

Evaluación de dos metodologías para la determinación del nivel de ploidía en plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) regeneradas por cultivo de anteras

Rosalía Velásquez S.^{1*}, Arnaldo Noguera A.², Isaac Blanca³ y Jonás Mata C.¹

¹Instituto de Genética, Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. Apdo. 4579. Maracay 2101. Aragua, Venezuela

²Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela

³Instituto de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar la eficacia de las técnicas de citometría de flujo y análisis citogenéticos en la determinación de los niveles de ploidía de plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) regeneradas a partir de las microsporas de anteras, empleando el contenido de ADN nuclear y el número de cromosomas de plantas verdes y albinas regeneradas. Se emplearon plantas haploides (x), dobles haploides (2x) y triploides (3x) de los cultivares 'Fonaiap 2000' y 'Blue Belle', con un contenido promedio de 0,47; 0,95 y 1,38 pg de ADN, respectivamente. El nivel de ploidía de las plantas regeneradas se corroboró a través de los análisis citogenéticos. No se encontró variación cromosómica entre las plantas verdes y albinas regeneradas, a pesar que se ha reportado que las plantas verdes tienden a poseer menor variación cromosómica. Las metodologías empleadas constituyeron un método rápido para la determinación de los niveles de ploidía de las plantas de arroz regeneradas. Los conocimientos acerca del contenido de ADN y número cromosómico de las plantas evaluadas proveen información relevante para los mejoradores y geneticistas interesados en emplear el cultivo de anteras en los programas de mejora del cultivo.

Palabras clave: citogenética, citometría de flujo, variación cromosómica.

Evaluation of two methodologies to determine ploidy levels in rice (*Oryza sativa* L.) plants regenerated by anther culture

ABSTRACT

The efficiency of flow cytometry and cytogenetic technique were evaluated to determine the ploidy levels in rice (*Oryza sativa* L.) plants regenerated from microspores-anther. The nuclear DNA content and chromosomal numbers of green and albino plants regenerated were used. Haploid (x), doubled-haploid (2x), and triploid (3x) plants from 'Fonaiap 2000' y 'Blue Belle' cultivars were used, containing an average 0.47, 0.95, and 1.38 pg of DNA, respectively. The ploidy level of regenerated plants were corroborated through cytogenetic analyses. In terms of cytogenetic stability, green plants had less chromosomal variation than albino plants; however, no chromosomal variation was found. The procedures are suitable for rapid determination of the ploidy levels of rice microspore-derived plants. The DNA content and chromosomes number of plants obtained provide useful information to plant breeders and geneticists interested in using anther culture in their breeding programs.

Key words: cytogenetics, flow cytometry, chromosomal variation.

*Autor de correspondencia: Rosalía Velásquez

E-mail: rvelasquezsalazar@gmail.com

INTRODUCCIÓN

El cultivo de anteras es una técnica *in vitro* por medio de la cual es posible producir líneas homocigotas a partir de poblaciones segregantes, mediante el doblamiento cromosómico del polen haploide y la regeneración de plantas (Lentini *et al.*, 1997).

La duplicación cromosómica de plantas androgénicas en cereales como el trigo, la cebada o el arroz, ocurre espontáneamente. Observaciones citológicas de las microsporas en esta etapa, permiten suponer dos formas mediante las cuales puede ocurrir la diploidización o poliploidización (Núñez *et al.*, 1989). Durante la primera, llamada fusión nuclear, el cultivo se inicia a partir de microsporas en estado uninucleado temprano a medio, donde no hay formación de membrana nuclear entre los núcleos en las primeras divisiones mitóticas, lo que hace posible la fusión de dos o más de ellos originándose así callos diploides o poliploides. Por su parte, cuando el proceso de cultivo se genera a partir de microsporas en estado uninucleado tardío, se fusionan los núcleos vegetativo y generativo originando un callo diploide. La segunda forma, llamada endoreduplicación, se produce al no separarse los cromosomas duplicados durante la mitosis de las células haploides, lo cual conduce a la formación de un solo núcleo con un número doble de cromosomas (López y Larkins, 1993).

