tomada y establecen que la medida de CV debe estar por debajo del 5% para considerarse aceptable. A partir de esta aseveración se establecieron los coeficientes de variación para los demás análisis por debajo del 5%. En la tabla 4.5 se presentan los valores de intensidad media de fluorescencia para el pico de G0/G1 obtenidos para cada uno de los tratamientos con

colchicina y orizalina junto con los valores en picogramos del contenido de ADN y sus respectivos CV's.

**Tabla 4.5** Clones de colchicina y orizalina analizados por citometría de flujo

ORIZALINA		INT. MEDIA	CONTENIDO ADN (pg)	%CV
A = 5µM	A2-B	4104,04	3,2	4,28
	A2-A	4162,79	3,3	4,49
	<b>*A5</b>	<b>17285,66</b>	<b>13,6</b>	<b>4,21</b>
B = 15µM	B2-A	4164,58	3,3	4,32
	B2-B	4660,98	3,7	4,63
	B3	4401,44	3,5	4,43
	B4-B	4861,68	3,8	4,31
	B7-A1	3650,02	2,9	4,20
	B7-A2	3676,81	2,9	4,60
	B9-A	3737,44	2,9	4,45
	B10-A	3292,82	2,6	4,5
C = 25µM	C2-B	4068,32	3,2	5,06
	C2-A	3463,9	2,7	4,77
	<b>*C4-B</b>	<b>21065,4</b>	<b>16,5</b>	<b>4,33</b>
	C4-A	4344,52	3,4	4,33
	C5-A	3850,44	3	4,27
	C6-A	5048,44	4	4,77
	C8-A	5102,32	4	4,17
	C9-A	4615,87	3,6	4,67
	<b>*C9-B1</b>	<b>16373,86</b>	<b>12,8</b>	<b>4,67</b>
	C9-B2	3589,86	2,8	4,64
D = 35µM	<b>*D1-A</b>	<b>15979,06</b>	<b>12,5</b>	<b>3,93</b>
	<b>*D1-B</b>	<b>17399,4</b>	<b>13,6</b>	<b>2,45</b>
D = 35µM	D3	4787,42	3,8	4,3

COLCHICINA		INT. MEDIA	CONTENIDO ADN (pg)	%CV
A = 25µM	A2	4123,01	3,22	4,38
	A5	4672,25	3,66	4,45
	A3	4163,52	3,26	4,6
B = 50µM	B2-A	5102,32	4	4,17
	B2-B	4329,64	3,39	4,34
	B3	3435,7	2,69	4,84
	B4	3640,62	2,85	4,67
	<b>*B5</b>	<b>16873,94</b>	<b>13,23</b>	<b>3,7</b>
	B6	3723,34	2,92	4,3
	B7-B	3702,12	2,9	4,6
	B7-A		0	
C = 100µM	C2-A		0	
	C2-B		0	
	C4	3453,53	2,71	4,29
	<b>*C6</b>	<b>14805</b>	<b>11,61</b>	<b>4,87</b>
D = 200µM	D4	3211,98	2,52	4,47

\* Individuos con el contenido de ADN aumentado

Seis de los clones regenerados a partir de los hipocótilos tratados con orizalina mostraron variación significativa en el contenido de ADN con respecto al control. El

contenido de ADN varió de 2.58 picogramos hasta 16.52 pg. Al comparar estos resultados con los obtenidos el conteo de cloroplastos en las células acompañantes del estoma, el estudio citométrico confirma 4 de los 8 clones sospechosos de ser tetraploides los clones: A5, C10-A, C4-A, D1-B. Para los clones B9-A, C4-B, C5-A, B4-B que los conteos de cloroplastos sugerían la posibilidad de ser poliploides, los datos citométricos descartan esta condición dado que el contenido de ADN en sus núcleos es muy cercano a la forma diploide inicial. Adicionalmente, se encontró que los clones C9-B1 y D1-A que no presentaron un conteo de cloroplastos alto que hiciera pensar en la posibilidad de que fueran poliploides, al realizar la citometría de flujo se encontraron elevados contenidos de ADN, Se realizó un nuevo conteo de cloroplastos, confirmando que en estos clones, la poliploidia detectada con la citometría, no estaba acompañada por variaciones en el número de cloroplastos en las células acompañantes de los estomas. Esto puede ocurrir, por un fenómeno conocido como mixoploidía, en donde se forma un tipo de quimerismo en la planta regenerada, con diferentes contenidos de ADN en sus órganos. Se ha establecido que si se llegan a presentar plantas mixoploides, el análisis de los cloroplastos presentes en los estomas puede llegar a ser un método poco confiable lo que hace necesario que esta metodología sea combinada con otras técnicas (Chen *et al.*, 2006 cit. en Ascough *et al.*, 2008) como en éste caso con la citometría de flujo.