Los variantes somaclonales o gametoclonales pueden ser detectados por presentar cambios morfológicos, anatómicos (plantas albinas), bioquímicos o cromosómicos. Para identificar estos últimos, los trabajos deben estar sustentados en caracterizaciones citogenéticas que permitan verificar verdaderos cambios en el número o la estructura cromosómica, y en consecuencia, en el grado de ploidía (Lares, 2004).

Entre las técnicas actualmente utilizadas para determinar el grado de ploidía destacan la citometría de flujo (CMF) y la citogenética. La CMF permite cuantificar los componentes celulares tales como ácidos nucleicos, lípidos, proteínas, polisacáridos, etc; mientras la citogenética se define como una rama de la genética a nivel celular, dedicada al estudio del número y la morfología de los cromosomas (Gailbraith *et al.*, 1983; Dolezel *et al.*, 1989; Farnham *et al.*, 1998).

La CMF utilizada para determinar el contenido de ADN de una muestra puede llevarse a cabo empleando colorantes que se combinan específica y estequiométricamente al ADN (Marie y Brown, 1993; Álvarez, 2000). Estos colorantes, denominados fluorocromos, son moléculas que se intercalan cuantitativamente entre pares de bases nitrogenadas de ácidos nucleicos, caracterizándose por absorber luz a una determinada longitud de onda y emitir a otra longitud diferente (Otto, 1990).

El objetivo de la presente investigación fue evaluar la eficacia de la citometría de flujo y el análisis citogenético con microscopía óptica en la determinación del nivel de ploidía de plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) regeneradas a partir del cultivo *in vitro* de anteras.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo en los Laboratorios de Cultivo de Tejidos y Citogenética, unidades adscritas al Centro de Investigaciones en Biotecnología Agrícola de la Facultad de Agronomía y el Instituto de Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad Central de Venezuela, respectivamente. Los estudios de citogenética y CMF se llevaron a cabo en el año 2006, contando con plantas de arroz (verdes y albinas) regeneradas *in vitro* por Noguera (2005) a partir del cultivo de anteras de los cultivares 'Fonaiap 2000' y 'Blue Belle', pertenecientes a los grupos Indica y Japónica, respectivamente.

Citometría de flujo

Se tomaron entre 20 y 50 mg de hojas correspondientes a tres plantas de cada cultivar, las cuales fueron cortadas finamente con una hojilla de bisturí y colocadas en una cápsula de Petri con 1 mL de buffer Otto I frío (Institute of Experimental Botany, 2004), para luego de 1 h proceder al filtrado de la solución a través de una malla de nylon de 60 μm de diámetro y centrifugadas a 1500 rpm durante 5 min. Luego se procedió a remover el sobrenadante, dejando 100 μL de líquido para proceder a la resuspensión del pellet por medio de agitación suave, seguida por la adición de buffer Otto I fresco e incubación a temperatura ambiente por 48 h. Transcurrido el tiempo de esta incubación preliminar, se adicionó 1 mL de buffer Otto II (Institute of Experimental Botany, 2004) y 50 μL de yoduro de propidio, incubando a temperatura ambiente durante 10-15 min. Se utilizó un citómetro de flujo marca Coulter (modelo Epics XL-MCL) que opera con luz visible, proporcionando la luz de excitación por medio de un láser de argón a una longitud de onda de 488 nm. A los fines del presente estudio, plántulas obtenidas a partir de semilla sexual fueron empleadas como estándares.

Las lecturas generadas por el citómetro de flujo fueron analizadas bajo el software MultyCycle® (2010), transformando los valores de intensidad de fluorescencia (IF) a picogramos (pg) de ADN con la fórmula reportada por el Institute of Experimental Botany (2004), para luego ser convertidos a millones de pares de bases (mpb) de acuerdo a la relación propuesta por Bennet y Smith (1976).

El valor de ADN reportado por Martínez *et al.* (2005) para plantas de arroz (grupos Indica y Japónica) fue utilizado como estándar para los cultivares en evaluación provenientes

tes de semilla, ya que se ha reportado el uso del contenido de ADN de núcleos aislados a partir de hojas jóvenes de la misma especie como estándar interno en la determinación del nivel de ploidía de plantas androgénicas de cebada (Vágera *et al.*, 2004)

Citogenética

Puntas de raíces de aproximadamente 2 cm de longitud tomadas de tres plantas androgénicas de cada cultivar, fueron tratadas con una solución de para-diclorobenceno por 3 h a temperatura ambiente, y posteriormente colocadas en una lámina de vidrio para ser teñidas con una solución de orceína acética al 1%. Las observaciones para comprobar que efectivamente había cromosomas fueron realizadas en un microscopio con aumento de 400X. Una vez realizado lo anterior, las láminas fueron sumergidas en etanol absoluto por 2 h a temperatura ambiente. La hidrólisis se realizó con una solución de ácido clorhídrico 0,2 N a 60°C por 1,5 min, seguido de tres lavados con agua destilada previo a la inmersión de las muestras de raíces en una solución de hidróxido de bario al 6,5% durante 7 min a temperatura ambiente, y posterior lavado con agua destilada estéril. El material así tratado se introdujo en una solución salina de citrato de sodio más cloruro de sodio a 60°C por 45 min y se tiñó con una solución de Giemsa 1% por 30 min. Las observaciones microscópicas se realizaron con un aumento de 400X, determinando el número de cromosomas por célula.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Citometría de flujo

En el Cuadro 1 se presenta el contenido de ADN obtenido a partir de una planta diploide control y de cada una de las plantas regeneradas, permitiendo la CMF determinar el nivel de ploidía de las plantas verdes y albinas regeneradas de los cultivares 'Fonaiap 2000' y 'Blue Belle'. Varios autores han reportado que la composición del medio de cultivo, bien sea por la fuente de reguladores de crecimiento o de carbono utilizado, o por algún efecto del nitrato de plata, está implicada en la regulación de los mecanismos de diploidización o poliploidización cromosómica (Ulrich *et al.*, 1988; Lentini *et al.*, 1995; Xie *et al.*, 1995).

Estos resultados permiten inferir, coincidiendo con Nuñez *et al.* (1989), que existen dos mecanismos para explicar la formación de plantas haploides, doble haploides y triploides de 'Fonaiap 2000' y 'Blue Belle', con base en el estado de desarrollo de las microsporas. Para las plantas doble haploide, se sugiere la fusión de los dos primeros núcleos formados luego de la mitosis I del núcleo de la microspora, es decir el vegetativo y el generativo, resultando una célula

Cuadro 1. Valores de ADN expresados como intensidad de fluorescencia (IF), nivel de ploidía y pares de base de plantas androgénicas y estándares de arroz.

Cultivar	Planta ¹	IF	ADN (pg) ²	Nivel de ploidía	mpb/C	Núcleos (N°)
'Fonaiap 2000'	PC	256	0,92	D	444	20 000
	P1	258	0,93	DH	449	20 000
	P2	253	0,91	DH	439	19 603
	P3	269	0,97	DH	468	20 000
	P4	385	1,38	TP	333	14 829
	P5	384	1,38	TP	333	12 942
	P6	256	0,92	DH	444	20 000
	P7	134	0,48	H	463	20 000
	P8	127	0,46	H	444	16 237
'Blue Belle'	A	299	1,08	DH	521	808
	PC	248	0,89	D	429	15 111
	P9	256	0,92	DH	444	20 000

¹PC: planta control, P: plantas analizadas (n: 1...9), A: albina, D: diploide, DH: doble haploide, H: haploide, TP: triploide

²pg: 965 mpb (Bennet y Smith, 1976)

³mpb/C: millones de pares de base/campo.

diploide; mientras que en el caso de callos triploides, además de la fusión nuclear, estaría operando un proceso de endoreduplicación que pudo haber ocurrido en uno de los dos núcleos participantes en la fusión. Consecuentemente, las plantas haploides son producto de la ausencia de los mecanismos de diploidización cromosómica o del estado uninnucleado temprano de algunas de las microsporas (López y Larkins, 1993; Farnham *et al.*, 1998).

Los contenidos de ADN nuclear de las plantas doble haploide regeneradas del cultivar 'Fonaiap 2000' están cercanos a los de su estándar diploide (0,92 pg), oscilando entre 0,91 y 1,08 pg de ADN por célula. En el caso de las plantas triploides, estas mostraron alrededor de 3 veces la cantidad de ADN (1,38 pg) encontrada en los haploides (0,46 y 0,48 pg de ADN), estos últimos con la mitad de ADN presente en la planta diploide o planta patrón. Estos resultados coinciden con los reportados por Martínez *et al.* (2005), quienes a través de CMF señalan diferencias significativas en el tamaño del genoma al evaluar el ADN nuclear de 10 especies de arroz, refiriendo adicionalmente diferencias significativas en el contenido de ADN de plantas haploides, doble haploides y tetraploides obtenidas a partir del cultivo de anteras de dicha especie.