Para los clones sospechosos de ser poliploides después del tratamiento con colchicina se detectaron 2 plántulas (C6 y B5) con contenido de ADN aumentado, e incremento en el número de los cloroplastos presentes en los estomas (6.74 y 6.52 cloroplastos respectivamente). Debido a la muerte del clon B7-A, que en el análisis estomático mostró un incremento significativo de los cloroplastos, no fue posible confirmar el estado poliploide por contenido de ADN en dicho clon.

La eficiencia en la inducción de poliploides, valorada en forma conjunta por número de estomas y citometría de flujo, muestran claramente que la orizalina es un inductor más eficiente que la colchicina.

## 4.6 Resumen

En la tabla 4.6 se presenta el resumen de la supervivencia de los clones regenerados de segmentos de hipocótilos de gulupa y el nivel de ploidía para los poliploides obtenidos con Colchicina y Orizalina.

**Tabla 4.6** Tasas de supervivencia por tratamientos y representatividad

TRATAMIENTO	# Hipocótilos sembrados	Clones regenerados	Clones triploides	Clones tetraploides	%
COLCHICINA	120	16	1	1	1,7
A	30	3	0	0	0,0
B	30	8	0	1	3,3
C	30	4	1	0	3,3
D	30	1	0	0	0,0
ORIZALINA	120	25	0	6	5,0
A	30	3	0	1	3,3
B	30	8	0	0	0,0
C	30	11	0	3	10,0
D	30	3	0	2	6,7

De los tratamientos llevados a cabo se puede establecer que orizalina fue menos tóxico que colchicina permitiendo la regeneración de 25 clones con 4 tetraploides y 2 mixoploides mientras que colchicina generó 16 clones con 1 tetraploide y 1 clon triploide.



## 5. Conclusiones y recomendaciones

Se estableció la mejor manera de activar de dormancia a los embriones de gulupa por medio del rescate del embrión limpio de la semilla, permitiendo de esta manera mantener en cultivo *in vitro* buena cantidad de material para el tratamiento con los agentes antimutógenos colchicina y orizalina.

La dosis letal 50 ( $DS_{50}$ ) permitió establecer las concentraciones a las que se trabajaron cada uno de los agentes antimutógenos ya que en las dosis trabajadas se lograron valores medios de afectación para la regeneración de los clones permitiendo producir y recuperar mutantes útiles para los análisis citológicos realizados.

Las técnicas citogenéticas en vegetales, son difíciles y por estar basadas en general en el aplastamiento de tejido de meristemo apical es frecuente que los cromosomas queden en varios niveles y sus conteos se deben efectuar manejando la profundidad de campo del microscopio. Por dificultad en la generación de raíces adecuadas para la determinación del número cromosómico en las plántulas post-tratamiento, esta técnica no fue de mucho apoyo en la determinación de las poliploidías que fueron confirmadas por los otros métodos.

La citometría de flujo y el estudio de cloroplastos en las células acompañantes del estoma, pudieron establecer que la orizalina es mucho más efectiva que la colchicina en la generación de tetraploides

El establecimiento del proceso de poliploidización permitió generar una línea clonal de los especímenes tetraploides que se espera lleguen a la fase de campo para su caracterización *ex vitro*.

La citometría de flujo mostro ser una herramienta indispensable para la confirmación de poliploidias, dado que por la variación somaclonal, se puede tener diferencias en el nivel de ploidía en diferentes tejidos que pueden ser subvalorados cuando se emplea solo una técnica.

## 6. Bibliografía

ADAMS K.L.; J.F, WENDEL. 2005. Polyploidy and Genome Evolution in Plants. *Plant Biology*. 8:135–141

ALAM M.; M REZAUL KARIM; M ABDUL AZIZ; M MONZUR HOSSAIN; BULBUL AHMED ABUL MANDAL. 2011. Induction and Evaluation of Polyploidy in Some Local Potato Varieties of Bangladesh. *J. Bio. & Env. Sci.* 1(2), 16-21.