En las Figuras 1, 2 y 3 se observan las tendencias de las curvas obtenidas por CMF, destacándose en ellas un pico G0/G1 (contenido de ADN 2C) bien definido, en el

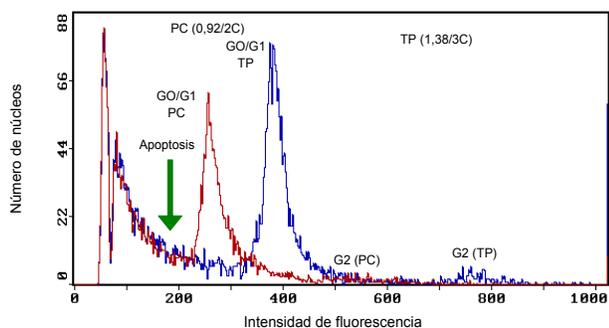


Figura 1. Histograma del contenido de ADN de una planta triploide (TP) y de un control diploide (PC) del cultivar 'Fonaiap 2000' (G0/G1: contenido de ADN 2C, G2: contenido de ADN posterior a la duplicación). PC: planta control.

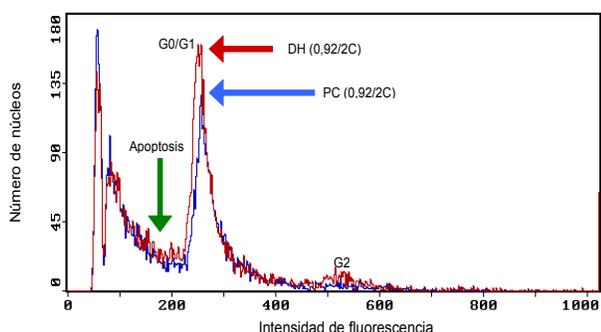


Figura 2. Histograma del contenido de ADN de una planta doble haploide (DH) y de un control diploide (PC) del cultivar 'Fonaiap 2000' (G0/G1: contenido de ADN 2C, G2: contenido de ADN posterior a la duplicación). PC: planta control.

que la cantidad de ADN para el diploide control y los doble haploide se corresponde con el nivel de ploidía ($2n$). Seguidamente, se encuentra la fase de síntesis de ADN (S) y luego la fase en la que el contenido de ADN se ha duplicado (G2), originando mayor intensidad de fluorescencia emitida. La intensidad de fluorescencia observada en G2 para la muestra control y la doble haploide fueron coincidentes, sin embargo, al comparar la intensidad de fluorescencia de la muestra control con las muestras triploides y haploides podemos observar una mayor intensidad de fluorescencia en la primera.

En todas las graficas se puede observar la región de apoptosis, mejor conocida como ruido de fondo, donde las células han perdido gran cantidad de ADN debido a un proceso de autodestrucción programada que se presenta como un mecanismo de control para evitar que células dañadas entren en la fase de síntesis, o que células inmaduras entren en mitosis (Borroto y Camps, 2007).

La cantidad estimada de pares de bases que tendrían las células de las plantas regeneradas en su complemento haploide, así como el número de núcleos analizados por

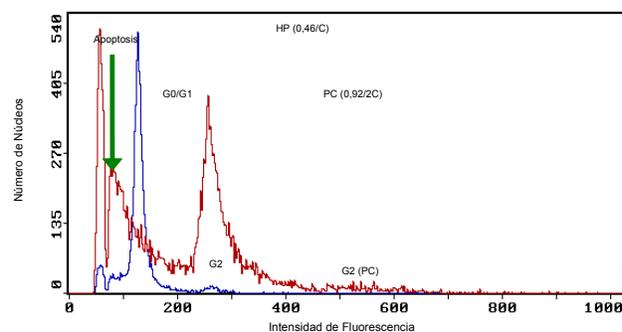


Figura 3. Histograma del contenido de ADN de una planta haploide (H) y de un control diploide (PC) del cultivar 'Fonaiap 2000' (G0/G1: contenido de ADN 2C, G2: contenido de ADN posterior a la duplicación). PC: planta control.

muestra, comprendidos éstos entre 800 y 20.000 núcleos. El caso más crítico se presentó en P9, donde a pesar de la poca cantidad de tejido empleado en la evaluación, la cantidad de núcleos fue superior a 800, lo que reafirma el alto grado de confiabilidad de los resultados en cuanto al índice de fluorescencia observado.