ASCOUGH G. D.; J. VAN STADEN; J. E. ERWIN. 2008. Effectiveness of Colchicine and Oryzalin at Inducing Polyploidy in *Watsonia lepidota* N.E. Brown. *HortScience*. 43:2248-2251

AZCON-BIETO J.; M. TALON 1993. Fisiología y Bioquímica Vegetal. *McGraw Hill*, Madrid, p. 486.

BAIRU M. W.; A. O. AREMU; J. VAN STADEN. 2011. Somaclonal Variation in Plants: Causes and Detection Methods. *Plant Growth Regul.* 63:147–17.

BAKRIM A.; M. LAMHAMDI; F. SAYAH; F. CHIBI. 2007. Effects of Plant Hormones and 20-Hydroxyecdysone on Tomato (*Lycopersicum esculentum*) Seed Germination and Seedlings Growth. *Afr. J. Biotechnol.* Vol. 6 (24), pp. 2792-2802.

BENÍTEZ H.; C. HOYOS. 2009. Sintomatología Asociada a Bacteriosis en Zonas Productoras de Gulupa (*Passiflora edulis Sims.*) en Colombia. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas* - Vol. 3 - No.2 - pp. 275-279.

BIDDINGTON N.L. 1992. The Influence of Ethylene in Plant Tissue Culture. *Plant Growth Regul.* 11: 173-187.

BUTTERFASS T. 1995. Reproduction and Continuity of Chloroplasts in Spermatophyta. *Bot Rev* 61: 1-27

CARDI T.; D. CARPUTO; L. FRUSCIANTE. 1992. *In vitro* Shoot Regeneration And Chromosome Doubling In 2x And 3x Potato Clones. *Amer. Potato J.* 69 : 1-12.

CHATURVEDI H. C.; M. JAIN; N. P. KIDWAI. 2007. Cloning of Medicinal Plants Through Tissue Culture- A Review. *Indian J. Expt. Biol.* 45: 937-948.

CHIAPERO A.L.; M.L. LAS PEÑAS; M.T. A. GARCÍA; G. BERNARDELLO. 2013. Estudios Citogenéticos en Especies de *Passiflora* subgénero *Passiflora* (Passifloraceae). *Bol. Soc. Argent. Bot.* 48 (1): 103-110.

COHEN, D; J.L. YAO. 1996. *In vitro* Chromosome Doubling of Nine *Zantedeschia* Cultivars. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 47:43–49.

COMPTON M.E.; D.J. GRAY; G.W. ELMSTROM. 1996. Identification of Tetraploid Regenerants from Cotyledons Of Diploid Watermelon Cultured *In Vitro*. *Euphytica* 87: 165–172

Corporación Colombia Internacional (Eds). 2007. Precios Internacionales: Inteligencia de Mercados, No. 78. [www.cci.org.co/cci/cci\\_x/Sim/Precios](http://www.cci.org.co/cci/cci_x/Sim/Precios)

CROSLAND-TAYLOR P. 1953. A device for counting small particles suspended in a fluid through a tube. *Nature*, 171(4340), 37-38.

DERMEN H. 1940. Colchicine Polyploidy and Technique. *Botanical Review*. Vol. 6, No. 11 Nov., 1940, pp. 599-635

DEWITTE W.; J. MURRAY. 2003. The Plant Cell Cycle. *Annu Rev Plant Biol* 54:235–264

DOLEZEL J.; S. LUCRETTI; I. SCHUBERT. 1994. Plant Chromosome Analysis and Sorting by Flow Cytometry. *Crit. Rev. Plant Sci.* 13:275–309.

DOLEZEL J.; J. BARTOS; H. VOGLMAYR; J. GREILHUBER. 2003. Nuclear DNA Content and Genome Size of Trout and Human. *Cytometry A* 51, 127–128.

DOLEZEL J.; J. BARTOS. 2005. Plant DNA Flow Cytometry and Estimation of Nuclear Genome Size. *Annals of Botany* 95: 99–110.

ELEFThERIOU E.P.; E. BEKIARI. 2000. Ultrastructural Effects of the Herbicide Chlorpropham (CIPC) in Root Tip Cells of Wheat. *Plant Soil*. 226 pp. 11–19.