Citogenética

Los resultados arrojados permitieron comprobar el nivel de ploidía obtenido por CMF de una planta androgénica haploide de 'Fonaiap 2000', en la que se cuantificaron 12 cromosomas (Figura 4), es decir, el número de cromosomas que existe en las células sexuales del arroz.

En los estudios citogenéticos de las plantas albinas no se observó ninguna alteración estructural de los cromosomas. Sin embargo, varios autores reportan que el albinismo en cereales está, entre otros factores, asociado a delección estructural del genoma de los plastidios como ocurre frecuentemente en arroz, cebada y trigo (Jähne y Lörz, 1995; Ohmido y

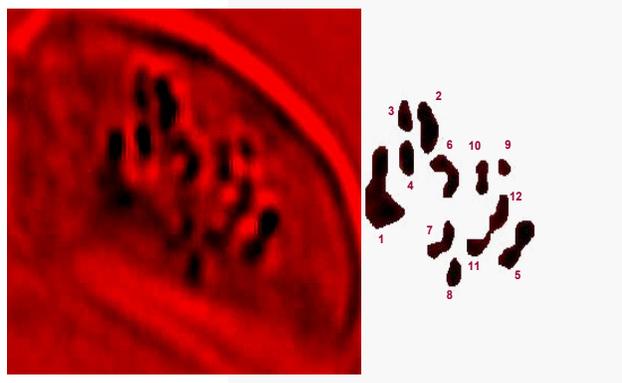


Figura 4. Cromosomas de una planta haploide del cultivar 'Fonaiap 2000' (400x).

Cuadro 2. Comparaciones morfológicas y nivel de ploidía entre plantas androgénicas del cultivar 'Fonaiap 2000' y obtenidas por semilla sexual (PC).

Planta (Nº)	Cromosomas (Nº)	ADN (pg)	Tipo de planta	Tamaño de planta	Macollos (Nº)	Apariencia de la panícula	Nivel de ploidía
PC	24	0,92 ^E	Fértil	Estándar	10 ^F	Normal ^C	D
P1	24	0,91 ^E	Fértil ^C	Estándar ^C	8 ^C	Normal ^C	DH
P7	12	0,46 ^E	Estéril ^C	Pequeña ^C	3 ^C	Pequeña y vana ^C	H

PC: control diploide de 'Fonaiap 2000', C: características determinadas en campo, E: valores determinados experimentalmente, P: Número de la planta analizada y F: información derivada de Ortiz (1999).

Fukui, 1995), aunque el tamaño y la localización de la deleción puede diferir entre un mismo grupo de plantas androgénicas (Harada *et al.*, 1991).

Asimismo, al realizar las comparaciones morfológicas (Cuadro 2) entre plantas haploides, doble haploides, las regeneradas por semilla (diploides) y sus correspondientes niveles de ploidía, se encontró que no existen diferencias fenotípicas entre la planta diploide y la doble haploide. Por el contrario, la planta haploide resultó ser estéril y de menor tamaño, coincidiendo estos resultados con los obtenidos por otros autores trabajando con genotipos de arroz del grupo japónica (Lentini *et al.*, 1997).