FONSECA-TRUJILLO N.; M.P. MÁRQUEZ-CARDONA; J.H. MORENO-OSORIO; W. TERÁN-PÉREZ; I. SCHULER-GARCÍA. 2009. Caracterización Molecular de Materiales Cultivados de Gulupa (*Passiflora edulis f. edulis*). *Universitas Scientiarum*, Vol. 14, Núm. 2-3, pp. 135-140

FRANCIS J. K., ed. 2009. Wildland Shrubs of the United States and its Territories: Thamnic Descriptions General Technical Report IITF-WB-1 U.S. Department of Agriculture, Forest Service International Institute of Tropical Forestry and Shrub Sciences Laboratory (recurso en línea).

GONZALEZ J.A; C. PASTENES; P. HORTON. 2001. Efecto de la Temperatura, el Estrés Hídrico y Luminoso Sobre la Heterogeneidad del FOTOSISTEMA II en Cuatro Variedades de Poroto (*Phaseolus vulgaris L.*). *Rev. chil. hist. nat.*, vol.74, n.4 pp. 779-791.

GRANT V. 1989. Especiación Vegetal. México, D.F., *Limusa*.

GREGORY T.R. Ed. 2005. The Evolution of the Genome. *Elsevier Academic Press, Inc.*, 768 pp.

GUERRA M. 1983. O uso da Giemsa na citogenética vegetal. *Cienc. Cult.* 35: 190-193.

GUPTA P. K. 1995. Cytogenetics. *Rastogi and Co., India*. 418 pg.

GUZZO F., S. CEOLDO, F. ANDRETTA, M. LEVI. 2004. *In vitro* Culture from Mature Seeds of *Passiflora* Species. *Scientia Agricola* 61 (1), 108-113.

HANSEN, K., L. GILBER, B. SIMPSON, A. CERVI, R. JANSEN Y S. DOWNIE. 2006. Phylogenetic Relationships and Chromosome Number Evolution in *Passiflora*. *Systematic Botany*, 31. 1:138–150

KARAGIANNIDOU T; E.P. ELEFThERIOU; I. TSEKOS; B. GALATIS; P. APOSTOLAKOS. 1995. Colchicine-induced paracrystals in root cells of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Annals of Botany*. 76:23-30.

KING L. A.; M. S. IRVINE. 2010. Investigation of *Passiflora* Hybrids Using Flow Cytometry. *Passiflora* , 20(1): pp. 5-11

LEITCH I J.; M.D. BENETT. 1997. Polyploidy in angiosperms. *Trends in Plant Science* 2: 470-476.

MAYEDA, L. Y. 1997. Estudo citogenético em dez taxons do gênero *Passiflora* L. (*Passifloraceae*). Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 89p.

MELO, N. F., M. GUERRA. 2003. Variability of the 5S and rDNA sites in *Passiflora* L. with species with distinct base chromosome numbers. *Ann. Bot.*, 92: 309-316p.

MIRANDA D. (Ed). 2009. Cultivo, Poscosecha y Comercialización de las *Passifloráceas* en Colombia: Maracuyá, Granadilla, Gulupa y Curuba. *Sociedad Colombiana de Ciencias Hortícolas*, Bogotá, 357 pp.

MOHAMED M.E.; R.G.T. HICKS; D. BLAKESLEY. 1996. Shoot Regeneration From Mature Endosperm of *Passiflora foetida*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, v.46, p.161-164.

MONTEIRO A.C.; G.T. NAKAZAWA; B.M. MENDES; A.P. RODRIGUEZ. 2000. *In vitro* Regeneration of *Passiflora suberosa* Leaf Disks. *Scientia Agricola*, v.57, p.571-573.

MURASHIGE T.; F. SKOOG. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant* 15:473–497.

OCAMPO J.; G. COPPENS; M. RESTREPO; A. JARVIS; M. SALAZAR; C. CAETANO. 2007. Diversity of Colombian Passifloraceae: biogeography and an updated list for conservation. *Biota Colombiana* 8: 1-45.

OLLITRAULT-SAMMARCELLI, F.; J. M. LEGAVE; N. MICHAUX-FERRIERE; A. M. HIRSH. 1994. Use of Flow Cytometry for Rapid Determination of Ploidy Level in the Genus *Actinidia*. *Scientia Horticulturae* 57: 303-313

ORMEROD, M. G. Ed. 2005. Flow Cytometry: A Practical Approach. *New York Oxford University Press*, p: 276.

PATERSON A; J.E. BOWERS; B. A. CHAPMAN. 2004. Ancient Polyploidization Predating Divergence of the Cereals, and Its Consequences for Comparative Genomics. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101:9903-9908.

PEDROSO M.C.; M.S. PAIS. 1995. Factors controlling somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*43:147±154.

PERERA M.F;M. G. GARCÍA; A. S. NOGUERA; M. SEPÚLVEDA.; M.P. FILIPPONE; A. P. CASTAGNARO. 2010. Evaluación de la Variación Somaclonal *in vitro* de Plantas de Caña de Azúcar Mediante Marcadores Moleculares. *Rev. ind. agric. Tucumán, Las Talitas*, v. 87, n. 2.

REGO M.M.; E.R. REGO; W.C. OTONI; C.H. BRUCKNER. (2009). Epigenetic Effects in Induced *in vitro* Tetraploids Passion Fruit (*Passiflora edulis Sims.*) *Acta Hort.* 829: 167-175.

REY H.; B. SANSBERRO; M. COLLAVINO; J. DAVINA; A. GONZALEZ, L. MROGINSKI. 2002. Colchicine, Trifluralin, and Oryzalin Promoted Development of Somatic Embryos in *Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae). *Euphytica* 123:49-56.

ROCA W.; L. MROGINSKI. 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura. CIAT. Cali Colombia. p. 969

RODRÍGUEZ N.; M. BUENO. 2006. Estudio de la Diversidad Citogenética de *Physalis peruviana* L. (Solanaceae). *Acta biol.Colomb.*, vol.11, no.2, p.75-85. ISSN 0120-548X.

RODRIGUEZ-COSTA J.; D. DE AGUSTIN. 1997. Punción Aspiración con Aguja Fina de Órganos Superficiales y Profundos. *Ediciones Diaz De Santos*.

SINGH R. J. 2003. Plant cytogenetics.--2nd ed. *CRC Press*.

SOUZA, M.M.; G. PALOMINO; T.N.S. PEREIRA; M.G. PEREIRA; A.P. VIANA. 2004. Flow Cytometric Analysis of Genome Size Variation in Some *Passiflora* Species. *Hereditas* 141: 31-38.

SOUZA M. M.; T. N. PEREIRA; V. SANTANA; M. L. CARNEIRO. 2008. Cytogenetic Studies in Some Species of *Passiflora* L. (Passifloraceae): A Review Emphasizing Brazilian Species. *Braz. arch. biol. technol.* vol.51, n.2. 247-258.

SQUEO F.A.; L. CARDEMIL, Eds. 2007. Fisiología Vegetal. Ediciones *Universidad de La Serena*, La Serena, Chile.

STEBBINS G.L. Jr. 1950. Variation and Evolution in Plants. *Columbia University Press*, New York.

STEBBINS G.L. Jr. 1971. Chromosomal Evolution in Higher Plants. *Addison- Wesley*, Reading, MA.

TALLEDO C.; C. ESCOBAR; V. ALLEMAN. 1993. Introducción al Análisis Cromosómico en Vegetales. *Universidad Ricardo Palma*, Lima, Perú. 141 p.

THOMPSON D.; N. ANDERSON; J. VAN STADEN. 2010. Colchicine-Induced Somatic Polyploids from *in vitro*-Germinated Seeds of South African *Watsonia* species. *HortScience*. vol. 45 no. 9 1398-1402

VALLADOLID A.; R. BIAS; R. GONZALES. 2004. Introducción al Recuento de Cromosomas Somáticos en Raíces Andinas. En: Raíces Andinas Contribuciones al Conocimiento y a la Capacitación. *Centro Internacional de la Papa* 6: 95-99p.

YOCKTENG R.; S. NADOT, 2004. Phylogenetic Relationships Among *Passiflora* Species Based on the Glutamine Synthetase Nuclear Gene Expressed in Chloroplast (npsGS). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 31: 379–396

ZHANG Q.; Y. YAN; G. L. LIANG. 2000. Callus Induction and Triploid Plant Regeneration from Endosperm of *Passiflora edulis*. *Journal of Southwest Agricultural University*, 2000-05.