CONCLUSIONES

El presente estudio demuestra la eficacia de la citometría de flujo y la citogenética como estrategias para determinar el nivel de ploidía de plantas regeneradas mediante el cultivo de anteras. Las plantas dobles haploides obtenidas por cultivo de anteras del cultivar 'Fonaiap 2000' no se diferenciaron morfológicamente de los diploides obtenidos por semillas, aunque la planta haploide resultó ser estéril y de menor tamaño.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Álvarez, R. 2000. Aspectos morfológicos, fisiológicos y bioquímicos de un fenotipo celular alargado de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv Bright yellow-1). Trabajo de Ascenso. Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. Maracay. 191 p.
- Bennet, M.D.; J.B. Smith. 1976. Nuclear ADN amounts in angiosperms. Phil. Trans. R. Soc. London (Ser. B). 274: 227-274.
- Borroto, M.; E. Camps. 2007. Apoptosis: muerte celular programada. Revista Ciencias. Disponible en: <http://www.revistaciencias.com/publicaciones/EEIEyAuuEyYIRnTdQq.php> [Consultado: 23 Noviembre 2008].
- Dolezel, J.; P. Binarova; S. Lucretti. 1989. Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. Biol. Plant 31: 113-120.
- Farnham, M.W.; E.J. Caniglia; C. Thomas. 1998. Efficient ploidy determination of anther-derived broccoli. Hort. Sci. 33: 323-327.
- Gailbraith, D.W.; K. Harkins; J. Maddox; N. Ayres; D. Sharma; E. Firoozabadi. 1983. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. Science 220: 1049-1051.
- Harada, T.; T. Sato; D. Asaka; I. Matsukawa. 1991. Large-scale deletions of rice plastid DNA in anther culture. Theor. Appl. Genet. 81:157-161.
- Institute of Experimental Botany. 2004. Laboratory of Molecular Cytogenetics and Cytometric. Disponible en: <http://www.lmcc.ieb.cz/plant-dna-cytometry-standards>. [Consultado: 10 Diciembre 2008]
- Jähne, A.; H. Lörz. 1995. Cereal microspore culture. Plant Sci. 109:1-12.
- Lares, N.T. 2004. Identificación morfológica, citogenética y bioquímica de variantes somaclonales en plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) de las subespecies Índica y Japónica. Trabajo de grado. Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. Maracay. 191 p.
- Lentini, Z.; P. Reyes; C. Martínez; W. Roca. 1995. Androgenesis of highly recalcitrant rice genotypes with maltose and silver nitrate. Plant Sci. 110:127-138.
- Lentini, Z.; C. Martínez; W. Roca. 1997. Cultivo de Anteras de Arroz en el Desarrollo de Germoplasma. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. 57 p.
- López, M.A.; B.A. Larkins. 1993. Endosperm origin, development and function. Plant Cell 5: 1383-1399.
- Marie, D.; S.C. Brown. 1993. A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. Biol. Cell 78: 41-51.
- Martínez, C.; K. Arumuganathan; H. Kikuchi; E. Earle. 2005. Estimation of nuclear DNA content in *Oryza* by flow cytometry. Rice Gen. Newsletter 10: 116-119.
- MultyCicle, 2010. MultyCicle, DNA analysis software. Flor & Image Cytometry Reagents & Software. Phoenix Flow Systems.
- Noguera, A. 2005. Cultivo de anteras de arroz (*Oryza sativa* L.) en cuatro cultivares del grupo indica y japónica. Trabajo de grado.

- Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. Maracay. 120 p.
- Núñez, V.M.; W. Roca; C. Martínez. 1989. El Cultivo de Anteras en el Mejoramiento del Arroz. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. 57 p.
- Ohmido, N.; K. Fukui. 1995. Cytological studies of African cultivated rice, *Oryza glaberrima*. *Theor. Appl. Genet.* 91:212-217.
- Ortiz, A. 1999. Guía teórica para el manejo agronómico del arroz (*Oryza sativa* L.). Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. Maracay. 36p.
- Otto, F. 1990. DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. *In: Crissman, H.A.; Z. Darzynkiewicz (Eds.). Methods in Cell Biology.* Academic Press, New York. EUA. pp. 105-110.
- Ulrich, I.; B. Fritz; W. Ulrich. 1988. Application of DNA fluorochromes for flow cytometric DNA analysis of plant protoplasts. *Plant Sci.* 55:108-117.
- Vágera, J.; J. Novotný; L. Ohnoutrová. 2004. Induced androgenesis *in vitro* in mutated populations of barley, *Hordeum vulgare*. *Plant Cell. Tiss. Organ Cult.* 77: 55-61.
- Xie, J.; M. Gao; Q. Cai; X. Cheng; Y. Shen; Z. Liang. 1995. Improved isolated microspore culture efficiency in medium with maltose and optimized growth regulator combination in japonica rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell. Tiss. Organ Cult.* 42:245-250.